

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE XANTANA
PRODUZIDA POR *Xanthomonas arboricola* pv pruni**

Amanda Ávila Rodrigues

Pelotas, 2010

AMANDA ÁVILA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE XANTANA
PRODUZIDA POR *Xanthomonas arboricola* pv pruni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Microbiologia Aplicada - Industrial e de Fermentações).

Orientadora: Prof^a Dr^a Claire Tondo Vendruscolo

Co-Orientadoras: Prof^a Dr^a Angelita da Silveira Moreira
Prof^a Dr^a Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaggetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R696a Rodrigues, Amanda Ávila
 Avaliação da genotoxicidade e caracterização de
 xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni /
 Amanda Ávila Rodrigues. – 64f. : il. – Dissertação (Mestrado).
 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade
 Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico.
 Pelotas, 2010. – Orientador Claire Tondo Vendruscolo; co-
 orientador Angelita da Silveira Moreira e Heloísa Helena
 Rodrigues de Andrade.

 1.Biotecnologia. 2.Microbiologia aplicada. 3.Xantana.
 4.*Xanthomonas arboricola* pv pruni. 5.Genotoxicidade.
 6.SMART. I.Vendruscolo, Claire Tondo. II.Moreira, Angelita da
 Silveira. III.Andrade, Heloísa Helena Rodrigues de. IV.Título.

CDD: 576.162

Banca examinadora:

Profª Drª Claire Tondo Vendruscolo (UFPel) – Presidente da Banca

Profª Drª Angelita da Silveira Moreira (UFPel)

Profª Drª Heloísa Helena Rodrigues de Andrade (UFRGS)

Prof Dr Rafael Rodrigues Dihl (ULBRA – Canoas)

*Dedico, com amor,
aos meus pais.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade e o aprendizado proporcionados.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa no Laboratório Toxigen.

Ao Mateus, essencial por todo amor, companheirismo, confiança e dedicação.

À minha família: mãe, pai, irmãs, sobrinha e cunhado, pelo carinho, paciência, dedicação, confiança. Meus incentivadores, indispensáveis na minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Claire Tondo Vendruscolo pela oportunidade, confiança, amizade e pelos ensinamentos durante esta orientação.

À Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira pelos ensinamentos e apoio na realização desta dissertação e pela disponibilidade e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade por acreditar no meu potencial, por disponibilizar seu laboratório e dedicar seu tempo nesta co-orientação.

Aos amigos do Laboratório de Biopolímeros: Andiará, Andrey, Bete, Carla, Cíntia Dóris, Fernanda, Fernando, Greici, Isabel, Joyce, Karine, Leidi, Lizandra, Lucas, Luiza, Matheus, Paula, Roger, Simara e Virgínia, pelo apoio nos experimentos e na rotina do laboratório, pelos momentos de alegria e descontração e pela amizade.

À equipe do Laboratório Toxigen: principalmente aos bolsistas de iniciação científica, à Paula, à Laura ao Rafael e ao Maurício pelo apoio fundamental nos experimentos e pela amizade no período em que estive na ULBRA.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo auxílio prestado.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“Se não fores estrada, sê vereda.
Se não podes ser sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que se vence
sê o melhor daquilo que for”*

Douglas Malloch

Resumo

RODRIGUES, Amanda Áila. **Avaliação da genotoxicidade e caracterização de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni**. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A goma xantana é um dos mais importantes hidrocolóides comerciais. Ela é um exoheteropolissacarídeo produzido por fermentação aeróbia de bactérias do gênero *Xanthomonas*. É amplamente utilizada em indústrias alimentícias e não-alimentícias como espessante, estabilizante, agente suspensivo, emulsificante, entre outros, sendo especialmente atrativa devido às suas propriedades reológicas singulares. Este estudo foi realizado com o objetivo de contribuir para a determinação da seguridade da goma xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni e para a possibilidade de aplicação dos polímeros das cepas 101 e 106 em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Para analisar a possibilidade de a goma xantana induzir mutação genética, aberração cromossômica e recombinação somática foi utilizado o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Foram analisadas soluções aquosas de xantana das cepas 101 e 106 nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2% (m/v)s. Os biopolímeros produzidos pelo patovar pruni foram caracterizados como incapazes de provocar mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* por ação direta e indireta. Análises químicas e físicas foram realizadas para caracterizar a representatividade das xantanas estudadas em relação ao patovar pruni e determinar a qualidade e aplicabilidade destes polímeros. Foram determinados o rendimento, a presença de açúcares e ácidos derivados – glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico, e o conteúdo de umidade, cinzas, nitrogênio, acetil, piruvato, sódio, potássio, magnésio, cálcio e viscosidade de solução aquosa. Os resultados foram comparados com dados da literatura sobre os limites determinados para xantana comercial e valores de xantanas produzidas por outras cepas do patovar pruni e corresponderam aos padrões exigidos para comercialização e foram similares aos verificados para xantanas produzidas por outras cepas deste patovar. Os polímeros analisados têm, portanto, qualidade adequada à aplicação em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos.

Palavras-chave: Xantana. *X. arboricola* pv pruni. Seguridade. Genotoxicidade. SMART.

Abstract

RODRIGUES, Amanda Ávila. **Assessment of genotoxicity and characterization of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni***. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Xanthan gum is one of the most important commercial hydrocolloids. It is an exoheteropolysaccharide produced by aerobic fermentation of bacteria of the genus *Xanthomonas*. It is widely used in food and non-food industries as a thickener, stabilizer, suspending agent, emulsifier among others; xanthan is particularly attractive due to their unique rheological properties. We aimed with this study contribute with the determination of the security of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* and to the possibility of application of the polymers produced by strains 101 and 106 in foods, pharmaceuticals and cosmetics. To asses the possibility of the xanthan gum to induce point and/or chromosome mutation and somatic recombination was used the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Aqueous solutions of xanthans produced by strains 101 and 106 at 0.25; 0.5; 1; 1.5; 2% (w/v) were analyzed. The xanthans produced by pathovar *pruni* were characterized as unable to cause mutation and recombination in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by direct and indirect action. Chemical and physical analysis were performed to characterize the representativeness of xanthans studied in relation to the pathovar *pruni* and determine the quality and applicability of these polymers. Were determined the xanthan yield and the presence of monosaccharides and acid derivatives - glucose, mannose, rhamnose and glucuronic acid, and contents of moisture, ash, nitrogen, acetyl, pyruvate, sodium, potassium, magnesium, calcium and viscosity of aqueous solutions. The results were compared against concerning literature data about the limits of legislation for commercial xanthan and the values for xanthans produced by other strains of the pathovar *pruni*. The values were in accordance to the standards required for commercial xanthan and were similar to those observed for xanthans produced by other strains of this pathovar. Therefore the analyzed polymers have suitable quality for application in foods, pharmaceuticals and cosmetics.

Keywords: Xanthan gum. *X. arboricola* pv *pruni*. Safety. Genotoxicity. SMART.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da xantana produzida por <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	18
Figura 2	Micrografias dos tipos de tricomas observados nas superfícies dorsal e ventral das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> no SMART	25
Figura 3	Tipos de manchas observadas nas superfícies dorsal e ventral das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> no SMART	27

Assessment of genotoxicity by *Drosophila* wing-spot test and chemical and physical characterization of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*

Figura 1	Comparative thin-layer chromatography of xanthans produced by strains 101 and 106. Standards: S ₁ glucuronic acid (GA), mannose (M); S ₂ glucose (G), rhamnose (R). Eluted with trichloromethane:methanol:acetic acid:water (40:40:10:10 v/v/v/v) on TLC aluminum sheets silica gel 60 F ₂₅₄ (Merck®) and visualized with sulfuric-anisaldehyde reagent	40
Figura 2	Viscosity (mPa s) of 1 % (w/v) aqueous solutions of xanthans produced by strains 101 and 106, measured in a viscometer with spindle L3 at 24 °C during 30 s in 10, 30, 60 or 100 rpm	41

LISTA DE TABELAS

Assessment of genotoxicity by *Drosophila* wing-spot test and chemical and physical characterization of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*

Tabela 1	Moisture, ash and nitrogen content (% w/w) of xanthans produced by strains 101 and 106	38
Tabela 2	Acetyl and pyruvate content (% w/w) of xanthans produced by strains 101 and 106	39
Tabela 3	Sodium, potassium, calcium and magnesium content (% w/w) of xanthans produced by strains 101 and 106	40
Tabela 4	Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing-spot test (SMART) in the ST cross after chronic treatment of larvae with xanthan aqueous solutions	44
Tabela 5	Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing-spot test (SMART) in the HB cross after chronic treatment of larvae with xanthan aqueous solutions	45

LISTA DE ABREVIATURAS

CAS – Chemical Abstracts Services	<i>mwh</i> – multiple wing hair
CDTec – Centro de Desenvolvimento Tecnológico	pv – patovar
CPCAT – Embrapa Clima Temperado	R – ramnose
DCB – Denominações Comuns Brasileiras	R _f – fator de retenção
DNA – ácido desoxirribonucléico	S ₁ – padrões ácido glicurônico e manose
EMS - etilmetanosulfonato	S ₂ – padrões glicose e ramnose
<i>flr</i> ³ – flare	SD – desvio padrão
G – glicose	SMART – Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática
GA – ácido glicurônico	SPA – meio sacarose:peptona:água
HB – cruzamento aprimorado	ST – cruzamento padrão
INS – Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares	TLC – Cromatografia de Camada Delgada
LD – limite de detecção	ULBRA – Universidade Luterana do Brasil
M – manose	UFPEL – Universidade Federal de Pelotas
mPa s – milipascal por segundo	UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>pruni</i>	15
2.2 Xantana.....	16
2.2.1 Histórico.....	16
2.2.2 Composição química.....	18
2.2.3 Produção.....	19
2.2.4 Propriedades e aplicações.....	21
2.2.4.1 Xantana na indústria alimentícia.....	22
2.2.4.2 Xantana nas indústrias farmacêutica e cosmética.....	23
2.3 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i>	24
ARTIGO: Assessment of genotoxicity by <i>Drosophila</i> wing-spot test and chemical and physical characterization of xanthan gum produced by <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>pruni</i>	30
1 Introduction.....	31
2 Material and methods.....	33
3 Results and discussion.....	37
4 Conclusions.....	46
5 Conflict of interest statement.....	46
6 Acknowledgements.....	46
7 References.....	46
CONCLUSÕES GERAIS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

No último século, a expansão demográfica do planeta, que superou os 6,7 bilhões de habitantes em 2009 enquanto que em 1900 éramos 1,5 bilhões (PRB, 2009), aliada à modernidade e à globalização, tem impulsionado o forte desenvolvimento de tecnologias capazes de satisfazer os desejos e as necessidades dos consumidores. Com a atribulada rotina da vida moderna, a população tem sido acometida por graves problemas de saúde, como o câncer, que é uma das principais causas de óbito no mundo (INCA, 2009). Na tentativa de prevenir possíveis riscos à saúde, muitos consumidores tornaram-se bastante exigentes na busca por alimentos saudáveis. Com a necessidade de ocupação dos territórios pela numerosa população, fica cada vez mais reduzida a disponibilidade de terras para produção de suprimentos. Para atender a demanda dos mais de 6,7 bilhões de habitantes, a biotecnologia mostra-se uma ferramenta atual, rápida e eficiente para o desenvolvimento de novos produtos seguros para indústria alimentícia e farmacêutica.

Através de processos fermentativos é possível produzir inúmeros compostos, dentre estes a xantana, que é considerada um dos principais aditivos alimentares comercializados atualmente. A xantana é um heteropolissacarídeo extracelular, sintetizado por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* através de fermentação aeróbia de açúcares como sacarose ou glicose. A molécula da goma xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* é composta por uma cadeia principal formada por unidades de glicose, e por cadeias laterais, que contém unidades alternadas de manose onde se ligam grupos acetil e piruvato, e ácido glicurônico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LILLY; WILSON; LEARCH, 1958). Porém a estrutura e a qualidade da xantana, como as propriedades reológicas, podem variar em função da cepa, do meio de cultivo e das condições operacionais empregadas durante todas as etapas do processo fermentativo, fazendo-se

necessário um processo de controle de qualidade antes da comercialização, no qual são realizadas análises químicas e físicas para determinação dos monossacarídeos constituintes, do teor de cinzas, nitrogênio, umidade, acetil, piruvato, metais pesados, resíduos de solvente e viscosidade de soluções aquosas (BORN; LANGENDORF; BOULENGUER, 2002; BURDOCK, 1997; CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987).

A estabilidade frente a diversas condições de temperatura, pH e concentração iônica, e a capacidade de formar soluções altamente viscosas mesmo em baixas concentrações de polímero renderam à goma xantana ampla aplicabilidade em diversos setores industriais, principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e petrolífera, onde é utilizada como espessante, estabilizante, agente emulsificante e suspensivo (COTTRELL; KANG, 1978; KATZBAUER, 1998; PARFITT, 1999; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Apesar da ampla utilização e possibilidade de aplicação, poucos são os países que detêm a tecnologia e a capacidade de produção desta goma. Atualmente, toda a xantana utilizada no mercado brasileiro é importada e produzida pelo microrganismo *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. No entanto, a produção de xantana no Brasil tende a ser economicamente viável, uma vez que os principais insumos para tal processo são glicose ou sacarose como nutriente e etanol como solvente para recuperação do polímero. Com esta visão, pesquisadores brasileiros do Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal de Pelotas estudam a produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e a sua caracterização, tendo obtido resultados, quanto à qualidade química e física da goma, semelhantes aos da xantana comercial (BORGES, 2007; DIAZ, 2002; KLAIC, 2010; MOREIRA, 2002; PINTO, 2005; PREICHARDT, 2009; RODRIGUES, 2006; ROLL, 2005; TEIXEIRA, 2005; VENDRUSCOLO et al., 2000). Porém, um fator limitante para a utilização do polímero produzido por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* como substituto àqueles que já se encontram no mercado é o escasso conhecimento sobre o seu potencial genotóxico. Apesar de o polímero ser constituído essencialmente por moléculas de açúcares e ácidos orgânicos, existe a possibilidade de que as variações no processo de fermentação resultem em compostos com potencial genotóxico.

