

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES
DERIVADOS DE XANTANA**

Mirian Tavares da Silva
Bacharel em Química de Alimentos

Pelotas, 2018.

Mirian Tavares da Silva

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DERIVADOS DE
XANTANA**

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

Comissão de orientação: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira
Prof^a. Dr^a. Lígia Furlan

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586o Silva, Mirian Tavares da

Obtenção e caracterização de antioxidantes derivados de xantana. / Mirian Tavares da Silva ; Angelita da Silveira Moreira, orientadora ; Lígia Furlan, coorientadora. — Pelotas, 2018.

93f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Atividade antioxidante. 2. DPPH. 3. ABTS. 4. Hidrólise. 5. Peróxido de hidrogênio. I. Moreira, Angelita da Silveira, orient. II. Furlan, Lígia, coorient. III. Título.

CDD : 664

Banca Examinadora:
Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira (Orientadora);
Prof.^a Dr.^a Rosane da Silva Rodrigues;
Prof.^a Dr.^a Ligia Furlan;
Prof.^a Dr.^a Alzira Yamasaki.

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, por me amar, me entender, me dar forças e socorro nos momentos difíceis.

Ao Instituto Federal Sul-Rio-Grandense – Campus Pelotas Visconde da Graça, em especial à Coordenação de Agroindústria, por toda infraestrutura disponibilizada para realização das análises.

Ao colega Gerson, pela enorme ajuda em termos de conhecimento, compreensão e auxílio diário.

À minha família, principalmente minha mãe Alda e meu marido Otavio que cuidaram de minha pequena Louise e entenderam meus momentos de angústia, para que eu pudesse realizar esse trabalho.

À minha orientadora prof. Dr.^a Angelita da Silveira Moreira, pela amizade, respeito, carinho, dedicação, compreensão, carinho e ensinamentos.

À professora Dr.^a Ligia Furlan, pela amizade, carinho, dedicação, sugestões, auxílio e ensinamentos.

À professora Dr.^a Rosane da Silva Rodrigues, pelas conversas, presteza, carinho, amizade e dedicação com a qual sempre me tratou.

Aos membros da banca pelas contribuições dadas a este trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biopolímeros pelo auxílio, amizade e apoio.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste projeto.

Obrigada.

“O meu corpo e o meu coração poderão fraquejar,
mas Deus é força do meu coração
e a minha herança para sempre.”
Salmo 73:26.

Resumo

SILVA, Mirian Tavares. Obtenção e caracterização de antioxidantes derivados de xantana. 2018. 68.f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Estudos recentes têm demonstrado o potencial antioxidante de polissacarídeos, dentre os quais destaca-se a xantana, um espessante microbiano com propriedades reológicas e estabilidade excepcionais. Segundo uma nova linha de pesquisa, a atividade antioxidante desse polissacarídeo pode ser aumentada, por meio de modificações químicas. Entretanto, o fato de não haver um método adequado à determinação do potencial antioxidante da xantana natural, devido sua elevada viscosidade, tem prejudicado a avaliação da eficiência das modificações químicas propostas para a goma. Assim, objetivou-se, neste trabalho, adaptar os tradicionais métodos dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) à determinação da atividade antioxidante de xantana e, por meio de hidrólise com peróxido de hidrogênio, obter derivados de maior atividade antioxidante e que, ao mesmo tempo, mantenham uma viscosidade elevada. Realizaram-se três adaptações a partir das determinações das interferências da amostra xantana nos métodos e propuseram-se formas de viabilizar as análises; considerou-se mais adequada a adaptação do método ABTS pela praticidade e reprodutibilidade. Utilizou-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 para determinação da influência da proporção de H_2O_2 e do tempo de reação sobre os parâmetros atividade antioxidante, teor de acetila e piruvato e viscosidade dos derivados de xantana produzidos. A melhor condição de hidrólise estudada foi 1,6% de H_2O_2 e 24h de reação a 65°C em pH13. O pH básico da reação desacetilou a xantana, mas não afetou o teor de piruvato. Não foi possível produzir um derivado com aumento do potencial antioxidante sem perda excessiva de viscosidade. O incremento do percentual de inibição obtido pela hidrólise da goma xantana com H_2O_2 , embora tenha sido significativo, não se mostrou satisfatório para justificar a modificação química.

Palavras Chave: determinação de atividade antioxidante; DPPH; ABTS; hidrólise, peróxido de hidrogênio.

Abstract

SILVA, Mirian Tavares. Obtention and characterization of antioxidant derived from xanthan. 2018. 68.f. Dissertation (Master degree) - Post-Graduate Program in Agroindustrial Science and Technology. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Recent studies have demonstrated the antioxidant potential of polysaccharides, such as xanthan, a microbial thickener with exceptional rheological properties and stability. According to a new line of research the antioxidant activity of this polysaccharide can be increased by means of chemical modifications. However, the fact that there is no adequate method for the determination of the antioxidant potential of natural xanthan due to its high viscosity has been detrimental to the evaluation of the efficiency of the chemical modifications proposed for the gum. The aim of this work was to adapt the traditional methods of the radicals DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline) 6-sulphonic acid) to the determination of the antioxidant activity of xanthan and, by means of hydrolysis with hydrogen peroxide, to obtain derivatives of greater antioxidant activity and that, at the same time, maintain a high viscosity. Three adaptations were made from the determinations of the interferences of the xanthan sample in the methods and it was proposed ways of making the analyzes feasible; it was considered more appropriate to adapt the ABTS method for practicality and reproducibility. The Rotational Central Compound Design (DCCR) 2^2 was used to determine the influence of the H_2O_2 ratio and the reaction time on the parameters antioxidant activity, acetyl and pyruvate content and viscosity of the xanthan derivatives produced. The best studied hydrolysis condition was 1.6% H_2O_2 and 24h reaction at 65°C in pH13. The basic pH of the reaction deacetylated xanthan, but did not affect the pyruvate content. It was not possible to produce an oligosaccharide with increased antioxidant potential without excessive loss of viscosity. The increase in the percentage of inhibition obtained by the hydrolysis of xanthan gum with H_2O_2 , although significant, was not satisfactory to justify the chemical modification.

Keywords: determination of antioxidant activity; DPPH; ABTS; hydrolysis, hydrogen peroxide.

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura do monômero polimérico de goma xantana.....	19
Figura 2	Reação do radical DPPH [•] frente ao composto fenólico quercetina. Diferença na coloração entre o início e final da reação, após a estabilização do radical	24
Figura 3	Reação de geração do radical ABTS ^{•+} com persulfato de potássio; a) estruturas químicas; b) esquematização das reações parciais e global.....	25
Figura 4	Redução do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante.....	26

Capítulo 1

Figura 1	Wavelength absorbance spectra of various xanthans. a) Xanthans Fufeng®, Jungbunzlauer® (Jung), Sigma® and pruni in aqueous solution at 0.04% (w/v); b) xanthan Fufeng® at several proportions (w/v).....	40
Figura 2	Percentages of DPPH [•] inhibition by xanthan (Fufeng®) at between 0.00047 and 0.8% (w/v), according to the traditional DPPH method, and linearity curves.....	42
Figura 3	Percentages of DPPH [•] inhibition and linearity curves: a) obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 1% (m/v), according to the DPPH I modification; b) obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 2% (m/v), according to the DPPH I modification.....	44
Figura 4	Percentages of DPPH [•] inhibition and linearity curves obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 3% (w/v), according to the DPPH II modification.....	46
Figura 5	Percentage of ABTS [•] inhibition and linearity curve obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 1.5% (m/v), according to the modified ABTS [•] method	47
Figura 6	DPPH I, DPPH II and ABTS adaptation time curves, to Jungbunzlauer® xanthan solution at 1% (w/v).....	51

Capítulo 2

Figura 1	Superfície de resposta para o percentual de inibição dos derivados de xantana produzidos pela hidrólise segundo o DCCR 2 ²	67
Figura 2	Curvas de viscosidade (mPas) <i>versus</i> taxa de deformação (0,01 a 1000s ⁻¹) a 25°C de soluções aquosas (1% m/v) dos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2 ²	69

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1	Antioxidant activity of xanthans Fufeng®, Sigma®, Jungbunzlauer® and pruni, as a percentage of radical inhibition.....	49
----------	--	----

Capítulo 2

Tabela 1	Delineamento experimental fatorial completo das condições para modificação química da goma xantana.....	61
Tabela 2	Matriz do planejamento experimental tipo DCCR 2 ² com valores codificados e reais e variáveis respostas para as xantanas modificadas.....	64
Tabela 3	Teste T de Student para análise de significância entre os pontos centrais (PC) do planejamento experimental DCCR 2 ² e a xantana nativa (controle).....	65
Tabela 4	Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H ₂ O ₂ , tempo de reação e suas interações no percentual de inibição do radical ABTS pelos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2 ²	66
Tabela 5	Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H ₂ O ₂ , tempo de reação e suas interações no teor de acetila dos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2 ²	68
Tabela 6	Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H ₂ O ₂ , tempo de reação e suas interações no teor de piruvato dos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2 ²	68
Tabela 7	Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H ₂ O ₂ , tempo de reação e suas interações na viscosidade.....	70

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAHP	2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C.V.	Coeficiente de Variância
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FDA	Food and Drug Administration
IC ₅₀	Concentração necessária do antioxidante para reduzir 50% do radical
INS	International Numbering System
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NRRL	Northern Regional Research Laboratories
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P.A.	Padrão Analítico
PC	Ponto Central
R ²	Coeficiente de Determinação
TEMPO	N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
XGOSMA	Xantana-anidrido maleico
XGOSMA-1	Xantana-anidrido maleico ensaio 1
XGOSMA-2	Xantana-anidrido maleico ensaio 2
XGOSPA	Xantana-anidrido ftálico
XGOSPA-1	Xantana-anidrido ftálico ensaio 1
XGOSPA-2	Xantana-anidrido ftálico ensaio 2
%I	Percentual de Inibição Antioxidante

Sumario

1 Introdução.....	14
1.2 Hipótese.....	15
1.3 Objetivo.....	15
1.3.1 Objetivos Específicos.....	15
2 Revisão da literatura.....	17
2.1 Antioxidantes.....	17
2.2 Xantana.....	18
2.2.1 Atividade antioxidante da xantana.....	20
2.3 Métodos de determinação da capacidade antioxidante.....	23
2.3.1 Determinação da atividade antioxidante da xantana.....	26
3 Capítulo 1 - Adaptation of the ABTS and DPPH methods for antioxidant activity determination of xanthan gum.....	29
3.1 Introduction.....	32
3.2 Materials and methods.....	34
3.2.1 Materials.....	34
3.2.2 Preparation of xanthan solutions.....	35
3.2.3 Determination of the UV-Vis absorptions of xanthan gum.....	35
3.2.4 Determination of antioxidant activity by the traditional DPPH' inhibition method.....	35
3.2.5 Adaptation of the DPPH' inhibition method.....	36
3.2.5.1 DPPH I adaptation.....	36
3.2.5.2 DPPH II adaptation.....	37
3.2.6 Adaptation of the ABTS' inhibition method.....	38
3.2.7 Time curve for analysis of ABTS' and DPPH' inhibition activities.....	39
3.2.8 Statistical analysis.....	39
3.3 Results and discussion.....	39
3.3.1 UV-Vis absorption spectrum of xanthan.....	39
3.3.2 Traditional DPPH' inhibition method.....	41
3.3.3 Adaptations of the DPPH' inhibition method.....	43
3.3.4 Adaptation of the ABTS' inhibition method.....	46

3.3.5 Application of adaptations to various xanthans.....	48
3.3.6 Time curve.....	50
3.4 Conclusions.....	52
3.5 References.....	53
4 Capítulo 2 – Caracterização de derivados de xantana por hidrólise parcial com peróxido de hidrogênio	58
4.1 Introdução.....	59
4.2 Material e Métodos.....	60
4.2.1 Materiais.....	60
4.2.2 Reação de Modificação.....	60
4.2.3 Atividade Antioxidante.....	61
4.2.4 Determinação do Teor de Piruvato.....	62
4.2.5 Determinação do Teor de Acetila.....	63
4.2.6 Análise de Viscosidade.....	63
4.2.7 Estatística.....	64
4.3 Resultados e Discussão.....	64
4.3.1 Resultados.....	64
4.3.2 Atividade Antioxidante.....	65
4.3.3 Teor de Acetila.....	67
4.3.4 Teor de Piruvato.....	68
4.3.5 Viscosidade.....	69
4.4 Conclusão.....	70
4.5 Referências Bibliográficas.....	71
5 Considerações Finais.....	79
6 Referências.....	80

1 Introdução

A xantana é um hidrocoloide polissacarídeo sintetizado por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, de elevado interesse industrial, principalmente para as indústrias de alimentos, fármacos e petróleo. O interesse, que já dura quase 60 anos, deve-se principalmente a suas propriedades reológicas, pois é altamente solúvel em água e viscosa mesmo em baixas concentrações (0,05-1,0%), estável em uma ampla faixa de pH e temperatura e compatível com muitos sais e ingredientes alimentares (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; SALEH; SIMARANI; ANNUAR, 2017).

Recentemente, a atividade antioxidante dos polissacarídeos tem atraído maior atenção; dentre esses, destaca-se a goma xantana, para a qual já verificou-se inibição significativa da oxidação induzida por Fe^{2+} em óleo de soja (SHIMADA et. al, 1992), potencial redutor de radicais livres inibindo a peroxidação lipídica (TROMMER; NEUBERT, 2005), efeito protetor na degradação do β -glucano por despolimerização induzida por radical $\text{OH}^\cdot$ (PAQUET; TURGEON; LEMIEUX, 2010), bem como efeito protetor de polifenóis, principalmente antocianinas, reduzindo sua degradação (RODRIGUES, 2006; FIORAVANTE et al, 2017), entre outros.

Novos estudos, entretanto, apontam que algumas modificações da xantana podem potencializar a sua atividade antioxidante. Delattre et. al. (2014) formaram um sal sódico de ácido poliglicurônico, chamado de “xanthouronan”, por oxidação da xantana com NaOCl/NaBr , que teria atividade antioxidante maior que a xantana natural. Por outro lado, Xiong (2013) submeteu a xantana à hidrólise em meio ácido e alcalino; posteriormente, na sequência dos estudos, juntamente com colaboradores, promoveu a reação dos derivados com anidrido maleico e anidrido ftálico (XIONG et al, 2014). Entretanto, os autores não obtiveram êxito na determinação da atividade antioxidante da xantana natural.

São poucos os relatos sobre estudos que tenham alcançado resultados através de análise direta de potencial antioxidante da xantana natural; em sua maioria os autores usaram métodos indiretos, nos quais a goma é aplicada em um produto e posteriormente verificando a atividade antioxidante do mesmo por diferentes métodos (SHIMADA, 1992; PAQUET, 2010; XIONG, 2013; DELATTRE, 2015).

Nesse contexto, ficou clara a importância de investigar a viabilidade da aplicação das metodologias tradicionais de análise de atividade antioxidante para goma xantana, bem como adaptar essas metodologias para que possam ser utilizadas como instrumentos de avaliação nos estudos de obtenção de antioxidantes derivados de xantana por meio de modificações químicas.

1.2 Hipótese

Os métodos tradicionais de determinação de atividade antioxidante baseados nos radicais DPPH e ABTS são adequados à xantana. E a hidrólise parcial do polímero xantana com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) influencia positivamente sua atividade antioxidante, tornando o polímero mais reativo que em sua forma original; mantendo uma viscosidade aceitável.

1.3 Objetivo

Determinar a atividade antioxidante da xantana natural e uma condição de hidrólise da xantana com peróxido de hidrogênio capaz de aumentar o seu potencial antioxidante sem reduzir significativamente sua capacidade viscosificante.

1.3.1 Objetivos Específicos

- Adaptar as metodologias dos radicais DPPH• e ABTS• à determinação da atividade antioxidante de xantana natural (não modificada quimicamente).
- Determinar as condições ideais de tempo e concentração de H_2O_2 para hidrolisar parcialmente a xantana, visando o aumento de sua atividade antioxidante.

- Avaliar a influência da reação de hidrólise com H_2O_2 na propriedade viscosificante da goma xantana.
- Avaliar a influência do teor de piruvato e acetil na atividade antioxidante da goma xantana e derivados obtidos.

2 Revisão da Literatura

2.1 Antioxidantes

Substâncias antioxidantes podem ser definidas como compostos químicos que inibem oxidações ou que, quando presentes em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminuem ou inibem significativamente os efeitos desencadeados pela ação de radicais livres e compostos oxidantes (ARAÚJO, 2008).

