



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710972-5 A2**



(22) Data de Depósito: 27/04/2007  
(43) Data da Publicação: 31/05/2011  
(RPI 2108)

(51) **Int.Cl.:**  
C08B 37/18 2006.01  
A23L 1/308 2006.01  
A23L 1/00 2006.01  
A61K 8/73 2006.01

(54) **Título: NULINA, SEU USO, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO ALIMENTAR, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, BEM COMO PASTA AQUOSA E SEU USO**

(57) **Resumo:** NULINA, SEU USO, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO ALIMENTAR, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, BEM COMO PASTA AQUOSA E SEU USO. A presente invenção refere-se a uma inulina de cadeia longa e a sua preparação a partir de raízes de alcachofra, ao seu uso em gêneros alimentícios e preparações cosméticas e a gêneros alimentícios e preparações cosméticas compreendendo a inulina de cadeia longa.

(30) **Prioridade Unionista:** 28/04/2006 EP 06 090066.9, 27/10/2006 EP 06 090199.8, 02/05/2006 US 60/796,818, 30/10/2006 US 60/855,248, 28/04/2006 EP 06 090066.9, 27/10/2006 EP 06 090199.8, 30/10/2006 US 60/855,248, 28/04/2006 EP 06 090066.9, 02/05/2006 US 60/796,818, 02/05/2006 US 60/796,818, 30/10/2006 US 60/855,248

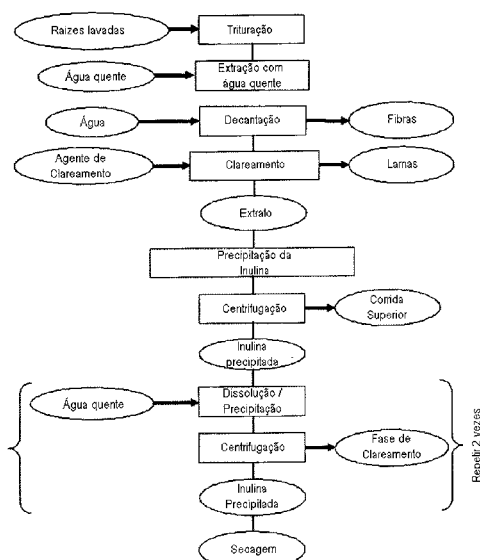
(73) **Titular(es):** Bayer Cropscience AG

(72) **Inventor(es):** Elke Hellwege, Friedrich Meuser, Ingo Bauer, Jens Pilling

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007004028 de 27/04/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/128559 de 15/11/2007



**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "NULINA, SEU USO, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO ALIMENTAR, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, BEM COMO PASTA AQUOSA E SEU USO".**

5           A presente invenção refere-se a uma cadeia de inulina particularmente longa e a sua preparação a partir de raízes de alcachofra, ao seu uso em gêneros alimentícios e preparações cosméticas e a gêneros alimentícios e preparações cosméticas compreendendo a inulina de cadeia particularmente longa.

10           A demanda por gêneros alimentícios que contenham pouca gordura e matérias-primas mais naturais aumentou muito nas últimas décadas. Muitas substâncias já foram propostas como substitutos de gorduras, tais como produtos à base de carboidratos ou proteínas ou substitutos sintéticos da gordura, tais como poliéster de açúcar de ácidos graxos. Contudo, esses sempre possuem desvantagens, tais como uma baixa estabilidade térmica, uma sensação desagradável na boca ou um efeito indesejável sobre as pessoas ou sobre o ambiente.

15           Há muito tempo sabe-se que a inulina é adequada para o uso em produtos alimentícios. A inulina possui um valor de energia baixo disponível para seres humanos e assim o uso da inulina como o substituto da gordura assegura uma grande redução no valor calórico do produto final. Além disso, a inulina é usada como prebiótico adicional e agente de volume em gêneros alimentícios.

20           Há muito tempo sabe-se que a inulina é adequada para o uso em produtos alimentícios. A inulina possui um valor de energia baixo disponível para seres humanos e assim o uso da inulina como o substituto da gordura assegura uma grande redução no valor calórico do produto final. Além disso, a inulina é usada como prebiótico adicional e agente de volume em gêneros alimentícios.

25           A inulina é um polissacarídeo que pertence ao grupo dos frutanos. Ela consiste em uma cadeia de moléculas de frutose unidas por ligação beta-2-1, e essa cadeia pode ter uma unidade alfa-D-glicose na extremidade de redução. A inulina ocorre em quantidades economicamente recuperáveis em várias plantas tal como, por exemplo, raízes de chicória, alcachofra e tubérculos de dália. Os comprimentos médios de cadeia de várias inulinas e as suas propriedades físico-químicas se diferenciam de espécie de planta para espécie de planta.

30           A inulina empregada até agora no setor de gêneros alimentícios não é inteiramente satisfatória nas suas propriedades de processamento tal como, por exemplo, viscosidade na forma de pasta aquosa, estabilidade

térmica e estabilidade frente a ácidos, capacidade de formar emulsão e capacidade de ligação com a água.

Há também a necessidade de uma inulina com propriedades de fermentação melhoradas e um maior efeito prebiótico.

5 Um problema adicional consiste em que na extração da inulina do tecido da planta com a água quente o extrato produzido além do polímero bruto da inulina contém também monossacarídeos, tais como glicose e frutose, dissacarídeos, tais como sacarose e frutoligossacarídeos (DP 3-10). Esses subprodutos (monossacarídeos e dissacarídeos, frutoligossacarídeos  
10 (DP 3-10)) podem interferir com um processamento adicional da inulina. Por exemplo, os monossacarídeos e dissacarídeos são indesejáveis na fabricação de produtos alimentícios dietéticos. O gosto doce dos monossacarídeos, dissacarídeos e frutoligossacarídeos (DP 3-10) interfere em certas aplicações no setor de produtos alimentícios. Os frutoligossacarídeos (DP 3-10),  
15 por causa de sua higroscopicidade e aderência, podem interferir muito no uso da inulina bruta em produtos alimentícios tanto durante o processamento como durante o armazenamento. Durante um processamento adicional da inulina bruta, por exemplo, por derivatização química, os monossacarídeos, dissacarídeos e frutoligossacarídeos (DP 3-10) podem levar à misturas inde-  
20 finidas de produtos que podem ser purificados somente por métodos dispendiosos ou por nenhum método. Além disso, uma alta proporção de açúcares reduzidos possui a desvantagem de que em processos térmicos na presença de compostos amino pode haver reações de escurecimento indesejáveis, a formação de aromas desagradáveis e a produção de acrilamida (rea-  
25 ção de Maillard).

A presente invenção é baseada no objetivo de fornecer uma inulina com a qual seja possível resolver os problemas definidos em cima.

A intenção foi atingir particularmente propriedades de processamento vantajosas para aplicações em cosméticos e na indústria de gêneros  
30 alimentícios. Os exemplos disso são um comportamento vantajoso da viscosidade, uma alta estabilidade térmica e estabilidade ao ácido, uma boa capacidade de formar emulsão e uma alta capacidade de ligação com a água.

Um problema abordado pela presente invenção foi fornecer adicionalmente uma inulina possuindo melhores propriedades de fermentação e efeito prebiótico melhorado para aplicações em gêneros alimentícios.

Finalmente, foi desejável fornecer uma inulina que, em comparação com a inulina bruta, possui um teor mais baixo de monossacarídeos, dissacarídeos e frutoligossacarídeos (DP 3-10).

Os problemas precedentes são resolvidos pelo fornecimento das modalidades definidas nas reivindicações.

A presente invenção se refere a uma inulina possuindo um grau médio de polimerização  $DP_w$  entre 65 e 81, preferivelmente entre 65 e 79, mais preferivelmente entre 66 e 78, muito particularmente bem mais preferivelmente entre 66 e 76, ainda mais preferivelmente entre 66 e 74 e bem mais preferivelmente entre 66 e 73.

Nesse contexto e com relação à presente invenção, o termo "entre" também se destina a incluir os limites numéricos respectivamente indicados.

O termo "inulina" possui o significado, em relação à presente invenção, de um polifrutano que consiste em uma cadeia de moléculas de frutose conectadas por ligações beta-2-1. Essa cadeia preferivelmente possui na sua extremidade uma unidade de redução alfa-D-glicose.

Em relação à presente invenção, o termo "o grau médio de polimerização  $DP_w$ " (peso DP médio) significa o quociente entre o peso médio da massa molecular  $M_w$  e a massa molecular do monômero  $M_0$ . O peso médio da massa molecular  $M_w$  resulta de:

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i},$$

onde  $N_i$  é o número de moléculas com massa molecular  $M_i$ .

O "grau médio de polimerização  $DP_w$ " é preferivelmente medido em relação à presente invenção pelo método de "cromatografia de permeação em gel com a detecção do espalhamento da luz e do índice de refração (sistema GPC-RI-MALLS)", descrito daqui por diante.

A inulina da presente invenção exibe, em comparação com a

inulina descrita na técnica anterior, a vantagem surpreendente que pode ser processada até o estado de cremes que expõem uma estabilidade excepcionalmente alta em tratamentos térmicos ou em tratamento ácido, de modo que são mais convenientes, por exemplo, para determinadas aplicações industriais ou aplicações em cosméticos e/ou nas indústrias de produtos alimentícios. Além disso, os cremes compreendendo a inulina de acordo com a presente invenção mostram uma estabilidade inesperadamente alta em relação às concentrações de cisalhamento. A inulina de acordo com a presente invenção exibe assim a vantagem adicional, comparada com a inulina convencional, de poder ser melhor processada em processos industriais nos quais atuem fortes concentrações de cisalhamento.

A inulina de acordo com a presente invenção é também notável em relação à propriedades de viscosidade particularmente vantajosas e uma alta concentração de gel e uma solubilidade muito baixa, o que é vantajoso para aplicações em gêneros alimentícios.

Além disso, a inulina de acordo com a presente invenção mostra propriedades surpreendentemente boas como substituto da gordura em gêneros alimentícios com propriedades sensoriais excelentes em relação ao paladar.

A inulina de acordo com a presente invenção também mostra, em comparação com produtos anteriormente empregados, uma fermentação mais lenta, o que é vantajoso na prevenção de doenças no intestino grosso posterior. A fermentação mais lenta é acompanhada por uma formação reduzida de gases no intestino, particularmente de hidrogênio.

A inulina de acordo com a presente invenção adicionalmente possui, em comparação com produtos anteriormente empregados, um maior efeito prebiótico. Particularmente, a inulina de acordo com a presente invenção estimula a geração da bifidobacteria de um modo vantajoso com uma redução simultânea de bactérias indesejáveis e/ou patogênicas. A inulina de acordo com a presente invenção é, desse modo, adequada para o uso em gêneros alimentícios e/ou medicamentos para a prevenção e o tratamento de disfunções e doenças do intestino, particularmente no intestino grosso

posterior.

Finalmente, a inulina de acordo com a presente invenção também confere a vários gêneros alimentícios propriedades vantajosas de uso tais como, por exemplo, aumento da viscosidade, capacidade de formar emulsão, capacidade de ligação com a água e formação de migalha. A inulina de acordo com a presente invenção surpreendentemente confere propriedades de cozimento melhoradas a produtos de panificação e aumenta o rendimento da massa de farinha. A inulina de acordo com a presente invenção é também um meio eficaz para modificação de sabor e estabilização de espuma.

Em uma modalidade adicional, a inulina de acordo com a presente invenção possui um teor de frutoligossacarídeos (oligofrutanos) possuindo um DP de 3 a 10, o que é menos do que 3%, preferivelmente menos do que 1,5%, particular e preferivelmente menos do que 0,7%, muito particular e preferivelmente menos do que 0,3%.

Em uma modalidade adicional, a inulina de acordo com a presente invenção possui um teor de glicose de menos do que 2%, preferivelmente menos do que 1%, particular e preferivelmente menos do que 0,5%, muito particular e preferivelmente menos do que 0,2% e bem mais preferivelmente menos do que 0,1%.

Em uma modalidade adicional, a inulina de acordo com a presente invenção possui um teor de frutose de menos do que 2,5%, preferivelmente menos do que 1,5%, particular e preferivelmente menos do que 1,0%, muito particular e preferivelmente menos do que 0,3% e bem mais preferivelmente menos do que 0,15%.

Em uma modalidade adicional, a inulina de acordo com a presente invenção possui um teor de sacarose de menos do que 2%, preferivelmente menos do que 1%, particular e preferivelmente menos do que 0,5%, muito particular e preferivelmente menos do que 0,3% e bem mais preferivelmente menos do que 0,1%.

Em uma modalidade inulina de acordo com a presente invenção que é particularmente vantajosa para aplicações em gêneros alimentícios, o

teor de monossacarídeos e dissacarídeos é de menos do que 0,5%.

Todas as percentagens são, a menos que de outro modo indicado, porcentagem em peso baseado no peso total seco da inulina e das substâncias adicionais. As "substâncias adicionais" são todas as substâncias na  
5 mistura seca que são diferentes da inulina.

Os teores de frutose, glicose e sacarose são medidos em relação à presente invenção pelo método enzimático ótico descrito abaixo (métodos gerais: "determinação de açúcar").

Em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades  
10 anteriores, a inulina de acordo com a presente invenção possui um peso médio da massa molecular  $M_w$  entre 10.500 g/mol e 13.150 g/mol, preferivelmente entre 10.500 e 12.800 g/mol, particular e preferivelmente entre 10.650 g/mol e 12.650 g/mol, mais preferivelmente entre 10.650 g/mol e 12.350 g/mol e bem mais preferivelmente entre 10.650 g/mol e 12.000 g/mol.

15 O peso médio da massa molecular  $M_w$  é preferivelmente medido em relação à presente invenção pelo método de "cromatografia de permeação em gel com a detecção do espalhamento da luz e do índice de refração (sistema GPC-RI-MALLS)", descrito daqui por diante.

Em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades  
20 anteriores, a inulina de acordo com a presente invenção possui um grau médio de polimerização  $DP_n$  (GPC) medido pela cromatografia de permeação em gel (GPC) entre 54 e 75, preferivelmente entre 54 e 72, bem mais preferivelmente entre 57 e 71, particular e preferivelmente entre 60 e 71.

O "grau médio de polimerização  $DP_n$ " é medido em relação à  
25 presente invenção preferivelmente pelo método da "cromatografia de permeação em gel com a detecção do espalhamento da luz e do índice de refração (sistema GPC-RI-MALLS)", descrito daqui por diante.

Em relação à presente invenção, o termo "grau médio de polimerização  $DP_n$ " (número DP médio) significa o quociente entre a massa molecular numérica média  $M_n$  e a massa molecular do monômero ligado  $M_o$  (anidrofrutose = 162 g/mol). A massa molecular numérica média  $M_n$  resulta de:  
30

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i},$$

onde  $N_i$  é o número de moléculas possuindo massa molecular

5  $M_i$ .

Em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades anteriores, a inulina de acordo com a presente invenção possui uma distribuição de pesos moleculares em uma faixa e variação de 650 a 48.000, mais preferivelmente de 970 a 40.000 g/mol, mais preferivelmente de 1.300 g/mol  
10 a 34.000 g/mol e bem mais preferivelmente de 4.000 g/mol a 26.800 g/mol.

Em ainda uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades anteriores, a inulina de acordo com a presente invenção mostra uma massa total de moléculas de inulina possuindo um peso molecular < 10.000 g/mol baseado na massa total de todas as moléculas de inulina de  
15 25% a 40% e uma massa total de moléculas de inulina possuindo um peso molecular > 20.000 g/mol baseado na massa total de todas as moléculas de inulina de 5% a 20%. É bem mais preferido para a massa total de moléculas de inulina que possuam um peso molecular de < 10.000 g/mol baseado na massa total de todas as moléculas de inulina para ser 30% a 36% e a massa  
20 total de moléculas de inulina possuindo um peso molecular > 20.000 g/mol baseado na massa total de todas as moléculas de inulina para ser 9% a 15%.

A distribuição de pesos moleculares é preferivelmente medida em relação à presente invenção pelo método de "cromatografia de permeação em gel com a detecção do espalhamento da luz e do índice de refração  
25 (sistema GPC-RI-MALLS)", descrito daqui por diante.

Em uma modalidade da inulina de acordo com a presente invenção com propriedades particularmente vantajosas, o grau de ramificação varia de 0,5% em mol a 2,0% em mol, mais preferivelmente de 0,7% em mol  
30 a 2,0% em mol, ainda mais preferivelmente de 0,9% em mol a 2,0% em mol. O grau de ramificação é definido aqui como o número percentual de monômeros de frutose unidas por ligação beta-2-1 com o ponto de ramificação adicional na

posição 6 dos monômeros da frutose (também abreviado para "2-1,6-" daqui por diante) baseado no número total de todos os monômeros da inulina medido em uma amostra da inulina de acordo com a presente invenção com pesos moleculares distribuídos aleatoriamente. Na sua posição 6, um monômero da frutose "2-1,6-" dentro de uma cadeia de polifrutose está ligado a outra cadeia de polifrutose, composta de pelo menos dois monômeros de frutose unidos por ligação beta-2-1, ou a um único monômero da frutose. O termo "ponto de ramificação" indica uma posição de um monômero da frutose, dentro de uma cadeia de polifrutose, na qual está ligada outra cadeia de polifrutose composta de pelo menos dois monômeros de frutose unidos por ligação beta-2-1, ou um único monômero da frutose. O grau de ramificação é medido pelo método da análise de metilação-padrão ou alternativamente pelo método da degradação redutora após a metilação. Ambos os métodos são descritos detalhadamente nos exemplos anexos.

Uma modalidade da inulina de acordo com a presente invenção que é particularmente vantajosa nas suas propriedades e que pode incluir as modalidades anteriormente descritas possui uma distribuição de pesos moleculares particularmente estreita expressa pelo quociente entre o grau de polimerização ponderal médio e o grau de polimerização numérico médio, DPw/DPn. Essa quantidade também é referida como índice de polidispersão. Em uma modalidade preferida, o quociente DPw/DPn é menor do que 1,25, em uma modalidade mais preferida é menor do que 1,20, em uma modalidade ainda mais preferida é menor do que 1,15 e na modalidade bem mais preferida é menor do que 1,10. Os valores de DPw e DPn são nesse contexto medidos pelo método de "cromatografia de permeação em gel com a detecção do espalhamento da luz e do índice de refração (sistema GPC-RIMALLS)" descritos daqui por diante. O peso molecular de um monômero por cálculos de conversão é estabelecido como sendo igual a 162 g/mol.

A presente invenção também se refere a uma pasta aquosa da inulina de acordo com a presente invenção que é obtida dispersando a inulina em água, cisalhando a dispersão resultante até ficar homogênea, guardando o produto obtido desse modo em uma temperatura de 4°C a 15°C por

12 h a 24 h e, depois de condicionar à temperatura ambiente, agitar até formar uma pasta homogênea. Uma pasta preferida compreende a água de 1% em peso a 40% em peso, mais preferivelmente de 1% em peso a 35% em peso, ainda mais preferivelmente de 1% em peso a 30% em peso, bem mais preferivelmente de 2% em peso a 25% em peso, ainda mais preferivelmente de 2% em peso a 20% em peso, e particular e preferivelmente de 10% em peso a 20% em peso de inulina baseado no peso total da pasta. O termo "pasta" é de acordo com a presente invenção equivalente a uma suspensão de inulina cristalina e/ou amorfa. Conseqüentemente, o termo "pasta aquosa" deve ser entendido como uma suspensão de inulina cristalina e/ou amorfa na fase aquosa. A fase aquosa é a base da água que pode compreender opcionalmente substâncias também dissolvidas ou suspensas, tais como sais, outros carboidratos, proteínas, aminoácidos. Em uma modalidade vantajosa a inulina na pasta é a inulina seca por secagem por atomização, isto é, inulina que foi seca por secagem por atomização antes de formar a pasta.

A pasta descrita acima referida pode ser usada como um componente em sistemas aquosos. Os sistemas aquosos preferidos são gêneros alimentícios em base aquosa e cosméticos, em que o termo "gêneros alimentícios" é definido em outras partes no presente relatório descritivo. Exemplos de gêneros alimentícios preferidos também são listados em outras partes no presente relatório descritivo. Em gêneros alimentícios e cosméticos, uma pasta de acordo com a presente invenção pode ser usada como componente de comunicação de estrutura, agente espessante, agente texturizante, agente de melhora da estabilidade ou agente construtor de viscosidade, com os quais a pasta nesse contexto pode ser de acordo com uma ou mais das funções acima mencionadas. Em gêneros alimentícios, uma pasta de acordo com a presente invenção também pode ser usada como um substituto da gordura, substituto de óleo, agente prebiótico e/ou componente de fibra dietético, em que a pasta nesse contexto pode estar de acordo com uma ou mais das funções acima mencionadas. Uso mais preferido é o uso como um substituto de óleo ou da gordura. Os gêneros alimentícios mais preferidos em que uma pasta de acordo com a presente invenção é usada

como um componente são laticínios, tais como iogurte, bebidas a base de iogurte, cremes, coalhada, coalho, manteiga, leite, particularmente o leite desnatado, o soro de leite, o leite azedo, quefir, queijos, tais como requeijão, queijo branco, queijo prato, queijo duro, soro de leite, leite em pó, bebidas na  
5 base de leite.