Segundo Roll (2005) as xantanas produzidas por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* cepas 06 e 24 não induziram mutações gênicas ou cromossômicas significativas em amostras de sangue e de medula óssea de roedores quando analisadas através dos

testes cometa e micronúcleo, respectivamente, e a aplicação destas gomas em alimentos pode ser viável. Adicionalmente a estes eventos genéticos analisados por Roll (2005), outro importante evento que deve ser investigado na genética toxicológica, e que é considerado fator preponderante na carcinogênese, é a recombinação mitótica (ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004).

Um teste capaz de detectar de maneira simultânea mutações gênicas e cromossômicas e recombinação mitótica é o SMART – Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* – que se caracteriza por ser um ensaio de curta duração, que utiliza como modelo experimental um organismo eucarioto com tempo de geração rápido, popularmente conhecido como “mosca da fruta”, que possibilita um grande número amostral e a alta reprodutibilidade dos resultados. O SMART baseia-se na identificação de tricomas nas asas de *D. melanogaster* que apresentem fenótipos mutantes, sendo que esses representam a expressão fenotípica de dois marcadores, *mwh* e *flr*³, devido a ocorrência de lesões em nível de DNA, causadas pelo composto em estudo, durante a proliferação mitótica de grupos de células das larvas que dão origem às asas das moscas adultas (ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004; GRAF et al., 1984).

Portanto, através deste trabalho, objetivou-se contribuir para a determinação da seguridade da goma xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e para a caracterização dos polímeros das cepas 101 e 106, visando determinar a possibilidade de aplicação destes polímeros em alimentos, produtos fármacos e cosméticos. Estas cepas foram escolhidas para o estudo, com base em trabalhos prévios (BORGES, 2007; KLAIC, 2010), por apresentarem expressivo rendimento de xantana com elevada capacidade viscosificante. O teste SMART foi utilizado para avaliar o potencial genotóxico. Análises químicas e físicas foram realizadas para caracterizar a representatividade das xantanas estudadas em relação ao patovar *pruni* e determinar a qualidade e aplicabilidade destes polímeros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*

Bactérias do gênero *Xanthomonas* (do grego *xanthos* = amarelo; *monas* = unidade) pertencem à família *Xanthomonadaceae* e perfazem um total de 20 espécies. Entre estas, encontra-se a *Xanthomonas arboricola*, que anteriormente à reclassificação deste gênero, proposta em 1995 (VAUTERIN et al., 1995), era denominada *Xanthomonas campestris*. Pertencem a esta espécie cinco patovares: *celebensis*, *corylina*, *juglandis*, *populi* e *pruni* (SADDLER; BRADBURY, 2005).

X. arboricola pv *pruni* são bacilos curtos e delgados, com 0,4 - 0,6 x 0,8 - 0,9µm, Gram negativos, predominantemente isolados, não esporogênicos e que possuem um flagelo polar que lhes confere motilidade. São aeróbios estritos, quimiorganotróficos, catalase positivos, oxidase negativos e não redutores de nitrato, não acumuladores de inclusões de polihidroxibutirato. Temperaturas entre 25 e 30°C favorecem o crescimento de colônias lisas, circulares, convexas, mucóides e amarelas; tal coloração se dá devido à característica produção de xantomonadina, que é um pigmento insolúvel em água do tipo aril-polieno brominado (BRADBURY, 1984; SADDLER; BRADBURY, 2005).

As espécies do gênero *Xanthomonas* são fitopatogênicas e infectam cerca de 250 gêneros de monocotiledôneas e dicotiledôneas. O patovar *pruni* causa mancha bacteriana (*Prunus* Bacterial Spot - PBS) em várias cultivares de espécies do gênero *Prunus*, como *P. armeniaca* (damasco), *P. avium* (cereja), *P. amygdalus* (amêndoa), *P. persica* (pêssego), *P. domestica* (ameixa europeia), entre outras, especialmente em regiões quentes e úmidas onde o clima é um agravante dessa doença (BRADBURY, 1984; CIVEROLO; HATTINGH, 1993; HAYWARD, 1993).

Relacionada à ação fitopatogênica das bactérias do gênero *Xanthomonas* está a capacidade destas de produzirem um exopolissacarídeo denominado goma

xantana, que no ambiente natural, está envolvida com a sobrevivência do microrganismo na superfície das plantas hospedeiras por torná-lo mais resistente aos altos níveis de raios ultravioleta e à elevada temperatura (HAYWARD, 1993; RUDOLPH, 1993).

Devido aos danos causados nos cultivos das diversas espécies vegetais hospedeiras e a capacidade de produção da goma xantana, biopolímero de ampla aplicação industrial, o gênero *Xanthomonas* é de interesse econômico e objeto de numerosos estudos.

A goma xantana é produzida habitualmente por *X. campestris patovar campestris* (JEANES, 1974). Porém este não é um fator limitante para realização de estudos relacionados com a produção de xantana por diferentes espécies, patovares e linhagens, dos quais já se sabe que a qualidade do polímero pode variar em função do microrganismo, do substrato e das condições empregadas durante cada etapa do processo (LILLY; WILSON; LEACH, 1958; MOCHI; SCAMPARINI, 1994; MOREIRA et al., 2001; ROTTAVA et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 1997).

O isolamento e a identificação de mais de uma centena de linhagens de *Xanthomonas arboricola pv pruni*, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Clima Temperado (Embrapa – CPCAT), no estado do Rio Grande do Sul, tem possibilitado ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Biopolímeros do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas, há mais de uma década, o desenvolvimento de estudos voltados à produção, caracterização, modificação química e aplicação de goma xantana sintetizada pelo patovar pruni (ANTUNES et al., 2003; BORGES, 2004, 2007; BORGES et al., 2008; DIAZ, 2002; KLAIC, 2010; MAYER et al., 2008; MOREIRA, 2002; MOREIRA et al., 2001; PEREIRA, 2009; PINTO, 2005; PREICHARDT, 2009; RODRIGUES, 2006; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; TEIXEIRA, 2005; VENDRUSCOLO et al., 2000).

2.2 Xantana

2.2.1 Histórico

A xantana foi descoberta no final da década de 50 por pesquisadores do Northern Regional Research Laboratory (NRRL), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, que objetivavam identificar microrganismos capazes de

sintetizar biopolímeros hidrossolúveis de interesse comercial. A goma xantana, também denominada polissacarídeo B-1459 e industrialmente produzida por *Xanthomonas campestris pv campestris* NRRL B-1459 e cepas derivadas, tem sido, desde então, até os dias de hoje, objeto de inúmeros estudos devido as suas propriedades espessante e estabilizante de interesse comercial (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND, 1993).

A empresa norte-americana Kelco iniciou em 1960 a produção industrial de xantana e em 1964 foi iniciada a comercialização do polissacarídeo para aplicação em produtos não alimentícios, sob o nome Kelzan[®]. Estudos complementares indicaram que a goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris pv campestris* NRRL B-1459 é inócua para o consumo e em 1969 o Food and Drug Administration (FDA) regulamentou seu uso na indústria alimentícia como estabilizante, emulsificante e espessante; neste mesmo ano a Kelco passou a comercializar a Keltrol[®], xantana comercial de grau alimentício (COTTRELL; KANG, 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; HARDING; CLEARY; IELPI, 1994; ROCKS, 1971;).

No Brasil, a utilização de xantana como aditivo alimentar é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, referente às normas regulatórias do emprego de aditivos para alimentos (BRASIL, 1965).

A xantana é o mais importante biopolímero microbiano sob o ponto de vista comercial; foi o segundo produzido industrialmente e o primeiro amplamente utilizado na indústria de alimentos (MAUGERI FILHO, 2001; MORRIS, 1992). Na última década, destacaram-se expressivamente na produção industrial de xantana as empresas Merck, Pfizer e Gargill (Estados Unidos), Rhône Poulenc e Sanofi-Elf (França), Danisco (Dinamarca) e Jungbunzlauer (Austria). O mercado atual de xantana gera anualmente aproximados US\$ 270 milhões oriundos de uma comercialização de 40.000t/ano; estima-se que a produção de xantana tenha um crescimento anual de 5-10% podendo totalizar US\$ 400 milhões e 80.000t/ano em 2015; sendo que o volume total de xantana tem aplicação assim dividida: 65% para indústria alimentícia, 15% para indústria petrolífera e aproximados 20% em setores diversos (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

2.2.2 Composição química

A goma xantana é um heteropolissacarídeo aniônico, extracelular, com elevada massa molar de 2×10^6 a 20×10^6 Da (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A estrutura primária da xantana produzida por *X. campestris pv campestris* é constituída de repetidas unidades pentassacarídicas. Geralmente é composta por uma cadeia principal celulósica de moléculas de D-glicose unidas por ligações do tipo β (1-4) e uma cadeia lateral trissacarídica, ligada alternadamente à posição 3 dos resíduos de glicose da cadeia principal, composta por duas moléculas de D-manose intercaladas por uma molécula de ácido D-glicurônico; a manose interna é acetilada e, aproximadamente, a metade das moléculas de manose terminal (externa) contém resíduos de ácido pirúvico (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; SLONECKER; JEANES, 1962). Um segundo grupo acetil ainda pode se ligar a algumas moléculas de manose terminal (STANKOWSKI; MUELLER; ZELLER, 1993). A estrutura molecular da goma xantana está representada na Fig. 1.

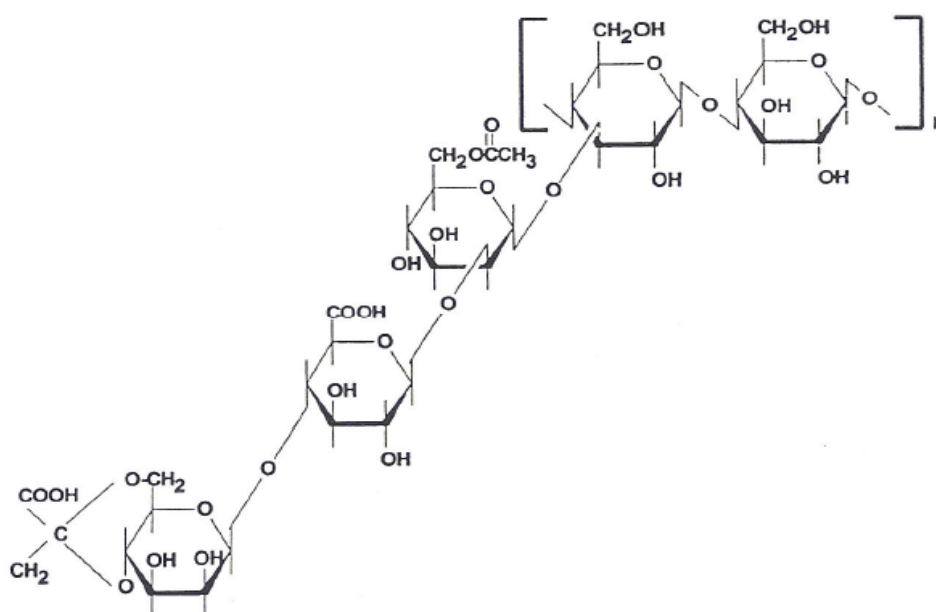


Figura 1- Estrutura molecular da xantana produzida por
X. campestris pv campestris

Fonte: BECKER et al., 1998.

Apesar da estrutura da xantana produzida por *X. arboricola pv pruni* ainda não ter sido descrita, sua constituição monossacarídica foi analisada por autores como Antunes et al. (2003), Moreira et al. (2001), Souza e Vendruscolo (1999) e Vendruscolo et al. (2000), através de Cromatografia de Camada Delgada comparativa, que identificaram glicose, manose, ácido glicurônico e ramnose como

componentes deste biopolímero; a presença de radicais acetil e pirúvico foi verificada por Borges (2007), Klaic (2010) e Pinto (2005) através dos métodos colorimétricos do ácido hidroximâmico (McCOMB; McCREADY, 1957) e da 2,4-dinitrophenilhidrazona (SLONECKER; ORENTAS, 1962) tendo portanto similaridade quanto a composição química com a xantana comercial.