Os radicais livres são moléculas geradas no organismo, durante o processo de redução do oxigênio, contendo um ou mais elétrons não pareados na última camada eletrônica, capazes de subsistirem independentemente. São altamente instáveis com meia-vida curta e quimicamente muito reativos, podendo causar danos por reagirem com praticamente qualquer molécula que entrem em contato (GONÇALVES, 2008).

Alguns radicais, quando em baixas concentrações, podem atuar de maneira benéfica; relacionando-se a processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros. Mas se produzidos em excesso ou na deficiência dos mecanismos de defesa, ocorre o chamado estresse oxidativo, que altera funções fisiológicas normais do organismo, gerando processos como a peroxidação de lipídeos de membrana e a agressão a proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Os danos causados pelo estresse oxidativo têm sido associados a doenças degenerativas como aterosclerose, diabetes, câncer, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e envelhecimento; assim, a utilização de antioxidantes pode ser fundamental para prevenir e/ou diminuir os riscos causados por radicais livres (GONÇALVES, 2008; LI; LI; ZHOU, 2007; PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012).

Além dos diversos problemas à saúde, os radicais livres podem interferir na qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, por atuarem principalmente nas alterações causadas pela oxidação, tais como rancificação das gorduras (óleos vegetais, gorduras animais e carnes animais que contenham gordura), escurecimento das frutas e demais produtos vegetais ricos em polifenóis, como antocianinas, descoloração das carnes e deterioração por oxidação dos sucos de frutas cítricas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A indústria alimentícia utiliza antioxidantes para evitar a deterioração dos produtos, aumentando a vida de prateleira dos mesmos e conservando o seu valor nutricional; mas também são de grande interesse na área da saúde, pois ajudam na proteção das células e tecidos contra danos oxidativos (WANG et. al., 2012).

Podemos classificar os antioxidantes disponíveis em sintéticos ou naturais. De modo geral os sintéticos são compostos fenólicos contendo vários graus de substituintes de alquila, enquanto os naturais são substâncias pertencentes a várias classes funcionais, como organossulfurados, fenóis e terpenos, entre outros, que fazem parte da constituição de matérias-primas vegetais. Os sintéticos são largamente utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica devido a sua alta capacidade antioxidante e menor custo. Contudo, estudos toxicológicos têm demonstrado que algumas dessas substâncias podem ocasionar efeitos nocivos ao organismo (ARAUJO, 2008; MUKAI et al, 1993; ZHENG; WANG, 2001). Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser causados pelo uso de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de encontrar antioxidantes provenientes de fontes naturais que sejam seguros (NASCIMENTO, 2010).

2.2 Xantana

A xantana é um heteropolissacarídeo hidrossolúvel sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas*, através do processo fermentativo aeróbico que utiliza a glicose ou sacarose como principal substrato (BRANDÃO et al., 2008).

Apresenta massa molar aproximada de $2 \cdot 10^6$ Da, podendo atingir até $5 \cdot 10^7$ Da; quimicamente a goma xantana é composta por unidades monoméricas pentassacarídicas, sendo a cadeia principal do polímero constituída por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações β 1-4, e a cadeia lateral consiste em duas unidades de D-manose, alternadas por uma molécula de ácido D-glicurônico. Grupos acetil podem apresentar-se ligados à manose interna na posição O-6, enquanto na manose terminal pode ocorrer ligação de grupos piruvato em O-4 e/ou O-6 (BRANDÃO, 2012; CADMUS et al., 1976; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; JANSSEN; KENNE; LINDBERG, 1975; SLONEKER;

JEANES, 1962). A presença dos ácidos glicurônico, acético e pirúvico tornam-na um polissacarídeo do tipo aniônico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

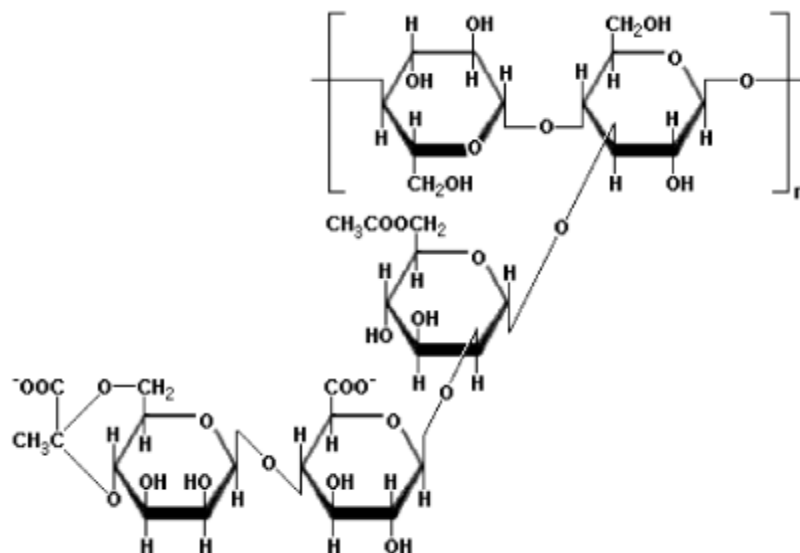


Figura 1- Estrutura do monômero polimérico de goma xantana.

Fonte: NERY, 2008.

A descoberta da xantana se deu na década 1950, pela Northem Regional Research Laboratories (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, que realizou, na época, um estudo para identificar microrganismos capazes de fazer biossíntese de produtos gomosos solúveis em água que tivessem uma possível importância comercial. Até aquele momento, as gomas utilizadas eram originadas de plantas marinhas e terrestres. A maioria desses polissacarídeos, derivados de plantas e algas, tinha o fornecimento e a qualidade variável em função da estação, condições climáticas adversas, entre outras (BORN et al., 2002; LUPORINI; BRETAS, 2008; RAMOS, 2011). O novo polissacarídeo B-1459, ou goma xantana, provocou grande interesse, pois possuía propriedades funcionais únicas, mas a produção em escala piloto teve início apenas em 1960 e sua produção industrial em 1964 (MCNEELY; KANG, 1973; ROSALAM; ENGLAND, 2006). Apesar disso, sua aprovação para utilização em alimentos no Brasil se deu há mais de 50 anos, em 1965 (BRASIL, 1965), enquanto que pelo FDA (Food and Drug Administration) apenas em 1969

(ROCKS, 1971). Atualmente, a xantana apresenta o código internacional para aditivos (International Numbering System) INS 415. Conforme a Resolução nº 45, de 3 de novembro de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) brasileira, a xantana é classificada como agente espessante, estabilizante, emulsificante e espumante que pode, salvo legislação específica, ser utilizada segundo as boas práticas de fabricação (BRASIL, 2010).

Devido a suas características singulares, a xantana é utilizada em diferentes segmentos industriais, entre eles alimentos, fármacos, cosméticos, indústrias químicas e exploração de petróleo e gás, o que se deve, principalmente, a suas propriedades reológicas; pois é altamente solúvel e viscosa, mesmo em baixa concentração (0,05-1,0%), estável em uma ampla faixa de pH e temperatura e compatível com muitos sais e ingredientes alimentares (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; SALEH; SIMARANI; ANNUAR, 2017).

Segundo estudo realizado pela *Grand View Research*, estima-se que o mercado mundial da goma xantana movimenta em torno de 987,7 milhões de dólares americanos em 2020, estando atualmente em constante expansão (RONČEVIĆ et al., 2016), sendo que a indústria de alimentos e bebidas é um dos segmentos com maior consumo da goma (ZION MARKET RESEARCH, 2016). No Brasil, a xantana acompanha a tendência mundial de expansão e, embora seja ainda totalmente importada, estudos para sua produção e mesmo melhoramento seguem sendo conduzidos, visando uma fatia desse mercado.

2.2.1 Atividade antioxidante da xantana

Ao longo dos anos, diferentes espécies, patovares e cepas de *Xanthomonas*, incubadas em diferentes condições operacionais de agitação, aeração, temperatura, pH, meios de cultivo, etc., têm sido alvo de estudos, buscando evidenciar características de interesse (BORGES, 2008). Seguindo essa linha, recentemente pesquisas descobriram que a xantana também pode agir como captador de radicais livres para a prevenção de danos oxidativos.

Pioneiramente, Shimada et al., em 1992, verificaram que a xantana em sinergismo com tocoferóis inibia significativamente a oxidação induzida por Fe^{2+} de óleo de soja contendo 16mg de xantana em 4mL de solução. Trommer (2005), em estudo conduzido com o objetivo de encontrar polissacarídeos com atividade

antioxidante para uso em filtros solares, observou na goma xantana potencial redutor de radicais livres com inibição da peroxidação lipídica, sendo que para os ensaios foi utilizada uma dispersão aquosa de ácido linolênico, contendo 0,002%, 0,004%, 0,04%, 0,08% ou 0,4% dos polissacarídeos, onde se determinou que o efeito protetor da goma xantana aumenta conforme sua concentração. Rodrigues (2006) detectou a potencialidade da xantana em sinergismo com ácido cítrico para preservar antocianinas em *toppings* (*coberturas*) de mirtilo, contendo 0,5% de xantana e 0,11% de ácido cítrico. A xantana também demonstrou efeito protetor parcial na degradação do β -glucano por despolimerização induzida por radical $\text{OH}^\cdot$, ao utilizar-se solução contendo 0,4% de β -glucano e 0,08% de xantana (PAQUET; TURGEON; LEMIEUX, 2010). Seguindo a linha de alimentos, Kuck (2012), Couto (2012) e Fioravante (2017) também verificaram a ação protetora da xantana sobre compostos fenólicos antioxidantes.

Visando potencializar a capacidade antioxidante recentemente descoberta da goma xantana, Wu et al. (2013) prepararam oligossacarídeos por hidrólise do polímero com H_2O_2 em solução alcalina. Foram determinadas como condições ótimas de reação o tempo de 24h, temperatura 65°C , concentração de H_2O_2 1,6% (v/v) e solução de NaOH 3M. Nessas condições o oligossacarídeo formado apresentou aproximadamente 85% em percentual de inibição do radical hidroxila $\text{OH}^\cdot$ a uma concentração de 2,5mg/mL.

Xiong et al. (2013) procuraram aperfeiçoar a reação de hidrólise com H_2O_2 de Wu et al. (2013) e realizaram a mesma em meio ácido ou alcalino, testando os oligossacarídeos produzidos frente à eliminação do ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), dos radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($\text{DPPH}^\cdot$), do H_2O_2 e poder redutor de íons ferrosos, sendo que o tempo de reação de hidrólise utilizado foi de 5 dias, concentração de H_2O_2 em torno de 6% e temperatura ambiente. Nessas condições, a reação em meio alcalino foi mais efetiva, resultando em potencial antioxidante (expresso em IC_{50} , que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir 50% do radical) de $4,03\text{mg mL}^{-1}$ para o ânion superóxido; $2,5\text{mg mL}^{-1}$ para radical hidroxila; $1,16\text{mg mL}^{-1}$ para $\text{DPPH}^\cdot$; $0,8\text{mg mL}^{-1}$ para eliminação de peróxido de hidrogênio e $2,53\text{mg mL}^{-1}$ de poder redutor de íons ferrosos.

Continuando a pesquisa, Xiong et al. (2014) realizaram no oligossacarídeo produzido pela reação de hidrólise com H_2O_2 em meio alcalino, uma etapa posterior que consistiu em reação de síntese com anidrido maleico ou anidrido ftálico. A atividade antioxidante foi avaliada através da eliminação dos radicais ânion superóxido, OH^- , DPPH^* e poder redutor de íons ferrosos. Foram escolhidos dois oligossacarídeos de cada síntese, xantana-anidrido ftálico (XGOSPA-1 e XGOSPA-2) e xantana-anidrido maleico (XGOSMA-1 e XGOSMA-2), com graus de substituição semelhantes entre si; Os resultados foram expressos em IC_{50} . A síntese de xantana-anidrido ftálico (XGOSPA) apresentou maior atividade antioxidante do que a xantana-anidrido maleico (XGOSMA) em todos os sistemas de avaliação antioxidante (os melhores resultados para XGOSMA e XGOSPA, foram para o ânion superóxido 2,65 e $0,75\text{mg mL}^{-1}$; radical hidroxila 1,54 e $0,69\text{mg mL}^{-1}$; pontencial de remoção do radical DPPH^* 0,85 e $0,31\text{mg mL}^{-1}$ e poder redutor de íons ferrosos 0,87 e $0,93\text{mg mL}^{-1}$, respectivamente).

A reação de carboxilação de polissacarídeos, como gelana e curdulara, demonstrou aumentar consideravelmente o potencial destes em relação à eliminação de radicais livres (ELBOUTACHFAITI et al., 2011; YAN et. al., 2014). Esse efeito pode ser explicado pela formação de quelatos entre cátions metálicos (tais como Fe^{2+} e Fe^{3+}), mas também pela diminuição de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre cadeias polissacarídicas. Seguindo essa tendência, Delattre et al. (2015) produziram um sal sódico de ácido poliglicurônico a partir da goma xantana, através da reação de oxidação régio seletiva com hipoclorito de sódio (NaClO) e brometo de sódio (NaBr) usando *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) como catalisador. O produto dessa reação, denominado pelo autor como “xanthouronan”, teve, em concentrações maiores que $2,5\text{g L}^{-1}$, atividade antioxidante frente ao radical DPPH^* semelhante ao do ácido ascórbico (de concentração equivalente), com valores próximos a 98% em percentual de inibição. No entanto, para potencial antioxidante do radical hidroxila, houve um aumento de apenas 10% em relação à xantana nativa e o percentual de inibição se manteve inferior ao do ácido ascórbico.

Durante o desenvolvimento das pesquisas, os autores correlacionaram o potencial redutor da goma xantana com sua composição química, sendo que os

dados coletados apontam que a atividade antioxidante da goma pode estar relacionada ao teor de açúcares redutores e piruvato (XIONG et al., 2013).

2.3 Métodos de determinação da atividade antioxidante

Considerando a grande variedade de substâncias biologicamente ativas, vários métodos têm sido desenvolvidos para estimar a capacidade antioxidante, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos, utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (ALVES et al., 2010; GONÇALVES, 2008; HUANG et al., 2005).

Podemos citar muitas classificações para metodologias de determinação da capacidade antioxidante: ensaios usados para avaliar peroxidação lipídica ou ensaios usados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres, métodos diretos ou indiretos, *in vitro* ou *in vivo*, e etc. A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é realizada utilizando reações químicas para determinar a capacidade da amostra de reagir com estruturas reativas, sendo elas radicais livres presentes ou não no organismo (MAGALHÃES et al., 2008). Atualmente, dentre os ensaios *in vitro* mais utilizados estão os do sequestro do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e do radical ABTS[•] (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

O DPPH[•] é um radical de nitrogênio orgânico caracterizado como estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda sua molécula. Essa deslocalização confere à molécula uma coloração violeta, que possui uma banda de absorção máxima na faixa de 515-520nm (MOLYNEUX, 2004). Na presença de um doador de hidrogênio, esse radical é reduzido e a intensidade de absorção diminui (Figura 2). Quando uma determinada substância antioxidante é adicionada a uma solução de DPPH[•], o radical recebe átomos de hidrogênio H⁺ sendo reduzido a hidrazina e ocorre uma mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES, 2010).

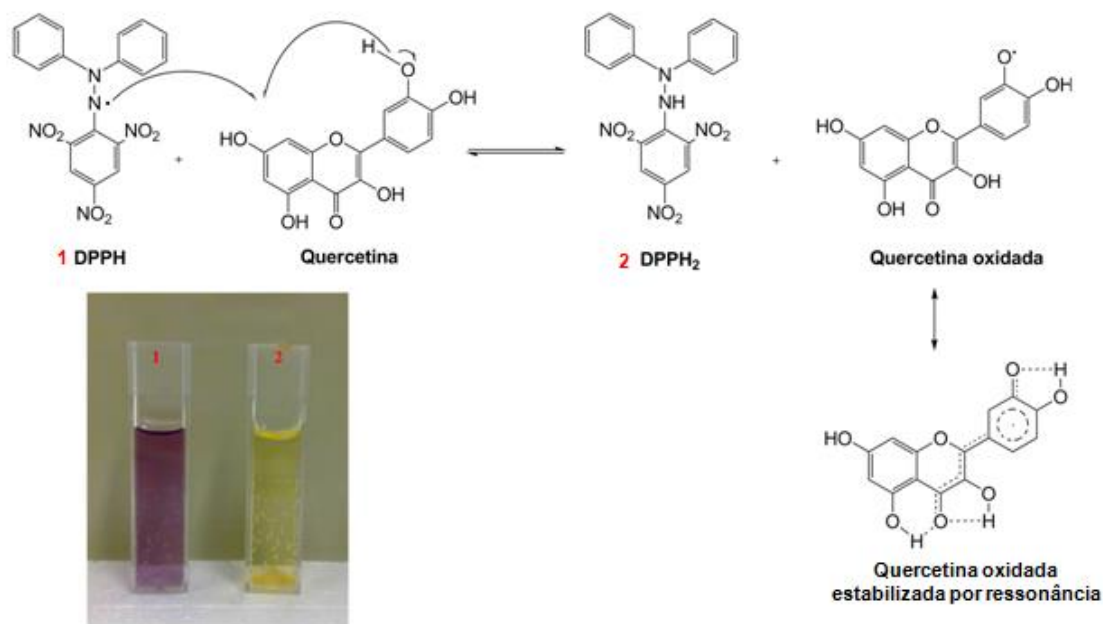


Figura 2 - Reação do radical DPPH[•] frente ao composto fenólico quercetina. Diferença na coloração entre o início e final da reação, após a estabilização do radical.
Fonte: Teixeira, (2016).