A inulina de acordo com a presente invenção mostra uma estabilidade surpreendentemente alta ao ácido. Particularmente, uma pasta aquosa da inulina de acordo com a presente invenção mostra uma alta estabilidade ao ácido. A estabilidade ao cisalhamento de uma pasta aquosa de inulina de acordo com a presente invenção é do mesmo modo excepcional em  
10 comparação com produtos comercialmente disponíveis.

A inulina de acordo com a presente invenção é diferenciada de outras, inulinas comercialmente disponíveis por uma concentração de gel surpreendentemente alta. As concentrações de gel de 4 N a 100 N, mais vantajosamente de 10 N a 100 N, bem mais vantajosamente de 20 N a 100 N e mais vantajosamente 40 N a 100 N, são atingidos em uma concentração de 1% a 35% (p/p), mais preferivelmente 1% a 30% (p/p), ainda mais preferivelmente 2% a 25% (p/p), ainda mais preferivelmente 2% a 20% (p/p), bem mais preferivelmente aproximadamente 20% (p/p) da inulina de acordo com  
15 a presente invenção em água quando a inulina é dissolvida a 90°C e depois armazenada na temperatura ambiente (23°C) durante um período de 24 h. As altas concentrações de gel como indicado anteriormente podem ser alcançadas particularmente bem com a inulina de acordo com a presente invenção que é seca por secagem por atomização e depois empregada para a  
20 formação de gel. Os géis obtidos desse modo mostram preferivelmente um carácter particulado (géis de partícula). O método de medição para determinar a concentração de gel é descrito detalhadamente na seção de exemplos (formação de estrutura pelas inulinas depois de aquecimento em água).

A presente invenção se refere em um aspecto adicional a um  
30 processo de obter a inulina no qual:

- a) as raízes de alcachofra são trituradas
- b) um extrato é obtido tratando as raízes trituradas com a água,

- c) os constituintes coloridos são retirados do extrato obtido,
- d) a inulina é precipitada a partir do extrato,
- e) a inulina é reprecipitada pelo menos uma vez.

O processo é particularmente adequado para obter a inulina anteriormente descrita de acordo com a presente invenção, mas não é restrita ao mesmo.

As raízes da alcachofra são usadas como material de partida, mas o processo não é restrito a uma variedade em particular. A trituração é vantajosamente precedida pela remoção de qualquer contaminante aderido às raízes, por exemplo, pela lavagem vigorosa com a água com um limpador de alta pressão. É vantajosamente possível lavar as raízes no estado congelado para minimizar a perda da massa do material de raiz.

Se necessário, as raízes são inicialmente trituradas grosseiramente, por exemplo, picando. Os desfibradores são preferidos para uma trituração adicional. O produto obtido é o material de raiz triturado na forma de cavacas fibrosas.

Na modalidade mais vantajosa do processo, são usadas raízes de alcachofra com as seguintes características: raízes maduras em relação à formação de massa seca e de inulina. O grau da maturidade pode ser estabelecido a partir da proporção entre o teor de inulina para o teor de matéria seca e a proporção entre o teor de frutose para o teor de inulina. O teor de inulina está preferivelmente em uma faixa e variação de 30% a 70% em peso, mais preferivelmente 40% a 65% em peso, ainda mais preferivelmente 50% a 60% em peso, baseado no peso total da matéria seca de raízes, e a proporção frutose/inulina está preferivelmente em uma faixa e variação de 3% a 24% em peso, mais preferivelmente 3% a 12% em peso, bem mais preferivelmente mais baixo do que 6% em peso. O teor de matéria seca das raízes de alcachofra limpas é preferivelmente 20% a 50% em peso, mais preferivelmente 30% a 40% em peso, mais preferivelmente 30% a 35% em peso, baseado no peso total de raízes limpas.

No caso em que as raízes de alcachofra devam ser armazenadas antes de serem usadas no processo de acordo com a presente inven-

ção, as raízes devem ser conservadas para evitar a contaminação microbiana, decomposição ou diminuição de peso molecular da inulina devido à degradação enzimática. Os métodos preferidos para conservação das raízes são o congelamento ou a secagem por ar quente das raízes trituradas para armazenamento.

5 Depois da trituração, o material das raízes trituradas é extraído com a água, preferivelmente em uma temperatura de 60°C a 95°C, bem mais preferivelmente de 80°C a 95°C. A extração preferivelmente é realizada em uma faixa de pH de neutro até ligeiramente alcalino. Uma temperatura de pelo menos 60°C em um pH variando de 7 a 9 é vantajosa porque neste caso as hidrólises enzimática e ácida são suprimidas. A concentração de material das raízes trituradas na água é preferivelmente 10% a 40% em peso, mais preferivelmente 20% a 30% em peso, medido como peso fresco de raízes baseadas no peso total da mistura de extração.

15 Preferivelmente uma proporção entre a matéria seca do material rasgado usado e a água como meio de extração é estabelecida que leva a um teor de matéria seca no extrato de 8% a 12% em peso e um teor de inulina de mais de 6% em peso, preferivelmente de 6% a 8% em peso, baseado no peso do extrato. Uma escolha igualmente adequada de condições de extração, tais como a proporção do peso de água para o peso de raízes, pode levar a uma transferência de 80% a 90% em peso da inulina presente nas raízes para o extrato. As condições acima mencionadas são adequadas para atingir uma cristalização favorável e um alto rendimento da inulina do extrato, baseado na observação que a inulina de alto peso molecular se cristaliza do extrato mesmo em uma concentração tão baixa quanto 5% em peso, baseado no peso do extrato.

25 Não há nenhuma restrição especial para o equipamento de extração, e podem ser aplicadas as técnicas convencionais para extração de material de planta. É mais preferido de acordo com a presente invenção que a extração seja realizada em um extrator aquecido por camisa com um agitador. Em outra modalidade altamente preferida um barril para fermentação de cerveja que possa ser aquecido é usado como extrator agitado. Assim, a

extração da inulina das raízes é combinada com a separação do extrato dos pedaços exauridos pela filtração, tal como descrito abaixo. O tempo de extração depois do equilíbrio da mistura raiz/água é preferivelmente de 30 minutos a 4 horas, preferivelmente de 1 a 2 horas. Depois desse tempo, o extrato é separado dos pedaços exauridos, por exemplo, por bombeamento ou por peneiramento ou por filtração.

Depois da separação do extrato dos pedaços exauridos, quando adequado, os materiais fibrosos e os fragmentos de plantas podem permanecer como materiais suspensos no extrato. Se estiveem presentes, esses materiais suspensos são do mesmo modo retirados do extrato. Nessa variante do processo, a etapa (b) do processo é desse modo realizada, antes da etapa (c), por uma etapa na qual os materiais suspensos, principalmente compostos de fibras, são retirados do extrato. A quantidade aceitável de materiais suspensos e se a remoção deve ser realizada será decidido pelo técnico experiente caso a caso. A remoção dos materiais suspensos pode ser realizada por técnicas de separação convencionais, como centrifugação ou filtração. Um separador para remoção de sedimentos resultou como sendo particularmente adequado. Uma tela ou o filtro com a delicadeza apropriada também podem ser usados.

Em uma modalidade altamente preferida, o material suspenso pode ser filtrado de usando os pedaços exauridos como um material filtrante. Nessa modalidade os pedaços exauridos são precipitados no fundo do reator de extração equipado com uma peneira de fundo, como um barril para fermentação de cerveja. A peneira é preferivelmente uma peneira do ângulo. Os pedaços exauridos precipitados são usados como um leito de filtração pelo qual o extrato flui. Usando essa técnica é possível uma remoção quase quantitativa do material suspenso sem necessidade de usar novas etapas de filtração antes do refino ou do clareamento do extrato ou da cristalização da inulina.

Os extratos são coloridos devido ao seu teor de constituintes corantes e coloidalmente suspensos da matéria corada. Os constituintes corantes consistem, entre outras coisas, no tanino e flavonóides que normal-

mente conferem uma cor amarela ou amarelo-amarronzado e/ou amarelo-amarronzada escura ao extrato. A inulina que pode ser obtida diretamente de tais extratos não está de acordo com as exigências desejadas acerca de uma cor neutra. É, desse modo, necessário retirar os constituintes corantes do extrato na etapa (c) do processo. A etapa (c) do processo de acordo com a presente invenção, para retirar a coloração dos constituintes dos extratos de plantas, também é geralmente citada como descoloração, clarificação ou "clareamento" de extratos de plantas. Esses termos são equivalentes no contexto de acordo com a presente invenção.

O clareamento pode ser realizado de acordo com a presente invenção acrescentando cal com subsequente carbonatação (adição de  $\text{CO}_2$ ). O processo da adição de cal é conhecido pela técnica anterior e é usado, por exemplo, na obtenção de sacarose da beterraba de açúcar. Em um processo de clareamento alternativo, os constituintes interferentes são retirados usando uma resina de troca iônica.

Em uma modalidade particularmente vantajosa do processo, os constituintes corantes são retirados na etapa c) por:

- i) misturar íons de magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ao extrato da planta,
- ii) misturar de pelo menos um componente alcalino ao extrato da planta,
- iii) formação de um precipitado, e
- iv) a remoção do precipitado que se formou do extrato da planta.

As etapas de (i) a (iv) nessa variante particularmente preferida são as subetapas da etapa de processo (c).

Esta variante de processo surpreendentemente permite uma descoloração mais eficaz do extrato comparado com o processo de clareamento com cal. Além disso, os auxiliares empregados, sais de magnésio e álcali, são de baixo custo. O processo é assim menos dispendioso do que o uso de uma resina de troca iônica. A despesa com aparelhagem e o tempo para executar essa etapa do processo é também particularmente baixa. Finalmente, este tipo de clareamento também simultaneamente retira materiais que causam turvação do extrato.

Os íons de magnésio ( $Mg^{2+}$ ) são misturados de acordo com a presente invenção ao extrato aquoso da planta. É possível em uma variante da etapa (i) acrescentar uma solução aquosa de um sal de magnésio ao extrato da planta. Em uma variante nova, mais preferida, um sal de magnésio é acrescentado diretamente na forma sólida ao extrato da planta e dissolvido na mesma.

Se um sal de magnésio for acrescentado, é preferivelmente um sal que, devido ao seu alto potencial de solubilidade, é muito rapidamente solúvel na água. Os sais de magnésio particularmente adequados são selecionados de cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, nitrato de magnésio, sais de magnésio de ácidos graxos inferiores, tais como acetato e propionato de magnésio, e misturas dos mesmos.

Um componente alcalino em (ii) significa de acordo com a presente invenção um componente compreendendo íons hidróxido ( $OH^-$ ) ou forma íons hidróxido no extrato depois de se combinar com o extrato da planta. O componente alcalino pode ser líquido, sólido ou gasoso. Um componente alcalino líquido é preferivelmente empregado.

Na adição de íons de magnésio e de um componente alcalino tal como descrito nas etapas (i) e (ii) do processo, um precipitado é formado por uma reação de precipitação. As etapas (i) e (ii) podem a princípio, no contexto do presente processo, ser executadas simultaneamente, particularmente se uma solução de íons de magnésio for usada na etapa (i) e um líquido alcalino for usado na etapa (ii). Contudo, é preferido executar a etapa de processo (i) primeiro e depois a etapa (ii).

É vantajoso para a etapa de processo (c) que tanto os íons de magnésio como o componente alcalino sejam distribuídos tão homogênea-mente quanto possível no extrato para que a reação de precipitação no extrato seja também homogênea e tão quantitativa quanto possível. Por isso, é preferido empregar como líquidos alcalinos aquosos componentes alcalinos tais como, por exemplo, soluções alcalinas ou suspensões alcalinas que possam ser rápida e homogênea-mente misturadas no extrato da planta. Uma solução ou a suspensão alcalina compreende os íons hidróxido ( $OH^-$ )

de acordo com a presente invenção ou são formados depois de serem combinados com o extrato da planta.

Em uma variante de processo muito preferida, um sal de magnésio é homogeneamente dissolvido no extrato primeiro na etapa (i). Posteriormente, na etapa (ii), são acrescentadas uma solução ou uma suspensão alcalina aquosa.

Em uma modalidade, o componente alcalino é uma solução ou suspensão aquosa de um hidróxido de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso. O hidróxido é preferivelmente selecionado do hidróxido de metais alcalinos e metais alcalinos-terrosos, tais como hidróxido de lítio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio e hidróxido de bário.

Em uma variante muito particularmente preferida, o componente alcalino é uma suspensão de hidróxido de cálcio. A vantagem de usar o hidróxido de cálcio consiste em que uma quantidade particularmente pequena de centrífugado é obtido na etapa (iii). Além disso, a precipitação simultânea de hidróxido de magnésio e sulfato de cálcio realiza uma maior taxa de sedimentação e uma maior compressibilidade do precipitado. O precipitado possui uma consistência particularmente um pouco gelatinosa. A ligação da inulina no precipitado permanece assim particularmente baixa nessa variante do processo.

Um componente alcalino adicional que pode ser usado é a amônia, preferivelmente em solução aquosa. Não é excluído, a princípio, o uso da amônia gasosa, mas isso é menos preferido do que o uso de uma solução aquosa.

Em uma modalidade adicional, o componente alcalino é uma solução aquosa ou uma suspensão de uma base orgânica, tal como a etilendiamina e trietanolamina.

Os sais de ácidos orgânicos fracos, tais como acetato de metal alcalino e de metal alcalino-terroso, particularmente acetato de sódio, acetato de potássio, acetato de cálcio e acetato de magnésio, também podem ser usados.

O hidróxido de magnésio é formado como precipitado. Os consti-

tuintes corantes do extrato aquoso permanecem de acordo com a presente invenção no precipitado e são assim separados da fase líquida. É obtido um extrato substancialmente descorado. As quantidades de íons  $Mg^{2+}$  e de componente alcalino empregados, e assim a quantidade de precipitado formado, determinam entre outras coisas quão quantitativo é o processo de descoloração. A otimização das quantidades dos reagentes está dentro das capacidades de um técnico experiente. No caso do sulfato de magnésio, a concentração preferível está em uma faixa e variação de 0,5% a 3% em peso, mais preferivelmente de 0,5% a 2% em peso do extrato aquoso.

Na variante preferida da etapa (c), como descrito acima, a razão molar de íons hidróxido para íons de magnésio  $OH^-:Mg^{2+}$  é preferivelmente de 2,2:1 a 1,8:1. É mais preferível para a razão que seja exatamente estequiométrica, isto é,  $OH^-:Mg^{2+} = 2:1$ . A quantidade do componente alcalino deve ser calculada para que esteja presente a quantidade adequada de íons hidróxido para íons de magnésio.

A dissolução do sal de magnésio e a mistura do componente alcalino nas etapas de processo (i) e (ii) preferivelmente ocorrem com agitação para atingir a dissolução e a homogenização o mais rápido possível e assim uma rápida reação. Contudo, não há nenhuma nova restrição determinada na técnica para mistura. Assim, o processo pode ser executado, por exemplo, também por outras técnicas de mistura familiares para o técnico experiente.

Para acelerar o processo, a etapa (i) é preferivelmente realizada em uma temperatura de 60°C a 80°C. O tempo da reação depois da adição do componente alcalino é geralmente de aproximadamente de 1 a 15 minutos, calculando uma média de aproximadamente 10 minutos.

A etapa de remoção (iv) preferivelmente se realiza por sedimentação ou filtração. A sedimentação pode ser feita mais rápida por uma centrífuga, preferivelmente uma centrífuga de disco, particularmente uma centrífuga para remoção de sedimentos. Contudo, outras técnicas de separação familiares para o técnico experiente também podem ser usadas. Essas também podem ser executadas em combinação umas com as outras,

para remoção de sedimentos por exemplo, centrifugação do extrato clarificado pela filtração subsequente do extrato sedimentado, por exemplo, com um filtro de placa.

5 Toda a etapa (c) do processo de acordo com a presente invenção pode, se necessário, também ser realizada mais do que uma vez. Se for usada a variante preferida anteriormente descrita da etapa (c) com as subetapas (i) a (iv), é também possível para as subetapas individuais (i) a (iv) sejam realizadas mais do que uma vez.

10 Depois da etapa (c), a inulina é precipitada a partir do extrato na etapa (d). A precipitação pode ser efetuada, por exemplo, acrescentando álcoois, tais como etanol, metanol ou isopropanol. Neste caso, dependendo da quantidade de álcool acrescentado ou do ajuste da polaridade da fase líquida, inicialmente as frações de inulina de pesos moleculares altos são precipitadas, de modo que é possível influir, via a quantidade de álcool acrescentado, quão quantitativamente a inulina presente no extrato é precipitada e que frações de peso moleculares são predominantemente obtidas.  
15 Além do álcool, é também possível empregar outros líquidos orgânicos não-polares que são miscíveis com a água.

20 Com essa finalidade, em uma modalidade particularmente vantajosa dessa etapa de processo, para limitar o uso de álcool, particularmente etanol e isopropanol, o extrato preparado é inicialmente concentrado, preferivelmente a um quarto a um quinto do seu volume inicial. A concentração pode ser realizada por evaporação ou filtração em membrana e por uma combinação de ambos os processos. Deve ser tomado cuidado neste caso  
25 em que o concentrado é armazenado quente durante a concentração, preferivelmente em 60°C a 95°C, para evitar a precipitação da inulina. Uma vantagem da filtração de membrana é a depleção, associada com a mesma, em substâncias de baixos pesos moleculares que acompanham a inulina. A precipitação subsequente da inulina do concentrado pode ser dirigida pela escolha  
30 lha da concentração do álcool acrescentado para que a inulina seja fracionada segundo as variedades de tamanho moleculares que são caracterizadas, por exemplo, pelo grau de polimerização ponderal médio (DPw). Dependem-

do da escolha das condições de precipitação, o resultado é frações possuindo o DPw de acordo com a presente invenção. Dependendo da pureza desejada.

É mais preferível obter a inulina esfriando o extrato do que pela precipitação alcoólica. As condições preferidas são tais que o extrato é resfriado a uma temperatura de 2°C a 10°C, mais preferivelmente de 2°C a 8°C, e mantido nessa temperatura durante o período de 6 h a 140 h, preferivelmente 6 h a 48 h, durante os quais a inulina precipita. A taxa de resfriamento e a temperatura, e a duração da influência do resfriamento na precipitação da inulina do extrato e a amplitude da distribuição de pesos moleculares e conseqüentemente, ao mesmo tempo, a quantidade. A escolha de um período mais longo e uma temperatura mais baixa resulta na precipitação da inulina de peso molecular mais baixo e uma distribuição mais ampla de pesos moleculares e assim um peso molecular médio mais baixo da fração precipitada. A inulina precipitada é separada da fase líquida por técnicas de separação convencionais tal como, por exemplo, centrifugação, deposição, filtração.

Em uma modalidade preferida, a inulina é cristalizada pela primeira vez depois da etapa de extração (b) e antes da etapa (c) do mencionado processo acima descrito. Tal cristalização é preferivelmente feita tal como descrito anteriormente. Cristalização antes da etapa (c) leva a um aumento no rendimento da inulina de alto peso molecular comparada com o clareamento direto do extrato, e economiza o uso dos agentes clarificadores, isto é, do composto de magnésio e do componente alcalino. É vantajoso clarear o extrato depois da primeira cristalização da inulina, pois neste caso somente os constituintes corantes ligados aos cristais de inulina devem ser retirados, o que leva do mesmo modo a uma quantidade menor de inulina ligada à lama de clareamento.

Uma primeira precipitação e a remoção da inulina precipitada podem ser seguidas por resfriamento renovado do extrato ou adição de álcool para obter qualquer fração de inulina que ainda está dissolvida. A decisão sobre a repetição é tomada caso a caso baseado em quão quantitativa-

mente a inulina deve ser obtida das plantas e que distribuição de pesos moleculares é desejada no produto final.

A concentração de inulina no extrato depende substancialmente do teor de inulina das raízes e da concentração das raízes trituradas no extrato e é uma nova variável possuindo um determinado efeito sobre a precipitação da inulina pelo resfriamento do extrato. A dependência da precipitação sobre a concentração, desse modo, pode ser utilizada para concentrar a fase líquida depois da primeira precipitação, por exemplo, pela evaporação, para precipitar também as frações de pesos moleculares baixos, se isso for desejado.

Na última etapa do processo (e), a inulina precipitada é reprecipitada. A "reprecipitação" significa no contexto da presente invenção que a inulina sólida, resultante da etapa do processo anterior, é redissolvida e depois precipitada e/ou cristalizada fora da solução novamente. Assim, a etapa de processo e) também pode ser formulado como: a inulina é dissolvida e precipitada e/ou cristalizada novamente, sendo que essa etapa é realizada pelo menos uma vez. A cristalização diferencia-se da precipitação porque naquelas são obtidas as estruturas predominantemente cristalinas.

A inulina é preferivelmente dissolvida sob a influência do calor e preferivelmente em água. A água com uma temperatura de 70°C a 100°C, particularmente de 90°C a 100°C, é particularmente adequada.

A precipitação na etapa (e) pode ser realizada pela precipitação alcoólica como anteriormente descrito. Contudo, a inulina é preferivelmente obtida esfriando a solução para 2°C a 10°C, mais preferivelmente de 2°C a 8°C, durante o período de 6 a 140 h, preferivelmente 6 h a 48 h.