2.2.3 Produção

A goma xantana é produzida durante o processo fermentativo aeróbio de culturas puras de *Xanthomonas* em meio líquido (LILLY; WILSON; LEARCH, 1958). Este biopolímero microbiano vem substituindo os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais (como plantas) devido à possibilidade de produção independente de condições climáticas e de reprodutibilidade (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

O processo de produção de xantana, nas escalas laboratorial, piloto ou industrial, visa simular processos ocorridos na natureza sob condições físico-químicas otimizadas (KENNEDY; BRADSHAW, 1984). Este processo envolve etapas de *upstream* (preservação do microrganismo e formação do inóculo), de produção propriamente dita e de *downstream* (recuperação e purificação). Todas as etapas podem influenciar a qualidade da xantana, através da interferência no crescimento do microrganismo, na produção, na estrutura química e nas características reológicas da xantana. Portanto, fazem-se necessários os controles tanto do microrganismo utilizado quanto do meio de cultura e das condições operacionais, tais como: configuração do biorreator, tipo de processo (contínuo ou descontínuo), temperatura, pH, velocidade de agitação, taxa de aeração e tempo de fermentação, além dos processos de recuperação e purificação (ANTUNES et al., 2003; BORGES et al., 2009; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MOREIRA et al., 2001; PREICHARDT, 2009).

A correta preservação de linhagens, mantidas em meio rico que propicie a multiplicação celular, bem como a estabilidade do microrganismo, confere alta produtividade e reprodutibilidade, características necessárias aos processos fermentativos (GALINDO, 1994; MCNEELY; KANG, 1973).

Uma vez estabelecido o cultivo da linhagem, é necessário otimizar o meio de produção do biopolímero, que deve conter fontes de nitrogênio, de sais minerais, e elevada concentração de carboidratos, que fornecem energia ao metabolismo celular e são constituintes da molécula de xantana (De VUYST; van LOO;

VANDAMME, 1987; KATZBAUER, 1998). Meios com diferentes concentrações de nutrientes possibilitam a síntese de moléculas de xantana com rendimento e massa molar diferentes (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; BORGES et al., 2009).

Como alternativa aos substratos químicos puros e aos meios semi-sintéticos, podem ser empregados como fonte de carboidratos resíduos agroindustriais locais, como melaço de cana, água de maceração de arroz e de milho, resíduo fibroso de cana, citrus e soja (ANTUNES, 2000; De VUYST; VERMEIRE, 1994; EL-SALAM; FADEL; MURAD, 1994; FORESTI, 2003; GREEN; SHELEF; BILANOVIC, 1994), que por serem de fácil obtenção reduzem os custos do processo (SUTHERLAND, 1996). Na produção comercial de xantana os principais substratos são a glicose e a sacarose (ROSALAM; ENGLAND, 2006). A glicose é considerada uma matéria prima de custo elevado; no entanto, no Brasil, é possível a produção de xantana utilizando sacarose com custos reduzidos por ser o país que detém a maior produção mundial de cana-de-açúcar, que, se transformada em açúcar ou melaço de cana, é fonte de carboidrato para síntese do biopolímero (APTA, 2007; PREICHARDT, 2009).

Meios de produção e linhagens bacterianas altamente eficientes são empregados nos processos de produção de xantana sob condições operacionais que exercem influência no rendimento e na qualidade da goma. A síntese de xantana pelo gênero *Xanthomonas* ocorre geralmente em processos de batelada, com temperaturas entre 28 a 34°C, e pH próximo da neutralidade, em biorreatores com aeração entre 0.5 e 10vvm e agitação mecânica, que pode variar (100 à 1400rpm) ao longo do processo devido ao incremento da viscosidade ou permanecer constante durante o período de produção, que varia de 24 a 144h (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Segundo Sutherland (2001), processos fermentativos otimizados levam à transformação de aproximadamente 70% da fonte de carbono em xantana.

O caldo fermentado obtido ao final da etapa de produção propriamente dita é submetido à etapa de *downstream*, como tratamento térmico para lise celular e/ou centrifugação para remoção das células e precipitação alcoólica para recuperação da xantana; após, o polímero é seco e moído. Adicionalmente, diferentes métodos de purificação do produto podem ser utilizados dependendo da aplicação que será dada, como em alimentos, cosméticos, fármacos e fluidos de perfuração de poços de petróleo (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SMITH; PACE, 1982).

A xantana comercial passa ainda por uma etapa final, denominada processo de controle de qualidade do polímero, quando são realizadas análises químicas e físicas para determinação dos teores de umidade, cinzas, nitrogênio, radicais pirúvico e acético e cátions monovalentes e divalentes, bem como análises reológicas que determinam a viscosidade de soluções aquosas de xantana (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; BURDOCK, 1997; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

2.2.4 Propriedades e aplicações

A xantana apresenta-se na forma de um pó branco ou creme, inodoro e insípido (BURDOCK, 1997). É solúvel tanto em água fria quanto quente (MORRIS, 1992). Ao mesmo tempo em que a viscosidade é elevada, as soluções de xantana são pseudoplásticas (diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento), e se adicionadas de outros hidrocolóides este efeito pode ser potencializado (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MORRIS, 1992). Dentre os polissacarídeos disponíveis atualmente no mercado a goma xantana é o que apresenta melhor estabilidade frente a uma ampla faixa de temperatura, pH e força iônica (COTTRELL; KANG, 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). A goma xantana é atóxica e, portanto, considerada segura para utilização em alimentos, cosméticos e fármacos, pois não causa sensibilização nem induz irritação na pele ou olhos (COTTRELL; KANG, 1978; PARFITT, 1999).

De 1964, quando foi estabelecida sua produção comercial, até os dias de hoje, a goma xantana vem se consagrando como eficiente espessante, agente suspensivo e estabilizante de emulsões (SUTHERLAND, 1996) da maior importância para diversos segmentos como as indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, petrolífera, agropecuária e tintureira. A ampla possibilidade de aplicação da xantana deve-se às suas notáveis propriedades reológicas que estão diretamente relacionadas com sua estrutura química de elevada massa molar, que conferem viscosidade elevada às soluções, mesmo em baixíssimas concentrações de polímeros, o que torna a utilização de xantana bastante econômica (CHALLENGE, 1993; De VUYST; van LOO; VANDAMME, 1987; GALINDO, 1994; MORRIS, 1992; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

2.2.4.1 Xantana na indústria alimentícia

A xantana é utilizada como um aditivo alimentar, registrado no Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS) sob o código 415, que caracteriza este biopolímero como espessante, estabilizante, agente emulsificante e suspensivo (FAO, 1999).

Uma propriedade de fundamental importância para escolha de um aditivo alimentar, seja espessante, estabilizante e/ou agente suspensivo e emulsificante, é a necessidade de compatibilidade e estabilidade para aplicação em produtos que contenham outros ingredientes ou aditivos, como sais, proteínas, lipídios, polissacarídeos, com pH muito ácido ou básico e em temperaturas elevadas para cozimento e/ou esterilização, e em todas estas possibilidades é possível utilizar a goma xantana (CHALLENGER, 1993; SUTHERLAND, 1996).

No setor alimentício, a aplicação da xantana contribui com uma maior aceitação do produto pelo consumidor, devido à melhora de atributos como textura, palatabilidade e aparência (CANUTO, 2006; CHALLENGER, 1993). Por apresentar viscosidade elevada, é pequena a concentração necessária de xantana para conferir ao produto as propriedades desejadas, não afetando, portanto, o sabor do produto final (ROSALIM; ENGLAND, 2006).

Por formar soluções pseudoplásticas, a goma xantana é especialmente atrativa na indústria alimentícia, pois ao ter a viscosidade reduzida com o aumento da taxa de cisalhamento, possibilita um elevado grau de mistura e facilita o bombeamento e escoamento do produto pelas tubulações da planta de processamento industrial, bem como o envase e a retirada do produto da embalagem para o uso (KATZBAUER, 1998; MAUGERI-FILHO, 2001). A influência exercida pela xantana sobre as qualidades sensoriais do produto está relacionada com a redução da viscosidade durante a mastigação, diminuindo a sensação de gomosidade, e possibilitando uma melhor percepção do sabor (CHALLENGER, 1993).

Devido a sua excelente solubilidade, tanto em soluções quentes ou frias, pode ser utilizada em diversos produtos instantâneos como sopas e molhos, sobremesas, bebidas e coberturas proporcionando rapidamente uma viscosidade uniforme (BECKER et al., 1998; BeMILLER; HUBER, 2010; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; KATZBAUER, 1998;). Por sua alta estabilidade térmica, a goma xantana é amplamente utilizada como estabilizante e emulsificante de alimentos enlatados de

frango, atum, presunto e batata formulados com molhos processados a quente (BECKER et al., 1998; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; KATZBAUER, 1998).

Por manter suas propriedades reológicas, mesmo em pH ácido, a xantana confere corpo a bebidas, além de estabilizar e suspender polpas e coberturas de frutas por longo período; tem ainda aplicação em produtos como molhos para salada, cebola, mostarda, pickles e tomate (BECKER et al., 1998; KATZBAUER, 1998; PEREIRA, 2009; RODRIGUES, 2006; ÜCKER et al., 2010).

A xantana, adicionada ao recheio de tortas, pudins, sorvetes, dentre outros alimentos congelados, se liga à água livre e melhora a estabilidade do produto prevenindo a sinerese, de forma que após um ou dois ciclos de congelamento não ocorra a formação de cristais de gelo, proporcionando uma textura mais lisa e uniforme (KATZBAUER, 1998). Esta elevada capacidade de retenção de água faz com que produtos de baixa caloria (*light*), quando adicionados de xantana, tenham a textura melhorada, aumentando, portanto a vida de prateleira, sem adicionar valor calórico ao produto. Quando utilizada na indústria de laticínios, isolada ou em combinação com outros hidrocolóides, possui a função de estabilizar produtos como *milk-shakes*, iogurtes e sobremesas lácteas (BECKER et al., 1998; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; KATZBAUER, 1998; STARK et al., 2007).

Por ser compatível com proteínas, lipídios e outros hidrocolóides (SUTHERLAND, 1993), a xantana tem sido utilizada em produtos de panificação para aumentar a vida de prateleira e contribuir na estrutura (PREICHARDT, 2009; TUBARI; SUMNU; SAHIN, 2008); e como estabilizante em substitutos de clara de ovos elaborados com proteína de soro e gelatina, que geralmente são usados em doces, sem afetar o sabor e a aparência (COUTO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2010; KUCK et al., 2010; LAUFFER et al., 2010).

2.2.4.2 Xantana nas indústrias farmacêutica e cosmética

A xantana, classificada pela Sociedade Química Americana como CAS - 11138-66-2, registro este também utilizado para identificação da goma como adjuvante na lista de Denominações Comuns Brasileiras (DCB) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007), é considerada um dos polímeros de origem microbiana biocompatível de maior relevância para o desenvolvimento de produtos na área da saúde (MOREIRA et al., 2002; VEIGA, 2009).

Nas indústrias farmacêutica e cosmética, assim como na alimentícia, a goma xantana contribui para aceitação dos produtos pelos consumidores por interferir na textura e, conseqüentemente, na aparência, sendo geralmente utilizada como espessante, emulsificante, agente suspensivo e estabilizante. Por ser atóxica - não induzindo reações alérgicas na pele ou olhos -, apresentar boa estabilidade e compatibilidade com inúmeras drogas e formar soluções altamente viscosas e pseudoplásticas, diversos fármacos e cosméticos possuem em sua composição a goma xantana (PARFITT, 1999).

Outra característica da goma xantana que tem sido estudada é a capacidade de encapsulação de compostos; pesquisas desenvolvidas na última década objetivaram avaliar a aplicação desta goma, isolada ou complexada a outros polímeros, na produção de dispositivos na forma de comprimidos e bucoadesivos para liberação controlada de fármacos como ácido salicílico (ANDREOPOULOS; TARANTILI, 2001), teofilina (VENDRUSCOLO et al., 2005) e diclofenaco sódico (WYPYCH, 2009); bem como no desenvolvimento de membranas utilizadas como curativos (VEIGA, 2009).

2.3 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

O teste SMART é uma técnica frequentemente utilizada nas últimas décadas em pesquisas na área da genética toxicológica. Trata-se de um bioensaio capaz de detectar diferentes lesões em nível de DNA que possam ocorrer em grupos de células denominados discos imaginais (presentes em larvas do organismo experimental *Drosophila melanogaster*), que após proliferação mitótica diferenciam-se em estruturas originando as asas das moscas adultas. A *Drosophila*, popularmente conhecida como “mosca da fruta”, é um organismo eucarioto com genoma bastante semelhante ao dos humanos, e com rotas bioquímicas e funções regulatórias altamente conservadas entre estas duas espécies; desta forma, os resultados obtidos para compostos analisados nesse bioensaio podem ser considerados relevantes também para a exposição de humanos a tais substâncias (GRAF et al., 1984; St. JOHN; XU, 1997).

Danos como mutações gênicas¹, cromossômicas (aneugênese² e clastogênese³) e recombinações homólogas⁴ podem ser simultaneamente detectados pelo SMART que possibilita ainda a quantificação da ocorrência de recombinação para a totalidade da toxicidade genética dos compostos analisados (GRAF et al., 1984). O SMART fundamenta-se no princípio de que as células dos discos imaginais das asas, durante o desenvolvimento embrionário, mantêm contato com a amostra em análise, sendo que esta pode danificar o DNA, de modo que nas asas dos adultos tais lesões possam ser fenotipicamente detectadas. Para que os possíveis danos sejam detectados através da observação das células que constituem as asas, são utilizados dois genes marcadores fenotípicos o *flr*³ e o *mwh* (Fig. 2); estes são responsáveis pela mudança na forma dos pêlos ou tricomas das asas. Estes fenótipos são expressos em forma de manchas (clones mutantes) quando as células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos, perdem a heterozigosidade devido à indução de alteração genética (GRAF et al., 1984).