O mecanismo de ação do DPPH[•] é predominantemente por transferência simples de elétrons, e, sendo assim, a reação é fortemente influenciada pelo pH e tipo de solvente. Esse ensaio é comumente realizado em solventes orgânicos, como etanol e metanol, pois quantidades maiores que 50% de água provocam a precipitação do DPPH[•]. Como o percentual de consumo de DPPH[•] é dependente de sua concentração, é mais adequado calculá-lo pela razão das absorbâncias (que são proporcionais às concentrações) da amostra e do reagente (MAGALHÃES et al., 2008). Essa análise é considerada, do ponto de vista metodológico, uma das mais fáceis, precisas e reprodutivas na avaliação da atividade antioxidante, mas seus resultados devem ser cuidadosamente analisados. Brand-Williams et al. (1995) por exemplo, ao utilizar o método para avaliar a atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos, concluíram que a interação de um potencial antioxidante com o DPPH[•] depende, sobretudo, de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Outro ponto importante de salientar é que as substâncias analisadas podem interferir nos resultados caso seus comprimentos de onda se sobreponham ao do DPPH[•], ao redor de 515nm, como, por exemplo, os carotenóides. Sendo a acessibilidade estérica o fator determinante da reação, moléculas consideradas

pequenas, que têm melhor acesso ao sítio do radical, podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparada às moléculas grandes.

A detecção da capacidade antioxidante pelo método ABTS[•] envolve o mesmo mecanismo de reação do método DPPH[•] e consiste na habilidade de compostos antioxidantes em eliminar o cátion ABTS⁺, que tem sua absorbância reduzida à medida que reage com os antioxidantes.

O radical ABTS[•] é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-sulfônico; esse radical é um composto cromóforo quimicamente estável, que na fase preliminar do ensaio tem que ser oxidado à sua forma catiônica, ABTS⁺, que possui uma coloração azul esverdeada. Embora apresente absorbância característica primária em 415nm e absorções secundárias em 660, 734 e 820nm, o valor de 734nm é preferido, pois elimina vários interferentes (MAGALHÃES et al., 2008).

Segundo Gülçin (2012), o método original desenvolvido por Miller (1993), baseia-se no tratamento da meta-mioglobina com peróxido de hidrogênio. O complexo perferril da hemeproteína produz o cátion radical ABTS^{•+}. Atualmente, outros métodos podem ser utilizados, tais como peroxidação de raiz-forte, AAHP (2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto), dióxido de manganês ou geração eletroquímica. Mas o método de escolha predominante para gerar o cátion ABTS⁺ tem sido a reação com persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Figura 3).

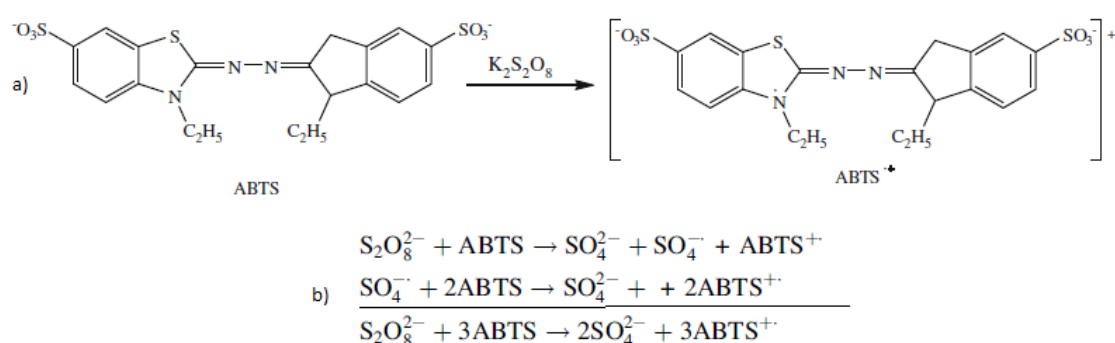


Figura 3 - Reação de geração do radical ABTS^{•+} com persulfato de potássio; a) - estruturas químicas; b) – esquematização das reações parciais e global.

Fonte: GÜLÇİN, 2012.

A determinação do potencial redutor de uma substância frente ao radical ABTS^{•+} baseia-se na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+}, induzindo à perda da coloração do meio reacional, o que pode ser observado na

figura 4. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{•+}$ é determinada em função do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante.

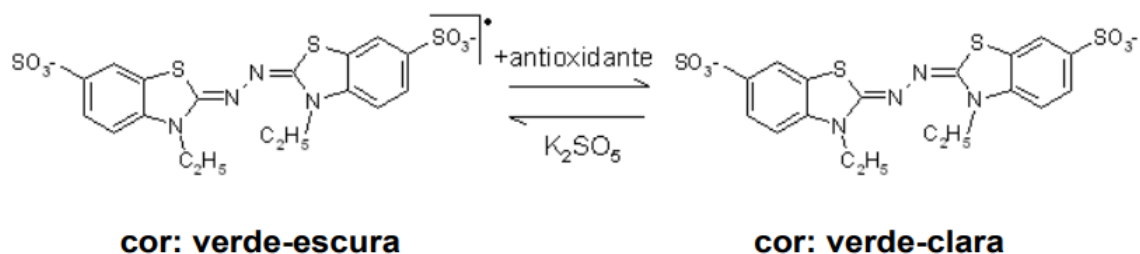


Figura 4 - Redução do radical $ABTS^{•+}$ por um antioxidante.

Fonte: Rufino et al. 2007.

Este método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE et al., 1999). Apesar do radical $ABTS^{•+}$ não ser tão estável quanto o radical $DPPH^{•}$, a simplicidade e rapidez do método têm atraído o interesse de investigadores (NENADIS et al., 2004).

2.3.1 Determinação da atividade antioxidante da xantana

Na investigação do potencial antioxidante da goma xantana, existem poucos relatos de autores que tenham conseguido alcançar resultados através de análise direta da goma. Em sua maioria, os autores usaram métodos indiretos, como Shimada et al. (1992) que aplicaram a xantana em uma emulsão de óleo de soja e determinaram a atividade antioxidante na emulsão com e sem xantana pelos métodos DPPH (KIRIGAYA et. al., 1971) e poder redutor de íons ferrosos (ASAKURA et. al., 1990). Kuck (2012), Couto (2012) e Fioravante (2017) também optaram por aplicar axantana, nesses casos em produtos à base de frutas, e verificaram a atividade antioxidantes produtos pelos métodos DPPH (Brand-Williams et al., 1995) e ABTS (LE et al., 1992), com e sem a adição de xantana; determinaram, dessa forma, que a goma teve efeito protetor sobre algumas classes de compostos fenólicos.

Em nossa pesquisa encontramos apenas um estudo (Delattre et al., 2015) relatando a análise de atividade antioxidante da goma xantana de forma direta; o autor realizou ensaios segundo o método DPPH, adaptado de Yamaguchi et al. (1998), e potencial antioxidante do radical hidroxila, segundo método adaptado de Luo et al. (2010). Resumidamente, para o método DPPH adaptado, as frações foram previamente dissolvidas em diferentes concentrações (0-10 g/L) em água ultra pura. Um mililitro da solução (amostra ou controle) foi adicionado a 1mL de uma solução de DPPH^{*} a 0,1mM em etanol. A solução foi fortemente agitada e incubada 30min à temperatura ambiente (25°C) sobre abrigo da luz. A absorbância foi medida a 517nm em espectrofotômetro. A inibição de DPPH (%) foi calculada utilizando a Equação1.

$$\text{Equação: Percentual de Inibição} = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \right) \times 100 \quad (1)$$

Quanto ao método do radical hidroxila adaptado, as frações foram previamente dissolvidas em diferentes concentrações (0-10g L⁻¹) em água ultra pura. Um volume de 0,2mL da solução (amostra ou controle) foi adicionado a 0,2mL de uma solução aquosa de FeSO₄ a 5mM. Após a agitação, adicionou-se 0,2mL de uma solução aquosa de H₂O₂ a 1% (v/v) à mistura. A solução foi novamente agitada e incubada à temperatura ambiente, por 60 minutos. Adicionou-se 1mL de água ultra pura e a absorbância foi medida a 510nm em espectrofotômetro. A inibição do radical hidroxila (%) foi calculada usando a Equação 2.

$$\text{Equação: Percentual de Inibição} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Segundo os resultados apresentados nesse estudo, a solução aquosa de xantana Jungbunzlauer obteve ~70% de percentual de inibição do radical DPPH^{*} na concentração de 1% (m/v), já em relação a inibição do radical hidroxila o artigo não relatou os valores obtidos, apenas cita que para o objetivo do estudo, não houve resultados significantes.

Xiong et al. (2013), entretanto, tiveram dificuldade, não conseguindo realizar a análise de potencial antioxidante em xantana nativa, pela sua alta viscosidade e forte ação intermolecular.

Tendo em vista as divergências entre os autores, a respeito da realização de análises de atividade antioxidante por métodos diretos com a goma xantana, acredita-se serem necessários maiores estudos nesta área, visando o aprimoramento das metodologias.

3 CAPÍTULO 1 - Adaptation of the ABTS and DPPH methods for antioxidant activity determination of xanthan gum

Manuscrito submetido ao periódico PlosOne

Adaptation of the ABTS and DPPH methods for antioxidant activity
determination of xanthan gum

Mirian T. Silva¹, Lígia Furlan², Gerson R. Dewantier³, Angelita S. Moreira^{1,2*}

¹ Department of Agronomic Science and Technology/Eliseu Maciel School of Agronomy/Postgraduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas - RS, Brazil

² Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas - RS, Brazil

³ Department of Education, Federal Institute Sul-rio-grandense - Campus Pelotas Visconde da Graça, Pelotas - RS, Brazil

*Corresponding author

E-mail: angelitadasilveiramoreira@gmail.com

Abstract

Recent studies have drawn attention to the antioxidant potential of polysaccharides, to xanthan especially. Xanthan gum is a microbial exoheteropolysaccharide, thickener and stabilizer with rheological properties and exceptional stability. There are several methods available to determine the antioxidant activity of compounds *in vitro* or *in vivo*. The 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) spectrophotometric methods are among the most widely used. However, direct xanthan analysis is difficult and poorly reproducible, so most of the studies advocate indirect strategies, by evaluating the antioxidant activity of the product in which xanthan is incorporated. In this context, the objective of the current work was to adapt the ABTS[•] and DPPH[•] radical inhibition methods for direct determination of the antioxidant activity of xanthan. It was verified that for spectrophotometric analyzes it is necessary to consider the intrinsic limitations of the sample, such as overlapping of absorption bands caused by the high viscosity of the solutions. Adjustments were made for the volumes used, temperature, precipitation of the sample at the end of the reaction and inclusion of a so-called correction term. The ABTS method was more suitable than the DPPH[•] inhibition assay, having a coefficient of determination of 0.9929 and coefficient of variation of 2.54%, besides being more practical and successfully applied in the establishing the antioxidant activity of the various xanthan samples tested.

Keywords: Xanthan, Free radicals inhibition, Spectrophotometrics methods.

3.1. Introduction

An antioxidant is defined as a substance or compound that when present in a low concentration compared to that of the oxidizable substrate, significantly decreases or inhibits its oxidation [1]. From the biochemical perspective, antioxidants play an essential role in preventing the damage caused by oxidative stress generated by free radicals and related to several diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes and aging [2,3]. Antioxidant consumption is linked to a healthy diet, due to the associated health benefits, but the application of antioxidants goes beyond the field of medicine and is widely used in the food, drug and other industries [4].

The antioxidant activity of polysaccharides has been known and studied since 1992 [5]. Xanthan gum is a hydrocolloid produced by fermentation through phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas*. It has a high commercial interest, mainly in the food, pharmaceutical, paints and oil industries [6,7].

When associated with primary antioxidants, xanthan was shown to significantly inhibit the Fe^{2+} -induced oxidation in soybean oil [5]. Subsequent work, however, revealed this polysaccharide could act as an antioxidant. It has demonstrated free radical reducing potential and, consequently, lipid peroxidation inhibition [8], a protective effect against OH radical-induced depolymerization of β -glucan [9], as well as providing protection (reduction of degradation) to polyphenols, mainly anthocyanins [10]. Studies have also been conducted to increase the antioxidant activity of natural xanthans, by various chemical modifications [11,12].

To evaluate the *in vitro* or *in vivo* antioxidant activity of various substances and compounds, several methods have been developed. Two of the most

commonly used methods are 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). DPPH[•] is a free radical that can be obtained directly, without prior preparation, whereas ABTS[•] is produced after a reaction, which may be chemical (manganese dioxide, potassium persulfate, 2,2'-azo-bis-[2-amidinopropane] dihydrochloride); enzyme (peroxidase, myoglobin) or electrochemical [13]. Both assays present excellent stability under certain conditions and are based on spectrophotometric measurements of the emitted or absorbed electromagnetic radiation by the substances [13]. Although ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy is widely accepted and used, this technique has limitations, and deviations from the linear relationship between absorbance (ABS) and concentration may occur at concentrations above 0.01 mol L⁻¹. Another noteworthy point is that in the analysis of mixtures of components there may be an overlap of the electronic transition or charge transfer bands in the same solvent [14].

A few investigations into the antioxidant potential of xanthan directly analyzed this biopolymer, but most authors used indirect methods, applying the gum in a product and later verifying the antioxidant activity of the same by various techniques, among them, DPPH and ABTS [5,8,9]. Xiong [11] confirmed the difficulty in analyzing the antioxidant potential of native xanthan due to its high viscosity and strong intermolecular action. In contrast, Delattre [12] directly evaluated the antioxidant activity of xanthan gum, using the DPPH[•] inhibition method adapted from Yamaguchi et al. [15] and the OH radical test adapted from Luo et al. [16].

Since xanthan gum is a high molecular weight polysaccharide, which develops viscous solutions even at low concentrations, the viscosity can interfere

with the linearity between ABS and concentration. Furthermore, if the sample absorbs at the same wavelength as the target compound, it can lead to band overlapping. The objective of this work was to adapt the ABTS[•] and DPPH[•] inhibition methods to the specific characteristics of xanthan gum, determine possible interferences, propose solutions and evaluate the viability of the techniques.

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Materials

The commercial xanthans included in the adaptations of the assays were Fufeng® (China, distributed by Farmaquímica, Brazil), Sigma® (Germany) and Jungbunzlauer® (Switzerland), as well as xanthan pruni (produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni strain 106, at the Laboratory of Biopolymers of the Center of Technological Development of the Federal University of Pelotas, according to patents BR122014030015-8 and PI 0406309-0 [17]). DPPH (Sigma-Aldrich®, Germany), ABTS (Sigma-Aldrich®, Germany), potassium persulfate (Merck®, Germany) and ethanol absolute analytical grade (Vetec®, Brazil) were purchased from the indicated suppliers. The tests were performed in a spectrophotometer model T90 (PG Instruments®, United Kingdom) and an ultrasonic bath model Soniclean 2 (Ultrasonic Sanders®, Brazil).

3.2.2. Preparation of xanthan solutions

Solutions of xanthan ranging from 1 to 3% (w/v) were prepared by dissolving in distilled water and heating at 80°C for 30 min until complete homogeneity. Solutions between 0.0004% and 0.8% were obtained by diluting the 1% solution. The xanthans Fufeng®, Sigma®, Jungbunzlauer® and pruni were used in the UV-Vis absorption and applicability spectrum analyzes. In the other analyzes, only xanthan Fufeng® was studied.

3.2.3. Determination of the UV-Vis absorptions of xanthan gum

To determine the wavelengths where the xanthan absorbs more intensely, a 0.04% (w/v) solution was scanned from 190 to 700 nm, in a 1 cm optical quartz cuvette.