A precipitação da inulina dissolvida na etapa (e) pode ser repetida para obter a inulina que ainda permanece na fase líquida. Uma decisão sobre a repetição deve ser tomada caso a caso dependendo de quão quantitativamente a inulina deve ser obtida das plantas e que distribuição de pesos moleculares é desejada no produto final. A fase líquida pode ser concentrada para simplificar a precipitação.

Depois da reprecipitação, a inulina sólida resultante é separada

da fase líquida por técnicas de separação convencionais tal como, por exemplo, centrifugação, deposição e filtração.

Para influenciar na distribuição de massa molecular e na pureza do produto de inulina resultante, a etapa de processo (e) pode ser realizada mais de uma vez. Surgiu o resultado de que as médias do peso molecular e as médias do grau de polimerização são deslocadas para valores mais altos pela repetição da etapa de reprecipitação (e). É assim possível estabelecer várias médias do peso molecular/grau de polimerização da inulina de acordo com a presente invenção dentro da faixa de variação reivindicada.

Se a impureza de partículas finas estive presente ainda, é vantajoso inserir uma ou várias etapas de filtração no processo. Qualquer impureza presente de partículas finas é retirada na filtração. A porozidade do filtro é escolhida pelo técnico experiente dependendo do tamanho de partícula da impureza.

A(s) etapa (s) de filtração pode(m) ser inserida(s) em qualquer parte no processo depois de obtido o extrato. Uma etapa de filtração diretamente depois de obtido o extrato na etapa (b), por exemplo, é vantajoso. A etapa de filtração deve ser diferenciada da etapa de remoção de materiais suspensos tal como descrito anteriormente, porque as partículas retiradas pela filtração são mais finas do que os materiais suspensos, que consistem principalmente em fibras. Em uma modalidade adicional preferida, a etapa de filtração é executada antes da etapa (d).

A etapa de filtração é preferivelmente combinada com uma reprecipitação tal como descrito para a etapa de processo (e). Isso implica a inulina sendo dissolvida tal como anteriormente descrito para a etapa (e), e a solução depois sendo filtrada. Depois da filtração, a inulina é precipitada ou cristalizada para fora da solução filtrada. A inulina sólida resultando depois da precipitação ou cristalização pode ser separada da fase líquida por técnicas de separação convencionais, tal como, por exemplo, centrifugação, deposição e filtração.

Em alguns casos a inulina resultante pode ser descorada por substâncias que não podem ser retiradas pela filtração. Em tais casos é pre-

ferível retirar as impurezas corantes por um tratamento com o carbono ativado. Em uma modalidade o carvão vegetal ativo é suspenso na água e acrescentado a uma solução de inulina em uma temperatura acima de 80°C, preferivelmente acima de 90°C. No caso de uma solução de inulina de 20% em peso a quantidade de carbono ativo está preferivelmente em uma faixa de variação de 1% a 10% em peso, preferivelmente de 2% a 6% em peso, mais preferivelmente de 2% a 3% em peso, baseado no peso da solução de inulina. Depois da adsorção da impureza corante, o carbono ativado é retirado por centrifugação e/ou filtração. A suspensão de carbono ativado pode ser pré-clarificada pela separação da lama de carbono ativado em centrífuga e depois clarificação pela filtração em duas etapas, por exemplo, com uma combinação de um filtro pré-revestido de kieselguhr e um filtro de folha de papel. É importante que durante a separação do carvão vegetal ativo da solução de inulina a temperatura seja mantida acima 80°C, preferivelmente acima 90°C, para manter a inulina em solução. Depois da remoção do carvão vegetal ativo, a inulina pode ser precipitada ou cristalizada e separada da fase líquida tal como descrito acima.

Depois da separação da fase líquida, o produto final pode ser lavado novamente com a água ou uma mistura de água/álcool. A lavagem com a água fria em uma temperatura de 2°C a 10°C é preferida. Com essa finalidade, a inulina precipitada é tornada em lama na água e a inulina é então novamente sedimentada.

A inulina resultante é preferivelmente seca em uma última etapa adicional do processo. A secagem pode ser realizada por secagem por congelamento, secagem por atomização ou secagem em tambor.

Em uma modalidade preferida, a inulina de acordo com a presente invenção está na forma secada por secagem por atomização. Os parâmetros adequados para secagem por atomização são descritos nos exemplos anexos. É mesmo evidente que em caso de um processo de secagem por atomização uma inulina precipitada ou cristalizada deve ser transformada em uma suspensão (em água abaixo de aproximadamente 80°C) ou em uma solução (em água acima de aproximadamente 80°C) novamente. Alter-

nativamente, uma última etapa de precipitação ou de cristalização, tal como descrito acima, pode ser omitida e a inulina suspensa ou dissolvida do processo pode ser seca diretamente por secagem por atomização. É possível acrescentando que a inulina secada por secagem por atomização de acordo com a presente invenção ao líquido preparou produtos alimentícios para a viscosidade a ser aumentada particularmente efetivamente. Na adição de quantidades iguais da inulina de acordo com a presente invenção, um maior aumento na viscosidade é atingido com uma inulina secada por secagem por atomização comparada com uma inulina seca de outro modo (por exemplo, secagem por congelamento).

Em ainda uma modalidade adicional preferida, a inulina de acordo com a presente invenção está na forma granulada por secagem por atomização. A inulina granulada por secagem por atomização é obtida por processos conhecidos, por exemplo, introduzindo um material anteriormente seco por secagem por atomização como semente de granulação e secando por atomização a inulina adicional. Uma inulina com um tamanho de partícula de 10  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ , por exemplo, pode servir da carga inicial. As condições adequadas de granulação por secagem por atomização são, por exemplo, uma composição de alimentação de água a 70% e inulina a 30% em uma temperatura de alimentação de 90°C.

A inulina de acordo com a presente invenção muito particular e preferivelmente possui um diâmetro médio de partícula de 50  $\mu\text{m}$  a 350  $\mu\text{m}$ , mais preferivelmente de 80  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$ , bem mais preferivelmente de 100  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$  e bem mais preferivelmente de 100  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ . Tal inulina é assim um aspecto adicional da presente invenção.

O diâmetro médio de partícula pode ser determinado tanto pela análise de peneira de uma amostra seca como por espalhamento da luz. O método preferido é, contudo, a análise de peneira para que a inulina de acordo com a presente invenção preferivelmente tenha um diâmetro médio de partícula de 50  $\mu\text{m}$  a 350  $\mu\text{m}$ , mais preferivelmente de 80  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$ , mesmo mais preferivelmente de 100  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$  e bem mais preferivelmente de 100  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , determinado por análise de peneira.

Em uma modalidade, a inulina de acordo com a presente invenção possuindo os tamanhos de partícula descritos é obtida por processo de granulação por secagem por atomização ou secagem por atomização. Uma inulina secada por secagem por atomização ou granulada por secagem por atomização possuindo os tamanhos de partícula anteriormente descritos é assim um aspecto adicional da presente invenção.

É possível ajustar o diâmetro médio preferido de partícula de uma inulina seca por meio do fracionamento da peneira no caso em que, depois da secagem, o diâmetro ainda esteja fora da faixa preferida. A seleção da peneira adequada está dentro da competência do técnico com experiência mediana.

As partículas de inulina de acordo com a presente invenção preferivelmente possuem uma fração cristalina de menos do que 45%, mais preferivelmente menos do que 40%, bem mais preferivelmente menos do que 35%. Em uma modalidade adicional preferida, menos que 20%, bem mais preferivelmente menos do que 10%. Na modalidade mais preferida, o grau de cristalinidade é menos do que 1%. Os graus determinados de cristalinidade são determinados pelo método de Ruland-Vonk (W. Ruland, *Acta Cryst.*, 14, 1180 (1961); C.G. Vonk, *J. Appl. Cryst.* 6, 148 (1973)). O método para determinar o grau de cristalinidade é descrito detalhadamente nos exemplos anexos. Um grau baixo de cristalinidade confere melhores propriedades de dissolução à inulina, o que é vantajoso em certas aplicações em gêneros alimentícios.

Em ainda um aspecto adicional, a presente invenção também se refere a composições compreendendo a inulina anteriormente descrita de acordo com a presente invenção e um ou vários ingredientes comestíveis ou farmacologicamente aceitáveis. As composições típicas incluem gêneros alimentícios para seres humanos e animais, bebidas, gêneros alimentícios funcionais, medicamentos e composições farmacêuticas (inclusive composições profiláticas e composições terapêuticas), e como intermediário dos mesmos.

Um gênero alimentício funcional significa, no contexto de acordo com a presente invenção, um gênero alimentício que à parte dos nutrientes

tradicionais compreende um ingrediente que pode ter um efeito promotor da saúde (definição do Instituto da Medicina da Academia Nacional de Ciências dos EUA, 1994).

Os ditos ingredientes comestíveis ou farmacologicamente aceitáveis são preferivelmente selecionados do grupo consistindo em açúcar (por exemplo, glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, maltose, isomaltose, polidextrose), polióis (por exemplo, sorbitol, lactitol, maltitol, isomalte, manitol, xilitol), maltodextrinas, adoçantes, xaropes de glicose hidrogenada, adições alimentícias para seres humanos e animais, intermediários alimentícios para seres humanos e para animais, produtos alimentícios para seres humanos e para animais, líquidos comestíveis, bebidas, fontes biodisponíveis de sais minerais, veículos farmacologicamente aceitáveis, substâncias farmacológica e terapeuticamente ativas, composições farmacêuticas e medicamentos.

Uma composição particularmente preferida, de acordo com a presente invenção, inclui a inulina de acordo com a presente invenção na presença de uma fonte comestível ou farmacologicamente aceitável, biodisponível de sais minerais, particularmente uma fonte de cálcio e/ou magnésio e/ou ferro, tal como, por exemplo, laticínios, sais e complexos de cálcio, magnésio e ferro.

Tal como acima explicado, o objetivo de acordo com a presente invenção foi fornecer uma inulina com propriedades particularmente vantajosas para uso em gêneros alimentícios, com os termos produtos alimentícios e gêneros alimentícios sendo equivalentes de acordo com a presente invenção. Em um aspecto adicional, a presente invenção também se refere a gêneros alimentícios e suplementos dietéticos compreendendo a inulina anteriormente descrita. O termo gêneros alimentícios inclui de acordo com a presente invenção ambos os gêneros alimentícios para seres humanos e gêneros alimentícios para animais, ou forragem. Os suplementos dietéticos incluem suplementos dietéticos para seres humanos e para animais.

Um gênero alimentício particularmente preferido é selecionado de laticínios, iogurtes, sorvetes, sorvete suave a base de leite, guarnições a

base de leite, pudins, milkshakes, manjar de ovo, queijo, barras alimentícias, barras nutritivas, barras matinais, confeitaria, produtos de panificação, biscoitos finos, biscoitos, craquers, aperitivo de cereal, produtos para refeição ligeira, chá gelado, sorvete feito com suco de frutas, bebidas dietéticas, bebidas acabadas, bebidas para desportistas, bebidas energéticas, misturas em pó para bebida de suplemento alimentar, alimento infantil e pediátrico, suco de laranja complementado com cálcio, pão, croissants, cereais matinais, macarrões, pastas, biscoitos e chocolates sem açúcar, alimentos mastigáveis contendo cálcio, produtos a base de carne, maionese, guarnições de 5  
10 salada, pasta de nozes, refeições congeladas, molhos, sopas e refeições prontas para servir. Os gêneros alimentícios compreendendo a inulina de acordo com a presente invenção são bem mais preferivelmente um laticínio, particularmente um iogurte. A inulina de acordo com a presente invenção mostra um efeito particularmente bom sobre a estabilidade, a textura, a 15  
20 apresentação encorpada e a sensação ao paladar de laticínios, particularmente do iogurte, com possibilidades de serem iogurtes batidos, iogurtes fermentados no próprio pote ou bebidas a base de iogurte.

Outros laticínios úteis de acordo com a presente invenção são o creme, a coalhada, o coalho, a manteiga, o leite, particularmente o leite desnatado, o soro de leite, o leite azedo, o quefir, o queijo, tal como o requeijão, 20  
queijo branco, o queijo prato, queijo duro, soro, leite em pó e bebidas na base de leite.

Um nível preferido de inulina em gêneros alimentícios, particularmente nos laticínios, particularmente no iogurte, é de 0,2% a 5% em peso, 25  
preferivelmente de 0,5% a 4,5% em peso da inulina seca, baseada no peso total de todos os componentes dos gêneros alimentícios, laticínios, ou iogurte.

Em uma modalidade de acordo com a presente invenção, os gêneros alimentícios são gêneros alimentícios fabricados por um processo de extrusão, tal como, por exemplo, um cereal matinal. 30

Em um aspecto adicional, a presente invenção se refere a preparações cosméticas compreendendo a inulina anteriormente descrita. A

preparação cosmética particular e preferivelmente toma a forma de cremes, particularmente os cremes para a pele e para o rosto.

Em um aspecto adicional, a presente invenção também se refere ao uso da inulina anteriormente descrita como adição em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais e preparações cosméticas. Uso também se refere particularmente a todos os gêneros alimentícios específicos e preparações cosméticas como acima mencionado.

Em ainda um aspecto adicional, a presente invenção se refere ao uso da inulina de acordo com a presente invenção para a fabricação de uma composição farmacêutica ou de um medicamento.

A inulina de acordo com a presente invenção pode ser vantajosamente usada em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais, composições farmacêuticas ou medicamentos que sirvam para modificar ou regular a composição da flora bacteriana no intestino grosso, particularmente na região distal do intestino grosso, de seres humanos, mamíferos e outros videtebrados.

É do mesmo modo possível usar a inulina de acordo com a presente invenção em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais, composições farmacêuticas ou em medicamentos que sirvam para modificar ou regular o padrão de fermentação da inulina no intestino grosso, particularmente na região distal do intestino grosso, de seres humanos, mamíferos e outros videtebrados.

Um uso adicionalmente preferido de inulina de acordo com a presente invenção é o uso como substituto da gordura ou do óleo e/ou como uma fibra alimentícia em gêneros alimentícios, em que o termo "gêneros alimentícios" abrange pelo menos todos os gêneros alimentícios acima mencionados, particularmente todos os laticínios acima mencionados. É vantajoso que as propriedades sensoriais, particularmente a impressão deixada na boca, sejam excelentes quando comparadas com a inulina convencional. Assim, a inulina de acordo com a presente invenção também pode ser usada como um melhorador das propriedades sensoriais, sobretudo como um melhorador da impressão deixada na boca, em gêneros alimentícios.

Um uso adicional da inulina de acordo com a presente invenção é o uso como um agente texturizante, agente melhorador da estabilidade, agente construtor da viscosidade, particularmente em gêneros alimentícios e cosméticos. O termo "gêneros alimentícios" abrange pelo menos todos os  
5 gêneros alimentícios acima mencionados, particularmente todos os laticínios acima mencionados.

Finalmente, a inulina de acordo com a presente invenção pode ser usada em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais, composições farmacêuticas ou em medicamentos possuindo os seguintes efeitos  
10 vantajosos: os efeitos de fibras, a regulação das funções do intestino, efeito prebiótico e/ou bifidogenicidade, absorção aumentada de sais minerais como, por exemplo, cálcio, magnésio e ferro, aumento na densidade de mineral dos ossos, aumentando no teor de minerais nos ossos, aumentando a massa máxima nos ossos, melhorando a estrutura dos ossos, redução da  
15 perda da densidade de minerais dos ossos, redução da perda de estrutura dos ossos, a regulação do metabolismo de lipídios, estimulação do sistema imune, prevenção do câncer e redução do risco de câncer, prevenção do câncer do intestino grosso e redução do risco de câncer do intestino grosso e prevenção do câncer de mama.

20 A presente invenção é explicada abaixo por meio de exemplos que não são destinados a limitar o conceito geral da presente invenção.

## EXEMPLOS

### Métodos Gerais

#### 1. Determinação de Frutano

##### 25 1.1 Determinação de Frutano por Hidrólise com Exoinulinase

As soluções de inulina a serem medidas são preparadas pesando exatamente 50,0 +/- 5,0 mg da inulina em um frasco graduado de 1 ml. 700 µl de H<sub>2</sub>O deionizada são adicionados até dissolução. A amostra então é agitada para separar o material da amostra bem como se possível do fundo do vaso, e então é colocada em um banho de água quase à fervura  
30 (~99°C) por 8 minutos. Durante a incubação, o frasco graduado é agitado cada 30 segundos. Depois da incubação, a amostra é deixada esfriar à tem-

peratura ambiente e depois é completada até a marca de 1 ml com H<sub>2</sub>O deionizada. A solução de mostra possui uma concentração de inulina de 5,0 +/- 0,5%.

5 Para determinação de açúcar antes de digestão, 200 µl são retirados e congelados a -20 °c. Antes da medição do açúcar, essa amostra é descongelada à temperatura ambiente, misturada, dissolvida por agitação em 1400 rpm sobre um bloco de aquecimento a 95°C por 5 minutos, e centrifugado em 4000 rpm por 2 minutos.

10 Para a hidrólise, 50 µl da solução de inulina com concentrações de aproximadamente 5% são postos na mistura de digestão composta de 50 µl de citrato de Na a 1M com pH 4,6, 25 µl de exoinulinase (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Irlanda, produto n°. E-EXO1, 2,5 U / µl) e 375 µl de H<sub>2</sub>O deionizada. A digestão é misturada e centrifugada em 4000 rpm por 1 minuto. A digestão então é incubada sobre um bloco de aquecimento a 40°C por 4 h. Todas as amostras digeridas são congeladas a -20 °c.  
15 Antes da medição de açúcar, estas amostras são descongeladas na temperatura ambiente, misturadas e centrifugadas em 4000 rpm por 2 minutos. Para a medição da frutose, uma diluição 1:10 é preparada acrescentando 10 µl da mistura de digestão a 90 µl de H<sub>2</sub>O deionizada.

20 Para determinar a frutose e glicose liberada na digestão, uma medição fotométrica de glicose e frutose é realizada em todas as amostras tal como descrito na "determinação de açúcar (glicose, frutose, sacarose)". Além da glicose e frutose, também a sacarose é determinada na amostra antes de digestão.

25 A solução de inulina não diluída com concentrações de 5% é usada para a medição de açúcar antes de digestão. 10 µl desta solução são adicionados a 200 µl de tampão de medição. Para medição de glicose nas amostras digeridas, 10 µl das amostras não diluídas são adicionados a 200 µl de tampão de medição. Para medição da frutose nas amostras digeridas,  
30 10 µl de amostras diluídas a 1:10 são adicionados a 200 µl de tampão de medição.

O cálculo está baseado em um coeficiente de extinção de molar

de  $6,23 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para a conversão de NADP a NADPH, tal como na determinação de açúcar. A concentração de glicose e de frutose presentes antes da digestão é subtraída das concentrações de glicose e de frutose nas amostras digeridas. Do mesmo modo, são subtraídas a glicose e a frutose que seriam liberadas da sacarose hidrolizada presente na amostra antes de digestão.

As concentrações de frutose e glicose formadas durante a digestão da inulina são então obtidas. O teor frutano é obtido pela adição dos teores de glicose e de frutose e com a inclusão do fator 162/180 para a conversão das hexoses livres medidas nas hexoses ligadas ao frutano.

## 2. Determinação de açúcar (glicose, frutose e sacarose)

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados por fotometria em um ensaio de enzimático via a conversão de NADP<sup>+</sup> (fosfato de dinucleotídio nicotinamida adenina) a NADPH (dinucleotídio nicotinamida adenina reduzido). O caráter aromático do anel de nicotinamida é perdido na redução, e assim o espectro de absorção é modificado. Essa modificação no espectro de absorção pode ser detectada por fotometria.

A glicose e frutose são convidetidas por meio da enzima hexoquinase e trifosfato de adenosina (ATP) sobre o fosfato de glicose-6 e o fosfato de frutose-6. O fosfato de glicose-6 então é oxidado pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase a 6-fosfogliconato. NADP<sup>+</sup> é reduzido a NADPH nessa reação, e a quantidade de NADPH formado é medido por fotometria. A proporção de NADPH formado para a glicose presente no extrato é 1:1, para que o teor de glicose possa ser calculado do teor NADPH usando o coeficiente de extinção de molar de NADPH ( $6,23 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) segundo a lei da Lambert-Beer.

Depois que a oxidação do fosfato de glicose-6 está completa, o fosfato de frutose-6 que é do mesmo modo produzido na solução é convertido pela enzima fosfoglucoisomerase em fosfato de glicose-6, que por sua vez é oxidado a 6-fosfogliconato. A proporção de frutose e a quantidade de NADPH formado são também 1:1. O conteúdo de frutose é calculado da quantidade de NADPH formado, como descrito para a glicose.

Posteriormente, a sacarose presente no extrato é clivada pela enzima sucrase (da Megazyme) em glicose e frutose. As moléculas glicose e frutose liberadas então são convidetidas pelas enzimas supracitadas na reação dependente do NADP<sup>+</sup> em 6-fosfogliconato. Duas moléculas de NADPH são formadas na conversão de uma molécula de sacarose em 6-fosfogliconato. A quantidade de NADPH formado é do mesmo modo medida por fotometria, e o teor de sacarose é calculado do mesmo usando o coeficiente de extinção molar de NADPH.