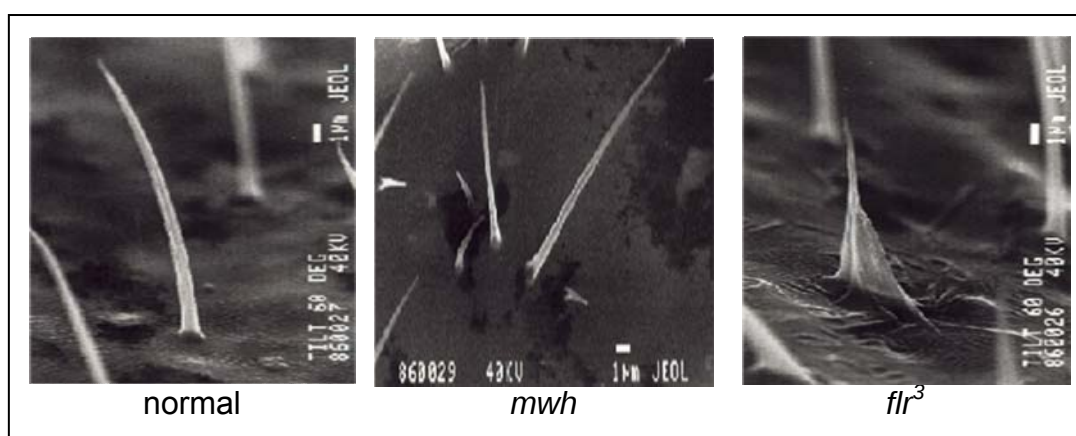


Figura 2 – Micrografias dos tipos de tricomas observados nas superfícies dorsal e ventral das asas de *Drosophila melanogaster* no SMART

Fonte: ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004.

A análise das manchas pode ser quantitativa e/ou qualitativa, permitindo a obtenção de informações distintas. Ao considerar o número de manchas se obtêm resultados quantitativos referentes aos danos induzidos; entretanto, informações referentes à natureza do evento que gerou o clone são obtidas quando se considera

¹Alteração na sequência de um gene por deleção, inserção ou substituição de um ou poucos nucleotídeos (ZAHA et al., 2001).

²Mutação cromossômica caracterizada pela perda ou ganho de pedaços ou cromossomos inteiros (ZAHA et al., 2001).

³Mutação cromossômica caracterizada pela quebra de cromossomos (ZAHA et al., 2001).

⁴Troca de cromátides irmãs (ZAHA et al., 2001).

o tipo de mancha. Quanto ao tipo, as manchas são classificadas como simples ou gêmeas (Fig. 3). Quando apenas pêlos múltiplos (*mwh*) ou apenas pêlos com base alargada (*flr*³) se expressam a mancha é denominada simples e é induzida pela ocorrência de mutações gênicas e/ou cromossômicas, bem como por eventos recombinogênicos. Quando ocorre a expressão de ambos os marcadores (*mwh* e *flr*³) em uma mesma mancha, esta é denominada gêmea, que é originada unicamente por recombinação somática. É considerada uma mancha pêlos mutantes em uma mesma região com distância inferior a três fileiras de tricomas normais. Ainda, é possível obter dados quando é analisado o tamanho das manchas, pois este possui correlação com tempo de atuação da genotoxina ao longo da embriogênese; para tanto, as manchas são classificadas como pequena, quando ocorrem de uma a duas células mutantes, ou como grande, quando três ou mais células mutantes constituem o clone (Fig. 3) (ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004; GRAF, 1995; GRAF et al., 1984).

Outra análise possível de ser realizada pelo SMART é a detecção de genotoxinas de ação direta e genotoxinas que necessitam de metabolização para exercer sua atividade (ação indireta). Esta classificação dos compostos é possível através da utilização de dois diferentes cruzamentos: o padrão, que utiliza fêmeas virgens da linhagem *flr*³ e machos da linhagem *mwh* e origina larvas portadoras de nível basal de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450, e o aprimorado, que utiliza fêmeas virgens da linhagem *ORR/flr*³ e machos da linhagem *mwh* e origina linhagens com alta atividade destas enzimas, especialmente CYP6A2 (FRÖLICH; WÜRGLER, 1990; GRAF; van SCHAIK, 1992). Tanto o cruzamento padrão quanto o aprimorado originam indivíduos com dois genótipos distintos, que são denominados como trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e *flr*³ (*mwh/flr*³) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (*mwh/TM3*). Como o cromossomo *TM3* apresenta múltiplas inversões, os produtos da recombinação são inviáveis para as células heterozigotas para este cromossomo, que expressam, portanto, somente mutações gênicas e/ou cromossômicas. Desta forma, quando os resultados destes indivíduos são confrontados com os resultados dos trans-heterozigotos, é possível quantificar o potencial recombinogênico do composto analisado (GRAF et al., 1984).

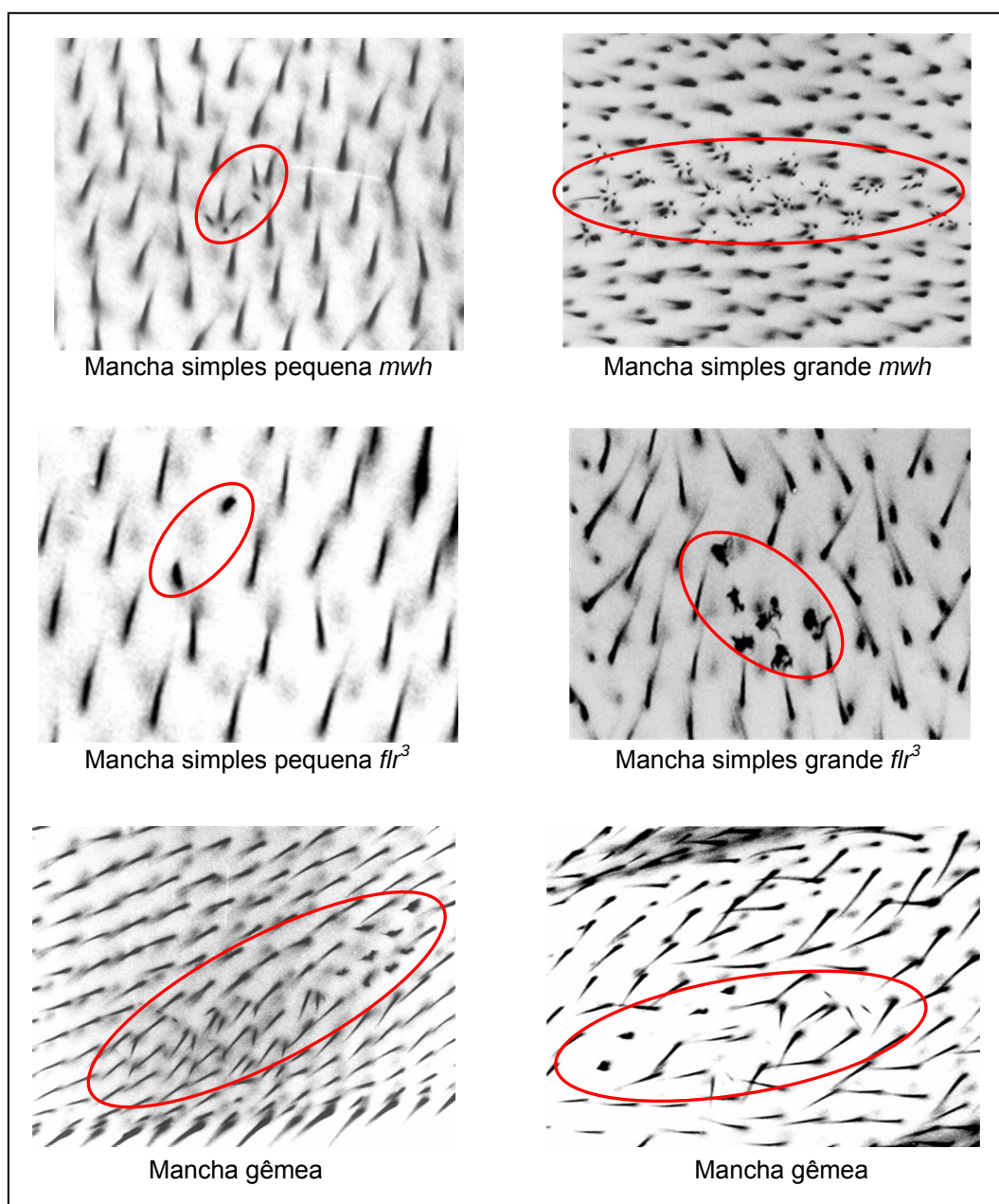


Figura 3 – Tipos de manchas observadas nas superfícies dorsal e ventral das asas de *Drosophila melanogaster* no SMART

Fonte: ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004 (adaptada).

Por possibilitar a detecção e diferenciação em células somáticas, dos diferentes eventos genéticos anteriormente relatados, e por ser considerado um bioensaio de curta duração, pesquisas foram documentadas em mais de 100 publicações que versam sobre a utilização do SMART na análise de mais de 400 compostos. Sendo a possibilidade de quantificar a contribuição de tais eventos para a genotoxicidade total do composto o principal fator para escolha do SMART (FREI; WÜRLER, 1996). Apesar da maioria dos estudos realizados estarem relacionados

com a investigação de produtos puros, algumas misturas complexas como partículas aéreas (DELGADO-RODRIGUEZ et al., 1999; DIHL et al., 2008a; DIHL et al., 2008b), água de superfície de rios (AMARAL et al., 2005, 2006; JACOCIUNAS, 2007), bebidas alcoólicas ou não como conhaque, vinho, chás e cafés (GRAF; WÜRGLER, 1986; van SCHAIK et al., 1984) também foram analisadas. Estes estudos relatam a sensibilidade do teste e demonstram a compatibilidade de resultados quando comparados, por exemplo, com os testes de Ames e Micronúcleo, explicitando, portanto, a aplicabilidade do SMART na análise de compostos sintéticos e/ou naturais.

ARTIGO

Assessment of genotoxicity by *Drosophila* wing-spot test and chemical and physical characterization of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*

Assessment of genotoxicity by *Drosophila* wing-spot test and chemical and physical characterization of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*

A.A. Rodrigues¹; H.H.R. de Andrade²; A.S. Moreira^{1, 3*}; C.T. Vendruscolo^{1, 3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Biopolímeros, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

²Laboratório da Toxicidade Genética (TOXIGEN) and Laboratório de Estomatologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel./fax: +55 53 32757585.

E-mail address: claire.vendruscolo@pq.cnpq.br (C.T. Vendruscolo).

ABSTRACT

Xanthan gum is an exoheteropolysaccharide produced by fermentation from bacteria of the genus *Xanthomonas*. It is an industrial biopolymer with great commercial significance. The aim of this study was to contribute with the determination of the security of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* and for applicability of xanthans produced by strains 101 and 106 on foods, pharmaceuticals and cosmetics, by assessing of genotoxic potential through Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and by chemical and physical determinations. Was assessed the capability of the xanthan gum to induce gene mutation, chromosome aberration and somatic recombination. The xanthan yield, the chromatographic profile to monosaccharides and acid derivatives as well as the contents of moisture, ash, nitrogen, acetyl, pyruvate, sodium, potassium, calcium, magnesium and viscosity of aqueous solutions were determined to characterize the representativeness of xanthans studied in relation to the pathovar *pruni* and determine the quality and applicability of these polymers. The results were compared against the literature data concerning the limits required for commercial xanthan and the values for xanthan produced by other strains of the pathovar *pruni*. The xanthans characterized in this study correspond to the required standards for commercial xanthan. Also, one can characterize these biopolymers, produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, as incapable to causing mutation and recombination in somatic

cells by direct or indirect action and therefore they can be applied in foods, pharmaceuticals and cosmetics.

Keywords: xanthan, *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, SMART, genotoxicity.

1 INTRODUCTION

Xanthan gum is an exoheteropolysaccharide produced by aerobic fermentation from bacteria of the genus *Xanthomonas* (Jeanes, 1974). It is an important biopolymer that can be used in many industrial sectors ranging from cosmetic, food, oil and pharmaceutical industries (Katzbauer, 1998). The xanthan has large applicability due to their rheological properties, being used as a thickener, stabilizer, emulsifier and / or suspending agent (Cottrell and Kang, 1978), specially because it is soluble in both hot and cold water showing high viscosity, even at relatively low concentrations (García-Ochoa et al., 2000); besides, it is stable in wide pH range and temperatures and compatible with a range of salts and requires the application of no more than 1 % of polymer to achieve a very viscous products (Challen, 1994; Born et al., 2002).

The backbone of the xanthan gum has units of $1 \rightarrow 4$ β -D glucose, and trisaccharide side chain comprises two units of D-mannose interspersed by a unit of D-glucuronic acid (Slonecker and Orentas, 1962). The presence of other monosaccharides such as galactose and rhamnose has been related (Lowson and Symes, 1977; Heyraud et al., 1998; Moreira et al., 2001). In the side chain, the unit of internal mannose is acetylated and about half of the external mannose units contains pyruvic acid residues (Jansson et al., 1975). Some external mannoses contain a second acetyl group (Stankowsky et al., 1993). In these acidic residues can linked cations such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} derived from the salts used in production medium and in solution of maintenance of pH or added after fermentation (Klaic et al., 2010). The chemical composition and the physical properties influence on the possibility of applying the polymer and changes in these parameters can provide different rheological behavior (Callet et al., 1987).