3.2.4. Determination of antioxidant activity by the traditional DPPH• inhibition method

To evaluate the antioxidant activity, we initially chose the DPPH• inhibition method, used by Delattre [12], according to Yamaguchi [15]. Briefly, 1 mL of 0.1 mM DPPH solution in ethanol was added to 1 mL of 0.4% (w/v) aqueous xanthan solution. The mixture was shaken vigorously and left to stand at room temperature (25°C), in the absence of light, for a reaction time of 30 min. The ABS was measured at 517 nm. The percentage DPPH inhibition was calculated as follows:

$$Inhibition (\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

where A_c and A_s are, respectively, the absorbances of the control and sample.

3.2.5. Adaptation of the DPPH[•] inhibition method

Two methods were developed by adaptations of the DPPH[•] scavenging activity test. Both were based on the protocol described by Brand-Williams [18], where the ABS is determined at 517 nm. In the developed adaptations, we initially chose the standard reaction time of 60 min, after which, a test was carried out to optimize the ABS determination time for the sample.

3.2.5.1. DPPH I adaptation

The adaptations were initiated by altering the volumes used in the reaction, incorporating a dilution step before the ABS determination and making use of a “correction term” in the calculation equation. To perform the analysis, the DPPH[•] ethanolic solution (ABS corrected to 2.2 ± 0.020) was mixed with aqueous solutions of xanthan, between 0.2 and 1.5% (w/v), in the ratio 1:1 (v/v). The reaction occurred under the light shield at a controlled temperature of 33°C for 60 min. Prior to the ABS determination, dilutions were made with 50% (v/v) ethanol hydroalcoholic solution (0.2 to 0.6% xanthan solutions, diluted 1:5 (v/v); 0.8% solution, diluted 1:10 (v/v); 1% solution, diluted 1:15 (v/v); 1.5% solution, diluted 1:20 (v/v)). The solutions for ABS determination were homogenized manually and sonicated in an ultrasonic bath at 40 kHz and 35°C for 5 min. As a control, DPPH[•]:distilled water was used in the same proportions of the sample:radical diluted in hydroalcoholic solution (v/v).

In this adaptation, the correction term was added into the equation. This term is the measure of the ABS of the xanthan solution at the concentration corresponding to that analyzed, together with the volume of ethanol (used in the DPPH[•] solution) and 50% ethanol for dilution, respecting the volumes used in the analysis, as mentioned in the previous paragraph.

The result of the antioxidant activity was expressed as percentage DPPH[•] inhibition, calculated according to the formula below:

$$Inhibition \% = \frac{A_c - (A_s - T_c)}{A_c} \times 100 \quad (2)$$

where A_c and A_s are, respectively, the absorbances of the control and the sample, and T_c is the absorbance of xanthan gum in volumes that simulate the reaction without the DPPH radical.

3.2.5.2. DPPH II adaptation

In the second test, adjustments were made to the volumes used, and the sample was also withdrawn after the reaction time, by precipitation before the absorption determination. The reaction was started by separately mixing the aqueous solutions of xanthan, between 0.2–3% (w/v), with the DPPH[•] ethanolic solution (ABS corrected to 2.2 ± 0.020) in 2:1 (v/v) ratio. After reaction at 33°C for 60 min, four volumes of absolute ethanol—minimum volume required, determined experimentally—and the solution were homogenized together to precipitate the xanthan. The filtrate was then filtered through filter paper, and the ABS of the filtrate was read. The results were expressed as percentage inhibition, calculated by Eq (1).

3.2.6. Adaptation of the ABTS[•] inhibition method

The ABTS[•] inhibition activity of xanthan solutions was established as described by Re [19]. Similarly to DPPH I, adaptations were made to the volumes used in the reaction, incorporating the dilution step before ABS determination and applying the correction term in the calculation equation.

The ABTS[•] was formed by the reaction of 5 mL of 7 mM ABTS solution with 88 μ L of 140 mM potassium persulfate solution, incubated at room temperature (23°C) in the absence of light for 16 h. Once formed, the radical was diluted in distilled water, until obtaining an ABS of 0.700 ± 0.020 at 734 nm.

In the dark, the aqueous solutions of xanthan, prepared at between 0.2 and 1.5% (w/v), were mixed with the ABTS[•], in the proportion 1:3 (v/v). The reaction occurred at room temperature for 60 min. Dilutions (0.2 to 0.6% xanthan solutions were diluted 1:5 (v/v); 0.8 to 1.5% were diluted 1:7 (v/v)) were performed with distilled water. As a control, ABTS[•] solution:distilled water was used in the same proportions of the sample:radical with final dilution in distilled water.

The proposed correction term was obtained by measuring the ABS of the sample in solution at a concentration corresponding to the analyzed sample, simulating the reaction, but without ABTS[•]. The result was expressed as percentage ABTS[•] inhibition, calculated according to Eq (2).

3.2.7. Time curve for analysis of ABTS[•] and DPPH[•] inhibition activities

The curves for the determination of the ideal reaction time were constructed using the procedures described above and by monitoring the ABS of the reaction over a certain time. This approach allowed measuring the behavior of the sample and identifying the minimum time where the xanthan demonstrates high antioxidant activity.

3.2.8. Statistical analysis

All experiments and ABS determinations were performed in triplicate, and the results were submitted to analysis of variance. The averages were compared by Tukey's test ($p < 0.05$).

3.3. Results and discussion

3.3.1. UV-Vis absorption spectrum of xanthan

Firstly, different xanthans (Fufeng[®], Sigma[®], Jungbunzlauer[®] and pruni) were used in the same proportions and then various amounts (0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% w/v) of the same xanthan (Fufeng[®]) were scanned from 190 to 700 nm. Fig 1 shows the wavelengths at which the gum absorbs.

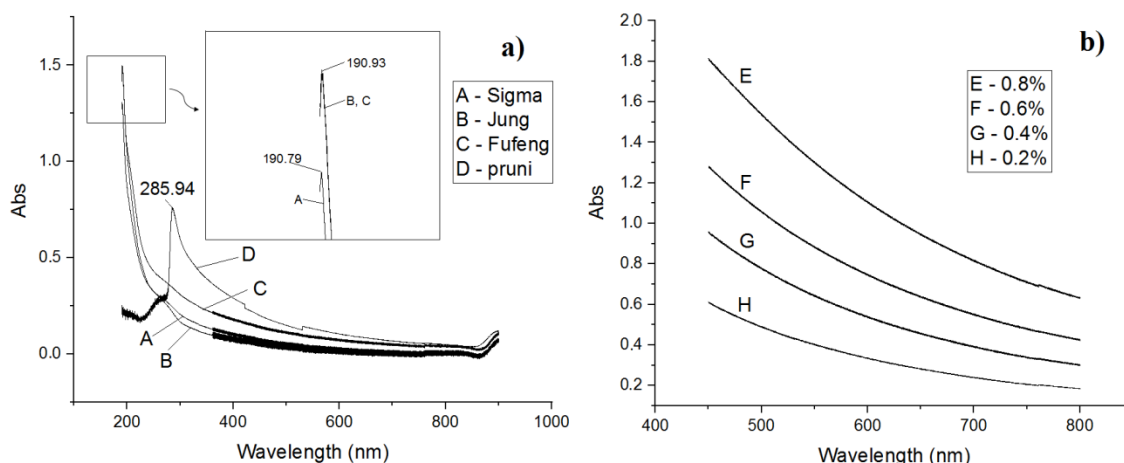


Fig 1. Wavelength absorbance spectra of various xanthans. a) Xanthans Fufeng®, Jungbunzlauer® (Jung), Sigma® and pruni in aqueous solution at 0.04% (w/v); b) xanthan Fufeng® at several proportions (w/v).

Xanthan has the main absorption peak (Fig 1a) in the UV region (200–190 nm), but each produced xanthan may have differences in chemical composition, mainly in the content of ionic acetyl and pyruvate substituents, which may cause the ABS variability. Lozano-Alvarez [20], for example, measured the maximum absorption peak of aqueous xanthan solution (Sigma®) at pH 12 at 220 nm, which under these conditions, was already deacetylated.

It has also been found that the polymer absorbs at all Vis wavelengths between 400 and 800 nm (Fig 1b). As well known, the turbidity particles can cause light scattering across the spectrum band, which leads to attenuation of the transmitted light intensity. Therefore, the turbidity particles will influence the UV-Vis absorption [21]. It is believed that xanthan, when in concentrated solutions, shows ABS at all wavelengths and not because it has the ability to absorb light properly. This ABS interferes with the analyzes in this spectral range, including those discussed in this article, for which 517 nm (DPPH• method) and 734 nm (ABTS• method) were used. The levels of 0.0016% (0.004 ABS) for the DPPH•

assay and 0.0024% (0.003 ABS) for the ABTS[•] assay were determined as the detection limit of these tests for Fufeng[®] xanthan. The concentration of the xanthan solution directly influenced the absorption (Fig 1b).

3.3.2. Traditional DPPH[•] inhibition method

To discuss the feasibility of measuring the DPPH[•] inhibition activity of xanthan gum, we applied the traditional protocol. For that, a diluted concentration was used, according to Oliveira [22]. For xanthan pruni, solutions below 0.0047 g L⁻¹ were tested because it has been estimated that at these levels, the individual chains do not show interaction physics [23], which is ideal for spectrophotometric methods. The 0.0024% (w/v) solution was analyzed, considering the detection limit of xanthan Fufeng[®] for the DPPH[•] method wavelength, and, also, the 0.2, 0.6 and 0.8% preparations were tested, to visualize the behavior of the sample when in concentrated solutions.

We can observe from the obtained results (Fig 2) that the diluted sample did not demonstrate detectable antioxidant activity. However, at concentrations above the xanthan detection limit, it can be seen that the result becomes negative and this negative percentage grows as the concentration increases. It proves the existence of overlapping xanthan and free radical bands, which makes it impossible to use this approach for measuring the antioxidant activity of xanthan gum.

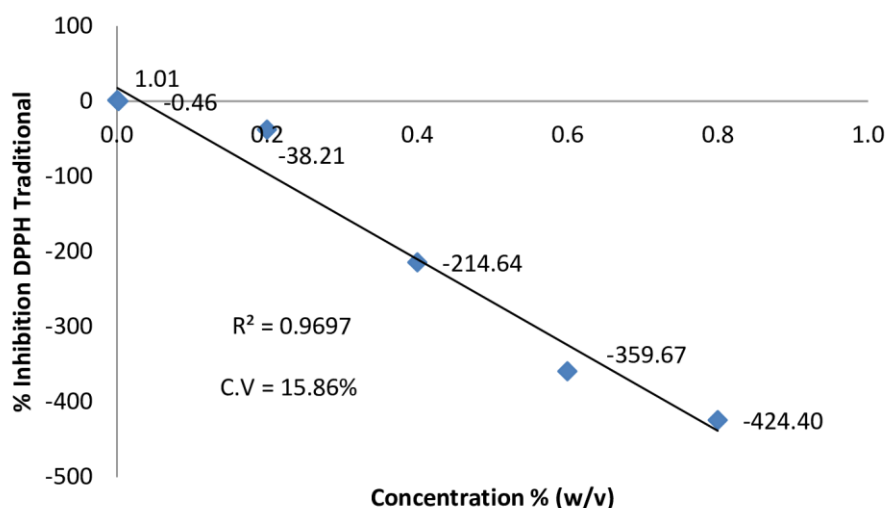


Fig 2. Percentages of DPPH[•] inhibition by xanthan (Fufeng®) at between 0.00047 and 0.8% (w/v), according to the traditional DPPH method, and linearity curves.

To determine the reliability of an experiment, we can evaluate the results by checking their precision, based on the coefficient of variation (C.V.) values or by the minimum significant difference [24,25]. According to Pimentel-Gomes [26], we can consider C.V. values lower than 10% as low, middle when they are between 10 and 20%; high when they are between 20 and 30%, and very high when they are above 30%. In the traditional method, a middle range C.V. was obtained, indicating that for xanthan gum, this methodology does not show good precision

Other authors also reported difficulty in performing the analysis of the antioxidant activity of xanthan by the DPPH[•] inhibition method; Xiong et al. [11] mentioned the inability to determine the antioxidant activity of natural xanthan (without chemical modification) due to its “poor water solubility and strong intermolecular interaction”, which made it impossible to compare the antioxidant activity of the chemically modified derivatives. For the modified xanthans with

reduced viscosity, the antioxidant activity (IC_{50} of 1.16 mg mL^{-1}) was established for xanthan hydrolyzed in alkaline medium, while the IC_{50} of acid-hydrolyzed xanthan could not be observed within the range of the experimental conditions. However, Delattre [12] reported 70% as the percentage of inhibition of 1% (w/v) aqueous Jungbunzlauer® xanthan solution, which we cannot reproduce.

3.3.3. Adaptations of the DPPH[•] inhibition method

The concentrations of the DPPH and ABTS solutions, according to the original protocols, are standard and fall within the ABS range of 0.700–1.100 (± 0.020). For the adapted DPPH[•] assay, it was necessary to use a concentrated solution with $ABS \ 2.2 \pm 0.020$, due to the dilution stage implemented before ABS determination, where a minimum ABS is required to guarantee the accuracy of the method.

It is known that a 10°C increase in temperature doubles the reaction rate [27]. Thus, the average reaction temperature was elevated from 23°C to 33°C , increasing the kinetic energy of the molecules and thereby favoring the maintenance of the equilibrium of the hydroalcoholic solution, since the xanthan gum, insoluble in organic solvents, precipitates when in a predominantly alcoholic medium. It was noted that the increase was limited to this value, to avoid evaporation of the hydroalcoholic solution.

In our adapted DPPH I investigation, a dilution was implemented at the end of the reaction, and the sample was sonicated to eliminate bubbles, thereby facilitating the optical path. From the absorption spectrum of xanthan (Fig 1), an overlap in the ABS bands of xanthan and the DPPH[•] solution was evident, as mentioned above. Thus, since the dilution only would not completely solve the

problem, it was necessary to use the correction term to cancel the interference of the ABS of the sample in the result. As a result, Eq (1) was proposed to calculate the DPPH[•] inhibition (%), in which the correction term is present.

It can be observed in Fig 3a that applying the DPPH I method to xanthan solutions in the range of 0.2–1% (w/v) results in a linear percentage of inhibition (I%), meaning the assay can provide results directly proportional to the concentration of the substance under examination [28]. A coefficient of determination (R^2) of 0.99 was obtained, which is considered as evidence of an ideal fit of the data to the regression line [29,30]. However, when the quantitation range was extended to 2% (w/v) (Fig 3B), this behavior was reduced, and R^2 decreased to 0.81, which is beyond the ideal range [29,30]. This effect can be attributed to the increased interaction between the molecules, and a very high dilution factor would be required to make the ABS determination possible, which would interfere with the accuracy of the analysis.

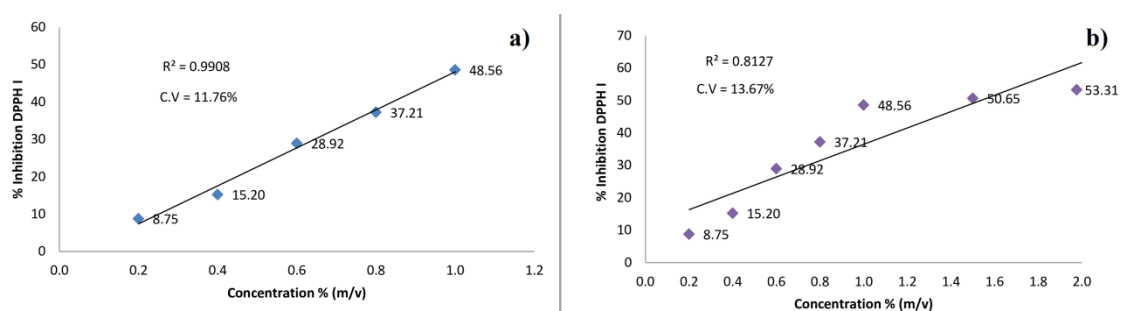


Fig 3. Percentages of DPPH[•] inhibition and linearity curves: a) obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 1% (m/v), according to the DPPH I modification; b) obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 2% (m/v), according to the DPPH I modification.

However, the C.V. for both quantitation ranges 0.2–1% and 0.2–2% (w/v) showed an average percentage of variation, indicating little reliability of the method. It was also found that the dissolution of the biopolymer under the conditions of the analysis was difficult, irrespective of the amount since xanthan is in hydroalcoholic solution, which is not an ideal condition for the dissolution of the gum.