Uma solução de inulina de concentrações de 5% como descrito na "determinação de frutano pela hidrólise com exoinulinase" é usada para a medição de açúcar. 10 µl desta solução são adicionados a 200 µl de tampão de medição. A medição se realiza como determinação em duplicada em microplacas usando os fotômetros SPECTRAMax (Dispositivos Moleculares). Todas as soluções de enzima usadas são compostas no tampão de medição composto de imidazol em HCl a 50 mM e pH 6,9, MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, ATP a 1 mM e NADP a 0,4 mM. A conversão de NADP a NADPH é avaliada em um comprimento de onda de 340 nm.

A determinação de glicose se realiza acrescentando 2 µl de uma mistura de hexoquinase (de levedura, 0,3 U/µl) e glicose-6-fosfato desidrogenase (de levedura, 0,14 U/µl). Depois que a conversão da glicose é completa, 2 µl de fosfoglicose isomerase (de levedura, 0,14 U/µl) são adicionados para determinar a frutose. Quando a frutose é completamente convidetida, 2 µl de sucrase (da Megazyme, 0,2 U/µl) são adicionados para clivar a sacarose presente. O cálculo de glicose, frutose e sacarose se realiza tal como descrito.

### 3. Análise da Distribuição de Pesos Moleculares

#### 3.1 Cromatografia de Permeação em Gel com Espalhamento da Luz e Detecção do Índice de Refração (sistema GPC-RI-MALLS)

As inulinas/frutanos são dissolvidas em água extra pura em uma concentração de 0,5% (p/v). As soluções são aquecidas a 95°C durante 30 minutos. O polímero é analisado usando os seguintes dispositivos: Sistema de Cromatografia Alliance (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EU-

A), Detector de Espalhamento de Luz DAWN-EOS (Wyatt Technology, Santa Barbara, EUA) com  $\lambda_0 = 658$  nm e 16 detectores em uma faixa e variação de ângulos de  $14,4^\circ$  a  $163,3^\circ$ , célula de fluxo K5. Os polímeros são fracionados em uma pré-coluna e três colunas possuindo as faixas de separação de  $300$  a  $10^4$ , de  $5 \times 10^4$  a  $2 \times 10^6$  e de  $10^6$  a  $10^8$  (SUPREMA-Gel, PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemanha). São injetados  $100 \mu\text{l}$  da solução. O fracionamento se realiza em uma temperatura de  $30^\circ\text{C}$  em uma taxa de fluxo de  $0,8$  ml/min com  $\text{NaNO}_3$  a  $0,05\text{M}$  como eluente. O programa Astra V 5.1.8.0 (Wyatt Technology, Santa Barbara, EUA) é usado para analisar a distribuição de pesos moleculares das amostras.

### 3.2 Cromatografia de Permeação em Gel com Detenção de Índice de refração (sistema GPC-RI)

A inulina é dissolvida no eluente (DMSO +  $\text{NaNO}_3$  a  $90\text{mM}$ ) em uma concentração de  $1\%$  (p/v) agitando suavemente em um agitador térmico a  $95^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Depois de um breve resfriamento, a solução de inulina é diluída a  $0,1\%$  com eluente ( $100 \mu\text{l}$  de solução de inulina +  $900 \mu\text{l}$  de eluente) e imediatamente colocado no auto-amostrador a  $60^\circ\text{C}$ . O polímero é analisado usando a seguinte aparelhagem: bomba Dionex P580, auto-amostrador Dionex AS50, forno de coluna Dionex modelo 585 (Dionex GmbH, Idstein, Alemanha), detector Shodex RI-71 (Shodex/Shoko Co. LTD, Tóquio, Japão). Os sistemas são controlados pelo software Chromeleon (Dionex GmbH, Idstein, Alemanha). O polímero é fracionado em uma pré-coluna PSS GRAM,  $10 \mu$ , e colunas de separação PSS GRAM 3000,  $10 \mu$  e PSS GRAM 100,  $10 \mu$  (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemanha).  $50 \mu\text{l}$  de solução de inulina a  $0,1\%$  são injetados para análise. O fracionamento se realiza no forno de coluna em uma temperatura de  $60^\circ\text{C}$  e com uma taxa de fluxo de  $0,7$  ml/min com o eluente DMSO +  $\text{NaNO}_3$  a  $90\text{mM}$ . Para determinar as massas moleculares, o sistema é calibrado com os seguintes padrões de dextrano (produto n° 31430, Fluka Riedel-deHaen, Seelze, Alemanha): dextrano T1 (Mw 1270), T5 (Mw 5220), T12 (Mw 11600), T25 (Mw 23800), T50 (Mw 48600), T80 (Mw 80900), T150 (Mw 147600), T270 (Mw 273000), T410 (Mw 409800) T670 (667800). O programa PSS

WinGPC compacto V.6.20 (PSS, Mainz, Alemanha) foi usado para analisar a distribuição de pesos moleculares das amostras.

#### 4. Determinação do Teor de Água

O teor de água é determinado usando um titulador AQUA 40.00 Karl-Fischer (Analytikjena AG). Hydranal-Coulomat AG (Riedel-deHaën, artigo N° 34836) foi usado como anólito. A substância de referência usada foi o tartarato dibásico do sódio diidratado (Riedel-deHaën, artigo N° 32323) com um teor de umidade de 15,61% a 15,71%. De 10 mg a 20 mg de amostra são pesados em frascos de mostra de 5 ml (N20-5DIN, Machery-Nagel, artigo N° 702 04.36), os frascos são fechados com tampas seladas (N20 TS/oA, Machery-Nagel, artigo N° 702815), e o teor de água da amostra é determinado usando o titulador Karl-Fischer.

#### 5. Determinação do Grau de Ramificação

A inulina é inicialmente permetilada e a metilação completa é videificada por espectroscopia ATR-IR (vide abaixo para aparelhagem e condições). As amostras então foram decompostas por hidrólise ácida (análise de metilação-padrão) ou alternativamente pela degradação redutora nos seus blocos construtores monoméricos, e a composição molar relativa foi determinada por cromatografia em gás (veja abaixo em relação à aparelhagem e condições) e cromatografia em gás espectroscopia de massa (CG-MS, vide abaixo em relação à aparelhagem e condições) dos acetato de alditol e acetato de anidroalditol parcialmente metilados.

##### ATR-IR.

Aparelho: Bruker Tensor 27.

25 Técnica: Diamond ATR.

##### CG:

Aparelho: Carlo Erba HRGC 5160 Série Mega.

Coluna: Chrompack CPSil8CB (25 m) com fenda de retenção (1,5 m).

DI: 0,25 mm DF: 0,25 µm.

30 Gás veículo: He (80 kPa).

Detector: FID.

Injetor: na coluna.

Integrador: Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrador.

Programa de temperatura: 60°C (1 minuto isotérmico), 10°C/min até 170°C, 3°C/min até 230°C, 20°C/min até 290°C (20 minutos isotérmicos).

#### CG-MS

5 Aparelho CG: Agilent 6890 GC.

Coluna: HP-5, 30 m.

Gás veículo: He.

Injetor: Fenda 5:1.

10 Programa de Temperatura: 60°C (1 minuto isotérmico), 10°C/min até 170°C, 3°C/min até 230°C, 20°C/min até 290°C (20 minutos isotérmicos).

Aparelho MS: JEOL GCmate II espectrômetro de campo de setor de duplo foco.

Modo: EI, 70 eV

Avaliação: AMDIS32, Wsearch32

#### 15 5.1 Permetilação

(De acordo com Ciucanu e Kerek / Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984), um método simples e rápido para permetilação de carboidratos. *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.)

20 Aproximadamente 50 mg da amostra são dissolvidos em 2,5 ml de sulfóxido de dimetila. Então, 3 eq/OH de hidróxido de sódio finalmente moído e 3 eq/OH de iodeto de metila são adicionados e agitados na temperatura ambiente durante 24 horas. Então, a metade da quantidade de cada um dos reagentes é acrescentada mais uma vez. As amostras estão posteriormente dializadas em água destilada durante quatro dias (membrana de

25 diálise Spectra/Por MWCO 3500, Spectrum laboratories, Rancho Dominguez, Califórnia, EUA) e secada por congelamentos. A metilação completa é videificada pela espectroscopia ATR-IR. A vibração de estiramento OH em uma faixa de variação de 3300 cm<sup>-1</sup> a 3400 cm<sup>-1</sup> deve ter desaparecido se ocorrer a permetilação.

#### 30 5.2 Análise de metilação-padrão

##### Hidrólise

Aproximadamente 2 mg da inulina permetilada são misturados

em um frasco V de 1 ml com 0,9 ml de ácido trifluoroacético a 0,5 M e hidrolizada por agitação a 90°C durante uma hora. Depois que a solução resfriou é evaporada à secura em um fluxo de nitrogênio. Os resíduos de ácido trifluoroacético são retirados por co-destilação com o tolueno.

## 5 Redução

A amostra hidrolizada é misturada com 500 µl de uma solução de NaBD<sub>4</sub> a 0,5 M em NH<sub>3</sub> a 2 M e aquecido a 60°C durante uma hora. Depois do resfriamento, o boroidreto de sódio em excesso é decomposto acrescentando algumas gotas de ácido acético glacial. O borato resultante é retirado por co-destilação com ácido acético metanólico a uma concentração de 15%.

### Acetilação

Os açúcares álcoois parcialmente metilados resultantes da redução são misturados com 200 µl de anidrido acético e 50 µl de piridina e acetilados a 90°C durante 2 horas. A solução é resfriada e a solução de bicarbonato de sódio saturada é acrescentada até que nenhuma nova formação de gás seja observada. Depois é extraída quatro vezes com 15 ml de diclorometano de cada vez. As fases orgânicas combinadas são lavadas duas vezes com 15 ml da solução NaHCO<sub>3</sub> saturada de cada vez, uma vez com 20 ml de HCl a 0,1 M a frio e uma vez com 25 ml de água destilada. A solução então é seca sobre cloreto de cálcio e concentrada a vácuo, e retomada em diclorometano grau CG.

### 5.3 Degradação Redutora

Aproximadamente 1 mg da amostra permetilada é dissolvido em 500 µl de diclorometano em um frasco de vidro com tampa de rosca, misturado com 6 eq/glicosídeo ligado em trietil silano e 4 eq de TMS triflato e agitado em temperatura ambiente durante 2 horas. Depois de adição de 20 µl do anidrido acético, a agitação é continuada na temperatura ambiente durante 2 horas. A reação então é parada acrescentando a solução de NaHCO<sub>3</sub> aquosa saturada, e a agitação é continuada durante 1 hora. O trabalho se realiza por extração com diclorometano e lavagem subsequente das fases orgânicas combinadas com solução NaHCO<sub>3</sub> aquosa saturada e água desti-

lada. A solução é finalmente seca sobre cloreto de cálcio, concentrada sob um fluxo de nitrogênio e retomada em diclorometano grau CG.

#### 5.4 Análise Qualitativa e Quantitativa

Os produtos de degradação foram analisados quantitativamente por cromatografia gasosa com injeção na coluna e detector de ionização de chama (FID). As áreas dos picos foram corrigidas de acordo com a sua efetiva resposta de carbono. Os picos foram identificados com base no seu espectro de massa (CG-MS) e em comparação com os tempos de retenção de amostras conhecidas.

#### 10 6. Varredura Diferencial da Inulina por Calorimetria

40 ml de uma solução de inulina com concentrações de 15% (p/v) foram preparados em tubos de polipropileno graduados de 50 ml (30,0 x 115 mm, da Greiner, nº catálogo 227261). Isso foi feito acrescentando o respectivo pó em água duplamente destilada e agitando. Posteriormente, toda a suspensão preparada é colocada em um banho de água (95°C) e dissolvida agitando várias vezes. Depois de 20 minutos, é estabelecido visualmente que toda a suspensão está completamente dissolvida. As soluções preparadas são então divididas em partes iguais em duas provetas de 50 ml de polipropileno (30,0 x 115 mm, da Greiner, nº catálogo 227261) e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. As soluções congeladas foram então secada por congelamentos durante dois dias (teor de água de aproximadamente 10%) e moídas em um gral.

O teor de água das amostras é determinado usando um titulador automático de Karl-Fischer (vide métodos gerais 4).

25 Para uma medição do DSC, aproximadamente 10 mg da substância seca da inulina são pesados em um cadinho de aço inoxidável (volume 50 µl), o peso exato é encontrado, e 30 µl da água destilada são adicionados. Os cadinhos então são hermeticamente selados. Um cadinho de aço inoxidável vazio é usado como referência. A amostra é aquecida em um aparelho DSC com o auto-amostrador (Perkin Elmer; Diamante) de 10°C a 30 160°C em uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto. A análise de dados é executada pelo programa do software PYRIS 7.0 (Perkin Elmer, 63110 Rod-

gau-Jügesheim, Alemanha). Isso constrói a determinação do  $T_0$  (partida) e da entalpia livre dH.

### 7. Determinação de Viscosidade

As soluções aquosas de inulina de várias concentrações (peso em volume de água destilada) foram preparadas agitando a 98°C, e as soluções claras foram medidas imediatamente depois de um tempo de dissolução não maior do que 13 minutos. As medições foram executadas em um reômetro BOHLIN Gemini Advanced (Malviden Instruments; Herrenberg, Alemanha) utilizando o modo de viscometria isotérmica (90°C) em um sistema de placa cônica CP4°/40 mm. A fenda de medição foi coberta com óleo de parafina extraleve. Foi usada uma taxa ao cisalhamento de 10 s<sup>-1</sup> por 60 s com um tempo de relaxamento de 10 segundos. O cisalhamento foi medido em etapas logarítmicas na forma de taxa de cisalhamento. A taxa de cisalhamento inicial foi 20 s<sup>-1</sup>, a taxa de cisalhamento final foi 30 s<sup>-1</sup> em uma função rampa de crescimento com um tempo de espera de 20 s um tempo de integração de 10 s. Os dados são baseados nos valores médios em uma faixa e variação de 20 s<sup>-1</sup> a 30 s<sup>-1</sup> e são as médias de três medições independentes por ponto de dados. Todas as medições especificadas como fora da faixa não estão incluídas nos valores médios. A definição de "fora da faixa" realizou-se pelo assim chamado "método do quadrante". Isso implicou que medições fora da faixa são aquelas medições que estão fora da faixa de variação do critério  $Q_2 - k * (Q_3 - Q_1) \leq$  nenhuma medição fora  $\leq Q_2 - k * (Q_3 - Q_1)$  (SACHS, Lothar: *Angewandte Statistik*, 10a edição, Springer-Verlag Berlin (2002), páginas 364 e seq.).  $Q_1$  e  $Q_3$  aqui são um quadrante de 25% e um quadrante de 75%, respectivamente, e  $Q_2$  é o número médio (quadrante de 50%) dos dados medidos. Um valor de 1,5 foi usado para o fator k.

### 8. Determinação de concentrações de gel e comportamento viscoelástico

70 g de suspensão de inulina 17% em peso em água (destilada) foram postos em um copo de medição MV de um viscosímetro Haake Rotovisco VT 550. Um agitador de pá então foi introduzido e montado em um aparelho preaquecido (90°C, camisa de aquecimento). A mistura então foi aquecida com a agitação a 128 rpm por 15 minutos.

Depois de 15 minutos, a mistura foi transferida a 90°C para um container consistindo em uma base e uma parede composta de dois anéis cilíndricos da folha acrílica (cada um de 20 mm de altura, diâmetro de 30 mm) que foram colocados um acima do outro e foram fixados em conjunto por meio de uma fita adesiva (de 19 mm de largura). A mistura foi introduzi-  
 5 da no container sem bolhas até que o nível fosse aproximadamente 5 mm abaixo da borda superior. O container então foi hermeticamente coberto de uma folha metálica de alumínio e deixado atingir a temperatura ambiente (23°C) durante a noite.

10 A concentração de gel foi medida depois do armazenamento na temperatura ambiente (23°C) durante aproximadamente 20 horas usando um analisador de textura TA XT2. Para fazer a medição da concentração de gel em uma superfície lisa, não seca, primeiramente a fita adesiva que man-  
 15 tinha os dois anéis cilíndricos do container juntos foi retirada. O gel então foi dividido com uma lâmina de navalha entre os anéis para que a parte mais baixa do gel expusesse uma superfície lisa.

A concentração de gel foi medida com o analisador de textura TA XT2 por uma cúpula de nível (diâmetro 24,5 mm) penetrante (de 1 mm) no gel. Os ajustes no analisador de textura foram como se segue:

20 Princípio de medição: força em direção da pressão

Velocidade para Frente: 2 mm/s

Velocidade do Teste: 2 mm/s

Valor de acionamento: 0,01 N

Velocidade revidesa: 2 mm/s

25 Deslocamento: 1 mm

É indicado o valor máximo com uma única penetração da cúpula em newtons.

### Exemplo 1

#### Caraterização da Inulina de Raízes de Alcachofra

##### 30 1. Cultivo das Plantas de Alcachofra

As plantas de alcachofra da variedade Madrigal foram cultivadas na proximidade de Valência, Espanha. As sementes foram semeadas em

abril de 2005, e as plantas foram colhidas em agosto/setembro de 2005. As raízes foram separadas da parte na terra, libertadas do solo aderente e secas. As raízes então foram transportadas sem esfriar da Espanha à Alemanha. As raízes foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até que a inulina fosse extraída.

## 5 2. Preparação de Inulina de Raízes de Alcachofra

As raízes de plantas de alcachofra da variedade Madrigal COM aproximadamente 4 a 5 meses são usadas para preparar a inulina. 60 quilogramas de raízes são liberados dos constituintes do solo aderidos lavando-as na etapa congelada com um limpador de alta pressão (Kärcher, Winnenden, tipo HD 700) antes que elas fossem também de processadas a rompidas em um desfibrador (desfibrador de jardim de Gloria Unividesal natura 2800L). Os pedaços são postos em um extrator aquecido por camisa com o agitador de portal contendo água preaquecida de  $70^{\circ}\text{C}$  a  $90^{\circ}\text{C}$ . A soma total de água acrescentada é 180 quilogramas. O pH do extrato é ajustado a 9,0 acrescentando NaOH. Depois do aquecimento rápido da papa de pedaços de  $80^{\circ}\text{C}$  a  $85^{\circ}\text{C}$  via a camisa do extrator, a papa é agitada de  $80^{\circ}\text{C}$  a  $85^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 60 minutos para extrair a inulina (frutano) dos pedaços. Depois desse tempo, o extrato bruto é separado dos pedaços por bombeamento.

O extrato bruto é descorado em um processo de duas etapas formando um total de 0,7 g de  $\text{Mg}(\text{OH})_2/100\text{ml}$  de extrato. Na primeira etapa, 3.400 g de  $\text{MgO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (equivalente a 0,5 g de  $\text{Mg}(\text{OH})_2/100\text{ ml}$  do extrato) são dissolvidos em 170 L do extrato de cor marrom-escura com agitação durante 10 minutos. Posteriormente, 1.015 g da concentração de 96% de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  são adicionados como uma suspensão em 3 L de água e agitados por 10 minutos. Um pH de 9,4 é encontrado. A mistura completa precipitada é quantitativamente clarificada em um separador de placa (GEA, Westfalia tipo SC 6-06-076) durante 120 minutos. A solução de extração descorada possui uma cor amarelo-pálida e é sem materiais que causem turvação. Uma fase sólida na forma de uma pasta grossa é obtida como fração da lama retirada. A etapa de descoloração completa é repetida na solução de extração obtida desse modo e compreendem 150 L com  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (e-

quivalente a 0,2 g  $Mg(OH)_2$ /100 ml de extrato) e 410 g da concentração de 96% de  $Ca(OH)_2$  como suspensão em 1,5 L de água. A mistura do precipitado completo é quantitativamente clarificada em um separador de placa durante 30 minutos. A solução de extração descorada com um pH de 9,4 é clara, possui uma cor amarela-pálida e é sem materiais que causem turvação. Um centrifugado de 7l na forma de uma pasta grossa é novamente obtido como fração da lama.

A inulina sólida é obtida do extrato clarificado desse modo pelo resfriamento até uma temperatura de 4°C durante o período de 48 h. A inulina é obtida como um sedimento semelhante a uma lama deposição centrífuga usando o separador de placa.

O sedimento também é purificado duas vezes sucessivas na mesma concentração que está presente no extrato clarificado dissolvendo a inulina em água quente e novamente precipitada no armazenamento a 2°C por 48 h. O sedimento de inulina obtido depois da segunda precipitação é secado por congelamento.

A figura 1 mostra um diagrama representativo do processo de extração.

Durante o processo de extração, a distribuição de polímero foi analisada depois das etapas individuais de purificação e extração por cromatografia de permeação em gel com determinação do índice de refração e calibração com padrões de dextrano (sistema GPC-RI, vide o Método 3.2 em "Métodos Gerais"). Como evidenciado pela figura 2, a distribuição de polímero do extrato (B) depois da extração com água quente é comparável com as raízes lavadas (A). A figura 2 mostra uma análise GPC-RI da distribuição de polímero nas raízes lavadas de alcachofra (A) e o extrato da inulina (B) depois da extração com água quente.