Nowadays, despite of wide application of xanthan, a very few countries produce this polymer. Currently, xanthan used on industries is produced by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. However, studies have characterized xanthans obtained by different species of *Xanthomonas* and different production medium, and they reported that the chemical composition and rheological quality of

xanthan varies with the strain, production medium as well as operational conditions (Callet et al., 1987; García-Ochoa et al., 2000; Vendruscolo et al., 2000; Moreira et al., 2001; Borges et al., 2008). Additionally, to obtain a xanthan gum with the physical and chemical characteristics improved, after the fermentation process, both the fermented broth as the polymer can still pass for thermal treatment, additional purification and processes of chemical modification as ion change and deacetylation (Smith and Pace, 1982; García-Ochoa et al., 2000; Pinto et al., 2010).

For the polymer to be considered safe it must be innocuous and not induce to allergic reactions. There are many factors that influence on the characteristics and consequently the quality of xanthan. Strong and significant changes on chemical composition of polymer can affect its safety. So, the commercial xanthan undergoes a quality control process that includes content of moisture, ash, nitrogen, pyruvate, heavy metals (as Pb), arsenic (as As), residues of isopropyl and ethyl alcohol and viscosity (Burdock, 1997; FAO, 1999). Additionally, some authors consider the contents of acetyl, monovalent and divalents cations as important parameters to determine the quality of xanthan (Born et al., 2002).

Classical methods for chemical and physical characterization of xanthan gum are frequently reported and improved, but assays to determination of toxicity and genotoxicity of xanthan gum are uncommon because this polymer has the status of GRAS (Generally Recognized as a Safety) (FAO, 1999). However, it is wise that when to produce a xanthan with different chemical composition their safety should be determined. To analyze the genotoxic potential of the polymer the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* can be considered a differential.

The SMART is considered a quick, cheap and reliable method for genotoxicity assessment. This test is able to detect simultaneously point and chromosome mutations (clastogenic and aneugenic events) and mitotic recombination. It is based on the premise that, during embryonic development, groups of cells (imaginal wing discs) proliferate mitotically until the point of differentiation, during metamorphosis, in structures that create the wings of adult flies. When there is a genetic alteration in one of the cells that are dividing by mitosis, is formed a clone of mutant cells, which can be detected phenotypically such as a mutant spot on the wing surface. The analysis of induced lesions is made by observation of mutant clones that express the

phenotypic marker genes *mwh* (multiple wing hairs) and *flr*³ (flare) responsible for changes in the shape of the trichomes (Andrade et al., 2004).

Therefore, we aimed in this study to contribute for the determination of the security of xanthan gum produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* and for characterization of the polymers produced by strains 101 and 106 with view to determine the applicability of these polymers on foods, pharmaceuticals and cosmetics. The choice of these strains was made based on data previously obtained (Borges, 2007; Klaic, 2010). These strains have xanthan yield expressive, with high thickening capability. To assess the genotoxic potencial was performed by the SMART test. For determine the representatively of xanthans studied in relation to the pathovar *pruni* and determine the quality and applicability of these polymers, chemical and physical determinations were performed.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism and xanthan production

The microorganisms used in this study were *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* strains 101 and 106 isolated from peach leaves. These strains were maintained at laboratory of biopolymers of Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) of Universidade Federal de Pelotas (UFPel) by subcultures every month on SPA agar and storage at 4 °C (Hayward, 1964); a stock sample was liofilized.

The production of xanthan was made in accordance to the patent WO2006047845, in bioreactor (BioStat from B. Braun Biotech International®) at a 10 L vessel with 7 L of fermentation medium and same operating conditions for the two strains employed. After finishing of fermentation, the broths were thermally treated (Vendruscolo et al., 2006). To determine the xanthan yield, the polysaccharides were recovered by precipitation in 96 % ethanol at a 4:1 ratio (v/v). After recovery the xanthans were dried at 56 °C until constant weight and then they were milled. Xanthan yield was measured by gravimetric methods in grams of dry polymer per liter of fermented broth (g L⁻¹) (Vendruscolo et al., 2000).

2.2 Chemical and physical characterization

To determine the moisture, ash and nitrogen content were utilized the methods 012/IV, 018/IV and 036/IV respectively (Instituto Adolfo Lutz, 2004).

The acetyl content was measured by colorimetric method of the hydroxamic acid according McComb and McCready (1957). The standard curve was made using a 0.1 % (w/v) aqueous solution of β -D-glucose pentaacetate; the standard was previously diluted at 5 mL of ethanol, and final volume was completed to 100 mL. Solutions comprising from zero to 420 $\mu\text{g mL}^{-1}$, into volumetric flasks, were made. To xanthan analysis 0.1 g of each sample (respectively) was added on 25 mL of a 3.75 % (w/v) hydroxylamine solution and stirred during 15 min. Then was added 25 mL of a 9.4 % (w/v) sodium hydroxide solution and this was stirred until complete dissolution of the biopolymer. An aliquot of 2 mL of this solution was transferred into 25 mL volumetric flask, which was added 5 mL of water and 5 mL of methanolic acid solution prepared with absolute methanol:perchloric acid 70 % at a 93:7 ratio (v/v); the volume was completed with a ferric perchlorate solution. The concentration of acetyl was determined by reading the absorbance of samples at a wavelength of 520 nm in a spectrophotometer (Ultrospec 2000 from Pharmacia Biotech®).

The pyruvate content was measured by colorimetric method of the 2,4-dinitrophenylhydrazone according Slonecker and Orentas (1962). The standard curve was made using a 0.1 mol L⁻¹ sodium pyruvate solution. Solutions comprising from zero to 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$, into volumetric flasks, were made. To xanthan analysis a 0.4 % (w/v) solution of each polymer was hydrolyzed with 2 M hydrochloric acid during 3 h at 90 °C. An aliquot of 2 mL this hydrolyzate was reacted with 1 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (0.5 % dinitrophenylhydrazine in a solution of 2 M hydrochloric acid) for 5 min. In this mixture was added 5 mL of ethyl acetate and after the aqueous phase was discarded. Then three extractions were made by addition of 5 mL 10 % sodium carbonate solution (w/v) to each procedure; the extract of interest was diluted to 25 mL with this solution. The concentration of pyruvate was determined by measuring the absorbance of samples at 375 nm in a spectrophotometer (Ultrospec 2000 from Pharmacia Biotech®).

Monovalents cations, sodium and potassium were determined using a flame photometer (B462 from Micronal®). Divalent cations, calcium and magnesium were determined using an atomic absorption spectrophotometer (AA-6300 from Shimadzu®). The samples were treated by acid digestion; 100 mg of xanthan samples were weighed into glass digester flasks and 5 mL of concentrated HNO₃ was added. The mixture was heated in a digester block (MA-4025 from Marconi®) at 100 °C for about 2 h. After cooling at room temperature 2 mL of HClO₄ was added

and the mixture was again heated at the same temperature for more than 1 h. After cooling at room temperature, the samples were diluted with ultrapure water to a final volume of 50 mL into volumetric flask, with subsequent dilutions appropriate for each analyte for subsequent analysis (Klaic et al., 2010).

The technique used for determination of monosaccharides and acids derivatives was the comparative thin-layer chromatography (TLC). The 3 % (w/v) solutions of samples of polymers were hydrolyzed with 2 M HCl. The standards used were 1 % methanolic solution of glucuronic acid (GA), mannose (M), glucose (G) and rhamnose (R). A volume of 3 μ L of each hydrolyzed samples and standards were applied on TLC aluminum sheets silica gel 60 F254 (Merck®) 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 sulfuric anisaldehyde reagent and heating at 100 °C during 5 min (Vendruscolo et al., 2000).

To determine the viscosity of each polymer, xanthan gum solutions (1 % w/v) were prepared by dissolving xanthan powder in distilled water heat at 80 °C and stirring during 30 min at 60°C. After, the solutions were kept at room temperature during 2 h (FAO, 1999). The viscosity was measured in a viscometer (Visco Tester 6L from Thermo Haake®) at 24 °C using spindle L3 at 10, 30, 60 and 100 rpm, during 30 s in each rotation.

All experiments were performed in triplicate and the results were submitted to analysis of variance, exception for viscosity, and means were compared by Tukey test at 5 % significance level.

2.3 Assessment of genotoxicity

To assess the genotoxic potential of xanthans produced by *pathovar pruni* – strains 101 and 106 - were used three strains of *Drosophila melanogaster*: (i) *mwh/mwh*, this strain has the marker for multiple wing hairs (*mwh*, 3-0.3), which is completely recessive, and when in homozygous is expressed as three or more trichomes per cell; (ii) *flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*, this strain has a marker of hair *flare* (*flr³*, 3-38.8), which is expressed as trichome with a large base when compared to wild trichomes; and (iii) *ORR/ORR; flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*, this strain has chromosomes 1 and 2 from strain Oregon R (R), resistant to DDT, which consist of genes responsible for high constitutive level of

metabolizing enzyme cytochrome P450. More informations about the genetic markers are available in Lindsley and Zimm (1992).

These strains were used to perform two different crosses: (i) Standard (ST) cross, in which females of the strain *flr³/TM3*, *Bd^s* were crossed with *mwh/mwh* males; and (ii) High Bioactivation (HB) cross, in which females of the strain *ORR/ORR; flr³/TM3*, *Bd^s* were crossed with *mwh/mwh* males. This cross increases test performance, detecting compounds that are dependent on activation by cytochrome P450. Other details regarding these crosses can be obtained in Graf and van Shaik (1992).

The ST and HB crosses were performed, and eggs derived from these crosses were collected during 8 h in culture medium containing a solid agar (3 % w/v) completely covered with a layer of live fermenting baker's yeast supplemented with sucrose. Approximately 72 h after the egg-laying stage, larvae were collected and distributed in plastic vials containing 1.5 g of *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply®) re-hydrated with 5 mL of diluent, i.e. xanthan aqueous solutions 101 or 106, in different concentrations (i.e., 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 %) for solution test, distilled water for negative control, and solutions of 1.5mM ethylmethanesulphonate (EMS) to ST and 20mM urethane to HB for positive control. The larvae were kept in these vials until that the adult flies were emerged (Andrade et al., 2004).

After metamorphosis, all surviving flies were collected and stored in vials with 70% ethanol for subsequent microscopic analysis. For detection of mutant clones were prepared slides, each containing wings of five males and five females. The wings of flies were removed and placed on slides with Faure's solution arabic gum:glycerol:chloral hydrate:water at a ratio of 30:20:50:50 (w/v/w/v). The dorsal and ventral surfaces of the wings, of thirty flies per tested concentration, were observed using an optical microscopy (CX21 from Olympus®) with 400 x magnification for the occurrence of mutant clones (Andrade et al., 2004).

Both crosses gave origin to individuals with two different genotypes, namely marker-heterozigous (*mwh* + / + *flr³*) and balancer-heterozigous (*mwh* + / *TM3*, *Bd^s*). When there is induction of loss of heterozygosity in the markers can be observed different mutant clones in wing of flies, classified as (i) single spots and (ii) twin spots. Single spots, either *mwh* or *flr³*, results from point or chromosomal mutations and / or mitotic recombination. These spots can be small - one to two cells *mwh* or *flr³* - or

large - three or more cells *mwh* or *flr*³. Twin spots that consisting of adjacent *mwh* and *flr*³ cells, which result exclusively from mitotic recombination. On balancer-heterozygous wings only *mwh* single spots can be observed as the inverted *TM3* balancer chromosome does not carry *flr*³ or any other suitable marker mutation. First reading was on the wings of the marker-heterozygous individuals; after statistical analysis was ruled out the need to examine individuals balancer-heterozygous. These individuals are used to quantify the frequency of mitotic recombination in genotoxins when a diagnostic positive is found at markers-heterozygous (Andrade et al., 2004).

All mutant clones, observed in treatments and in negative control, were recorded in SMART protocols for distinguishing the types of clones. To determine the statistical significance of the results obtained, these were evaluated according to multiple decision procedure, described by Frei and Wurgler (1988), which generates four different diagnoses: negative, inconclusive, positive or weakly positive. The conditional binomial test of Kastembaum and Bowman (1970) was used to compare the frequency of each type of mutant clone per fly, at each concentration of xanthan, against to the frequency of negative control; the significance level used was 5%.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Xanthan yield determination

The xanthan yield obtained to strains 101 and 106 were $19.16 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$ and $20.21 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$ respectively, in accordance to Borges et al. (2008) and Borges et al. (2009). The values obtained were significantly different. When compared with yield from other species of *Xanthomonas* these strains show promise for production of xanthan on a larger scale. Studies report that bacteria of the genus *Xanthomonas* have yield values below 10 g L^{-1} (Galindo et al., 1994) to 30.5 g L^{-1} (García-Ochoa et al., 2000).

3.2 Moisture, ash, and nitrogen content

In xanthans produced by strains 101 and 106 there was not significant difference on moisture levels. In opposition, the ash and nitrogen levels were significantly different among the xanthans analyzed. The results are showed in the Table 1.

TABLE 1 – Moisture, ash and nitrogen content (% w/w) of xanthans produced by strains 101 and 106

Analysis	Xanthan		Limits (%)*
	101	106	
Moisture	4.8 ^a ± 0.02	5.0 ^a ± 0.03	≤15
Ash	14.87 ^a ± 0.06	14.37 ^b ± 0.04	≤16
Nitrogen	0.99 ^b ± 0.01	1.06 ^a ± 0.01	≤1.5

Values = means ± SD. Lines with different letters are significantly different by Tukey test ($p < 0.05$).