In the DPPH II adaptation, an attempt was made to eliminate the interference of the xanthan ABS, by precipitation of the polymer after its reaction with the oxidizing solution of DPPH[•]. For this, the volume of the sample (xanthan solution) was increased relative to the DPPH[•] solution, facilitating the subsequent step, in which xanthan gum was precipitated by the addition of ethanol. The high viscosity of the xanthan solution and its absorption at the same wavelength of the DPPH[•] solution are factors that influence the analysis results, as we show in this article. Thus, precipitation of xanthan and removal thereof by filtration resulted in a transparent solution suitable for ABS measurement, without interferers.

The advantage of the DPPH II approach is not only based on the elimination of xanthan interference in the ABS determination, but it can also be applied over a broad sample quantitation range. According to the R^2 presented in Fig 4, the 1% increase along of xanthan concentration, demonstrating that the method has linearity; also, the C.V. had low variation, corroborating with the reliability of the technique.

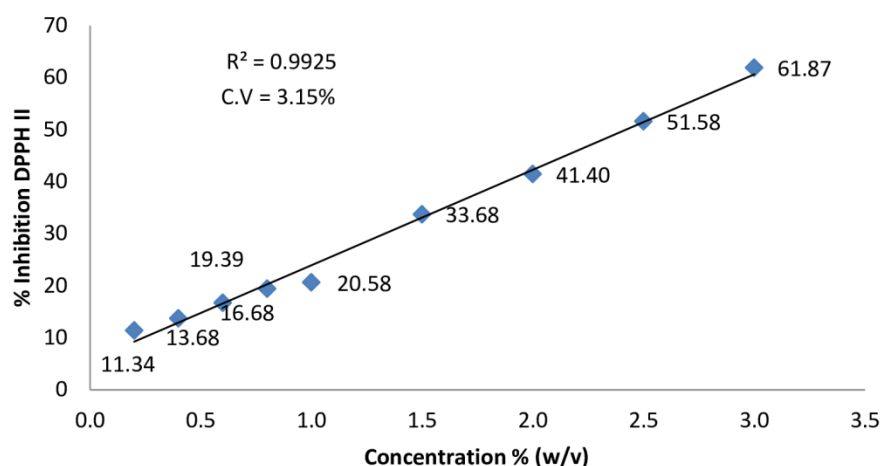


Fig 4. Percentages of DPPH[•] inhibition and linearity curves obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 3% (w/v), according to the DPPH II modification.

Comparatively, the DPPH II test resulted in a lower percentage of inhibition (I%) (antioxidant activity) than DPPH I (Fig 4), for 60 min of reaction. It is known that for a reaction to occur, it is necessary that the molecules collide with each other and that this collision is effective. Given the higher xanthan level in the DPPH II than DPPH I adaptation, we can affirm that the reaction in the DPPH II assay occurs in a more viscous medium, which limits the mobility of the molecules and, consequently, reduces the speed of the reaction [27,31]. It was also observed that increasing the amount of the polymer increased the difference between the results of both adaptations, which confirms our hypothesis.

3.3.4. Adaptation of the ABTS[•] inhibition method

In the adaptation of the ABTS[•] inhibition, there was no need to raise the reaction temperature, since the sample and the radical are soluble in water, allowing the analysis at room temperature (23°C), according to the original

protocol. However, the dilution and correction term were used, for reasons already described above in the adaptation of the DPPH I method.

Based on the R^2 , this method also demonstrates linearity of the antioxidant activity as a function of the amount of sample (Fig 5), and a low C.V., which is an indication of the efficiency of this strategy

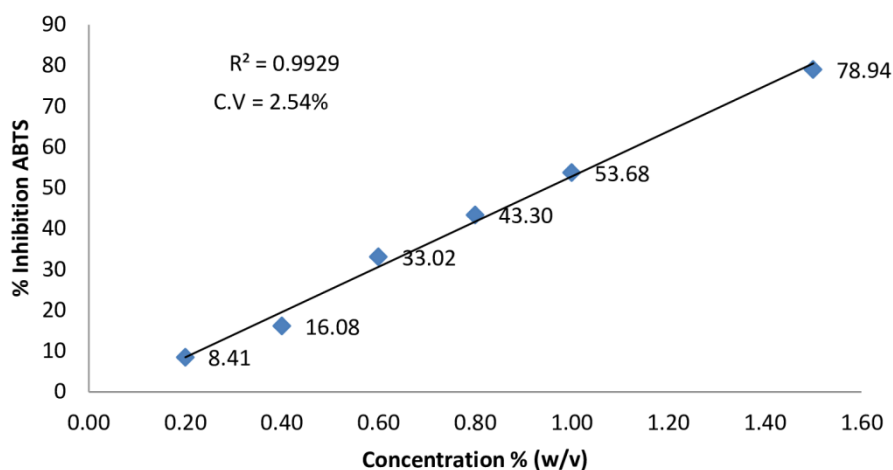


Fig 5. Percentage of ABTS• inhibition and linearity curve obtained using solutions of xanthan (Fufeng®) between 0.2 and 1.5% (m/v), according to the modified ABTS• method.

Overall, the ABTS• method was more practical than the DPPH• assay, due to the use of the same solvent for the sample and radical. In the literature, no report was found to determine the antioxidant activity of xanthan gum by the ABTS• method.

The antioxidant activity values obtained by the adaptation of the ABTS• method were higher than those demonstrated by the DPPH I and II adaptations. Floegel et al. [13] also detected a significantly higher ABTS• inhibition capacity for fruits, vegetables and beverages compared to the DPPH• inhibition activity. In

the same study, the ABTS[•] inhibition capacity was highly correlated with the oxygen radical absorbance capacity (commonly referred to as the R2 assay).

3.3.5. Application of adaptations to various xanthans

To better evaluate the applicability of the methods, the analyzes were performed on several different xanthans, according to the three adaptations proposed. It was verified (Table 1) that xanthan pruni has significantly superior antioxidant potential than the others in all the trials. In the determination of the ABTS[•] inhibition, differently from that observed in the DPPH I method, Sigma® xanthan showed the lowest percentage of inhibition among the samples analyzed. This alteration may be due to the mechanisms of reaction of ABTS[•] and free radical scavengers, which are also influenced by the structural conformations of antioxidants [32].

Table 1. Antioxidant activity of xanthans Fufeng®, Sigma®, Jungbunzlauer® and pruni, as a percentage of radical inhibition.

Sample	Method		
	DPPH I (I%)	DPPH II (I%)	ABTS (I%)
Pruni	19.64 ^{A c} ± 1.18	27.04 ^{A b} ± 1.57	66.01 ^{A a} ± 0.57
Jungbunzlauer®	16.81 ^{AB a} ± 3.61	ND	16.99 ^{B a} ± 1.13
Sigma®	15.47 ^{AB a} ± 0.93	14.82 ^{B a} ± 0.78	9.14 ^{C b} ± 0.68
Fufeng®	15.02 ^{B a} ± 0.68	14.49 ^{B a} ± 1.14	16.52 ^{B a} ± 0.47
C.V.	10.47%	6.26%	2.87%

I% = radical inhibition percentage; values = mean ± standard deviation; C.V. = coefficient of variation; ND = not determined; Columns with different uppercase letters and lines with different lowercase letters are significantly different by the Tukey test ($p < 0.05$).

Regarding the applicability of the methods, when using the DPPH I adaptation, the xanthans Jungbunzlauer®, Sigma® and Fufeng® had the same degree of significance. Conversely, with the DPPH II and ABTS adaptations, only Sigma® and Fufeng®, and Jungbunzlauer® and Fufeng®, were significantly equal, respectively. Therefore, in all adaptations, the xanthan pruni had the highest value, and the results were similar among different xanthans, which indicates the broad comprehensiveness of the method adaptations. However, in the DPPH II adaptation, it was not possible to determine the antioxidant activity of xanthan Jungbunzlauer® since it did not precipitate, representing a limiting factor of this approach (Table 1).

3.3.6. Time curve

To ascertain the ideal times for ABS determination, we attempted to detect the point where the reaction begins to present linearity between the percentage of inhibition and time. In this sense, we can consider 60, 45 and 30 min, as adequate for the durability of the reactions in the DPPH I, DPPH II and ABTS adaptations, respectively (Fig 6).

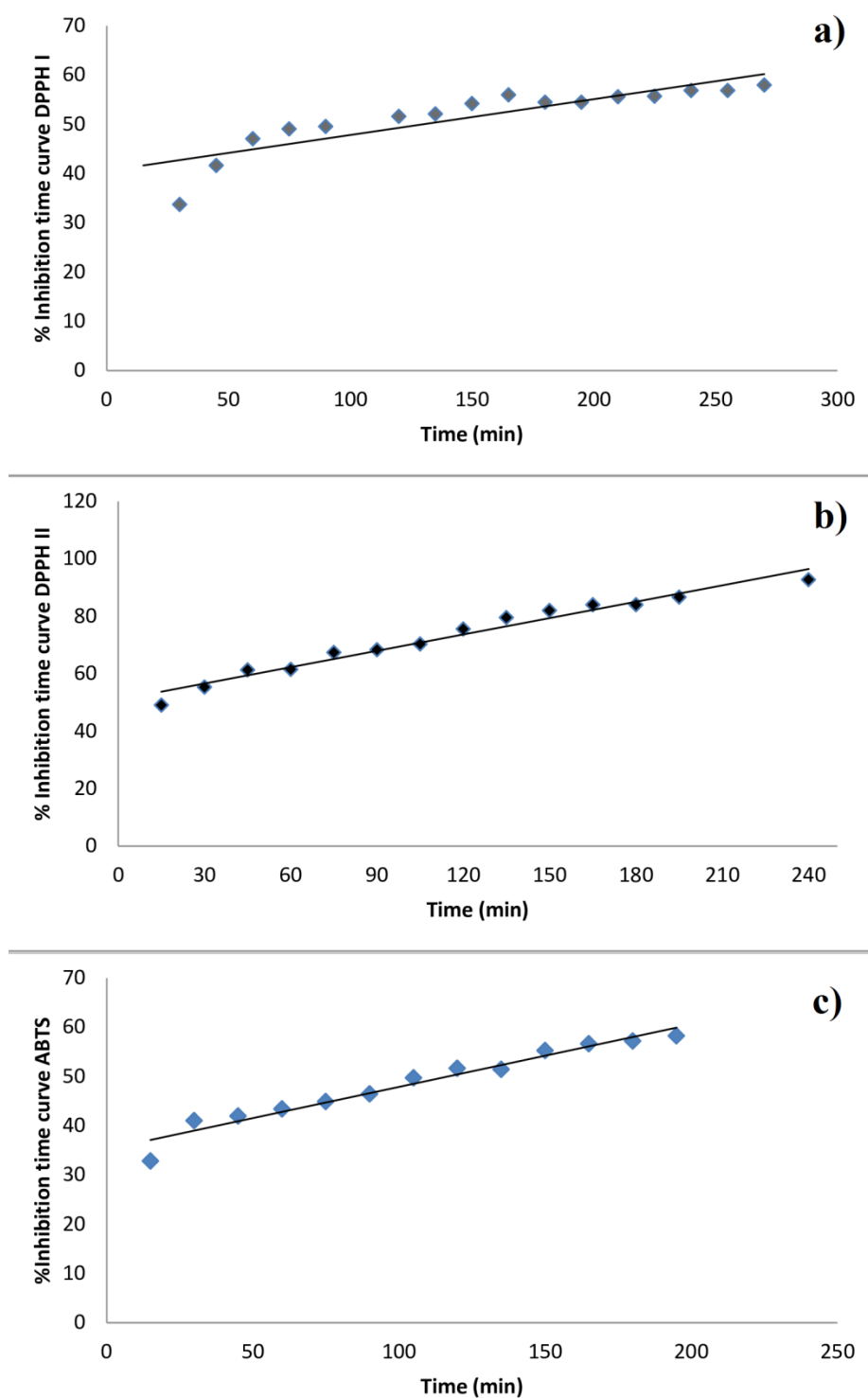


Fig 6. DPPH I, DPPH II and ABTS adaptation time curves, to Jungbunzlauer® xanthan solution at 1% (w/v).

In the DPPH II adaptation, the radical was consumed almost in its entirety in 240 min, whereas this did not occur in the DPPH I adaptation because even

within 24 h, the percentage of inhibition was 60.54%. Considering that the proportion of sample:radical in DPPH I adaptation is 1:1 and in DPPH II adaptation it is 2:1, these data reaffirm the probability mentioned in the discussion as to why DPPH II adaptation resulted in a lower percentage of inhibition in 60 min than the DPPH I adaptation. Namely, if the kinetics of the reaction were affected by the relatively higher viscosity of the solution in the DPPH II assay, the time to reach the activation energy would be greater, but when we observe the DPPH II adaptation over an extended duration, the behavior of the sample becomes coherent with its concentration.

3.4. Conclusions

To determine the DPPH[•] and ABTS[•] inhibition activities of xanthan gum, it is necessary to consider the limitations caused by its low solubility and the overlap of absorption bands due to the high viscosity of the solutions.

The use of the correction term was efficient and effective, allowing coherent results. The main reason was that the other alternative, which would be the use of solutions considered diluted (that do not interfere in the optical path), did not have acceptable results, due to the low concentration of the samples.

For the DPPH[•] inhibition method, the DPPH II adaptation is the most efficient because it can be applied over a wide sample quantitation range and eliminates the interference of the xanthan viscosity in the ABS determination solution. However, it was not applicable to all xanthan samples analyzed.

The adaptations of the methods were performed successfully. However, the DPPH radical needs a solvent with a polarity different from that used for

xanthan, which makes dissolution of the sample difficult. As a result, the determination of the percentage of the ABTS[•] inhibition activity was comparatively more adequate.

We identified the ideal duration times for the DPPH I, DPPH II and ABTS adaptations, as 60, 45 and 30 min, respectively, which allows us to classify the adaptations as rapid tests.

It is noteworthy that this study is unprecedented and, therefore, significant not only in the determination of the antioxidant capacity but also to the various xanthan analyzes, based on spectrophotometry.

3.5. References

1. French RB, Olcott HS, Mattill HA. Antioxidants and the Autoxidation of Fats. III. Industrial and Engineering Chemistry. 1935; 27 (6):724-728.
2. Li XM, Li XL, Zhou AG. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits in vitro. European Polymer Journal. 2007; 43 (2): 488–497.
3. Sarangarajan R, Meera S, Rukkumani R, Sankar P, Anuradha G. Antioxidants: Friend or foe?. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017; 10 (12) 1111–1116.
4. Nirmala C, Bisht MS, Bajwa HK, Santosha O. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. Trends in Food Science & Technology. 2018; 77: 91-99.
5. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1992; 40: 945-948.

6. Morrís VJ. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. Food polysaccharide and their applications. New York: Basel Marcel Dekker. 1995; 341-375.
7. Saleh HM, Simarani K, Annuar MSM. Ultrasound degradation of xanthan polymer in aqueous solution: Its scission mechanism and the effect of Na Clincorporation. *Ultrasônica Sono Chemistry*. 2017; 39: 250-261.
8. Trommer H, Neubert RHH. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 298 (1): 153-163.
9. Paquet E, Turgeon SL, Lemieux S. Effect of xanthan gum on the degradation of cereal β -glucan by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science*. 2010; 52 (2): 260-262.
10. Fioravante JB, Souza VRD, Rodrigues RS, Oliveira PD, Moreira AS. Alternatives for preservation of bioactive compounds in blueberry pulp: heat treatment associated with the addition of xanthan pruni. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2017; 39 (3).
11. Xiong X, Li M, Xie J, Jin Q, Xue B, Sun T. Antioxidant activity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods. *Carbohydrate Polymers*. 2013; 92 (2): 1166-1171.
12. Delattre, C. et al. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. *Carbohydrate Polymers*. 2014; 116: 34-41.
13. Floegel A, Kim D, Chung S, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US

- foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011; 24 (7): 1043-1048.
14. Paschoal LR, Ferreira WA, Prado MRD, Vilela APO. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2003; 39.
15. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998; 62: 1201-1204.
16. Luo AX, He XJ, Zhou SD, Fan YJ, Luo AS, Chun Z. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. *Carbohydrate Polymers*. 2010; 79: 1014-1019.
17. Vendruscolo CT, Vendruscolo JLS, Moreira AS. Meio de Cultura para Crescimento de *Xanthomonas*. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Brazil: Universidade Federal de Pelotas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
18. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995; 28 (1): 25-30.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, New York. 1999; 26 (9): 1231-1237.