A análise da distribuição de polímero depois da precipitação a frio (4°C) da inulina mostrou que uma alta fração de inulina de peso molecular (C) foi separada de uma fração de peso molecular baixa (D) (figura 3). A figura 3 mostra uma análise GPC-RI da distribuição de polímero no extrato depois da extração com água quente da inulina (B), no sedimento depois da

precipitação de inulina a 4°C (C) e na corrida superior obtida depois centrifugação da inulina depois da precipitação (D).

Um enriquecimento adicional da inulina de alto peso molecular e uma depleção de substâncias de peso moleculares baixos, particularmente os monossacarídeos e dissacarídeos, foram atingidos pela reprecipitação de frações de inulina de alto peso molecular (figura 4). figura 4: Análise GPC-RI da distribuição de polímeros na inulina precipitada a 4°C (C), no sedimento depois da reprecipitação (F) e na fase clara depois da reprecipitação (E).

### 3. Determinação da Pureza da Inulina Preparada

A pureza da inulina preparada da alcachofra obtida na seção 2 foi determinada pela determinação do frutano e pelos teores de água do material congelado a vácuo. O teor de água determinado para a inulina de alcachofra foi de 1,7% (vide o método "Determinação do teor de água").

O teor de frutano foi determinado por hidrólise da inulina com a enzima exoinulinase (vide o método "determinação de Frutano pela hidrólise com exoinulinase"). A pureza com base na matéria seca (DM) foi encontrada a partir do teor frutano e do teor de água.  $Pureza = \frac{\text{teor de frutano} \times 100}{100 - \text{teor de água}}$ .

Como é evidente da Tabela 1, o grau de pureza médio da inulina de alcachofra preparada é de 97% da matéria seca (DM).

Tabela 1:

Determinação da Pureza da Inulina Preparada a Partir da Alcachofra.

		Digestão de Exo-inulinase	
		Frutano [% do peso inicial]	Pureza [% Material Total]
Inulina de alcachofra	1,7	95 ± 3	97

### 4. Determinação do Peso Molecular por GPC-RI-MALLS

As soluções aquosas 0,5% (p/v) foram preparadas da inulina de alcachofra purificada obtida na seção 2, e de amostras de referência compradas do Raftiline HP (Orafti, lote: HPBNH4DNH4) e de inulina de tubérculos de dália (Sigma, artigo n°: I-3754, lote: 75H7065), e a distribuição de massa molecular da inulina foi determinada pela cromatografia de permea-

ção em gel (vide o método 3.1). Essa distribuição é representada na figura 5, e as massas moleculares (anidrofrutose = 162 g/mol) e comprimentos médios de cadeia calculados da mesma foram resumidos na Tabela 2.

A análise da distribuição de pesos moleculares usando o sistema GPC-RI-MALLS resultou em um peso molecular ponderal médio  $M_w$  de 12.088 g/mol e peso molecular numérico médio  $M_n$  de 11.500 g/mol da inulina da alcachofra. Isso equivale a um comprimento de cadeia médio de 75 para o  $DP_w$  e de 71 para o  $DP_n$ . Os comprimentos de cadeia da inulina de alcachofra purificada são em média distintamente mais longos do que aqueles da Raftiline HP ( $DP_w = 33$ ,  $DP_n = 29$ ) e da inulina de dália ( $DP_w = 39$ ,  $DP_n = 33$ ). Isso também é refletido nas massas moleculares mínimas e máximas, que são distintamente maiores para a inulina de alcachofra.

Tabela 2:

Distribuição de Massa Molecular de Dividesas Inulinas.

Material	$M_w$ [g/mol]	$M_n$ [g/mol]	Distribuição do Polímero (min - máx) [g/mol]	$DP_w$	$DP_n$	Dispersão Molecular
Inulina de alcachofra	12088	11500	4385 a 26086	75	71	1,06
Inulina de Raftiline HP	5391	4738	999 a 15162	33	29	1,14
Inulina de dália	6250	5407	1139 a 19569	39	33	1,18

### 15 5. Resultados da Determinação de Glicose, Frutose e Sacarose.

A proporção de glicose, frutose e sacarose na inulina de alcachofra obtida na seção 2 foi determinada pela determinação fotométrica do açúcar em soluções de inulina de concentrações de 5% como descrito no Método 3 ("Determinação de Açúcar").

20 Como fica evidente na Tabela 3, os teores de sacarose e glicose na inulina de alcachofra purificada são menos de que 0,1% de inulina em pó, o teor de frutose é 0,12% de inulina em pó.

Tabela 3:

Teores de Glicose, Frutose e Sacarose na Inulina Purificada de Alcachofra

Material	Glicose (g/100g inulina em pó)	Frutose (g/100g inulina em pó)	Sacarose (g/100g inulina em pó)
Inulina de alca- chofra	< 0,1	0,12	< 0,1

6. Grau de Ramificação6.1 Análise de Metilação Padrão

5 O grau de ramificação foi medido em uma amostra de inulina de acordo com a presente invenção possuindo um DPw de 75 e um DPn de 71 e uma distribuição de 1256 g/mol a 31631 g/mol. Os exemplos comparativos usados foram a Raftiline HP (Orafti, lotes HPBNO3DNO3 e HPBNH4DNH4) e inulina de tubérculos de dália (Sigma, artigo n°: I-3754, lotes: 022K7045 ou  
10 75H7065) e raízes de alcachofra (Sigma, artigo n°: I-2880, lotes: 111H7045 e 88F7220) o grau de ramificação foi determinado por meio da análise da metilação (vide Métodos Gerais, 5,1).

A hidrólise, a redução e a acetilação de frutanos com ligações 2-1 resultam em 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil-D-manitol e 1,2,5-tri-O-  
15 acetil-3,4,6-tri-O-metil-D-sorbitol. Os radicais terminais frutosila produzem 2,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol e 2,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-sorbitol. Uma unidade glicopiranosila terminal resulta em 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-sorbitol. Construir blocos adicionalmente ramificados na posição 6 produzem os correspondentes 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-  
20 di-O-metilalditóis.

Além dos produtos indicando a ligação 2-1, foi possível detectar em todas as amostras frutano aquelas com blocos construtores terminais de frutose e glicose. Os cromatogramas adicionalmente mostraram a difrutose dianidra (DFDA, aproximadamente 3% em mol) que é formada na remoção  
25 do TFA em um fluxo de nitrogênio a partir da frutose ligada por 2-1.

Dos espectros de massa foi adicionalmente possível identificar produtos resultando de uma ligação 2-1,6 em todas as amostras. Os compostos acetilado-1,3 e acetilado-1,4 também foram identificados, que poderi-

am surgir com ramificações nas posições 3 e 4, respectivamente, mas também poderiam derivar de uma metilação incompleta. A ocorrência não-específica de produtos acetilado-1,3 e acetilado-1,4 é um indicador da submetilação. Supondo que a posição 6 seja afetada por uma submetilação na mesma extensão que as posições 3 e 4, a proporção não-específica (média de compostos 1,3-Ac e 1,4-Ac) é subtraída da proporção de unidades de frutose ramificadas nas posições 2-1,6. A Tabela 4 em baixo mostra os resultados provenientes disto.

Tabela 4:

Amostra	2-1,6-Frutose [mol%]*
Inulina Alcachofra	1,1 **
Raftiline HP	0,4
Dália	0,2
Alcachofra	não-detectado

\* baseado em todas as espécies consideradas.

\*\* média de duas medições.

A avaliação da análise da metilação revelou um grau de ramificação de 1,1% em mol na inulina da alcachofra. O grau de ramificação desta inulina é assim distintamente mais alto do que o da inulina das amostras de referência de chicória (RaftilineHP), dália e alcachofra de Jerusalém.

## Exemplo 2

### Propriedades da Inulina de Raízes de Alcachofra

Todas as seguintes investigações se referem à inulina de alcachofra de acordo com a presente invenção descrita anteriormente no Exemplo 1 e detalhada anteriormente nas Tabelas de 1 a 4. A inulina de Raftiline HP em comparação com a inulina de dália são também detalhados no Exemplo 1.

#### 1. Investigação da Inulina por Varredura Calorimétrica Diferencial

A análise por varredura calorimétrica diferencial da inulina (para procedimento: vide métodos) mostrou diferenças distintas entre vários materiais (vide Tabela 5 abaixo) em relação ao comportamento durante a fusão. Ambas as amostras de inulina diferenciaram-se muito em relação à entalpia

de fusão. Isso ficou acima de 29 J/g para a inulina de alcachofra e somente 22,8 J/g para a inulina do Raftiline HP. As diferenças em  $T_{partida}$  ( $T_0$ ) foram um pouco menores, mas a temperatura de fusão inicial da inulina de alcachofra foi 40,4°C que foi mais do que 2,5°C mais alto do que para a inulina de chicória de comparação. Essa estabilidade térmica aumentada da inulina de alcachofra pode ser uma vantagem considerável em certos processos térmicos no setor de produtos alimentícios, porque a inulina de alcachofra é distintamente menos sensível a altas temperaturas do que a inulina de chicória.

10 Tabela 5:

Material	$T_0$ [°C]	Entalpia de fusão dH [J/g]
Inulina de alcachofra	40,4	29,1
Raftiline HP	37,8	22,8

## 2. Viscosidade

Tabela 6:

15 Comparação da viscosidade dinâmica de inulina de chicória e inulina de alcachofra em água como uma função da concentração ( $T = 90^\circ\text{C}$ ).

Viscosidade (mPas)		
Concentrações% (p/v)	Raftiline HP (chicória)	Inulina de alcachofra
10	2,4	2,3
24	4,3	5,4
26	4,2	12,2
28	4,5	15,7

20 Como fica evidente da Tabela acima referida, ambas as inulinas mostraram que em concentrações de até 24% (p/v) a viscosidade muito baixa em 90°C (água = 1 mPas). A inulina de acordo com a presente invenção ficou viscosa em concentrações de 26% (p/v) e particularmente em 28%, a etapa que o Raftiline HP permaneceu muito semelhante na sua viscosidade à água até 28% (p/v).

## 3. Tamanho de Partícula Depois da Secagem por congelamento

A amostra secada por congelamento do exemplo 1 foi moída em um moinho de faca (Grindomix GM200, Retsch Technologie GmbH, Haan, Alemanha) e o tamanho de partícula foi determinado pela análise de peneira (máquina de peneira vibradora "Analysette 3" da Fritsch, frequência 2,0, auxiliar de peneiramento: 8 bolas de ágata (diam 10 mm)/peneira, tempo de peneiração 1 a 2 minutos, a quantidade carregada aproximadamente 50 g). O resultado é mostrado na Tabela 7 abaixo. Foi possível determinar o diâmetro médio de partícula pela análise de peneira como 126  $\mu\text{m}$ .

Tabela 7.

Largura da malha ( $\mu\text{m}$ )	Massa/g	%
<63	12,80	25,78
<90	4,99	10,05
<125	6,60	13,29
<160	6,26	12,61
<200	5,09	10,25
<500	13,75	27,69
> 500	0,16	0,32
Total	49,65	100,00

#### 10 4. Secagem por atomização, Tamanho de Partícula

Uma inulina com DPw = 81 foi preparada como descrito no Exemplo 1. Depois de uma secagem por congelamento intermediária, foi redissolvido e depois secado por atomização em um Glatt GPCG3.1 unidade fluidizada em leito de secagem por atomização. Com essa finalidade, a inulina secada por congelamento foi introduzida na água, aquecida de 85°C a 90°C e dissolvida. A solução aquecida foi seca por secagem por atomização com a temperatura de passagem do ar variada, e as propriedades de processo e as propriedades de produto são observadas. A temperatura de entrada foi guardada constante em 120°C. Os alimentos consistem em 80% de água e 20% de inulina a temperatura de alimentos foi de 85°C a 90°C e a temperatura do ar de passagem foi de 80°C.

A distribuição de tamanho de partícula foi determinada pela aná-

lise de peneira como descrito acima. Os resultados da análise de peneira da amostra secada por secagem por atomização são indicados na Tabela 8, abaixo. O tamanho de partícula médio do produto seco por secagem por atomização foi decidido da distribuição de tamanho de partícula da análise de peneira como sendo  $<60 \mu\text{m}$ .

Tabela 8:

Largura da tela ( $\mu\text{m}$ )	Massa/g	%
<63	34,63	69,9
<90	9,43	19,0
<125	3,03	6,1
<160	1,05	2,1
<200	0,53	1,1
<500	0,86	1,7
> 500	0,00	0,0
Total	49,53	100,00

### 5. Cristalinidade

As amostras de inulina na forma de pó foram preparadas sem novo pré-tratamento em uma amostra-veículo de 2 mm de espessura (padrão) entre dois filmes de cobertura de PET. As medições de raios-x foram executadas com um difratômetro de dois discos D5000 de Bruker-AXS na transmissão simétrica que usa monocromático (Ge (111) monocromador) radiação de Cu-K $\alpha$ . Os registros foram feitos em 30 mA e 40 kV na faixa de ângulo  $2\theta$  de  $3^\circ$  a  $29^\circ$  (largura do ângulo  $\Delta 2\theta = 0,1^\circ$ ) e  $29,5^\circ$  a  $104^\circ$  (largura do ângulo  $\Delta 2\theta = 0,5^\circ$ ), etapa/  $\Delta 2\theta$ : 60 segundos.

O software baseado no método Ruland-Vonk (WAXS 7, desenvolvido pelo Fraunhofer Institut für angewandte Polymerforschung, Potsdam (Alemanha), descrito em [http://edocs.tu-berlin.de/diss/2003/rihm\\_rainer.pdf](http://edocs.tu-berlin.de/diss/2003/rihm_rainer.pdf), páginas 19 e seq.) foi usado para encontrar o grau de cristalinidade  $x_c$ , o tamanho do cristalitos  $D_{(hkl)}$  e o parâmetro de desordem  $k$ , que é uma medida da perturbação da treliça nos cristalitos, do campo de dispersão. O campo de dispersão para amostra 2 (vide abaixo) foi usado como arquivo de base

amorfa. A frutose foi usada como base química, calculada com uma densidade de  $1,65 \text{ g/cm}^3$ . Os tamanhos dos cristais  $D_{(hkl)}$  foram determinados pela metade dos comprimentos das reflexões de raio X pela fórmula Scherrer nas duas primeiras interferências principais em  $2\theta = 8^\circ$  e  $12^\circ$ .

- 5 Foram medidas as amostras de uma inulina secada por congelamento com um DPw de 77 a 82 e de uma inulina seca em tambor com DPw 81. Os resultados obtidos estão na Tabela 9 abaixo:

Tabela 9:

	Cristalinidade $x_c$ [%]	Parâmetro de desordem $k$ [ $10^{-2} \text{ nm}^2$ ]	$D_{(hkl)} 2\theta = 8^\circ$ [nm]	$D_{(hkl)} 2\theta = 12^\circ$ [nm]
Inulina secada por congelamento	35	4,9	5,7	7,3
Inulina seca em tambor	28	2,4	6,7	10,1

#### 6. Formação de estrutura da inulina depois de aquecimento em água

- 10 Porções de 15 ml da suspensão de concentrações de inulina a 20% em água foi, cada uma, preparada em béqueres de alumínio (béqueres RVA-3d da Winopal Forschungsbedarf GmbH; volume aproximadamente 70 ml, diâmetro 38 mm), agitada e equipada de uma barra de agitação magnética e finalmente coberta. A suspensão foi aquecida usando um agitador
- 15 multitérmico (VARIOMAG Multitherm 15 de H+P Labortechnik AG) com agitação. A temperatura foi controlada neste caso usando um termopar PT 100 (acessório da VARIOMAG Multitherm 15) que permaneceu no béquer de referência coberto com a água destilada no bloco de aquecimento. O agitador multitérmico foi preaquecido para que a temperatura da amostra de referência permanecesse estável em  $90^\circ\text{C}$ . As suspensões a serem aquecidas
- 20 foram colocadas no agitador multitérmico e agitadas a  $90^\circ\text{C}$  por 8 minutos. As amostras então foram retiradas do agitador multitérmico, guardadas na temperatura ambiente durante 24 horas. A concentração dos géis resultantes então foi medida usando um analisador de textura TA-TX2 (Stable Micro
- 25 Systems). Essa medição foi executada usando uma sonda penetrante SMSP/0.5 R076 (Stable Micro Systems) com um diâmetro de 12 mm como sistema de medição. Os seguintes parâmetros foram aplicados para a medi-

ção do TA com a célula de medição de 5 kg:

- Opções: medição da força na direção da pressão.
- Teste único.
- Parâmetro: velocidade para diante 2,00 mm/s.
- Velocidade to teste 0,50 mm/s.
- Velocidade revidesa 0,50 mm/s.
- Deslocamento (profundidade de penetração) 3 mm.

5

Força de acionamento 2 g.

O comportamento de formação da estrutura de várias inulinas depois do tratamento térmico na água foi investigado. Resultado disso é que a inulina da chicória (Raftiline HP® e Beneo HPX®) não forma estruturas parecidas com um gel sob essas condições (Tabela 10). Em contraste, a inulina da alcachofra com DPw = 77 a 81 ou DPw = 75 forma estruturas muito fortes. Surpreendentemente, a amostra na qual foi usada a inulina secada por secagem por atomização com DPw = 81 também formou géis consideravelmente mais fortes do que as amostras comparáveis (DPw = 77 a 81 ou DPw = 75) na qual o frutano foi secado por congelamento. Isso é particularmente claro pelo fato de que as concentrações de gel consideradas com somente 15% (p/p) da concentração da inulina empregada ficaram em um nível semelhante àquelas com as amostras comparativas secada por congelamentos a 20%.

15

20

Tabela 10:

Formação de Estrutura dos Frutanos Depois do Aquecimento com Água

	Concentrações de inulina, % (p/p)	Concentrações de gel [g]	Desvio padrão
Raftiline HP® DPw 33	20	Nenhum gel	-
Beneo HPX® DPw 33	20	Nenhum gel	-
Inulina DPw 77-81	20	370	10*
Inulina DPw 75	20	350	44 **
Inulina DPw 81, seca por atmização	20	931	42*
Inulina DWw 81, seca	15	289	69*

	Concentrações de inulina, % (p/p)	Concentrações de gel [g]	Desvio padrão
por secagem por atomização			

\* n = 2

\*\* n = 4

## 7. Propriedades de Prebióticas

O efeito prebiótico da inulina de acordo com a presente invenção foi investigado em um modelo de estudo *in vivo* em um sistema de fermentação de três etapas (modelo do intestino). Os tipos de bactérias que colonizam o sistema de fermentação, e as suas atividades metabólicas (a formação de ácidos graxos de cadeia curta), foram avaliadas.

### 1. Materiais e métodos:

#### 10 a) Sistema de cultura contínua de três etapas:

Um sistema de cultura contínua de três etapas que foi anteriormente descrito por Pereira et al. (2003) *Appl Environ Microbiol* 69 (8), 4743-4752 e Probert et al. (2004) *Appl Environ Microbiol* 70, 4505-4511, foi usado neste estudo. O modelo do intestino consiste em três vasos de cultura V1, V2 e V3 com volumes de trabalho de 0,28, 0,30 e 0,30 litros que foram ar-  
 15 ranjados em série. Cada vaso foi equipado com um agitador magnético, a temperatura foi mantida a 37°C por meio de um banho de água, e o pH nos vasos individuais foi controlado por um controlador de pH Electrolab. O sistema inteiro (inclusive o reservatório de meios) funcionou sob condições anaeróbicas passando nitrogênio estéril, sem oxigênio, pelo líquido. O pH nos  
 20 três vasos foi ajustado acrescentando a quantidade apropriada de HCl-NaOH a 0,5 M de 5,5 (V1), 6,2 (V2) e 6,8 (V3). O vaso 1 simulou as condições microbianas no intestino grosso anterior. Foi relativamente rico em nutrientes, tinha um pH relativamente mais ácido e um tempo de residência  
 25 mais curto do que o vaso 3 com um pH mais neutro e um substrato comparativamente pequeno. O vaso 3 simulou a parte posterior do intestino grosso. O vaso 2 modelou a parte central, transvidesal do intestino grosso (cólón transvideso).

O nitrogênio sem oxigênio foi continuamente levado ao meio de cultura estéril, e foi introduzido por meio de uma bomba peristáltica em V1 que o conduziu em seqüência a V2 e V3. O meio de cultura consistiu nos seguintes componentes em água destilada (g/L): amido de batatas, 5,0; pectina (cítricos), 2,0; caseína (sal de sódio), 3,0; Raftiline LS (Orafti, Tienen; ESTEJA), 1,0; xilano (casca de aveia), 2,0; arabinogalactana (Fluka), 2,0; goma, 1,0; mucina (gástrica de porco tipo III), 4,0; triptona (Oxoid), 5,0; água de peptona (Oxoid), 5,0; extrato de levedura (Oxoid), 4,5; sais de bile N°. 3 (Oxoid), 0,4; L-cisteína HCl, 0,8; NaHCO<sub>3</sub> (Fisher Scientific), 1,5; hemina, 0,05; NaCl (Fisher Scientific), 4,5; KCl (Fisher Scientific), 4,5; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (BDH), 0,15; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (BDH), 0,5; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (BDH), 0,005; MgO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Fisher Scientific), 1,25. Além disso, 1,0 ml de Tween 80 (BDH) e 10 microlitros da vitamina K foram acrescentados. Uma solução 4 ml com concentrações de 0,025% (p/v) de resazurina foi acrescentada ao meio de crescimento como indicador de condições anaeróbicas. O meio foi autoclavado em 121°C por 15 minutos e esfriado sob uma atmosfera de nitrogênio. A menos que seja indicado de outro modo, todos os produtos químicos foram comprados da Sigma Chemical Co, Reino Unido.