*Limits established by FAO (1999).

The moisture content is related to the stability, quality and composition of the product (Cechi, 2003). Generally water-soluble polymers are dried in order to provide between 8 % and 15 % moisture content; in this state they are hygroscopic. The humidity absorption can induce to hydrolytic degradation (Smith and Pace, 1982; García-Ochoa et al., 2000). The moisture content of the samples did not differ significantly (Table 1) and was below the maximum value established by FAO (1999), Burdock (1997) and the values found for xanthan produced by other strains of pathovar pruni (Torres et al., 1993).

The ash content determined refers to the inorganic residue (K, Na, Mg, Ca, Fe, P and other mineral compounds) remaining from the burning of organic compounds and from production medium (Cecchi, 2003). Although the samples differed significantly in ash content (Table 1) with values below of the maximum value specified by Compendium of Food Additive Specification (FAO, 1999) and Burdock (1997). However, some researchers have been related values lower than 13 % for different strains (Torres et al., 1993; Morris, 1995; García-Ochoa et al., 2000; Borges et al., 2007; Klaic et al., 2010).

The nitrogen present in xanthan can be derived from the production medium or from the remaining cells that were not totally removed during recovery. The values of nitrogen to xanthans analyzed (Table 1) differed significantly and they were consistent with the values recommended by FAO (1999) and Burdock (1997), of about 1.5 % of nitrogen, and by Garcia-Ochoa (2000), with values between 0.3 % and 1 % nitrogen.

3.3 Acetyl and pyruvate content

The samples did not differ significantly on the content of acetyl (Table 2) and are in agreement with the established by the concerning literature that is between 1.9 % and 6 % (García-Ochoa et al., 2000). The concentration of pyruvate (Table 2) of

xanthan 101 was significantly lower than xanthan 106, but both samples are in accordance with the minimum of 1.5 % set by Burdock (1997) and FAO (1999) to commercial xanthan and with the recommendations of García-Ochoa et al. (2000), which indicate maximum value to 5.7 %. There is no consensus in the literature about the effect that variations in the content of these groups cause in the properties of the biopolymer and its applications. There are reports that xanthans with higher levels of pyruvate are more viscous than those with lower levels of pyruvate (Cadmus et al., 1978; Smith et al., 1981). However, some authors showed low, or neither, correlation between the content of pyruvate and the thickening ability of the polymer (Torrestiana et al., 1990; Borges et al., 2009).

TABLE 2 – Acetyl and pyruvate content (% w/w) of xanthans produced by strains 101 and 106

Analysis	Xanthan	
	101	106
Acetyl	2.39 ^a ± 0.07	2.45 ^a ± 0.10
Pyruvate	1.52 ^b ± 0.01	1.93 ^a ± 0.06

Values = means ± SD. Lines with different letters are significantly different by Tukey test ($p < 0.05$).

3.4 Monovalent and divalent cation contents

The cation contents of the samples (Table 3), except for calcium that was below the detection limit, were significantly different. The content of monovalent cations is in accordance with the scientific literature that is from 3.6 % to 14.3 % (García-Ochoa et al., 2000). Already the content of divalent cations of the xanthan produced by strain 106 was slightly higher than the recommended for commercial xanthan gum that is from 0.085 % to 0.17 % (García-Ochoa et al., 2000). However, studies with xanthan produced by *pathovar pruni* reported levels of divalent cations from 0.18 % to 0.30 % and levels of monovalent cations from 4.5 % to 8.36 %; therefore the samples by strains 101 and 106 are in agreement with the contents of cations of this *pathovar* (Borges et al., 2007, Klaic et al., 2010). The cations contained in the samples have origin in the production medium and solutions to control pH, and they have influences on the functionality of xanthan, stabilizing the ordered conformation of the molecule (Katzbauer, 1998).

TABLE 3 – Sodium, potassium, calcium and magnesium content (% w/w) of xanthans produced by strains 101 and 106

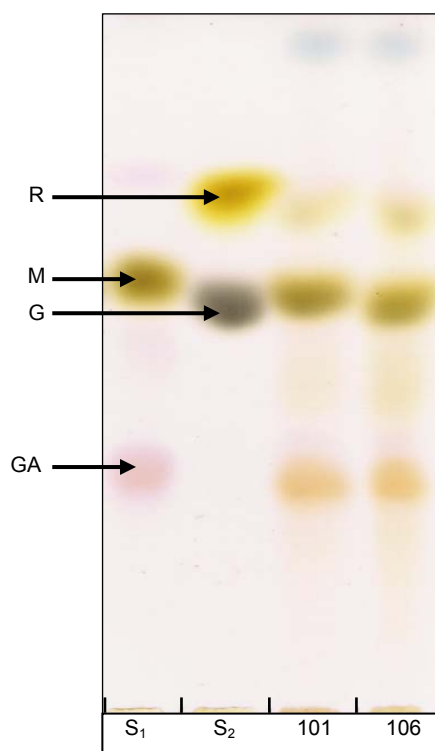
Analysis	Xanthan	
	101	106
Sodium	4.00 ^b ± 0.08	4.24 ^a ± 0.05
Potassium	3.01 ^a ± 0.45	2.32 ^b ± 0.55
Calcium	< LD	< LD
Magnesium	0.17 ^b ± 0.05	0.19 ^a ± 0.01

Values = means ± SD; LD= Limit of detection for Ca (0.45 mg g⁻¹). Lines with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05).

3.5 Determination of monosaccharides and acid derivatives

In both xanthans analyzed were found glucose (Rf 0.58) and mannose (Rf 0.59) as the dominant hexoses units, along with glucuronic acid (Rf 0.34), as advised by Burdock (1997) and FAO (1999), and rhamnose (Rf 0.70) (Figure 1) as expected for polymers produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. So all samples differed of the commercial xanthan produced by *Xanthomonas campestris* pv campestris due to the presence of rhamnose (Moreira et al., 2001).

FIGURE 1 – Comparative thin-layer chromatography of xanthans produced by strains 101 and 106. Standards: S₁ glucuronic acid (GA), mannose (M); S₂ glucose (G), rhamnose (R). Eluted with trichloromethane:methanol:acetic acid:water (40:40:10:10 v/v/v/v) on TLC aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Merck®) and visualized with sulfuric-anisaldehyde reagent



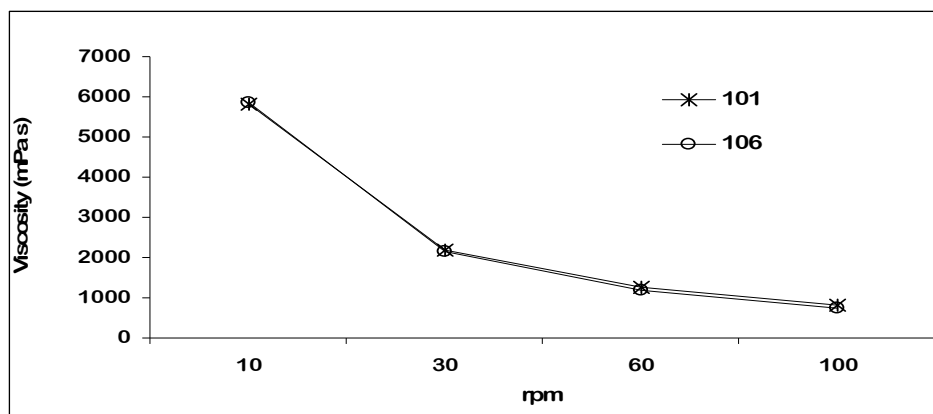
3.6 Viscosity

Xanthans 101 and 106 showed pseudoplastic behavior and viscosities of 1.255 and 1.203 mPa s, respectively, at 60 rpm. These values are higher than that the 600 mPa s or cP, minimum required to 1 % (w/v) xanthan solutions in this rotation (Burdock, 1997; FAO, 1999) and high viscosity for xanthans by pathovar pruni (Borges et al., 2008), as can be seen on the Figure 2.

The xanthan were thermally treated and, according to Borges et al. (2009), the thermic post-fermentative treatment increases the viscosity of xanthan gum.

As the polymers had a similar chromatographic profile of monosaccharides, and contents of acetyl, pyruvate and cations, was not possible to establish a relationship between these parameters and the viscosity of their solutions.

FIGURE 2 – Viscosity (mPa s) of 1 % (w/v) aqueous solutions of xanthans produced by strains 101 and 106, measured in a viscometer with spindle L3 at 24 °C during 30 s in 10, 30, 60 or 100 rpm.



3.7 Assessment of genotoxicity

The SMART test was used to evaluate the genotoxic potential of xanthan gum. In Tables 4 and 5 the results for the samples of xanthans produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni strains 101 and 106 for the analysis of ST and HB crosses respectively are shown. In the tables can be observed for each tested xanthan concentration, the total number of flies analyzed, the frequency of different mutant clones, as well as the total number of spots, which represents the total genotoxicity of the tested compound.

For both crosses were scored only the wings of individuals trans-heterozygous. Because only in the case of a positive diagnosis for this progeny is

necessary to score the wings of individuals balancer-heterozygous, to quantify the contribution of homologous recombination in the total genotoxicity of the compound (Andrade et al., 2004). The frequencies of total spots per fly of negative control in both crosses were slightly higher, but similar to those usually reported for genotype trans-heterozygous (Wurgler et al., 1985).

As can be seen in Table 4, neither of the concentrations of xanthan aqueous solutions had genotoxic potential to flies trans-heterozygous at ST cross when compared with negative control. The EMS, used as positive control, proved the sensitivity of this assay to detect genotoxic potentials at ST cross.

Other high concentrations were not tested because it is extremely difficult to work with solutions of xanthan with concentrations above 2% due to the high viscosity and the lower water activity, which hinders the complete hydration of the medium. However, at all the tested concentrations there was an apparent dispersion and hydration of medium.

In the results of HB cross, which are showed in the Table 5, also can be noted that xanthan from both strains 101 and 106, at all tested concentrations, were characterized as devoid of genotoxic potential when compared with the negative control. The HB cross distinguishes itself by high expression of CYP450 genes, especially Cyp6a2 (Frölich and Wurgler, 1989; Graf and van Schaik, 1992). It is of great importance in the detection of indirect-action of genotoxic agents, because a compound with a negative diagnosis on the ST cross can, differently, be genotoxic at HB cross due to metabolism of tested substance by cytochrome P450 (Graf; van Schaik, 1992). However, for the samples studied in this work, the HB cross confirmed the absence of genotoxic potential of xanthan gum of strains 101 and 106, which presented total frequency of spots for all tested concentration lower than the frequency of negative control. The sensitivity of this assay to detect genotoxic potentials to HB cross was proved through positive control using urethane solution .

The commercial xanthan gums have been extensively studied in animal models to ensure the safety of their ingestion, inhalation and topical use (Knott and Johnston, 1973; Woodard et al. 1973; Guillot et al., 1982). The effects of the ingestion of xanthan gum also have been evaluated in humans, in studies in which were concluded that besides the commercial xanthan do not show toxicological risks it still induces to a slowly but significantly loss weight (Wong, 1974; Eastwood et al., 1987). In the studies so far reported were analyzed the xanthans produced by

Xanthomonas campestris pv *campestris* and almost all of them were directed only for toxicologic evaluation.

The results obtained with the SMART test in our study show that despite the xanthans analyzed have different chemical composition in relation to commercial xanthan (Moreira et al. 2001; Antunes et al., 2003), due to be produced by a different specie, xanthans 101 and 106 can be considered, in relation to assay of the genotoxicity by SMART test, safe for use in foods, drugs or cosmetics in the studied concentrations. In this study the SMART test provided results that has applicability to the xanthan produced by other strains of *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, because the chemical and physical characteristics observed on the xanthans produced by the strains 101 and 106 are similar those presented by xanthans produced by other strains of this pathovar, as well by the commercial xanthan, excepted to the presence of rhamnose. Our results are in accordance with the study of Roll (2005), that analyzed xanthans produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* strains 06 and 24 and these did not induce point or chromosome mutations statistically significant in samples of peripheral blood and bone marrow of rodents when analyzed by the comet assay and micronucleus test, respectively.

The SMART test have been used in many other studies, in which both, positive and negative results, were found on analysis of environmental samples and natural compounds (Graf et al., 1994; Amaral et al., 2006; Dihl et al., 2008; Jacociunas et al., 2010) and drugs (Franchi et al., 2009; Schneider et al., 2009; Danesi et al., 2010; Ercyas et al., 2010; Yüksel et al., 2010), showing great sensitivity and accuracy not only to detect the genotoxicity as well as to ensure the safety of various compounds. The large utilization of this test declare the importance of our study, which was the first assay of genotoxicity of xanthan gum using the SMART test.

The found results for xanthans 101 and 106 in SMART test are important because they can be considered to use humans, in view of the similarity of the genome of *Drosophila melanogaster* with the human genome and the high conservation of biochemical pathways and regulatory functions (Graf et al. 1984; St. John and Xu, 1997). This correlation between *Drosophila melanogaster* and humans surveys the development of many future works towards the use of xanthans 101 and 106 in the development of new food or non-food products, especially because the xanthan gum is the polysaccharide biopolymer more currently used industrially.