20. Lozano–Álvarez JA, Jáuregui–Rincón J, Mendoza–Díaz G, Rodríguez–Vázquez R, Frausto–Reyes C. Study of Sorption Equilibrium of Biopolymers Alginic Acid and Xanthan with C.I. Disperse Yellow 54. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2009; 53 (2) 59-70.
21. Hu Y, Wen Y, Wang X. Novel method of turbidity compensation for chemical oxygen demand measurements by using UV–vis spectrometry. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016; 227: 393-398.
22. Oliveira PD, Michel RC, McBride AJA, Moreira AS, Lomba RFT, Vendruscolo CT. Concentration Regimes of Biopolymers Xanthan, Tara, and Clairana, Comparing Dynamic Light Scattering and Distribution of Relaxation Time. *PLOS ONE*. 2013; 8 (5): e62713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062713>.
23. Doi M, Edwards SF. *The theory of polymer dynamics*: Oxford University Press, USA. 1988; 391p.
24. Nesi CN, Dal Bó HC, Guidoni AL, Bringhenti C. Número mínimo de repetições em experimentos de competição de híbridos de milho. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 2010; 9 (1): 74-81.
25. Storck L, Garcia DC, Lopes SJ, Estefanel V. *Experimentação vegetal*. 3^a ed. Santa Maria: UFSM. 2011; 198p.
26. Pimentel-Gomes F, *Curso de estatística experimental*. 15^a ed. Piracicaba: Fealq. 2009; 451p.
27. Atkins PW, Jones L. *Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. 3ed. Porto Alegre: Bookman; 2006.
28. Swartz ME, Krull IS. *Validação de métodos cromatográficos*. *Pharmaceutical Technology*. 1998; 2 (3): 12-20.

29. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography*. 2003; 987: 57-66.
30. Green JM. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*. 1996; 68 (9): 305-309.
31. Al Habsi NA, Davis FJ, Niranjana K. Development of Novel Methods to Determine Crystalline Glucose Content of Honey Based on DSC, HPLC, and Viscosity Measurements, and Their Use to Examine the Setting Propensity of Honey. *Food Science*. 2013; 78 (6): 845-852.
32. Almeida MMB, Sousa PHM, Arriaga AMC, Prado GM, Magalhães CEC, Maia GA, Lemos TLG. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil, *Food Research International*. 2011; 44: 2155-2159.

4 CAPÍTULO 2 – Caracterização de antioxidantes derivados de xantana por hidrólise parcial com peróxido de hidrogênio

4.1 Introdução

A goma xantana é um polissacarídeo aniônico produzido pelo microrganismo *Xanthomonas campestris*. Esse heteropolissacarídeo ramificado de alta massa molecular é constituído por unidades monoméricas pentassacarídicas, sendo a cadeia principal do polímero constituída por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações β 1-4, e a cadeia lateral consiste de duas unidades de D-manose, alternadas por uma molécula de ácido D-glicurônico (CADMUS et al., 1976; JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; SLONEKER; JEANES, 1962; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; BRANDÃO, 2012). É um espessante com propriedades reológicas excepcionais e com estabilidade em uma variada faixa de temperatura e pH sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia.

Nas últimas duas décadas, alguns estudos em alimentos funcionais descreveram a atividade antioxidante da xantana (SHIMAIDA et al., 1992; PAQUET et al., 2010; XIONG et al., 2013). Modificações químicas têm sido propostas para melhorar o potencial de inibição da goma, como a hidrólise de xantana por tratamentos enzimáticos, químicos e térmicos (LIU et al., 2005, QIAN et al., 2006, SOARES et al., 2005, SUN et al., 2010).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido usado para hidrolisar polissacarídeos como celulose, amido, hemicelulose e xantana, pois tem valor acessível, é facilmente disponível e de manuseio simples (CHANG et al., 2001, QIN et al., 2002, SHAO et al., 2003, SUN et al., 2010). Essa técnica baseia-se na formação de radicais livres, que podem atacar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos.

Neste estudo objetivou-se preparar antioxidantes derivados de xantana por hidrólise parcial com peróxido de hidrogênio, determinando uma condição capaz de aumentar o potencial antioxidante sem reduzir significativamente a capacidade viscosificante. Ainda, procurou-se avaliar o efeito da concentração dos substituintes acetila e piruvato sobre a atividade antioxidante.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Materiais

Foi utilizada xantana comercial Fufeng® (distribuída pela Farmaquímica, Lote: M1201B-N07) e espectrofotômetro (PG Instrumentes®, modelo T90) para o desenvolvimento deste experimento.

4.2.2 Reação de Modificação

Para realizar a hidrólise da goma xantana utilizou-se como base a reação descrita por Xiong et al. (2013). A influência do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do tempo de reação foi avaliada através de um Planejamento Experimental tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR; *Central Composite Design Rotatable*, segundo Rodrigues e Lemma, 2005; 2^2 ensaios + 4 ensaios nas condições axiais + 3 repetições no ponto central) (Tabela 1).

Inicialmente, pesou-se uma quantidade de xantana suficiente para o preparo de 350mL de solução aquosa a 0,86% (m/v) e dissolveu-se o polímero em 70% do volume do solvente. O sistema foi aquecido a 80°C e agitou-se por 30 minutos até formação de solução homogênea. O pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH 2mol L⁻¹ e adicionou-se H₂O₂ em diferentes volumes, como descrito no delineamento experimental (Tabela 1); finalizou-se o preparo avolumando a solução para 350mL com água destilada e levando-a para estufa com temperatura controlada em 65°C. Decorrido os tempos determinados para cada tratamento, finalizou-se as reações com adição de etanol refrigerado (8°C) na proporção 3:1 (v/v). O precipitado foi recolhido através de filtração, dissolvido em água destilada (200mL), neutralizado com HCl 1mol L⁻¹ e reprecipitado com etanol absoluto. Os derivados de xantana resultantes foram coletados e secos a 40°C até peso constante.

Tabela 1 – Delineamento experimental fatorial completo das condições para modificação química da goma xantana

Ensaio	Níveis Codificados		Níveis Reais	
	H ₂ O ₂	Tempo	H ₂ O ₂ %	Tempo (hora)
1	-1	-1	0,6	10
2	1	-1	2,6	10
3	-1	1	0,6	38
4	1	1	2,6	38
5	-1,41	0	0,2	24
6	1,41	0	3	24
7	0	-1,41	1,6	4,26
8	0	1,41	1,6	43,74
9 (PC)	0	0	1,6	24
10 (PC)	0	0	1,6	24
11 (PC)	0	0	1,6	24

(PC): ponto central

4.2.3 Atividade Antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante usou-se o método ABTS adaptado segundo Capítulo 1 (Artigo I), no qual o radical foi formado pela reação de 5mL da solução ABTS 7mM com 88μL da solução de persulfato de potássio 140mM, incubados à temperatura ambiente de ~23°C e na ausência de luz, durante 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído em água destilada até a obtenção de ABS de 0,700±0,020 a 734nm.

Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 0,5mL de solução aquosa de xantana a 0,05% (m/v), para tubo de ensaio com 1,5mL de ABTS*. A análise foi realizada em temperatura ambiente e o tempo de reação 60 minutos. Para determinação da absorbância procedeu-se à diluição com água destilada na proporção 1:5 (v/v). Como branco usou-se solução de ABTS*:água destilada, nas mesmas proporções da amostra:radical com diluição final em água destilada.

Foi inserido no cálculo final um termo de correção que seria a medida da absorbância da amostra em solução de concentração correspondente à analisada, simulando a reação, mas sem ABTS*. O resultado foi expresso em I%, calculado de acordo com a equação 1.

$$\text{Equação: } I\% = \frac{A_C - (A_A - T_C)}{A_C} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

I% = Percentual de Inibição

A_C = Absorbância do controle

A_A = Absorbância da amostra

T_C = Absorbância da goma xantana em volumes que simulam a reação sem o radical.

4.2.4 Determinação do Teor de Piruvato

A determinação quantitativa de grupos piruvato da xantana comercial e modificada quimicamente foi realizada através do método colorimétrico, segundo Sloneker & Orentas (1962). Para realização da análise preparou-se uma curva analítica com soluções de concentrações variando entre zero a 0,22mg de piruvato, a partir de uma solução estoque de piruvato de sódio 0,1mol L⁻¹. Retirou-se de cada solução alíquotas de 2mL e transferiu-se para um funil de decantação, ao qual adicionou-se 1mL de solução de dinitrofenilhidrazina 0,5% (m/v), preparada em HCl 2mol L⁻¹. Após 5min, adicionou-se 5mL de acetato de etila, agitou-se a mistura e desprezou-se a fase aquosa inferior. Posteriormente, adicionou-se três alíquotas de 5mL de solução de carbonato de sódio 10% (m/v), coletando-se o extrato da fase inferior para cada alíquota adicionada. Transferiu-se o extrato de interesse para balões volumétricos de 25mL e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 10% (m/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (PG Instrumentes ®, modelo T90), no comprimento de onda de 375nm. Para determinação do teor de piruvato nos derivados de xantana obtidos pela modificação química, soluções das amostras a 0,4% (m/v) do polímero em HCl 2mol L⁻¹ foram colocadas em banho-maria por 16h a 80°C. Retirou-se alíquotas de 2mL de cada solução e procedeu-se a reação com dinitrofenilhidrazina, conforme descrito anteriormente para curva analítica. As reações colorimétricas, bem como as leituras das absorbâncias, foram realizadas em triplicata.

4.2.5 Determinação do Teor de Acetila

A determinação do teor de grupos acetila das xantanas comerciais e modificadas quimicamente (derivados de xantana) foi realizada através do método colorimétrico, segundo McComb & McCready (1957).

Para realização da análise, construiu-se a curva analítica a partir de solução padrão contendo 0,1089g de β -D-glicose pentacetato, a qual foi dissolvida através de aquecimento (banho-maria 30°C) em 5mL de álcool etílico e avolumada com água destilada em balão de 100mL; preparou-se soluções com concentrações de acetato variando de zero a 420 μ g, em balão volumétrico de 50mL. Retirou-se 5mL de cada solução e transferiu-se para balão volumétrico de 25mL; adicionou-se 1mL de cloridrato de hidroxilamina 3,75% (m/v), 1mL de hidróxido de sódio 9,4% (m/v) e 5 mL de solução metanólica ácida, preparada com ácido perclórico 70% em metanol P.A. na proporção de 7:93 (v/v); completou-se o volume com solução de perclorato férrico. Procedeu-se então a determinação da absorbância das soluções por espectrofotometria no comprimento de onda de 520nm.

Para o preparo das amostras foi utilizado 0,1g de xantana a qual foi dissolvida sobre vigorosa agitação, por 15min, em 25mL de solução de cloridrato de hidroxilamina 37,5% (m/v), em seguida adicionou-se 25mL de hidróxido de sódio 9,4% (m/v), mantendo-se a agitação por mais 2h para que ocorresse a completa transformação do acetato em ácido hidroxâmico. Foram transferidos 2mL desta solução para balão volumétrico de 25mL onde adicionou-se 5mL de água destilada e 5mL de solução metanólica ácida 70,4% (m/v), sendo o volume final completado com solução de perclorato férrico. Nessa etapa ocorreu a transformação do ácido hidroxâmico em ácido acetohidroxâmico férrico, cuja intensidade da cor é proporcional ao teor de acetila na amostra. Determinou-se as absorbâncias espectrofotometricamente, nas mesmas condições da curva de calibração. As reações colorimétricas, bem como as leituras das absorbâncias, foram realizadas em triplicata.

4.2.6 Analise de Viscosidade

Prepararam-se soluções de xantana a 1% (m/v) pela hidratação do polímero em água destilada e agitação moderada em agitador magnético em temperatura ambiente por 2h. Em seguida, submeteram-se as soluções a

aquecimento de 60°C em banho-maria durante 20min (XUEWU et al., 1996). As amostras permaneceram em repouso a 4°C durante 24h previamente às análises.

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

4.2.7 Estatística

Os resultados obtidos no DCCR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a predição ou não do modelo matemático. A qualidade do ajuste dos modelos matemáticos foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo teste para a falta de ajuste do modelo. A significância estatística foi determinada pelo teste F e a superfície de resposta foi construída a partir da equação de regressão.

O derivado de xantana que apresentou melhor atividade antioxidante no DCCR foi comparado a um controle (xantana natural) através de análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste T de Student

Em ambos os casos utilizou-se o software Statistica versão 7.0 (Statsoft, USA) (StatSoft, 1998), ao nível de 95% de confiança.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Resultados

Na tabela 2 estão apresentados os resultados do experimento utilizado para avaliar o efeito do H₂O₂ e tempo de duração da reação de hidrólise.

Tabela 2- Matriz do planejamento experimental tipo DCCR 2² com valores codificados e reais e variáveis respostas para as xantanas modificadas.

Ensaio	H ₂ O ₂	Tempo	ABTS	Acetila	Piruvato	Viscosidade
1	-1 (0,6)	-1 (10)	4,57	0,28	2,10	0,30
2	1 (2,6)	-1 (10)	8,62	0,57	1,59	2,24
3	-1 (0,6)	1 (38)	2,72	0,38	1,85	0,06
4	1 (2,6)	1 (38)	5,08	0,47	1,66	0,41
5	-1,41 (0,2)	0 (24)	4,43	0,37	1,89	0,33
6	1,41 (3)	0 (24)	4,34	0,2	1,81	0,05
7	0 (1,6)	-1,41 (4,26)	4,85	0,33	1,86	0,36
8	0 (1,6)	1,41 (43,74)	8,75	0,33	1,78	0,05
9 (PC)	0 (1,6)	0 (24)	10,93	0,37	1,51	0,69
10 (PC)	0 (1,6)	0 (24)	11,33	0,52	2,28	0,65
11 (PC)	0 (1,6)	0 (24)	10,05	0,38	1,88	0,67

PC = ponto central; ABTS expresso em I%; teor de acetila e piruvato em % (m/m) e viscosidade em índice de consistência (K).

Tabela 3 – Comparação entre o ensaio selecionado a partir do DCCR2² (correspondente aos pontos centrais e xantana natural (controle)).

Variável	ABTS (I%)	Acetila (%)	Piruvato (%)	Viscosidade
Ensaio PC	10,77* ± 0,655	0,42* ± 0,084	1,89 ± 0,385	0,67* ± 0,02
Xantana Natural	8,9* ± 0,28	5,88* ± 0,12	1,53 ± 0,03	5,87* ± 0,52

Valores = Média ± Desvio Padrão; * demonstra diferença significativa pelo teste T de Student a um nível de confiança a 95%; Xantana Natural= Controle.

ABTS expresso em I%; teor de acetila e piruvato em % (m/m) e viscosidade em índice de consistência (K);

4.3.2 Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos no DCCR (Tabela 2) demonstraram que, dentro da faixa estudada, os pontos centrais apresentaram maior percentual de inibição para atividade antioxidante.

Sabe-se que as hidroxilas ativas dos polissacarídeos podem participar na eliminação de radicais livres e contribuir para a atividade antioxidante (Zha et al., 2009). Nesse mesmo sentido, têm sido relatados que outros constituintes da goma xantana, como os resíduos de piruvato e os açúcares redutores, têm atividade antioxidante (ARZAMASTSEV et al., 1999; THETSRIMUANG et al., 2011; VARMA, HEGDE, HENEIN, 2003). Segundo Xiong (2013), as xantanas modificadas pela reação de hidrólise realizada em meio básico preservam os grupamentos piruvato e possuem maior percentual antioxidante que xantanas submetidas à reação de hidrólise em meio ácido. Wu (2013) também observou que o pH ideal para degradação oxidativa da xantana é básico (pH 12), obtendo nessa condição o maior teor de açúcares redutores.

A modificação proposta neste experimento visou aumentar o número de hidroxilas ativas e manter os resíduos de piruvato nos derivados de xantana produzidos.

Avaliou-se a atividade antioxidante através do ensaio ABTS, que se baseia na geração de um $ABTS^{•+}$ azul/verde, aplicável a sistemas antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos; outra vantagem do radical ABTS é a sua alta reatividade e, portanto, a capacidade de reagir com uma ampla gama de antioxidantes. Por outro lado, a preparação do reagente ABTS é mais difícil e sua estabilidade é menor em comparação com outros métodos, por exemplo, o DPPH (STRATIL et al., 2007; ZHAO et al., 2008).

Comparando a atividade antioxidante da xantana natural (controle) e do derivado de xantana produzido pela reação nas condições do ponto central (Tabela 3) do nosso experimento, observamos, que o aumento do potencial redutor foi significativo. Contudo, na prática, não se mostra relevante o suficiente para justificar o tempo e recursos gastos.

Tabela 4 - Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H_2O_2 , tempo de reação e suas interações no percentual de inibição do radical ABTS pelos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2².