#### Coleta e preparação do material fecal:

O volume restante de cada vaso foi composto com a suspensão fecal recentemente preparada de um homem de 30 anos que não tinha tomado nenhum antibiótico durante três meses antes do teste. 20% (p/p) da suspensão fecal fresca foram preparados com em tampão fosfato salina anteriormente reduzida (PBS) e digeridos com a velocidade normal durante 25 minutos em um aparelho de digestão (estômago). Os grandes resíduos de alimento foram retirados por um filtro de saco. 100 ml da suspensão resultante então foram empregados para inocular cada um dos três vasos de fermentação. O sistema foi inicialmente feito funcionar como cultura em batelada usando o meio de cultura mais de 48 horas. Depois de 48 h de fermentação da cultura em batelada, o meio de crescimento complexo que simula a composição de fluido intestinal foi introduzido em V1 e depois em V2 e V3 via a bomba peristáltica. O tempo de residência (R) foi calculado pela taxa

de diluição recíproca de cada vaso. O tempo de residência foi estabelecido em 27,1 horas, e o sistema foi feito funcionar durante 12 dias depois do período de equilíbrio inicial de 48 h para assegurar um estado estacionário. O tempo de residência total foi o total dos tempos de residência individuais R de cada fermentador.

#### Amostragem:

A primeira amostra (5 ml) (dia 0) foi tomada depois da fermentação de 24 h. A fermentação continuou até que um estado estacionário (SS1) fosse atingido (depois de 10 a 12 dias). Nessa etapa, as amostras do líquido de cultura foram retiradas de cada vaso para análise subsequente para bactérias e para ácidos graxos de cadeia curta, e foram usadas como o indicador do SS1. Depois que o SS1 foi atingido, o substrato de teste foi posto no vaso 1 a cada dia durante um novo período de 10 a 12 dias. A fermentação foi continuada até que um novo estado estacionário (SS2) fosse atingido e mais uma vez as amostras foram retomadas do líquido de cultura de cada vaso para análise subsequente.

#### Contagem de bactérias em amostras fecais e amostras do modelo do intestino por análise de FISH:

As amostras de vasos individuais do sistema de fermentação foram tratadas como mostrado abaixo.

#### Preparação de mostra:

As amostras (375  $\mu$ l) foram retiradas das culturas em batelada, acrescentou em 1.125  $\mu$ l de solução de paraformaldeído 4% (p/v) filtrada (pH 7,2), misturado e armazenado a 4°C durante a noite para fixar as células. As células fixas foram centrifugadas em 13.000 rpm durante 5 minutos e lavadas duas vezes na solução de tampão de fosfato filtrada e ressuspensas em 150  $\mu$ l de PBS. Etanol (150  $\mu$ l) foi acrescentado, e a amostra foi misturada e mantida a -20°C até ser usada, mas não durante mais de 3 meses.

#### Hibridização:

As células fixadas (16  $\mu$ l) foram acrescentadas a 264  $\mu$ l de tampão de hibridização preaquecido (forno) (preaquecido em X (Tris-HCl a 30 mM, NaCl a 1,36 M, pH 7,2, 0,1% v/v dodecil sulfato de sódio, SDS) e

agitado. A mistura foi acrescentada a uma sonda adequada rotulada com Cy3 (50 ng/μl) em uma razão de 9:1 (v/v), misturado e colocado no forno de hibridização em uma temperatura adequada durante a noite.

Lavagem e filtração:

5 A amostra hibridizada (alíquotas adequadas para atingir de 30 a 150 células por campo da visão) foi acrescentada a 5 ml de tampão de hibridização preaquecido, filtrado (Tris-HCl 20 a mM, NaCl a 0,9 M, pH 7,2) em conjunto com 20 μl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 500 ng/μl) e deixado na temperatura adequada de hibridização por 30 minutos. A mistura foi posta em um filtro de membrana preto com um tamanho de poro de 0,2 μm (GTBP 10 01300, Millipore Corp). Uma LU2 de desbotamento vagaroso antidesbotamento (Slowfade-light Antifade") (Molecular Probes Europe, Leiden, NL) foi posto no filtro para evitar o esmaecimento da fluorescência, e os suportes foram guardados no escuro a 4°C por um máximo de 3 dias.

15 Mínimo de 15 campos de visão por suporte foi examinado com um microscópio de fluorescência Nikon EPI Microphot (1000 x de aumento). O filtro de DM510 (550 nm) foi usado para contar as células hibridizadas, e o filtro de extração DM400 foi usado para as células tingidas DAPI.

20 A seguinte fórmula foi usada para calcular a concentração de células C (células/ml) em cada amostra:

$$C = N \times 15,56 \times 14.873,74 \times (1000/q)$$

N: número médio de células contadas por campo da visão

q: volume usado de mistura hibridização

14.873,74: constante de ampliação

25 15.56: o fator de todas as diluições feito

Sondas de oligonucleotídeos 16S rRNA rotuladas com tintura fluorescente Cy3 de gênero específico que foram anteriormente projetadas e validadas foram usadas para contar grupos importantes de bactérias. As sondas usadas foram Bif164, específica para *bifidobacterium* (Langedijk 30 (1995), *Appl Environ Microbiol* 61, 3069-3075), Bac303, específica para bacterioides (Manz et al. (1996) *Microbiology* 142, 1097-1106), His150, específico para o *Clostridium histolyticum* subgrupo e Erec482, específico para o

*Clostridium coccooides* grupo *Eubacterium rectale* (Franks et al. (1998) *Appl Environ Microbiol* 64, 3336-3345), Lab158, específico para *Lactobacillus/Enterococcus* (Harmsen et al. (1999) *Microb Ecol Health Dis* 11, 3-12), Ato291, específico para o grupo *Atopobium*. O corante para ácido nucléico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi usado para a contagem de célula total (Tabela 11).

Tabela 11:

Sonda	Gênero-alvo	Seqüência (5' a 3')	Temp hibridização °C
Bif 164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CATCCGGCATTACCACCC	50
Bac 303	<i>Bacteroides</i> spp.	CCAATGTGGGGGACCTT	45
Chis 150	<i>Clostridium histolyticum</i> grupo	TTTCCYTCTAATTATGGCGTATT	50
Laboratório 158	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp.	GGTATTAGCATCTGTTTCCA	50
Ato 291	Grupo de <i>Atopobium</i>	GGTCGGTCTCTCAACCC	50
Erec 482	<i>Clostridium coccooides</i> grupo <i>E. rectale</i>	GCTTCTTAGTCARGTACCG	52

Análise dos ácidos graxos de cadeia curta:

A ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) em amostras retomadas de vários vasos do modelo do intestino foi analisada como descrito em Pereira et al., *Appl. Environ Microbiol* (2003) 69 (8), 4743-4752. As amostras foram centrifugadas (6000 G, 10 minutos) para retirar bactérias e corpos sólidos e depois filtrado por um filtro de polissulfona HPLC com um tamanho de poro de 0,2 µm. Então, 200 µl de cada sobrenadante filtrado foi diluído com 800 µl de acetonitrila (1:4) contendo o ácido 2-etil-butírico a 3,7 mM como padrão interno. Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa utilizando um sistema CG CV 5890 série II provido de uma coluna capilar empacotada com sílica fundida (Permabond FFAP, Macherey Nagel, DE) (25 m, 0,32 mm, espessura de filme de 0,25 µm). O hélio foi usado como gás veículo com um fluxo volumétrico de 2,42 ml/min. A temperatura de coluna foi de 140°C e a temperatura do injetor e do detector foi de 240°C. 5 minutos depois da injeção da amostra, a temperatura da coluna foi aumentada em etapas de 20°C/min até 240°C e deixou-se que o sistema corresse durante

uns 5 minutos adicionais. A composição de gás foi analisada usando um Software ChemStation Apg-top CV 3365 série II, Versão A0.03.34. Os seguintes ácidos foram usados como padrões externos, cada um com concentrações em uma faixa e variação de 0,5 mM a 40 mM: ácido acético, ácido propiônico, ácido n-butírico, ácido n-valérico, ácido isovalérico (Fluka), ácido isobutírico (Fluka) e ácido n-capróico. A menos que indicado de outro modo, todos os ácidos foram comprados da Sigma e foram mais de 99% puros. As concentrações SCFA foram calculadas usando uma calibração com padrão interno e foram expressas em mM por litro.

## 10 2. Resultados

A seguinte inulina foi testada no modelo do intestino descrito acima:

Inulina de acordo com a presente invenção: DPw = 77 a 81.

Amostra de comparação: Raftinline HP® (Orafti), DPw = 33

15 A comparação foi feita entre o segundo estado estacionário (SS2) e o primeiro estado estacionário (SS1) e os dados foram analisados usando o teste de t Student.

A figura 5 mostra a comparação da população bacteriana no vaso 1 (V1) entre estado estacionário 1 (SS1) e estado estacionário 2 (SS2) depois do tratamento com a inulina de acordo com a presente invenção. As figuras 6 e 7 mostram comparações correspondentes do vaso 2 (V2) e 3 (V3).

A figura 8 mostra a comparação da população bacteriana no vaso 1 (V1) entre estado estacionário 1 (SS1) e estado estacionário 2 (SS2) depois do tratamento com a amostra comparativa. As figuras 9 e 10 mostram comparações correspondentes do vaso 2 (V2) e 3 (V3).

Uma resposta bifidogênica foi observada depois da adição da inulina de acordo com a presente invenção ao modelo do intestino. O nível do aumento foi significativo nos três vasos de bifidobactéria e significativo para o lactobacilo no vaso 2 ( $P < 0,05$ ). Os níveis de *Clostridia* permaneceram inalterados. Com a amostra comparativa foi observada tendo um aumento de bifidobactéria no vaso 1, mas isso não foi significativo. A população

de lactobacilos no vaso 3 foi significativamente mais alta ( $P < 0,05$ ) mas nenhuma modificação foi observada na população de *Clostridia*. O Bacteroides e o *Clostridium coccooides* grupo *E. rectale* foram significativamente mais baixos no vaso 2 ( $P < 0,05$ ).

5 A figura 11 mostra uma comparação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) em todos os vasos entre o estado estacionário 1 (linha de base) (SS1) e estado estacionário 2 (SS2) depois do tratamento com a inulina de acordo com a presente invenção. Os ácidos graxos individuais são traçados em cada caso como diagrama de bile de cada vaso  
10 e o estado estacionário (por exemplo, V1-SS1). Da esquerda à direita: ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido n-valérico, ácido capróico.

A figura 12 mostra a comparação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) em todos os vasos entre o estado estacionário 1 (linha de base) (SS1) e o estado estacionário 2 (SS2) depois do tratamento com a amostra comparativa.  
15

A adição da inulina de acordo com a presente invenção no modelo do intestino levou a um aumento significativo nas concentrações de butirato e propionato no vaso 3 (V3) ( $P < 0,05$ ). A concentração de butirato não  
20 aumentou significativamente nos outros vasos. A adição da amostra comparativa no modelo do intestino levou a um aumento na concentração de acetato, propionato e butirato em todos os vasos, mas isso foi significativo somente no vaso 2 (V2).

O teste *in vivo* revelou que a inulina de acordo com a presente  
25 invenção é um prebiótico potencial forte porque tanto o número de bifidobacteria como o número de lactobacilos aumentou nos três vasos. Isso foi acompanhado por um aumento na concentração de butirato em todos os vasos e um aumento significativo de butirato e propionato no vaso 3. O aumento em butirato e propionato no vaso 3 são uma indicação forte que a inulina  
30 de acordo com a presente invenção expõe um efeito prebiótico na parte posterior do intestino grosso. Isso é vantajoso porque a maioria dos cânceres do intestino surge na região distal do intestino grosso ou no reto.

## 8. Produção de iogurte

### Métodos

O iogurte foi preparado em bateladas de 700 g. O leite foi padronizado a teores diferentes de corpos sólidos de leite sem gordura (MSNF) em uma faixa e variação 11,0 a 14,0 por cento em peso baseado na composição total. As quantidades da inulina (a inulina de acordo com a presente invenção e inulina comparativa Beneo PH® da Orafiti) foram ajustados de 0,0 a 4,5% em peso. As receitas de iogurte são enumeradas na Tabela 12. A inulina de acordo com a presente invenção (inulina de cadeia muito longa, daqui por diante abreviada como VLCl) equivaleu à inulina do Exemplo 1/Tabela 2 e tinha um grau médio de polimerização DP<sub>w</sub> = 75, o Beneo PH® de mostra comparativa tinha um DP<sub>w</sub> = 34. Todas as porcentagens se referem a porcentagem em peso baseado na composição total, a menos que de outro modo indicado.

Os ingredientes secos foram misturados em conjunto para facilitar a dispersão da inulina e do leite em pó sem gordura, e depois acrescentaram ao leite com cisalhamento moderado para formar o iogurte de base. A base padronizada foi mantida a 4°C durante 3 horas para que o leite em pó sem gordura pudesse se dissolver completamente. Cada lote foi pasteurizado a 80°C durante 30 minutos, rapidamente esfriado a 44°C e inoculado com Yo-Flex 88 (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*, da Chr. Hansen Inc) em uma concentração de 3,6 g/l. Para o iogurte fermentado em pote (iogurte em estilo de manjar), a base inoculada foi vazada nos potes finais antes da incubação. O iogurte agitado foi incubado em tanques grandes. As misturas de base foram incubadas a 44°C durante 4 a 6 horas até que atingissem o pH 4,5 (pH inicial de aproximadamente 6,8). Quando o iogurte atingiu o pH 4,5, as amostras de iogurte estilo manjar foram resfriadas a 4°C e mantidas assim durante 48 horas para conseguir a viscosidade máxima. As amostras agitadas foram resfriadas a 35°C, misturadas com baixo cisalhamento, empacotadas em potes plásticos, resfriados a 4°C e mantiveram assim durante 48 horas para conseguir a viscosidade máxima. A viscosidade foi medida com um viscosímetro Brookfield com um adaptador heliopatía.

Tabela 12:

(todos os dados numéricos estão em% em peso baseado na massa total, excluindo a viscosidade).

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	Variação do teor de inulina						Menos sólidos com 3,5% de inulina			Açúcar			Sem estabilizante						
a) Dados para componentes individuais																			
2% leite	-	-	-	-	69,84	-	-	-	-	-	-	-	-	70,33	-	67,62	-	-	71,00
Açúcar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,87	3,90	4,04	-	-	4,08	-	-	-
Leite desnatado	89,05	89,92	90,88	91,79	23,38	89,05	90,74	91,58	92,43	90,74	85,61	86,42	89,45	23,55	90,54	22,64	91,37	23,77	
Leite sem gordura	5,81	5,86	5,93	5,99	6,08	5,81	5,01	4,13	3,25	5,01	5,58	5,64	5,83	6,12	5,90	4,98	5,04	5,23	
Estabilizante CC723	0,67	0,68	0,68	0,69	0,70	0,67	0,68	0,69	0,70	0,68	0,64	0,65	0,67	-	-	0,68	-	-	
Beneo HIPX	-	-	-	-	-	4,47	-	-	-	3,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina da invenção (VLCI)	4,47	3,53	2,51	1,53	-	-	3,57	3,60	3,63	-	4,29	3,40	-	-	3,56	-	3,59	-	



Resultados:

A figura 13 mostra os efeitos de inulina e dos sólidos do leite na viscosidade de iogurte. A inulina de acordo com a presente invenção (VLCI) desenvolvem uma viscosidade significativa no iogurte sem gordura, os níveis de viscosidade atingidos com VLCI a 4,5% que é duas vezes tão alto como aqueles de um iogurte com gordura de 1,5% sem qualquer inulina. A direita a curva na figura 13 mostra uma modificação intensa na viscosidade quando os teores VLCI no iogurte com sólidos de leite de aproximadamente 13,5% aumentam de 1,5% a 4,5%. Em comparação com isso, uma modificação no teor do Beneo HP® teve uma única influência insignificante na viscosidade, mesmo quando o teor de sólidos de leite foi modificado em 1%. O topo da curva na figura 13 demonstra o efeito dos sólidos de leite crescentes no iogurte contendo VLCI a 3,5%. Em geral, um aumento de 1% em VLCI aumentou a viscosidade do iogurte sem gordura em aproximadamente 30%, na etapa em que o Beneo HP® tinha um efeito muito menor sobre a viscosidade. Dependendo do teor de corpos sólidos de leite, a quantidade dos VLCI necessários para gerar o nível de viscosidade de um iogurte comparativo com a gordura de 1,5% foi de 1,5 a 3,5%. Pelo menos 3,5% do CV Beneo® foram necessários para atingir o nível de viscosidade de um iogurte comparativo com um nível de gordura de 1,5%.

Em um novo teste, o VLCI de 2,5% e o Beneo PH® de 4,5% foram misturados em um iogurte sem gordura. Um iogurte com gordura a 1,5% foi usado como comparação. A amostra com VLCI tinha uma viscosidade mais alta do que duas amostras comparativas com o CV Beneo® e gordura de 1,5%, como mostrado na Tabela abaixo.

Tabela 13.

Quantidade de inulina	Viscosidade/relativa
2,5% VLCI	4.666
4,5% Beneo PH®	3.400
1,5% de Gordura	3.300

A VLCI é inequivocamente mais eficaz para modificação da textura de iogurte sem gordura do que o Beneo HP®, já que a viscosidade

mais alta foi atingida com teores mais baixos. Isso abre a possibilidade de utilizar a inulina mais economicamente no iogurte mantendo um teor de inulina necessário para atingir um bom efeito volumétrico. Nos experimentos acima mencionados, as quantidades mínimas de 3 g da inulina por cada porção foram mantidos como a quantidade necessária para um efeito volumétrico.

A Tabela 14 mostra testes adicionais com o iogurte fermentado em pote (estilo manjar). A produção foi feita como indicado anteriormente. É evidente que uma inulina secada por secagem por atomização de acordo com a presente invenção possui um efeito particularmente forte que aumenta a viscosidade em comparação com a inulina secada por congelamento e seca em tambor. Cerca de 2,5% da inulina seca por atomização ou seca em tambor de acordo com a presente invenção ainda ocasionam um maior aumento na viscosidade do que a inulina de 4,5% do exemplo comparativo.

A Tabela 15 mostra os testes com o iogurte não-agitado, fermentado em pote (manjar) e com o iogurte agitado. As Amostras de A a D foram fermentadas normalmente. Uma porção de cada amostra foi misturada com agitação branda enquanto o iogurte ainda estava quente (de 37°C a 40°C). AS preparações agitadas e não-agitadas (manjar) foram analisadas para a viscosidade de cada amostra depois de 48 horas. As Amostras de E a I foram novamente normalmente fermentadas, mas as frações agitadas de E a G foram misturadas ainda quentes, como acima, e a sacarose foi acrescentada durante o processo de mistura. As amostras H e I foram misturadas depois que a temperatura tinha caído para 10°C, para investigar o efeito da temperatura sobre a viscosidade da inulina e a viscosidade do iogurte.

A adição da inulina seca por atomização de acordo com a presente invenção (teste C) aumentou a viscosidade no iogurte agitado e nas preparações tipo manjar, com a viscosidade do iogurte integral e gordo (teste D) sendo atingido. Na segunda série (testes de E a I), a viscosidade foi aproximadamente a mesma da adição da inulina em comparação com o

Beneo PH® tal como depois da adição da inulina de acordo com a presente invenção, mas o produto do teste F foi granular e a suavidade foi baixa. Uma nova observação consistiu em que em todos os experimentos houve formação de um leito de 5 mm de proteína de soro de leite desnaturada no fundo do vaso de fermentação, com exceção dos exemplos nos quais a inulina de acordo com a presente invenção foi acrescentada. Isso é uma indicação de que a inulina de acordo com a presente invenção possui efeitos benéficos sobre a estabilidade do iogurte.

Tabela 14.

	Exemplo comparativo 4,5% inulina comercial	Exemplo 2,5% inulina seca em tambor	Exemplo 2,5% inulina seca em tambor	Exemplo 2,5% inulina seca por secagem por atomização	Exemplo comparativo 1,5% de gordura	Exemplo comparativo 3,35% de gordura
<b>a) Dados dos componentes individuais</b>						
Leite integral	--	--	--	--	--	95,91
2% leite	--	--	--	--	71,85	--
Açúcar	--	--	--	--	--	--
Leite desnatado	91,51	93,44	93,44	93,44	24,06	--
Leite sem gordura	3,21	3,28	3,28	3,28	3,37	3,37
Estabilizante CC723	0,69	0,70	0,70	0,70	0,72	0,72
Beneo HPX®	4,59	--	--	--	--	--
Inulina DPw = 75	--	--	--	--	--	--
Inulina DPw = 81 secada por congelamento	--	2,58	--	--	--	--

Inulina DPw = 81 seca em tambor	--	--	2,58	--	--	--
Inulina DPw = 81 secada por secagem por atomização	--	--	--	2,58	--	--
<b>b) Dados dos sólidos</b>						
Spolidos do Leite	11,14	11,37	11,37	11,37	11,67	11,67
Inulina	4,59	2,58	2,58	2,58	--	--
Gordura	--	--	--	--	1,44	3,36
Total de sólidos	15,73	13,95	13,95	13,95	13,11	15,03
Viscosidade (centipoises)	302 500	292 500	338 750	362 500	281 250	320 000
pH	4,34	4,52	4,41	4,57	4,57	4,55

Todos os dados estão em porcentagem baseada na massa total, exceto a viscosidade e o pH.