TABLE 4 - Summary of results obtained with the *Drosophila* wing-spot test (SMART) in the ST cross after chronic treatment of larvae with xanthan aqueous solutions

Sample and Genotype	Concentration (%)	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots) / statistical diagnosis ^a								Total <i>mwh</i> clones ^c (<i>n</i>)	
			Small single spots ^b (1-2 cells) m = 2			Large single spots ^b (>2 cells) m = 5		Twin spots m = 5		Total spots m = 2		
Xanthan 101												
<i>mwh/flr</i> ³	NC	30	0.87	(26)		0.10	(03)		0.07	(02)	1.03 (31)	30
	0.25	30	0.93	(28)	-	0.10	(03)	i	0.03	(01)	i 1.07 (32)	31
	0.5	30	0.63	(19)	-	0.10	(03)	i	0.03	(01)	i 0.77 (23)	23
	1.0	30	0.93	(28)	-	0.13	(04)	i	0.03	(01)	i 1.10 (33)	32
	1.5	30	0.77	(23)	-	0.07	(02)	i	0.00	(00)	i 0.83 (25)	25
	2.0	30	0.87	(26)	-	0.13	(04)	i	0.00	(00)	i 1.00 (30)	30
PC / EMS	1.5 mM	20	14.05	(281)	+	4.20	(84)	+	2.55	(51)	+	20.08 (416) + 392
Xanthan 106												
<i>mwh/flr</i> ³	NC	30	0.87	(26)		0.10	(03)		0.07	(02)	1.03 (31)	30
	0.25	30	0.73	(22)	-	0.10	(03)	i	0.10	(03)	i 0.93 (28)	28
	0.5	30	0.67	(20)	-	0.23	(07)	i	0.03	(01)	i 0.93 (28)	28
	1.0	30	0.83	(25)	-	0.03	(01)	i	0.07	(02)	i 0.93 (28)	28
	1.5	30	0.83	(25)	-	0.17	(05)	i	0.13	(04)	i 1.13 (34)	33
	2.0	30	0.90	(27)	-	0.13	(04)	i	0.07	(02)	i 1.10 (33)	33
PC / EMS	1.5 mM	20	14.05	(281)	+	4.20	(84)	+	2.55	(51)	+	20.08 (416) + 392

NC = Negative control. PC= Positive control (EMS = ethylmethanesulphonate).

^a Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor for the assessment of significantly negative results. Significance levels $\alpha=\beta= 0.05$.

^b Including rare *flr*³ spots.

^c Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

TABLE 5 - Summary of results obtained with the *Drosophila* wing-spot test (SMART) in the HB cross after chronic treatment of larvae with xanthan aqueous solutions

Sample and Genotype	Concentration (%)	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots) / statistical diagnosis ^a										Total <i>mwh</i> clones ^c (n)		
			Small single spots ^b (1-2 cells) m = 2		Large single spots ^b (>2 cells) m = 5			Twin spots m = 5		Total spots m = 2					
Xanthan 101															
<i>mwh/flr</i> ³	NC	30	0.97	(29)		0.17	(05)		0.00	(00)		1.13	(34)	34	
	0.25	30	0.80	(24)	-	0.07	(02)	-	0.00	(00)	i	0.87	(26)	-	26
	0.5	30	0.47	(14)	-	0.10	(03)	i	0.00	(00)	i	0.57	(17)	-	17
	1.0	30	0.77	(23)	-	0.03	(01)	-	0.10	(03)	i	0.90	(27)	-	25
	1.5	30	0.57	(17)	-	0.13	(04)	i	0.00	(00)	i	0.70	(21)	-	21
	2.0	30	0.73	(22)	-	0.10	(03)	i	0.00	(00)	i	0.83	(25)	-	24
PC / Urethane	20mM	20	39.60	(792)	+	5.50	(110)	+	3.60	(72)	+	48.70	(974)	+	956
Xanthan 106															
<i>mwh/flr</i> ³	NC	30	0.97	(29)		0.17	(05)		0.00	(00)		1.13	(34)		34
	0.25	30	0.67	(20)	-	0.13	(04)	i	0.00	(00)	i	0.80	(24)	-	24
	0.5	30	0.67	(20)	-	0.10	(03)	i	0.10	(03)	i	0.87	(26)	-	26
	1.0	30	0.60	(18)	-	0.03	(01)	-	0.00	(00)	i	0.63	(19)	-	19
	1.5	30	0.77	(23)	-	0.03	(01)	-	0.03	(01)	i	0.83	(25)	-	25
	2.0	30	0.50	(15)	-	0.03	(01)	-	0.07	(02)	i	0.60	(18)	-	18
PC / Urethane	20mM	20	39.60	(792)	+	5.50	(110)	+	3.60	(72)	+	48.70	(974)	+	956

NC = Negative control. PC = Positive control (Urethane).

^a Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor for the assessment of significantly negative results. Significance levels $\alpha=\beta=0.05$.

^b Including rare *flr*³ spots.

^c Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

4 CONCLUSIONS

The xanthans produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* were characterized through the SMART test as incapable of causing mutation and recombination in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by direct or indirect action, in the studied concentrations. There withal, the xanthans analyzed are in accordance with the physical and chemical characteristic specified by the legislation and concerning literature and show excellent quality. So, these biopolymers, have a large potential for applicability in foods, pharmaceuticals and cosmetics.

5 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the authors are grateful to this financial support and also the teams of Laboratório de Biopolímeros (UFPEL) and of Laboratório Toxigen (ULBRA/Canoas) that contributed by the technical support.

7 REFERENCES

- Amaral, V.S., Sinigaglia, M., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2006. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Environ. Pollut.* 39, 469-476.
- Andrade, H.H.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2004. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, D.S. (Ed.), *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Humana Press Inc., Totowa, pp.389-412.
- Antunes, A.E.C., Moreira, A.S., Vendruscolo, J.L., Vendruscolo, C.T., 2003. Screening of *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. *Braz. J. Food Tech.* 6, 317-322.

Borges, C.D. Estudo das condições operacionais na produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. 2007. 120f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Borges, C.D., Bastos, C.P., Vendruscolo, C.T., 2007. Avaliação das características físicas e químicas de gomas xantanas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas 28, 107-114.

Borges, C.D., De Paula, R.C.M., Feitosa, J.P.A., Vendruscolo, C.T., 2009. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni strain 106. Carbohydr. Polym. 75, 262–268.

Borges, C.D., Moreira, A.S., Vendruscolo, C.T., Ayub, M.A.Z., 2008. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. Rev. Arg. Microb. 40, 81-85.

Born, K., Langendorff, V., Boulenguer, P., 2002. Xanthan. In: Steinbüchel, A.; Vandamme, E.J., Baets, S. Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim, 5, pp. 259-291.

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

Cadmus, M.C., Knutson, C.A., Lagoda, A.A., Pittsley, J.E., Burton, K.A., 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotechnol. Bioeng. 20, 1003 -1014.

Callet, F., Milas, M., Rinaudo, M., 1987. Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. Int. J. Biol. Macromol. 9, 291-293.

Cecchi, H.M., 2003. Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos, second ed. Editora da Unicamp, Campinas.

Challen, I.A., 1994. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: Nishinari, K., Doi, E. Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions. Plenum Press, pp.135-140.

Cottrell, I.W., Kang, K.S., 1978. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. Develop. Ind. Microb.19,117-131.

Danesi, C.C., Bellagamba, B.C., Dihl, R.D., Andrade, H.H.R., Cunha, K.S., Lehmann, M., 2010. Evaluation of the genotoxicity of cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil combined treatment in the *Drosophila* wing-spot test. Food Chem. Toxicol. 48, 3120-3124.

Dihl, R.R., Bereta, M.S., Amaral, V.S., Lehmann, M., Regul, M.L., Andrade, H.H.R., 2008. Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons are inducers of mitotic homologous recombination in the wing-spot test of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 46, 2344–2348.

Eastwood, M.A., Brydon, W.G., Anderson, D.M.W., 1987. The dietary effects of xanthan gum in man. Food Addit. Contam. 4, 17-56.

Erciyas, A.F., Erciyas, K., Sarikaya, R., 2010, Genotoxicity of two mouthwash products in the *Drosophila* Wing-Spot Test. Food Chem. Toxicol. 48, 2577-2580.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999. Compendium of food additives specifications, addendum 7, FAO/WHO, Rome.

Franchi, L.P., Pentiado, N.H.G.R., Silva, R.N., Guimarães, N.N., Jesuino, R.S.A., Andrade, H.H.R.A., Lehmann, M., Cunha, K.S., 2009. Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 47, 578-582.

Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.

Frei, H., Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11, 315-325.

Frölich, A., Würgler, F.E., 1990. *Drosophila* wing spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 234, 71-80.

Galindo, E., 1994. Aspects of the process for xanthan production. *Inst. Chem. Eng.* 72, 227-237.

García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J. A., Gómez, E., 2000. Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnol. Adv.* 18, 549-579.

Graf, U., Moraga, A.A., Castro, R., Carrillo, E.D., 1994. Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem. Toxicol.* 32, 423–430.

Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59-67.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188.

Guillot, J.P., Giauffret, J.Y., Martini, M.C., Gonnet, J.F., Soule, G., 1982. Safety evaluation of gum and thickeners used in cosmetic formulation. *Int. J. Cosmet. Sci.* 4, 53-66.

Hayward, A.C., 1964. Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum*. J. Gen. Microb. 33, 287-298.

Heyraud, A., Sayah, B., Vojnov, A., Colin-Morel, P., Gey, C., Geremía, R.A., Dankert, M., 1998. Structure of an extra cellular manosylated cellulose produced by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. Cell. Mol. Biol. 44, 447-454.

Instituto Adolfo Lutz., 2004. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, fourth ed. IMESP, São Paulo, p. 1032.

Jacociunas, L.V., Dihl, R.R., Lehmann, M., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2010. Recombinagenic activity of water and sediment from Sinos River and Araçá and Garças Streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test. Sci. Total Environ. 408, 571–577.

Jansson, P.E., Kenne, L., Lindberg, B., 1975. Structure of the exocellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res. 45, 275-285.

Jeanes, A., 1974. Extracellular microbial polysaccharides - new hydrocolloids of interest to the food industry. Food Technol. 28, 34-40.

Kastembaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat. Res. 9, 527–549.

Katzbauer, B., 1998. Properties and applications of xanthan gum. Polym. Degrad. Stab. 59, 81-84.

Klaic, P.M.A. 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 em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Klaic, P.M.A., Nunes, A.M., Ribeiro, A.S., Moreira, A.S., Vendruscolo, C.T., 2010. Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: sample treatment by acid digestion. Carbohydr. Polym. article in press.

Knott, W.B., Johnston, C.D., 1973. Keltrol[®], acute inhalation toxicity to rats. Woodard Res. Corporat., Herndon.

Lindsley, D.L., Zimm, G.G., 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York. p. 1133,.

Lowson, C.J., Symes, K.C., 1977. Oligosaccharides produced by partial acetolyses of xanthan gum. Carbohydr. Res. 58, 433-438.

McComb, E.A., McCready, R.M., 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Anal. Chem. 29, 819-821.

Moreira, A.S., Vendruscolo, J.L.S., Gil-Tunes, C., Vendruscolo, C.T., 2001. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. Food Hydrocoll. 5, 469-474.

Morris, V.J., 1995. Bacterial polysaccharides. In: Stephen, A. M. Food polysaccharide and their applications. Basel Marcel Dekker, New York, pp. 341-375.

Pinto, E.P., Furlan, I., Vendruscolo, C.T., 2010. Chemical deacetylation natural xanthan (Jungbunzlauer). Revista Polímeros, article in press.

Roll, R. Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv pruni através de ensaios cometa e teste de micronúcleos. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Schneider, L.E., Amaral, V.S., Dihl, R.R., Lehmann, M., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2009. Assessment of genotoxicity of Lidocaine, Prilonest and Septanest in the *Drosophila* wing-spot test. *Food Chem. Toxicol.* 47, 205-208.

Sloneker, J.H., Orentas, D.G., 1962. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. *Nat.* 194, 478-479.

Smith, I.H., Pace, G.W., 1982. Recovery of microbial polysaccharides. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v. 32, 119-129.

Smith, I.H., Symes, K.C., Lawson, C.J., Morris, E.R., 1981. Influence of the pyruvate of xanthan on macromolecular association in solution. *Internat. J. Biol. Macromol.* 3, 129-134.

Stankowski, J., Mueller, B., Zeller, S., 1993. Localization of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.* 241, 321-326.

St. John, M.A.R., Xu, T., 1997. Insights from model systems-Understanding human cancer in a fly? *Am. J. Hum. Gen.* 61, 1006-1010.

Torres, L.G., Brito, E., Galindo, E., Choplin, L., 1993. Viscous behavior of xanthan solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 58-64.

Torrestiana, B., Fucikovsky, L., Galindo, E., 1990. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Lett. Appl. Microb.* 10, 81-83.

Vendruscolo, C.T., Moreira, A.S., Souza, A.S., Zambiasi, R., Scamparini, A.R.P., 2000. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: Nishinari, K. *Hydrocolloids*. Elsevier, Amsterdam, pp.187-191.

Vendruscolo, C.T., Moreira, A.S., Vendruscolo, J.L., 2006. Universidade Federal de Pelotas; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Clima. Process for preparing a xanthan biopolymer. International Patent WO/2006/047845.