	Efeito	p-Valor
Média	10,77	0,001230
H_2O_2	-6,58241	0,006993
Tempo	-6,58241	0,017294
H_2O_2/tempo	-0,79621	0,022605

A concentração de H_2O_2 e tempo de reação tiveram interação e efeito significativo na atividade antioxidante (I%), dentro da faixa estudada (Tabela 4). Foi gerado modelo matemático ($I\% \text{ ABTS} = 10,77 - 3,29H - 2,08T$) preditivo e significativo ($r=71\%$), com superfície de resposta apresentada na figura 5. Com base na superfície de resposta, verificou-se que a combinação de condições mais adequadas para hidrólise da xantana com peróxido de hidrogênio, visando o aumento da atividade antioxidante, encontra-se usando uma concentração em torno de 1,6% de H_2O_2 e tempo de reação de 24h, os quais correspondem aos valores utilizados nos ensaios do ponto central do DCCR (Tabela 2). Wu (2013) obteve resultados equivalentes para o teor de açúcares redutores de derivados de xantana, em condições semelhantes de reação, comprovando que o potencial redutor das xantanas também está ligado ao percentual de açúcares redutores.

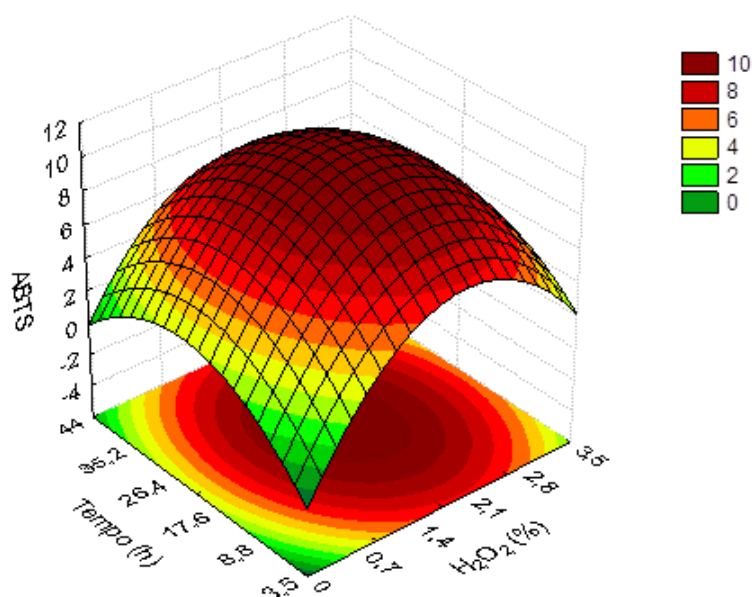


Figura 1. Superfície de resposta para o percentual de inibição dos derivados de xantana produzidos por hidrólise segundo o DCCR 2².

4.3.3 Teor de Acetila

Os percentuais de acetil dos derivados de xantana foram próximos a 0% (Tabela 2), indicando que ocorreu desacetilação da xantana. Esse resultado refletiu na diferença significativa demonstrada entre a xantana natural (controle) e os derivados de xantana produzidos no PC do DCCR 2² (Tabela 3). A reação de desacetilação da xantana consiste em uma hidrólise alcalina, onde o grupo éster que está ligado à α -D-manose da cadeia lateral da xantana é deslocado pelo álcali havendo formação de sal e álcool (MORRISON, 1996). A solução inicial de xantana usada no presente estudo estava em pH 13, o que propiciou a reação de desacetilação da amostra.

Como esperado, as variáveis H₂O₂ e tempo de reação não tiveram efeito significativo ($p > 0,05$) no teor de acetilas, pois nessa etapa da reação a amostra já encontravam-se desacetiladas pela alcalinização do meio como citado (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H_2O_2 , tempo de reação e suas interações no teor de acetila dos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2².

	Efeito	p-Valor
Média	0,42286	0,01285
H_2O_2	-0,07924	0,37978
Tempo	-0,03397	0,67897
H_2O_2/tempo	-0,1	0,35539

4.3.4 Teor de Piruvato

O piruvato tem sido sugerido como um sequestrador endógeno de espécies reativas de oxigênio, atuando na prevenção do estresse oxidativo (JUNG et. al., 2017; VARMA, HEGDE, HENEIN, 2003).

A reação de modificação da goma xantana utilizada em nosso experimento visava manter os grupamentos de piruvato inalterados. Embora a xantana natural utilizada possua baixo conteúdo de grupos piruvato (SANDFORD et al. 1977), podemos dizer que o objetivo inicial foi alcançado, pois, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a xantana natural (controle) e o derivado de xantana produzido pela reação nas condições do ponto central (Tabela 3) do nosso experimento.

As variáveis H_2O_2 e tempo não tiveram efeito significativo no teor de grupos piruvato (Tabela 6), sendo assim não foi gerado modelo matemático e superfície de resposta. Como a reação não afetou a concentração de piruvato é esperado que as variáveis correspondentes à reação de hidrólise (H_2O_2 e tempo) não tenham tido efeito sobre o teor do mesmo.

Tabela 6 - Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H_2O_2 , tempo de reação e suas interações no teor de piruvato dos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2².

	Efeito	p-Valor
Média	1,890138	0,013556
H_2O_2	-0,057888	0,875196
Tempo	-0,088068	0,812044
H_2O_2/tempo	0,159715	0,718586

4.3.5 Viscosidade

Realizaram-se análises de viscosidades nos polímeros (derivados de xantana) obtidos segundo as condições do DCCR 2² para investigar a influência do processo de hidrólise nas propriedades reológicas da xantana. Como pode ser observado na figura 6, todas as soluções aquosas dos derivados de xantana obtidas tiveram comportamento não newtoniano pseudoplástico. Em concordância com esses resultados, Bradshaw et al. (1983) demonstraram que uma xantana comercial (Keltrol®) permaneceu pseudoplástica após a modificação química.

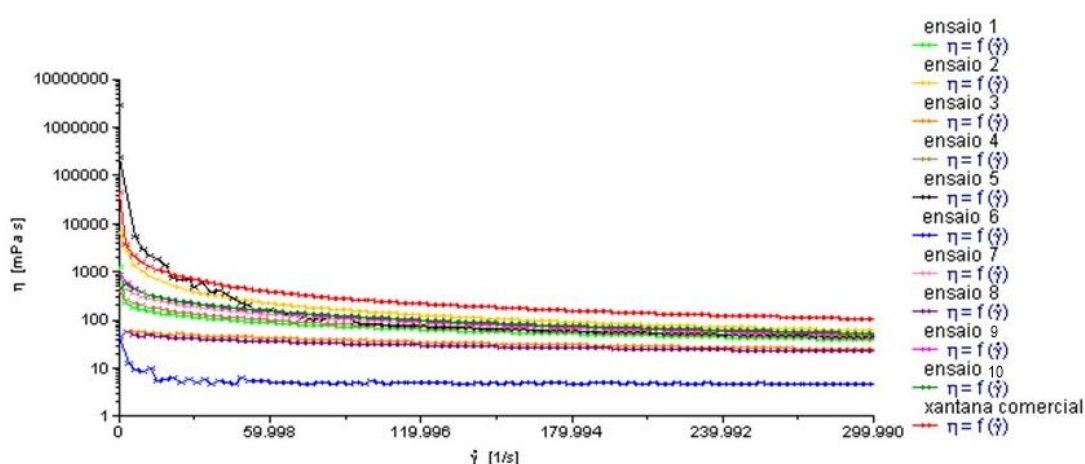


Figura 2 - Curvas de viscosidades (mPa s) versus taxa de deformação (0,01 a 1000s⁻¹) a 25°C de soluções aquosas (1% m/v) dos derivados de xantana obtidos pela hidrólise segundo o DCCR 2² e de xantana natural comercial.

Como esperado, todos os derivados de xantana produzidos através da modificação química da xantana tiveram diminuição na viscosidade quando comparados ao controle (xantana natural) (Figura 2). A viscosidade de um polímero está diretamente relacionada às propriedades moleculares fundamentais (conformação molecular, massa molecular e sua distribuição, interações intramoleculares e intermoleculares) (LEFEBVRE; DOUBLIER, 2004). A reação de hidrólise quebra o polímero, reduzindo sua massa molecular e causando a diminuição da viscosidade.

Os resultados do índice de consistência (K), que indicam a resistência do material ao escoamento ou viscosidade, encontram-se na tabela 2. Em termos de avaliação de viscosidade e atividade antioxidante, podemos considerar que o

ensaio 2 obteve o melhor conjunto para esses resultados. No entanto, o valor da atividade antioxidante foi inferior ao da xantana natural (Tabela 3).

As variáveis estudadas tiveram efeito da interação significativo sobre a viscosidade, dentro da faixa estudada (Tabela 7). Foi gerado modelo matemático não preditivo ($\text{viscosidade} = 0,51 + 0,24H - 0,31T - 0,40H.T$), sendo assim não foi possível obter superfície de resposta ($r = 0,49\%$).

Tabela 7 - Análise dos efeitos das variáveis: proporção de H_2O_2 , tempo de reação e suas interações na viscosidade.

	Efeito	p-Valor
Média	0,666685	0,019092
H_2O_2	0,475824	0,026783
Tempo	-0,628035	0,020297
H_2O_2/tempo	-0,796217	0,022605

4.4 Conclusão

As variáveis H_2O_2 e tempo influenciam o potencial antioxidante e a viscosidade dos derivados de xantana produzidos. Determinou-se as condições ideais de reação para elevar o poder redutor da goma xantana, no entanto, não foi possível evitar uma grande perda de viscosidade.

O incremento do percentual de inibição obtido pela hidrólise da goma xantana, embora tenha sido significativo, não se mostrou satisfatório para justificar a modificação química em questão.

4.5 Referências Bibliográficas

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. ed. 4º. Ed UFV, 596 p. 2008.

ARZAMASTSEV, A. P. et al. Evaluation of the antioxidant activity of medicinal plant preparations. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.33, p. 587-590, 1999.

ASAKURA T.; NAKAMURA Y.; INOUE N.; MURATA M.; HOMMA S. Characterization of zinc chelating compounds in instant coffee. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 855–862, 1990.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; Goma xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

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

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, Lillian Vasconcellos. **Goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel: produção, caracterização e aplicação para fluido de perfuração de poços de petróleo**, Tese de

Doutorado apresentada à Universidade Federal da Bahia, Doutorado em Engenharia Química, 2012, p5.

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

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº45, de 3 de novembro de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as boas práticas de fabricação. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, DF, 3 de novembro de 2010.**

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

COUTO, Andiara de Freitas. **Elaboração e aplicação de pré-Mix de framboesa (*rubus idaeus* L.) estabilizado por xantana e ácido tartárico.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal De Pelotas, Pelotas/RS.

CHANG, K. L. B.; TAI, M. C.; CHENG, F. H. Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4845-4851, 2001.

DELATTRE, C.; PIERRE, G; GARDARIN, C; TRAIKIA, M; ELBOUTACHFAITI, R; ISOGAI, A; MICHAUD, P. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. **Carbohydrate Polymers**. v. 116, p. 34-41, 2014.

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

ELBOUTACHFAITI R.; DELATTRE C.; PETIT E.; MICHAUD C. P.
Polyglucuronic acids: Structures, functions and degrading enzymes.
Carbohydrate Polymers, v. 84, n. 1, p. 1-13, 2011.

ELBOUTACHFAITI R.; DELATTRE C.; PETIT E.; PILLON, M.; COURTOIS, B.;
COURTOIS, J. Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained
by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide. **Food Chemistry**, v.
127, p. 976-983, 2011.

FIORAVANTE, J. B.; SOUZA, V. R. D.; RODRIGUES, R. S.; OLIVEIRA, P. D.;
MOREIRA, A. S. Alternatives for preservation of bioactive compounds in
blueberry pulp: heat treatment associated with the addition of xanthan gum.
Revista Brasileira de Fruticultura, v. 39, n. 3, 2017.

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

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e
polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e
vitamina C**. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas –
Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of
Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, p.1841-1856, 2005.

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

JEANES A. R.; SLONEKER J. H. UNITED STATES, SECRETARY OF
AGRICULTURE. **Method of producing an atypically salt-responsive
alkalideacetylated polysaccharide**. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961.

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

JUNG, S. M.; LEE, J.; BAEK, S. Y.; LEE, J.; JANG, S. G.; HONG, S.; PARK, J.; CHO, M.; PARK, S.; KWOK, S. Ethyl pyruvate ameliorates inflammatory arthritis in mice. **International Immunopharmacology**, v.52, p. 333-341, 2017.

KITTS, D. D. Bioactive substance in food: identification and potencial use. **Canada Journal of the Physiology and Pharmacology**, v. 72, p. 423-434, 1994.

KIRIGAYA, N.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Studies on Antioxidant Activity of Nonenzymic Browning Reaction Products. Part 3. Fractionation of Browning Reaction Solution between Ammonia and D-Glucose and Antioxidant Activity of the Resulting Fractions. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 45, p. 292-298, 1971,45.

KUCK, Luiza Siede. **Desenvolvimento de polpa de mirtilo (*Vaccinium Ashei* Reade) e preservação das suas antocianinas para aplicação em alimentos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

LEE, H. S.; HONG K. **Review chromatographic: analysis of anthocyanins**. *Journal of Chromatographic*, Amsterdam, v.624, p.221- 234,1992.

LEFEBVRE, J.; DOUBLIER, J. L. Rheological Behavior of Polysaccharides Aqueous Systems. In: DUMITRIU, S. Editors. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. Second Edition, CRC Press, New York, 2004. p. 459 – 474.

LI, X. M.; LI, X. L.; ZHOU, A. G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits in vitro. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 2, p. 488–497, 2007.

Liu , H; Huang, C; Dong, W; Du, Y; Bai, X; Li X. Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3701 – 3706, 2005.

LOUISE C. C. S. **Utilização do soro de leite em bioprocesso para a produção de goma xantana**. Dissertação de Mestrado- Faculdade de

Farmácia e Bioquímica – Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

LUO, A. X.; HE, X. J.; ZHOU, S. D.; FAN, Y. J.; LUO, A. S.; CHUN, Z. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 1014-1019, 2010.

LUPORINI, S.; BRETAS, R. E. S. **Caracterização reológica da goma xantana: efeitos do cloreto de sódio e sulfato de alumínio, concentração e temperatura em experimentos permanentes e dinâmicos**. Relatório de Pós-Doctor, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2008.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos** – v. 5, n.1, p. 50-67, 2009.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

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

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH*) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

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

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Kinetic study of reaction between tocopheroxyl radicals and fatty acids. **Lipids**, Champaign, v.28, n.1. p. 753-756, 1993.

NASCIMENTO, Rosilda Josefa. **Potencial antioxidante de resíduo agroindustrial de goiaba**. 2010. Dissertação (Mestrado). Departamento de ciências domésticas. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE.

NENADIS, N.; WANG, L.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 15, p. 4669-4674, 2004.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.

PAQUET, E.; TURGEON, S. L.; LEMIEUX, S. Effect of xanthan gum on the degradation of cereal β -glucan by ascorbic acid. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 260-262, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Essex, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos benéficos do açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, p. 15–20, 2012.

QIN, C. Q.; DU, Y. M.; XIAO, L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v.76, p. 211-218, 2002.

QIAN, F.; AN, L. J.; HE, X. Y.; HAN, Q. H.; LI, X. Z. Antibacterial activity of xantho-oligosaccharide cleaved from xanthan against *phytopathogenic Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1582-1588, 2006.

RAMOS, B. F. M. **Produção de goma xantana em água produzida da indústria de petróleo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Industrial, Pós-graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 71p., 2011.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

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

RODRIGUES, Sabrina Ávila. **Efeito de acidulantes, espessantes e cultivares nas características físico-químicas e estruturais de topping de mirtilo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

RONČEVIĆ, Z. Z.; BAJIĆ, B. Ž.; VUČUROVIĆ, D. G.; DODIĆ, S. N.; GRAHOVAC, J. A.; DODIĆ, J. M. Xanthan production on waste waters from wine industry. **Grand View Research**, v. 71, n. 2, p. 145–153, 2017.

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.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico 128. Embrapa**, Fortaleza, 2007.

SALEH, H. M.; SIMARANI, K.; ANNUAR, M. SM. Ultrasonic degradation of xanthan polymer in aqueous solution: the cleavage mechanism and the effect of incorporation of NaCl. **Ultrasonic Sono chemistry**, v. 39, p. 250-261, 2017.

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

SHAO, J.; YANG, Y. M.; ZHONG, Q. Q. Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v.82, p. 395-398, 2003.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição. Florianópolis**, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun., 2004.

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 945-948, 1992.

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.

SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. **Polymer Degradation and Stability**, v.90, p. 449-454, 2005.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determinação do teor total de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em vegetais - avaliação de métodos espectrofotométricos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 607–616, 2006.