Tabela 15.

Teste	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	logurte comparativo de baixo teor de gordura	Beneo HP comparativo a 2% com baixo teor de gordura	Exemplo de Inulina a 2% com baixo teor de gordura DPw = 81, seca por secagem por atomização	logurte comparativo integral com gordura	logurte comparativo de baixo teor de gordura	Beneo HP comparativo a 2% com baixo teor de gordura	Exemplo de Inulina a 2% com baixo teor de gordura DPw = 81, seca por secagem por atomização	Exemplo de Inulina a 2% com alto teor de gordura DPw = 81, seca por secagem por atomização	logurte comparativo de alto teor de gordura
Viscosidade de tipo manjar [cPs]	238.000	267.000	308.000	326.000	240.000	306.000	306.000		
Viscosidade do tipo agitado [cPs]	90.000	110.000	146.000	152.000	61.000	104.000	120.000	84.000	62.000
Sacarose adicionada	--	--	--	--	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Sólidos do leite	11,67%	11,44%	11,44%	11,67%	10,99%	10,78%	10,78%	11,44%	11,67%
Inulina	--	2,04%	2,04%	--	--	1,83%	1,83%	2,04%	--
Gordura	1,44%	1,41%	1,41%	3,36%	1,28%	1,26%	1,26%	3,29%	3,36%
Total de sólidos	13,11%	14,89%	14,89%	15,03%	12,27%	13,88%	13,88%	16,77%	15,03%

## REIVINDICAÇÕES

1. Inulina, caracterizada pelo fato de que apresenta um grau médio de polimerização DPw entre 65 e 81.
2. Inulina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que apresenta um grau médio de polimerização DPw entre 65 e 79. 5
3. Inulina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que apresenta um grau de ramificação entre 0,5 e 2,0% em mol com 2 a 1,6 monômeros de frutoses ligados, com base no total de monômeros da inulina.
- 10 4. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o quociente DPw/DPn é inferior a 1,25.
5. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o quociente DPw/DPn é inferior a 1,20.
6. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15 3, caracterizada pelo fato de que o quociente DPw/DPn é inferior a 1,15.
7. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o teor de glicose é inferior a 2% em peso, com base no peso total seco.
8. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20 6, caracterizada pelo fato de que o teor de glicose é inferior a 1% em peso, com base no peso total seco.
9. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o teor de frutose é inferior a 2,5% em peso, com base no peso total seco.
- 25 10. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o teor de frutose é inferior a 1,5% em peso, com base no peso total seco.
11. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pelo fato de que é uma inulina seca por atomização.
- 30 12. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada pelo fato de que está na forma de partículas com um diâmetro médio de 100 µm a 250 µm.

13. Processo para obtenção de inulina, caracterizado pelo fato de que:

- (a) as raízes de alcachofra são trituradas,
- (b) um extrato é obtido tratando as raízes trituradas com a água,
- 5 (c) os constituintes coloridos são retirados do extrato obtido,
- (d) a inulina é precipitada do extrato,
- (e) a inulina é reprecipitada pelo menos uma vez.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de filtração adicional.

10 15. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que os constituintes corantes são retirados na etapa (c) por:

- (i) mistura dos íons de magnésio ( $Mg^{2+}$ ) ao extrato da planta,
- (ii) mistura de pelo menos um componente alcalino ao extrato da
- 15 planta,
- (iii) formação de um precipitado, e
- (iv) remoção do precipitado formado do extrato da planta.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que um sal de magnésio é misturado à etapa (i).

20 17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o sal de magnésio é selecionado de cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, nitrato de magnésio, acetato de magnésio e propionato de magnésio.

25 18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada em uma temperatura de 60°C a 80°C.

30 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, caracterizado pelo fato de que a quantidade do componente alcalino é escolhida de modo que a proporção de molar  $OH^-:Mg^{2+}$  seja ajustada de 2,2:1 a 1,8:1.

20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 19, caracterizado pelo fato de que o componente alcalino é uma solu-

ção ou suspensão aquosa de um hidróxido de metal de álcali ou hidróxido de metal alcalinoterroso.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 20, caracterizado pelo fato de que o componente alcalino é uma suspensão do hidróxido de cálcio.

22. Gênero alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende a inulina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

23. Gênero alimentício de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que é selecionado de laticínios, iogurtes, sorvetes, sorvete suave, guarnições à base de leite, pudins, milkshakes, manjar de ovos, queijos, barras nutritivas, barras energéticas, barras matinais, doces, produtos de panificação, biscoitos finos, biscoitos recheados, biscoitos, aperitivo de cereal, produtos para refeição leve, chá gelado, sorvete feito de suco de fruta, bebidas dietéticas, bebidas prontas, bebidas para desportistas, bebidas para resistência, misturas em pó para bebida de suplemento alimentar, alimento infantil e pediátrico, suco de laranja complementado com cálcio, pão, croissants, cereais matinais, macarrões, pastas, biscoitos e chocolates sem açúcar, alimentos mastigáveis contendo cálcio, produtos a base de carne, maionese, guarnições de salada, pasta de nozes, refeições congeladas, molhos, sopas e refeições prontas para servir.

24. Gênero alimentício de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que é um produto de extrusão.

25. Suplemento alimentar, caracterizado pelo fato de compreender a inulina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

26. Preparação cosmética, caracterizada pelo fato de que compreende inulina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

27. Uso da inulina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser como adição a gêneros alimentícios.

28. Uso da inulina de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ser como adição com propriedades prebióticas, agente texturizante, agente intensificador de estabilidade, agente construtor da vis-

cosidade e/ou fibra alimentícia.

29. Uso da inulina como definida nas reivindicações de 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser como substituto da gordura ou do óleo, em gêneros alimentícios.

5                   30. Uso da inulina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser como adição em preparações cosméticas.

10                   31. Uso da inulina de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de ser como agente texturizante, agente intensificador de estabilidade e/ou agente construtor da viscosidade.

32. Pasta aquosa, caracterizada pelo fato de ser uma pasta aquosa de inulina, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

15                   33. Uso de uma pasta aquosa como definida na reivindicação 32, caracterizado pelo fato de ser como componente de comunicação de estrutura, substituto da gordura, substituto do óleo, agente texturizante, agente intensificador de estabilidade, e/ou agente construtor da viscosidade, em gêneros alimentícios ou preparações cosméticas.