Wong, G.O., 1974, Method of controlling human appetite. United States Patent No. 3, 843, 786.

Woodard, G., Woodard, M.W., Mcneely, W.H., Kovacs, P., Cronin, M.T.I., 1973. Xanthan gum: safety evaluation by two-year feeding studies in rats and dogs and a three-generation reproduction study in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24, 30-36.

Würgler, F.E., Graf, U., Frei, H., 1985. Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. *Prog. Mutat. Res.* 5, 325–340.

Yüksel, M., Sarikaya, R., Bostanci, N., 2010, Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2682-2687.

CONCLUSÕES GERAIS

As xantanas produzidas por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* foram caracterizadas, através do teste SMART, como desprovidas de potencial genotóxico nas concentrações testadas. As características físicas e químicas analisadas nas xantanas produzidas pelas cepas 101 e 106 estão de acordo com os limites especificados pela FAO e pela literatura pertinente. As xantanas analisadas mostraram elevada viscosidade quando comparadas à xantanas de outras cepas do patovar *pruni*. Portanto, os biopolímeros analisados têm grande potencial para aplicação em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, V. S.; MEDINA-SILVA, R.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. **Mutation Research**, v.583, p.67-74, 2005.
- AMARAL, V. S.; SINIGAGLIA, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. **Environmental Pollution**, v.139, p.469-476, 2006.
- ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), in: HENDERSON, D. S. ***Drosophila* Cytogenetics Protocols**. Totowa: Humana Press, 2004. p.389-412.
- ANDREOPOULOS, A. G.; TARANTILI, P. A. Xanthan gum as a Carrier for controlled release of drugs. **Journal of Biomaterials Applications**, v.16, p.34-46, 2001.
- 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.
- ANVISA. Resolução - RDC nº 61 de 21 de setembro de 2007. Inclusões na lista DCB publicada pela RDC - nº 211, de 17 de novembro de 2006. Lista das Denominações Comuns Brasileiras (DCB-2006). **Diário Oficial da União**, nº 184, p. 36, Brasília, DF, 24 set. 2007.
- APTA. Associação Paulista de Tecnologia de Agronegócios. Workshop de melhoramento e biotecnologia de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/termo_referencia_melhoramento.pdf>. Acesso em: 01 set. 2010.
- 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.

BeMILLER, J.N; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed.Porto Alegre: Artmed, 2010. p.75-130

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

BORGES, C. D. **Estudo das condições operacionais na produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo**. 2007. 120f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.; DE PAULA, R.; FEITOSA, J.; 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, 2009.

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. 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.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S. **Biopolymers**. v.5. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p.259-291.

BRADBURY, J. F. Genus *Xanthomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, 1984. p.199.

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 regulatórias do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, 09 abr. 1965.

BURDOCK, G. A. **Enciclopedia of food and colors additives**. v.3. Boca Raton: CDC Press, 1997.

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.

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

CANUTO, A. P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) -

Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions**. New York: Plenum Press, 1993. p.135-140.

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

COTTRELL, I. W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**, v.19, p.117-131, 1978.

COUTO, A. F.; MOREIRA, A. M.; VENDRUSCOLO, C. T. Índice de aceitabilidade de sobremesa láctea tipo mousse livre de matéria de origem animal. In.: 9ª Mostra da Pós-Graduação da Universidade Católica de Pelotas, 2010, Pelotas. **Anais da 9ª Mostra da Pós-Graduação da Universidade Católica de Pelotas**. Pelotas: UFPEL, 2010.

DANESI, C. C.; BELLAGAMBA, B. C.; DIHL, R. D.; ANDRADE, H. H. R.; CUNHA, K. S.; LEHMANN, M. Evaluation of the genotoxicity of cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil combined treatment in the *Drosophila* wing-spot test. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3120-3124, 2010.

DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTÍZ-MARTTELO, R.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GÓMEZ-ARROYO, S.; GRAF, U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, v.39, p.33-43, 1999.

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

De VUYST, L.; 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.

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.

DIHL, R. R.; BERETA, M. S.; AMARAL, V. S.; LEHMANN, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons are inducers of mitotic homologous recombination in the wing-spot test of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.2344–2348, 2008.

DIHL, R. R.; DA SILVA, C. G. A.; AMARAL, V. S.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. Mutagenic and recombinagenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP,

organic extracts in the *Drosophila* wing-spot test. **Environmental Pollution**, v.151, p.47-52, 2008.

EASTWOOD, M. A.; BRYDON, W. G.; ANDERSON, D. M. W. The dietary effects of xanthan gum in man. **Food Additives and Contaminants**, v.4, p.17-56, 1987.

EL-SALAM, M. H.; FADEL, M. A.; MURAD, H. A. Bioconversion of sugarcane molasses into xanthans gum. **Journal Biotechnology**, v.33, p.103-106, 1994.

ERCIYAS, A. F.; ERCIYAS, K.; SARIKAYA, R. Genotoxicity of two mouthwash products in the *Drosophila* Wing-Spot Test. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.2577-2580, 2010.

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

FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados**. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FRANCHI, L. P.; PENTIADO, N. H. G. R.; SILVA, R. N.; GUIMARÃES, N. N.; JESUINO, R. S. A.; ANDRADE, H. H. R. A.; LEHMANN, M.; CUNHA, K. S. Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.578-582, 2009

FREI, H., WÜRGLER, F.E., Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.297–308, 1988.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v.11, p.315-325, 1996.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E. *Drosophila* wing spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic hydrocarbons. **Mutation Research**, v.234, p.71-80, 1990.

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

GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, v.51, p.168-173, 1995.

GRAF, U.; MORAGA, A.A.; CASTRO, R.; CARRILLO, E.D. Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, p.423-430, 1994.

GRAF, U.; van SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67, 1992.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E. Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, p.835-842, 1986.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p.153-188, 1984.

GREEN, M.; SHELEF, G.; BILANOVIC, D. The effect of various citrus waste fractions on xanthans fermentations. **Chemical Engineering Journal**, v.56, p.37-41, 1994.

GUILLOT, J. P.; GIAUFFRET, J. Y. ; MARTINI, M. C. ; GONNET, J. F. ; SOULE, G. Safety evaluation of gum and thickeners used in cosmetic formulation. **International Journal Cosmetic Science**, v. 4, p. 53-66. 1982.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and Biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food biotechnology: microorganisms**. New York: VCH Publisher, 1994. p.495-514.

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

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

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

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil – 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 30 set 2010.

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

JACOCIUNAS, L. V.; DIHL, R. R.; LEHMANN, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. Recombinogenic activity of water and sediment from Sinos River and Araçá and Garças Streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test. **Science of the Total Environment**, v.408, p.571–577, 2010.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the exocellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v.45, n.1, p.275-285, 1975.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v.28, n.5, p.34-40, 1974.

KASTEMBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**. v.9, p.527-549, 1970.

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

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. Production, properties and applications of xanthan. **Progress in Industrial Microbiology**, v.19, n.1, p.319-371, 1984.

KLAIC, P. M. A. **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 em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KLAIC, P. M. A.; NUNES, A. M.; RIBEIRO, A. S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: sample treatment by acid digestion, **Carbohydrate Polymers**, article in press, 2010.

KNOTT, W. B.; JOHNSTON, C. D. **Keltrol[®], acute inhalation toxicity to rats**. Woodard Research Corporation, Herndon, VA, USA, 1973.

KUCK, L. S.; ALVES, F. G.; SOMACAL, S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Desenvolvimento de *mousse* de mirtilo (*Vaccinium ashei* reade) livre de ingredientes de origem animal. In.: XII Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2010, Pelotas. **Anais do XII Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas**. Pelotas: UFPEL, 2010.

LAUFFER, M. L.; ALVES, F. G.; BOROWSKI, J. M.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da aplicação de diferentes hidrocolóides para elaboração de *mousse* de maracujá livre de ingredientes de origem animal. In.: XIX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2010, Pelotas. **Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**. Pelotas: UFPEL, 2010.

LILLY, V. G.; WILSON, H. A.; LEACH, J. G. Bacterial polysaccharides II. Laboratory Scale production of polysaccharides by species *X. campestris*. **Applied Microbiology**, v.6, n.2, p.105 -108, 1958.

LINDSLEY, D. L.; ZIMM, G. G. **The Genome of *Drosophila melanogaster***. Academic Press, New York. p.1133, 1992.

LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolyses of xanthan gum. **Carbohydrates Research**, v.58, p.433-438, 1977.

MAUGERI-FILHO, F. Produção de Biopolímeros. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W., **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, 2001. p.125-153.

MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C. T.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B. Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv phaseoli. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, n.2, p.87-95, 2008.

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: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial gums**, New York: Academic Press, 1973. p.473-497.

MOCHI, A. C.; SCAMPARINI, A. R. P. Xanthan gum production from brazilian strains. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food Hydrocolloids**. New York: Plenum Press, 1994. p.147-150.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni**. 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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**, Oxford, v.15, n.4-6, p.469-474, 2001.

MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharide and their applications**. New York: Basel Marcel Dekker, 1995. p.341-375.

MORRIS, V. J. Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and Stabilisers for the Food Industry**. Oxford: Pergamon Press, 1992. p.315-328.

PARFITT, K. Stabiling and suspending agents. In: **Martindale - The complete drug reference**. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, p.1470, 1999.

PEREIRA, E. R. B. **Cobertura de Framboesa (*Rubus idaeus*): efeito de espessantes e ácidos no processamento e estabilidade**. 2009. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.

PINTO, E. P.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C. T. Chemical deacetylation natural xanthan (Jungbunzlauer). **Revista Polímeros**, article in press, 2010.

PRB, POPULATION REFERENCE BUREAU. La Fiche de données sur la population mondiale - 2009. Disponível em: < http://www.prb.org/FrenchContent/Articles/2009/09wpdsarticle_fr.aspx>. Acesso em: 30 set 2010.

PREICHARDT, L. D. **Aplicação de xantana comercial e xantana sintetizada por *Xanthomonas arboricola* pv pruni em bolos sem glúten**. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

RODRIGUES, S. A. **Efeito de acidulantes, espessantes e cultivares nas características físico-químicas e estruturais de topping de Mirtilo**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ROLL, R. **Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv pruni através de ensaios cometa e teste de micronúcleos**. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.77, n.1, p.65-71, 2009.

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p.193-264.

SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. Order III. Xanthomonadales ord. nov. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, v.2, 2005. p.63-90.

SÁNCHEZ, A.; RAMÍREZ, M. E.; TORRES, L. G.; GALINDO, E. Characterization of xanthans from selected *Xanthomonas* strains cultivated under constant dissolved oxygen. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, n.4, p.443-451, 1997.

SCHNEIDER, L. E.; AMARAL, V. S.; DIHL, R. R.; LEHMANN, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. Assessment of genotoxicity of Lidocaine, Prilonest and Septanest in the *Drosophila* wing-spot test. **Food and Chemical Toxicology**, v.47 p.205-208, 2009.

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

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

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

STANKOWSKI, J.; MUELLER, B.; ZELLER, S. Localization of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, n.241, p.321-326, 1993.

STARK, C. B.; RODRIGUES, S. A.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Xantana e mirtilo em iogurte. In.: XVI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2007, Pelotas. **Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**. Pelotas: UFPEL, 2007.

St. JOHN, M. A. R.; XU, T. Insights from model systems-Understanding human cancer in a fly? **American Journal of Human Genetics**, v.61, p.1006-1010, 1997.

SUTHERLAND, I. W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. **International Biodeterioration and 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. Xanthan In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall, 1993. p.363-388.

TEIXEIRA, A. M. **Tempo de fermentação na produção e qualidade de xantana e no perfil eletroforético de *X. campestris* pv pruni**. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

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

TUBARI, E.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Rheological properties and quality of rice cakes formulated with different gums and an emulsifier blend. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.305-312, 2008.

ÜCKER, C. L.; SOMACAL, S.; RODRIGUES, A. A.; RODRIGUES, S. A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. *Topping* de champignon: aceitação sensorial e intenção de compra. In: 19º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Católica de Pelotas, 2010, Pelotas. **Anais do 19º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Católica de Pelotas**. Pelotas: UCPEL, 2010.

van SCHAIK, N.; GRANT, A.; RUBENCHIK, I.; GRAF, U. Use of *Drosophila* test systems for genotoxicity testing of herbal teas. **Immunology Hematology Research**, v.3, p.199-202, 1984.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n.3, p.472-489, 1995.

VEIGA, I. G. **Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele**. 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, v.1, p.187-191, 2000.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Clima. **Process for preparing a xanthan biopolymer**. International Patent WO/2006/047845, 2006.

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v.296, p.1-11, 2005.

WONG, G. O. **Method of controlling human appetite**. United States Patent No. 3,843,786. 1974

WOODARD, G.; WOODARD, M. W.; MCNEELY, W. H.; KOVACS, P.; CRONIN, M.T.I. Xanthan gum: safety evaluation by two-year feeding studies in rats and dogs and a three-generation reproduction study in rats. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.24, p.30-36, 1973.

WÜRGLER, F.E., GRAF, U., FREI, H. Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. **Progress in Mutation Research**. v. 5, p. 325–340. 1985.

WYPYCH, T. C. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas bucoadesivos contendo diclofenaco sódico**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

XUEWU, Z.; et al. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v.27, n.2, p.203-209, 1996.

YÜKSEL, M.; SARIKAYA, R.; BOSTANCI, N. Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.2682-2687, 2010.

ZAHA, A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. 336p.