SUN, T.; XIONG, X. Y.; XIE, J.; LIU, J. J.; ZHOU, D. X. Degradation and oxidation resistance of xanthan gum. **Human Agricultural Science**, v.19, p. 19-21, 2010.

TEIXEIRA, F. A.; SILVA, C. G. DPPH. Química Nova Interativa. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPvU900znaLVcJT9yuEtosdRR6OUaLje9uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q> Acesso em: 01 agosto 2016.

THETSRIMUANG, C.; KHAMMUANG, S.; SARNTHIMA, R. Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. **International Journal of Pharmacology**, v.7, p. 58-65, 2011.

TROMMER, H.; NEUBERT R. H. H. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model

system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 153-163, 2005.

VARMA, S. D.; HEGDE, K.; HENEIN, M. Oxidative damage to mouse lens in culture. Protective effect of pyruvate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, p. 246-252, 2003.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 855–864, 2012.

WU, S.; WU, J.; XIA, L.; CHU, C.; LIU, D.; GONG, M. Preparation of xanthan-derived oligosaccharides and their hydroxyl radical scavenging activity. **Carbohydrate Polymers**, v.92, n. 2, p. 1612-1614, 2013.

XIONG, X.; LI, M.; XIE, J.; JIN, Q.; XUE, B.; SUN, T. Antioxidant activity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods. **Carbohydrate Polymer**, v. 92, n. 2, p.1166-1171, 2013.

XIONG, X.; LI, M.; XIE, J.; XUE, B.; SUN, T. Preparation and antioxidant activity of xanthan oligosaccharides derivatives with similar substituting degrees. **Food Chemistry**.v. 164, n. 1, p. 7-11, 2014.

YAN, J. K.; MA, H. L.; CAI, P. F.; ZHANG, H. N.; ZHANG, Q.; HU, N. Z. Structural characteristics and antioxidant activities of different families of 4-acetamido-TEMPO oxidized curdlan. **Food Chemistry**, v.143, p. 530-535, 2014.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.62, p. 1201-1204, 1998.

ZHA, X. Q. et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p. 570-575, 2009.

ZHAO, H.; FAN, W.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; SHAN, L.; LIN, Y.; KONG, W. Avaliação de atividades antioxidantes e conteúdos fenólicos totais de

variedades de cevada de malte típicas. **Food Chemistry**, v.107, p. 296–304, 2008.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

ZION MARKET RESEARCH. **Xanthan gum market for oil and gas, food and beverage, pharmaceutical, cosmetics, and other applications** - Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, Size, Share, Growth, Segment, Trends and Forecast, 2015 – 2021. 2016. Data do relatório: 26/10/2016. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/market-analysis/xanthan-gum-market>. Acesso em: 26/11/2016.

5 Considerações Finais

Comprovou-se, através deste estudo, que para realização de análises espectrofotométricas na goma xantana é necessário levar em consideração as limitações causadas pela solubilidade restrita e sobreposição de bandas de absorção decorrentes da elevada viscosidade das soluções.

Nas adaptações dos métodos DPPH e ABTS a utilização do “termo de correção” se mostrou eficiente, possibilitando resultados coerentes. No entanto, a determinação do percentual da atividade antioxidante pelo ABTS[•] se mostrou mais adequada, pois o radical DPPH[•] necessita de solvente de polaridade diferente ao usado para a xantana, o que dificulta a dissolução da amostra.

O desenvolvimento de adaptações das metodologias de análise de potencial antioxidante adequados para a goma xantana permitiu determinar se a reação de hidrólise elevava essa característica do polissacarídeo. Os resultados demonstraram que, embora esse incremento do percentual de inibição tenha sido significativo, o mesmo não se mostrou satisfatório para justificar a modificação química.

6. Referências

ALMEIDA M. M. B; SOUSA P. H. M; ARRIAGA A. M. C.; PRADO G. M.; MAGALHÃES C. E. C.; MAIA G.A.; LEMOS TLG. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, p. 2155-2159, 2011.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

AL HABSI N. A.; DAVIS F. J.; NIRANJAN K. Development of Novel Methods to Determine Crystalline Glucose Content of Honey Based on DSC, HPLC, and Viscosity Measurements, and Their Use to Examine the Setting Propensity of Honey. **Food Science**, v.78, n.6, p. 845-852, 2013.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. ed. 4º. Ed UFV, 596 p. 2008.

ARZAMASTSEV, A. P. et al. Evaluation of the antioxidant activity of medicinal plant preparations. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.33, p. 587-590, 1999.

ASAKURA T.; NAKAMURA Y.; INOUE N.; MURATA M.; HOMMA S. Characterization of zinc chelating compounds in instant coffee. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 855–862, 1990.

ATKINS P.W.; JONES L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ed. Porto Alegre: Bookman; 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; Goma xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

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

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, Lillian Vasconcellos. **Goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel: produção, caracterização e aplicação para fluido de perfuração de poços de petróleo**, Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal da Bahia, Doutorado em Engenharia Química, 2012, p5.

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

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº45, de 3 de novembro de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as boas práticas de fabricação. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, DF**, 3 de novembro de 2010.

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

COUTO, Andiar de Freitas. **Elaboração e aplicação de pré-Mix de framboesa (*rubus idaeus L.*) estabilizado por xantana e ácido tartárico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal De Pelotas, Pelotas/RS.

CHANG, K. L. B.; TAI, M. C.; CHENG, F. H. Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4845-4851, 2001.

DELATTRE, C.; PIERRE, G; GARDARIN, C; TRAIKIA, M; ELBOUTACHFAITI, R; ISOGAI, A; MICHAUD, P. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid

sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 34-41, 2014.

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

DOI M.; EDWARDS S. F. **The theory of polymer dynamics: Oxford University Press**, USA. 1988; 391p.

ELBOUTACHFAITI R.; DELATTRE C.; PETIT E.; MICHAUD C. P. Polyglucuronic acids: Structures, functions and degrading enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 1-13, 2011.

ELBOUTACHFAITI R.; DELATTRE C.; PETIT E.; PILLON, M.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide. **Food Chemistry**, v. 127, p. 976-983, 2011.

FIORAVANTE, J. B.; SOUZA, V. R. D.; RODRIGUES, R. S.; OLIVEIRA, P. D.; MOREIRA, A. S. Alternatives for preservation of bioactive compounds in blueberry pulp: heat treatment associated with the addition of xanthan gum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 3, 2017.

FLOEGEL A.; KIM D.; CHUNG S.; KOO S.I.; CHUN O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n.7, p.1043-1048, 2011.

FRENCH R. B.; OLCOTT H. S.; MATTILL H. A. Antioxidants and the Autoxidation of Fats. III. **Industrial and Engineering Chemistry**. V.27, n.6, p.724-728, 1935.

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

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e**

vitamina C. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GREEN J. M. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry**, v.68, n.9, p.305-309, 1996.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.

HU Y.; WEN Y.; WANG X. Novel method of turbidity compensation for chemical oxygen demand measurements by using UV–vis spectrometry. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.227, p. 393-398, 2016.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

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

JEANES A. R.; SLONEKER J. H. UNITED STATES, SECRETARY OF AGRICULTURE. **Method of producing an atypically salt-responsive alkaliacetate polysaccharide**. U. S., Patente n. 3 000 790, 19 set. 1961.

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

JUNG, S. M.; LEE, J.; BAEK, S. Y.; LEE, J.; JANG, S. G.; HONG, S.; PARK, J.; CHO, M.; PARK, S.; KWOK, S. Ethyl pyruvate ameliorates inflammatory arthritis in mice. **International Immunopharmacology**, v.52, p. 333-341, 2017.

KITTS, D. D. Bioactive substance in food: identification and potential use. **Canada Journal of the Physiology and Pharmacology**, v. 72, p. 423-434, 1994.

KIRIGAYA, N.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Studies on Antioxidant Activity of Nonenzymic Browning Reaction Products. Part 3. Fractionation of Browning Reaction Solution between Ammonia and D-Glucose and Antioxidant Activity of the Resulting Fractions. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 45, p. 292-298, 1971,45.

KUCK, Luiza Siede. **Desenvolvimento de polpa de mirtilo (*Vaccinium Ashei* Reade) e preservação das suas antocianinas para aplicação em alimentos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

LEE, H. S.; HONG K. **Review chromatographic: analysis of anthocyanins**. Journal of Chromatographic, Amsterdam, v.624, p.221- 234,1992.

LEFEBVRE, J.; DOUBLIER, J. L. Rheological Behavior of Polysaccharides Aqueous Systems. In: DUMITRIU, S. Editors. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. Second Edition, CRC Press, New York, 2004. p. 459 – 474.

LI, X. M.; LI, X. L.; ZHOU, A. G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits in vitro. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 2, p. 488–497, 2007.

Liu, H; Huang, C; Dong, W; Du, Y; Bai, X; Li X. Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3701 – 3706, 2005.

LOUISE C. C. S. **Utilização do soro de leite em bioprocesso para a produção de goma xantana**. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Farmácia e Bioquímica – Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

LOZANO-ÁLVAREZ J. A.; JÁUREGUI-RINCÓN J.; MENDOZA-DÍAZ G.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ R.; FRAUSTO-REYES C. Study of Sorption Equilibrium of Biopolymers Alginic Acid and Xanthan with C.I. Disperse Yellow 54. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v.53, n.2, p. 59-70, 2009.

LUO, A. X.; HE, X. J.; ZHOU, S. D.; FAN, Y. J.; LUO, A. S.; CHUN, Z. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 1014-1019, 2010.

LUPORINI, S.; BRETAS, R. E. S. **Caracterização reológica da goma xantana: efeitos do cloreto de sódio e sulfato de alumínio, concentração e**

temperatura em experimentos permanentes e dinâmicos. Relatório de Pós-Doctor, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2008.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos** – v. 5, n.1, p. 50-67, 2009.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C.; Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

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

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

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

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

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Kinetic study of reaction between tocopheroxyl radicals and fatty acids. **Lipids**, Champaign, v.28, n.1. p. 753-756, 1993.

NASCIMENTO, Rosilda Josefa. **Potencial antioxidante de resíduo agroindustrial de goiaba**. 2010. Dissertação (Mestrado). Departamento de ciências domésticas. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE.

NENADIS, N.; WANG, L.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 15, p. 4669-4674, 2004.

NESI C. N.; DAL BÓ H. C.; GUIDONI A. L.; BRINGHENTI C. Número mínimo de repetições em experimentos de competição de híbridos de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.9, n.1, p.74-81, 2010.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.

NIRMALA C.; BISHT M. S.; BAJWA H. K.; SANTOSHA O. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.77, p. 91-99, 2018.

OLIVEIRA P. D.; MICHEL R. C.; MCBRIDE A. J. A.; MOREIRA A. S.; LOMBA R. F. T.; VENDRUSCOLO C. T. Concentration Regimes of Biopolymers Xanthan, Tara, and Clairana, Comparing Dynamic Light Scattering and Distribution of Relaxation Time. **PLOS ONE**. 2013; 8 (5): e62713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062713>.

PAQUET, E. TURGEON, S. L. LEMIEUX, S. Effect of xanthan gum on the degradation of cereal β -glucan by ascorbic acid. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 260-262, 2010.

PASCHOAL L. R.; FERREIRA W. A.; PRADO M. R. D; VILELA A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.39, 2003.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Essex, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos benéficos do açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, p. 15–20, 2012.

PIMENTEL-GOMES F. **Curso de estatística experimental**. 15^a ed. Piracicaba: Fealq. 2009; p.451, 2009.

QIN, C. Q.; DU, Y. M.; XIAO, L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v.76, p. 211-218, 2002.

QIAN, F.; AN, L. J.; HE, X. Y.; HAN, Q. H.; LI, X. Z. Antibacterial activity of xantho-oligosaccharide cleaved from xanthan against *phytopathogenic Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1582-1588, 2006.

RAMOS, B. F. M. **Produção de goma xantana em água produzida da indústria de petróleo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Industrial, Pós-graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 71p., 2011.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

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

RODRIGUES, Sabrina Ávila. **Efeito de acidulantes, espessantes e cultivares nas características físico-químicas e estruturais de topping de mirtilo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

RONČEVIĆ, Z. Z.; BAJIĆ, B. Ž.; VUČUROVIĆ, D. G.; DODIĆ, S. N.; GRAHOVAC, J. A.; DODIĆ, J. M. Xanthan production on waste waters from wine industry. **Grand View Research**, v. 71, n. 2, p. 145–153, 2017.

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.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia científica: determinação da

atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}.
Comunicado Técnico 128. Embrapa, Fortaleza, 2007.

SALEH, H. M.; SIMARANI, K.; ANNUAR, M. S. M. Ultrasonic degradation of xanthan polymer in aqueous solution: the cleavage mechanism and the effect of incorporation of NaCl. **Ultrasonic Sono chemistry**, v. 39, p. 250-261, 2017.

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

SALEH H. M.; SIMARANI K.; ANNUAR M. S. M. Ultrasound degradation of xanthan polymer in aqueous solution: Its scission mechanism and the effect of Na Clincorporation. **Ultrassônica Sono Chemistry**, v.39, p. 250-261, 2017.

SARANGARAJAN R.; MEERA S.; RUKKUMANI R.; SANKAR P.; ANURADHA G. Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.10, n.12, p.1111–1116, 2017.

SHAO, J.; YANG, Y. M.; ZHONG, Q. Q. Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v.82, p. 395-398, 2003.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição. Florianópolis**, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun., 2004.

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 945-948, 1992.

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.

SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. **Polymer Degradation and Stability**, v.90, p. 449-454, 2005.

SHABIR G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography*, v.987, p.57-66, 2003.

STATSOFT, INC. **Programa computacional Statistica 7.0**. E.U.A. 1998.

STORCK L.; GARCIA D. C.; LOPES S. J.; ESTEFANEL V. **Experimentação vegetal**. 3^a ed. Santa Maria: UFSM, p.198, 2011.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determinação do teor total de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em vegetais - avaliação de métodos espectrofotométricos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 607–616, 2006.

SUN, T.; XIONG, X. Y.; XIE, J.; LIU, J. J.; ZHOU, D. X. Degradation and oxidation resistance of xanthan gum. **Human Agricultural Science**, v.19, p. 19-21, 2010.

SWARTZ M. E.; KRULL I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p. 12-20, 1998.

TEIXEIRA, F. A.; SILVA, C. G. DPPH. Química Nova Interativa. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPvU900znaLVcJT9yuEtosdRR6OUaLje9uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q> Acesso em: 01 agosto 2016.

THETSRIMUANG, C.; KHAMMUANG, S.; SARNTHIMA, R. Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. **International Journal of Pharmacology**, v.7, p. 58-65, 2011.

TROMMER, H.; NEUBERT R. H. H. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 153-163, 2005.

VARMA, S. D.; HEGDE, K.; HENEIN, M. Oxidative damage to mouse lens in culture. Protective effect of pyruvate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, p. 246-252, 2003.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 855–864, 2012.

WU, S.; WU, J.; XIA, L.; CHU, C.; LIU, D.; GONG, M. Preparation of xanthan-derived oligosaccharides and their hydroxyl radical scavenging activity. **Carbohydrate Polymers**, v.92, n. 2, p. 1612-1614, 2013.

XIONG, X.; LI, M.; XIE, J.; JIN, Q.; XUE, B.; SUN, T. Antioxidant activity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods. **Carbohydrate Polymer**, v. 92, n. 2, p.1166-1171, 2013.

XIONG, X.; LI, M.; XIE, J.; XUE, B.; SUN, T. Preparation and antioxidant activity of xanthan oligosaccharides derivatives with similar substituting degrees. **Food Chemistry**.v. 164, n. 1, p. 7-11, 2014.

YAN, J. K.; MA, H. L.; CAI, P. F.; ZHANG, H. N.; ZHANG, Q.; HU, N. Z. Structural characteristics and antioxidant activities of different families of 4-acetamido-TEMPO oxidized curdlan. **Food Chemistry**, v.143, p. 530-535, 2014.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.62, p. 1201-1204, 1998.

ZHA, X.Q. et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p. 570-575, 2009.

ZHAO, H.; FAN, W.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; SHAN, L.; LIN, Y.; KONG, W. Avaliação de atividades antioxidantes e conteúdos fenólicos totais de variedades de cevada de malte típicas. **Food Chemistry**, v.107, p. 296–304, 2008.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

ZION MARKET RESEARCH. **Xanthan gum market for oil and gas, food and beverage, pharmaceutical, cosmetics, and other applications** - Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, Size, Share, Growth, Segment, Trends and Forecast, 2015 – 2021. 2016. Data do relatório: 26/10/2016. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/market-analysis/xanthan-gum-market>. Acesso em: 26/11/2016.