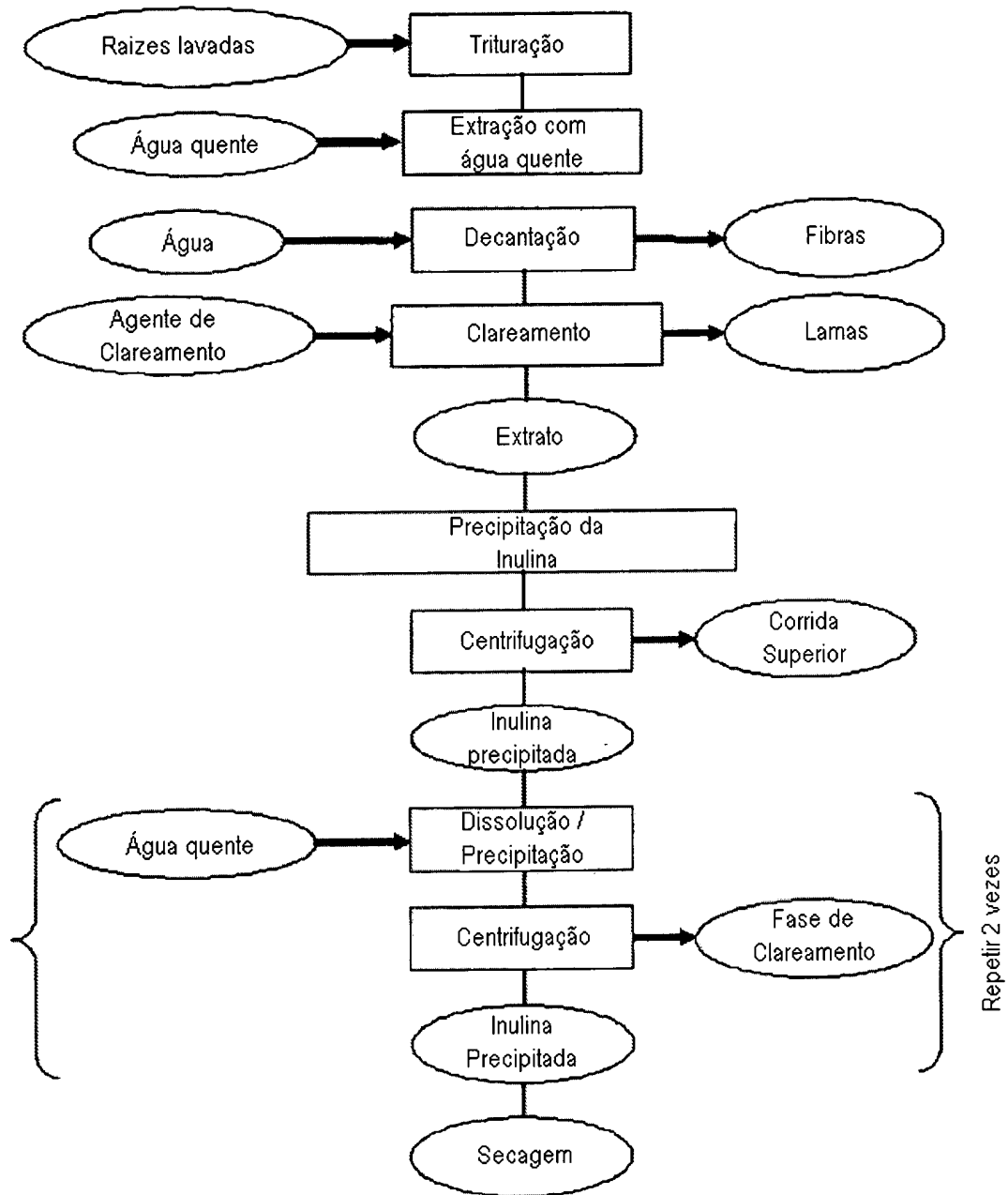


FIG. 1

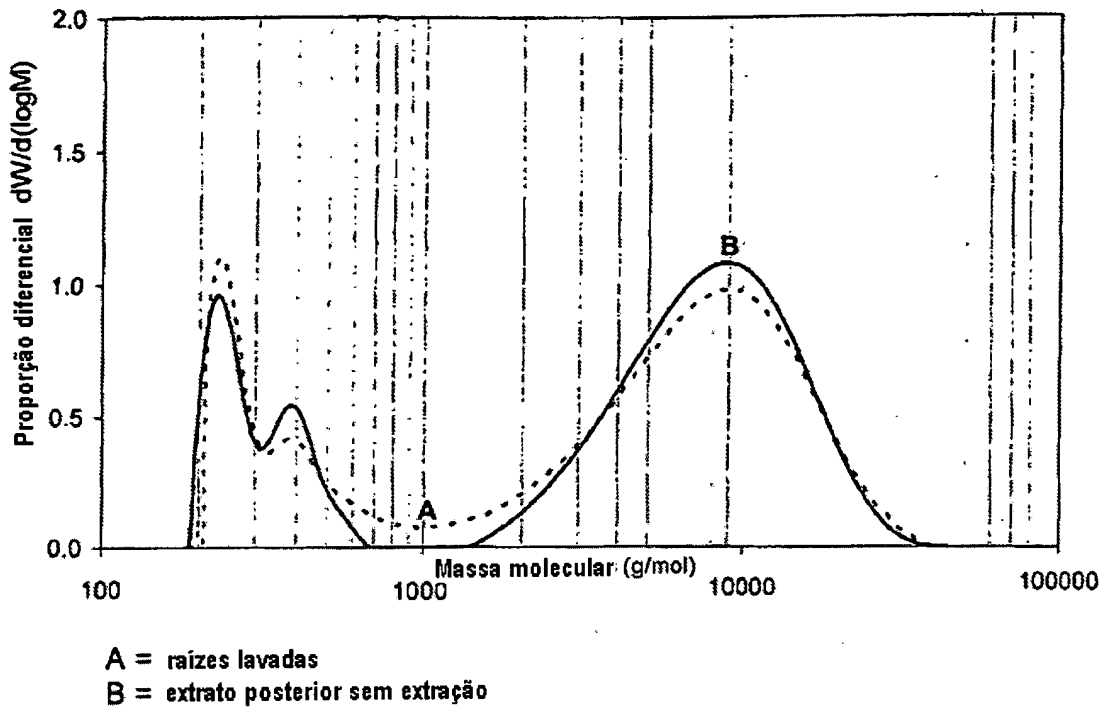


FIG. 2

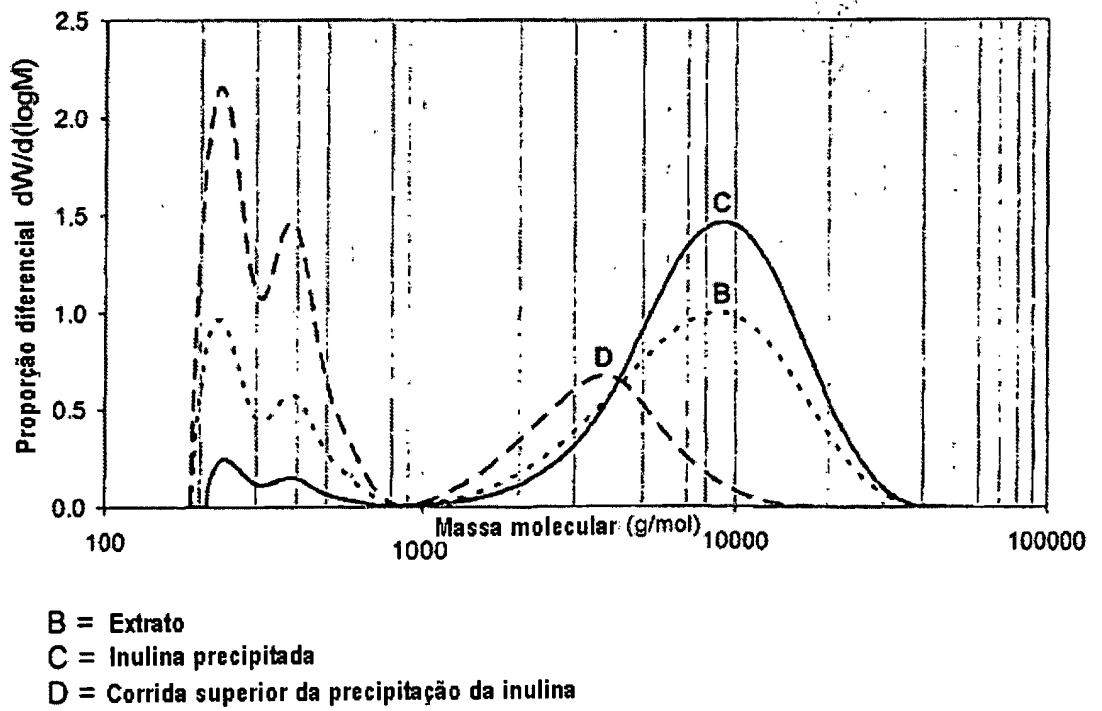


FIG. 3

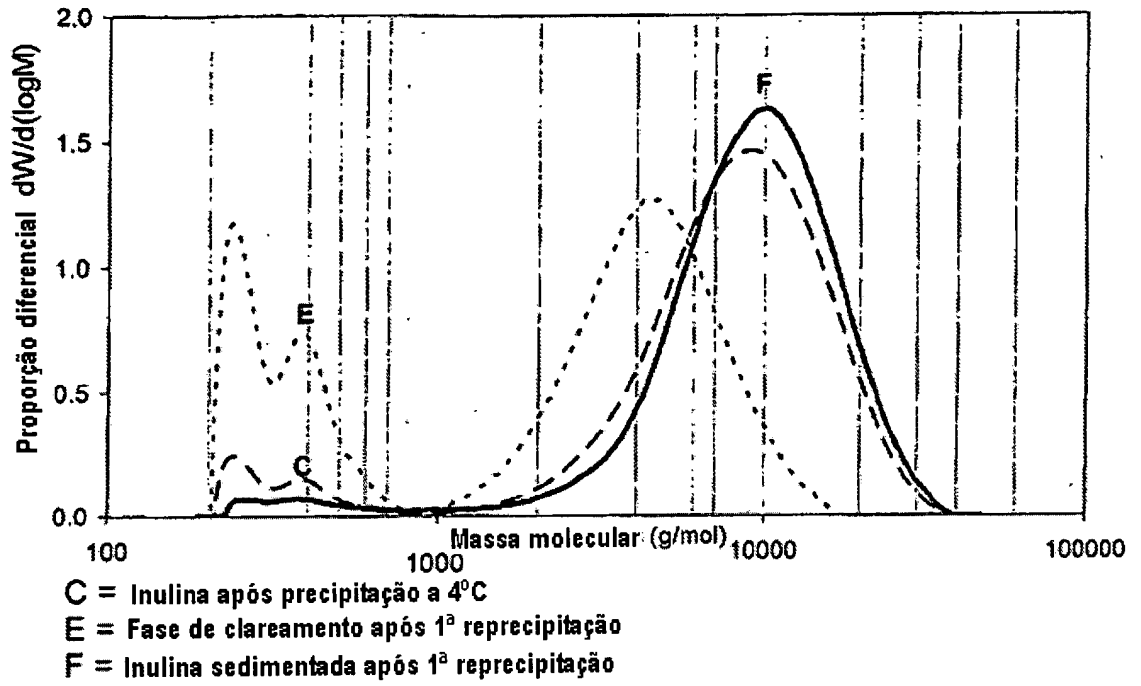


FIG. 4

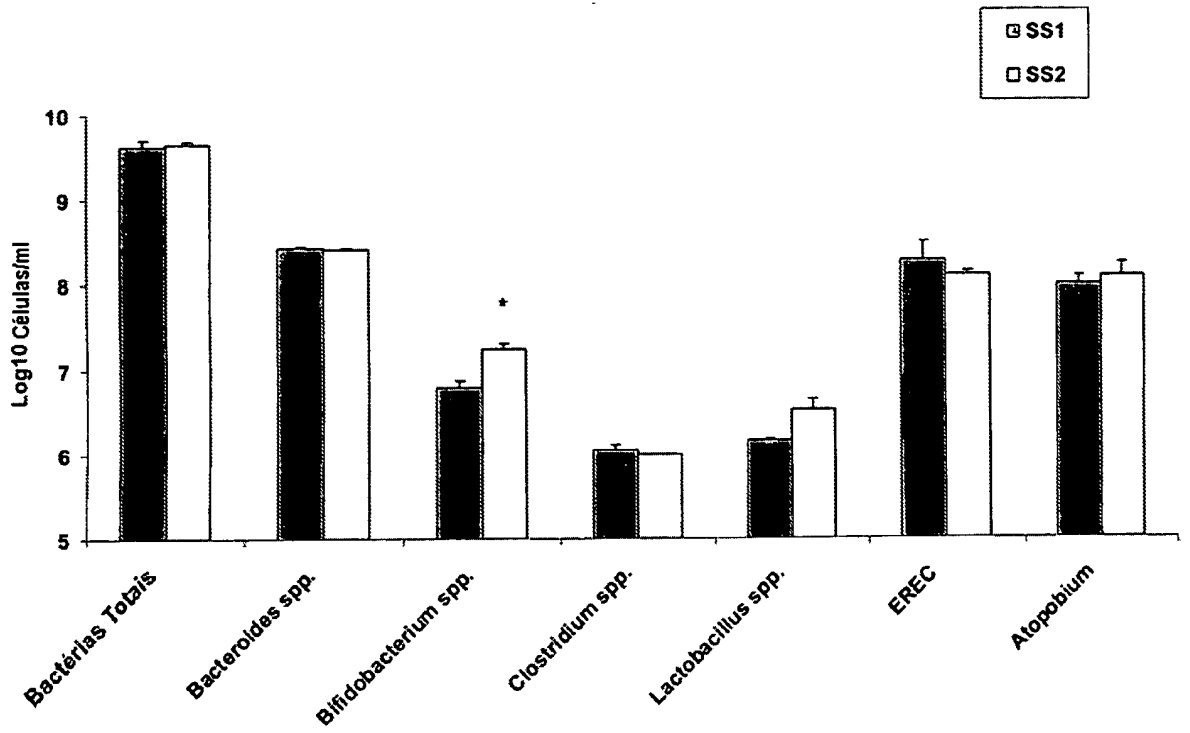


FIG. 5

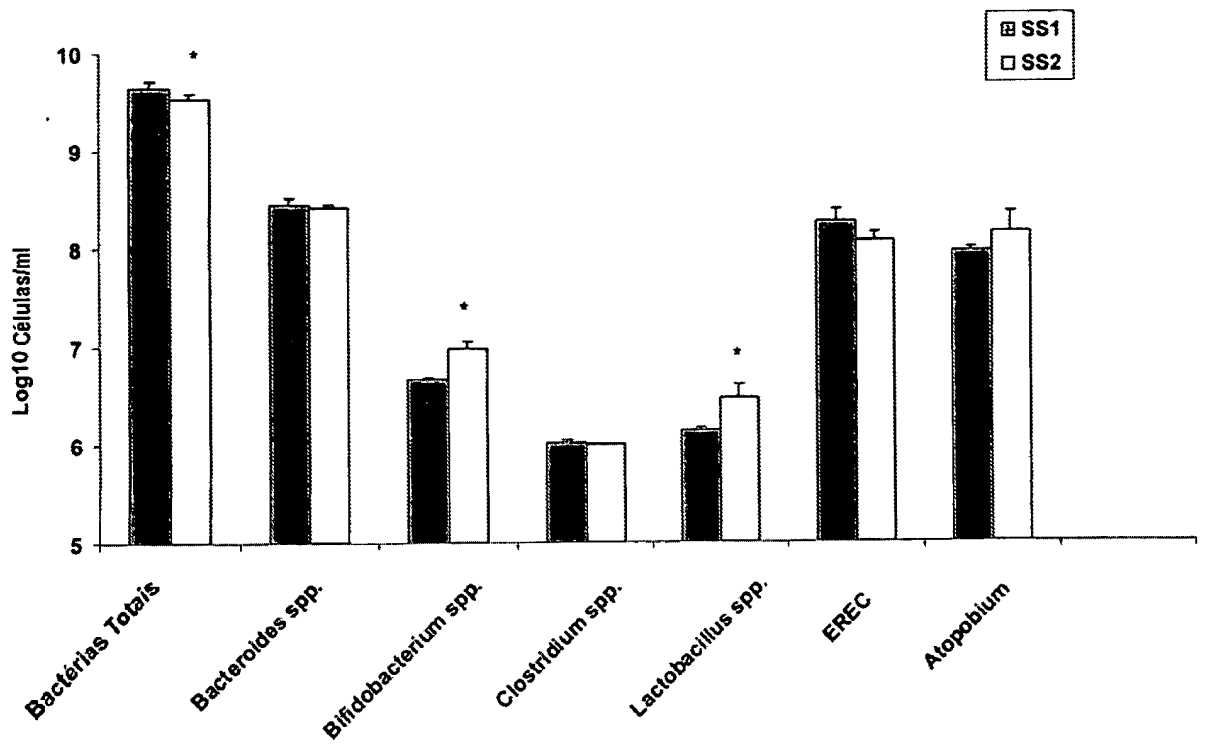


FIG. 6

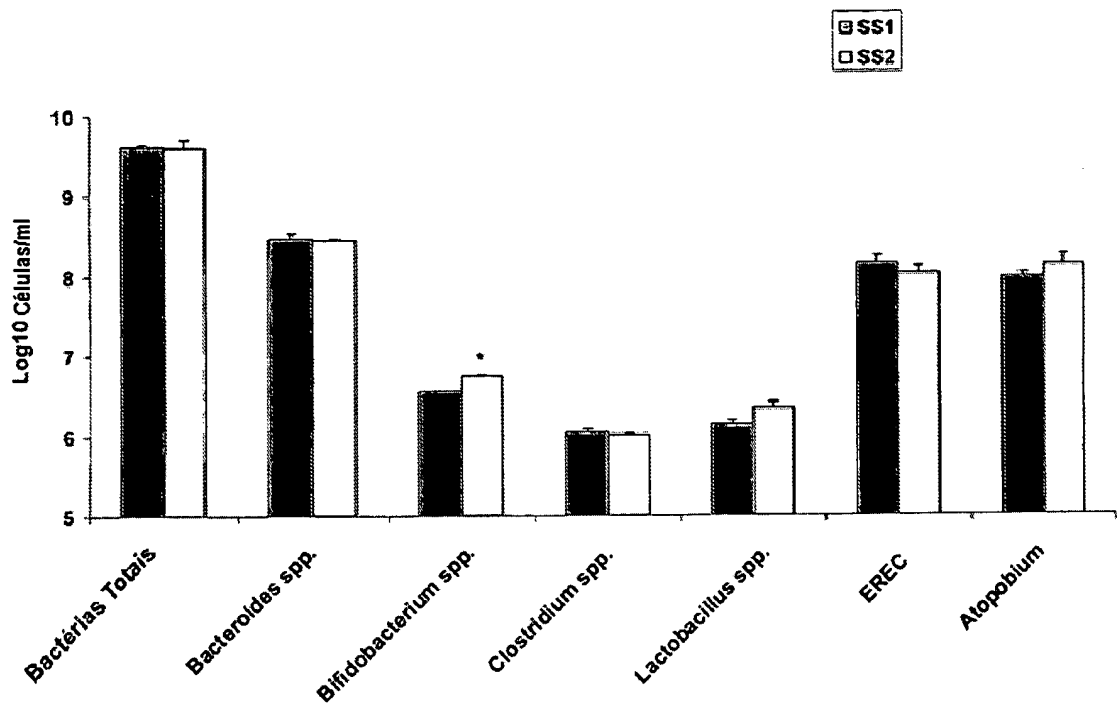


FIG. 7

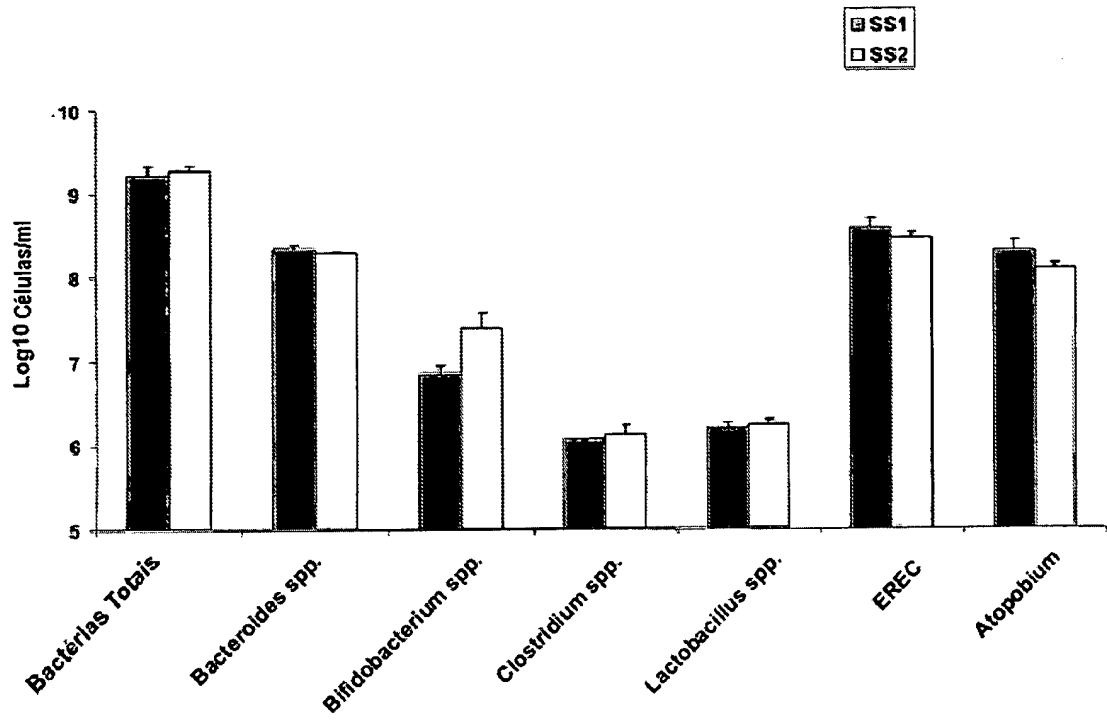


FIG. 8

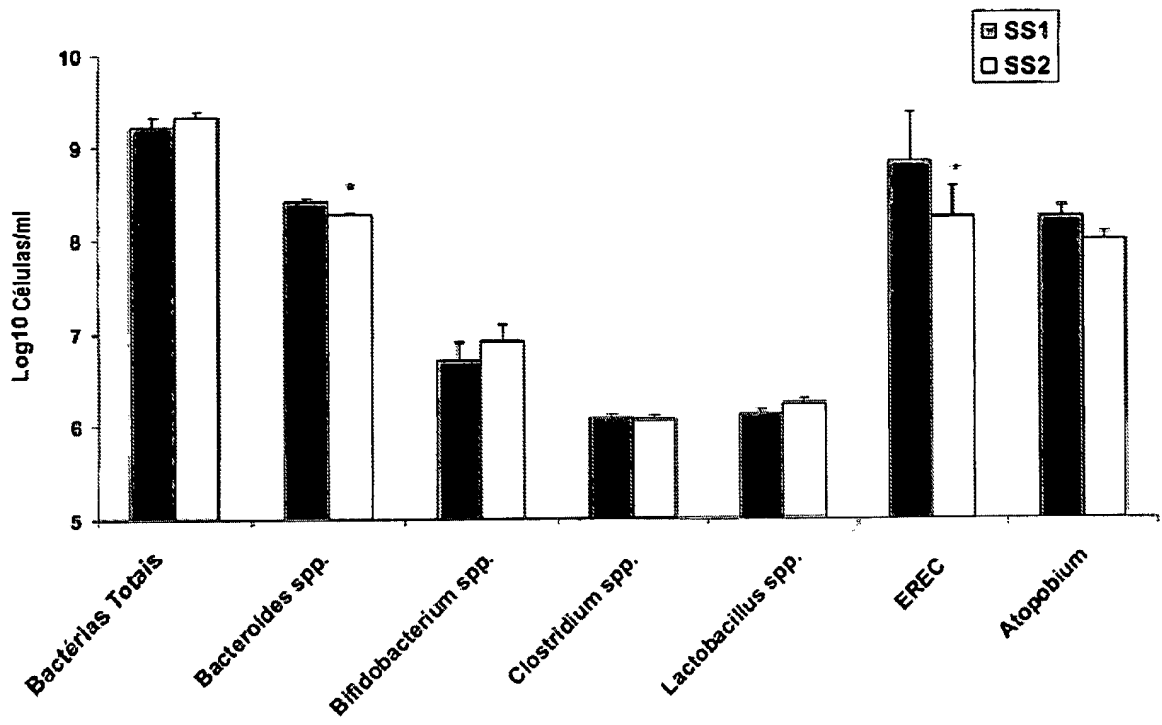


FIG. 9

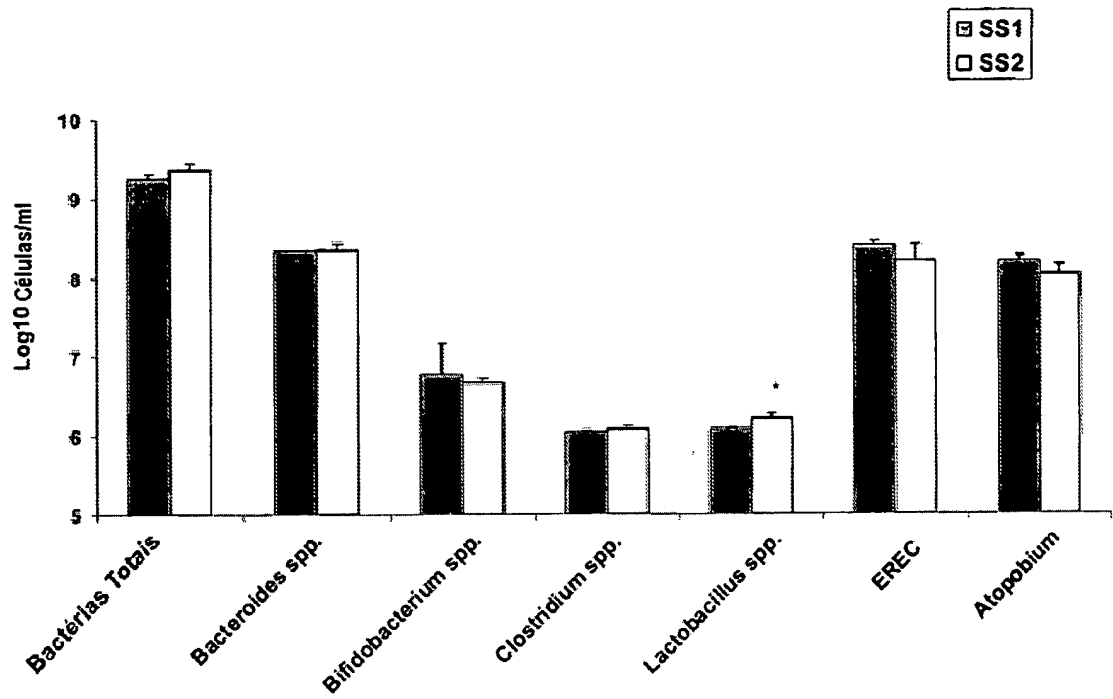


FIG. 10

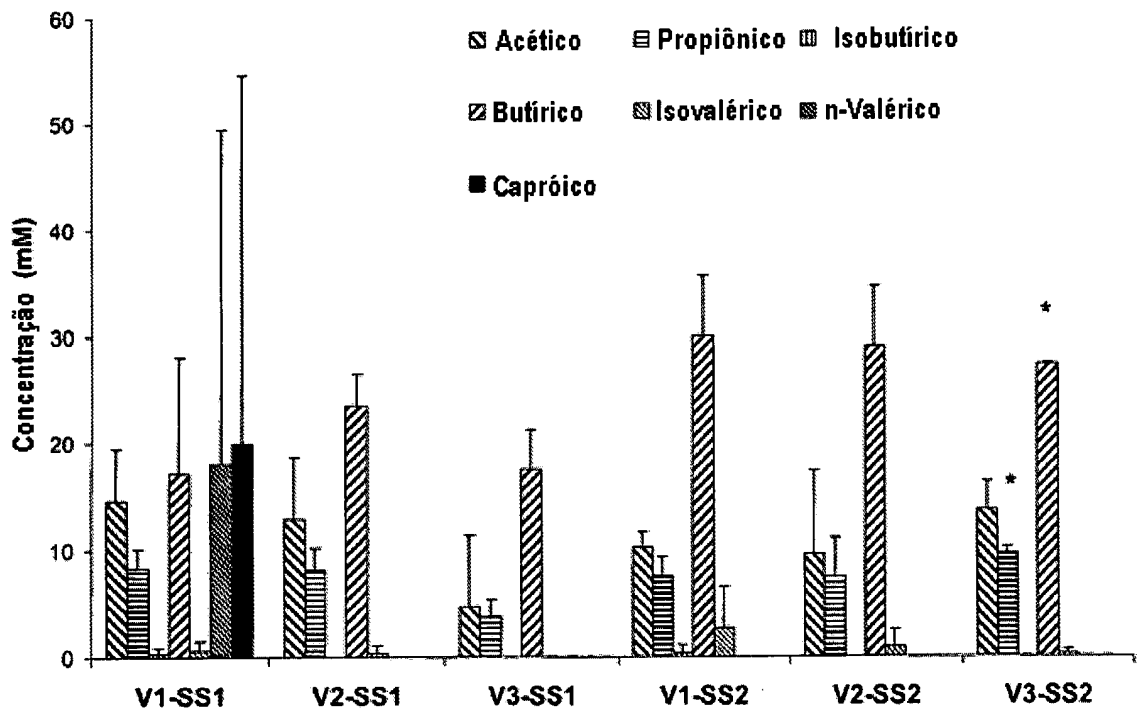


FIG. 11

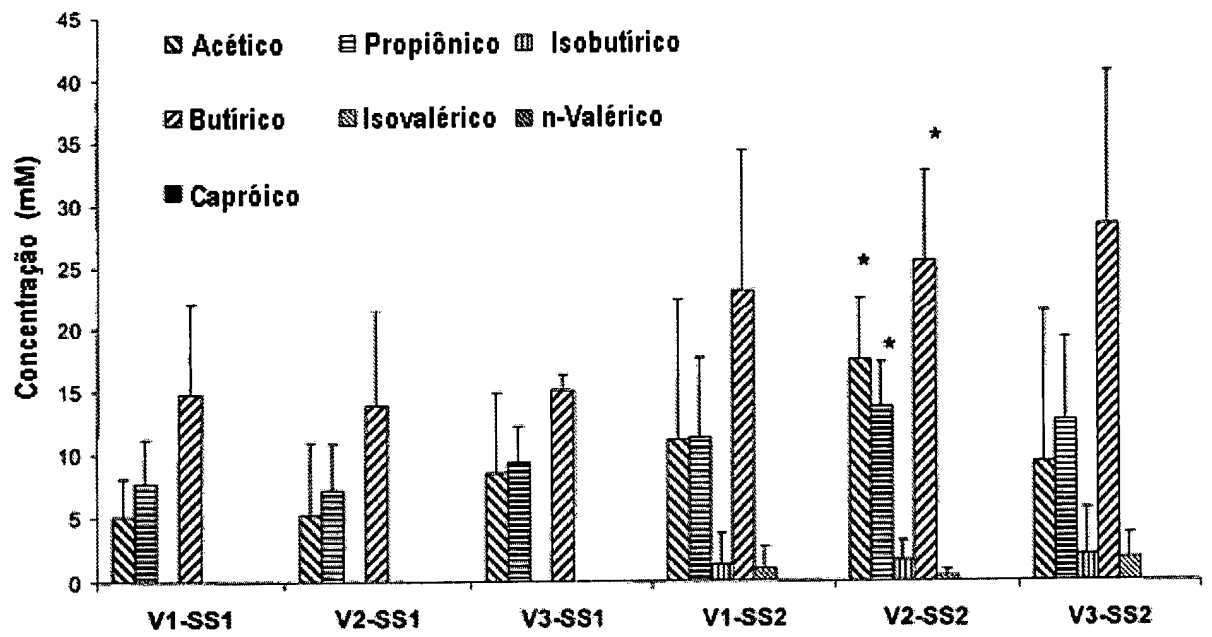


FIG. 12

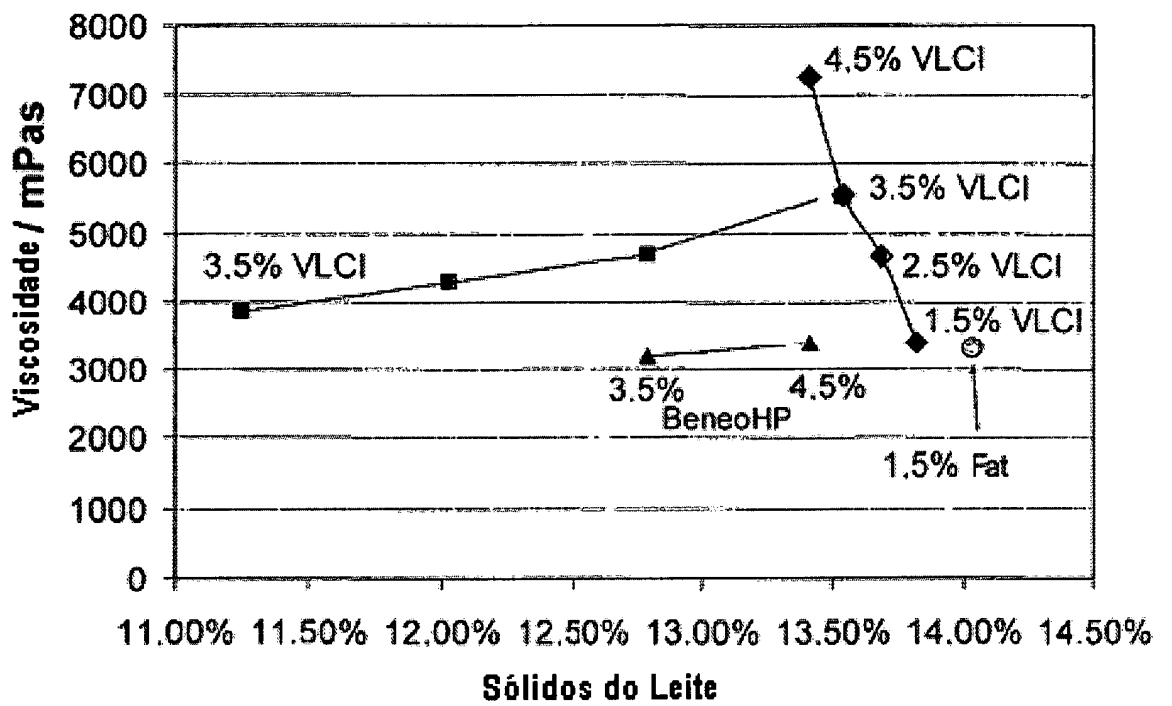


FIG. 13

**RESUMO**

Patente de Invenção: "NULINA, SEU USO, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO ALIMENTAR, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, BEM COMO PASTA AQUOSA E SEU USO".

- 5           A presente invenção refere-se a uma inulina de cadeia longa e a sua preparação a partir de raízes de alcachofra, ao seu uso em gêneros alimentícios e preparações cosméticas e a gêneros alimentícios e preparações cosméticas compreendendo a inulina de cadeia longa.