



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

(21) **PI0710867-2 A2**



(22) Data de Depósito: 27/04/2007
(43) Data da Publicação: 21/06/2011
(RPI 2111)

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

(54) Título: **INULINA DE CADEIA LONGA, PROCESSO PARA OBJEÇÃO DA MESMA, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO DE DIETA, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, USO DA INULINA, PASTA AQUOSA DE INULINA E USO DA MESMA**

(57) Resumo: INULINA DE CADEIA LONGA, PROCESSO PARA OBJEÇÃO DA MESMA, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO DE DIETA, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, USO DA INULINA, PASTA AQUOSA DE INULINA E USO DA MESMA. A presente invenção refere-se a uma inulina de cadeia longa e sua preparação a partir de raízes de alcachofra, ao seu uso em gêneros alimentícios e preparações cosméticas e a gêneros alimentícios e preparações cosméticas que compreendem uma inulina de cadeia longa.

(30) Prioridade Unionista: 28/04/2006 EP 06 090064.4, 27/10/2006 EP 06 090200.4, 02/05/2006 US 60/796,819, 30/10/2006 US 60/855,250, 28/04/2006 EP 06 090064.4, 27/10/2006 EP 06 090200.4, 30/10/2006 US 60/855,250, 28/04/2006 EP 06 090064.4, 02/05/2006 US 60/796,819, 02/05/2006 US 60/796,819, 30/10/2006 US 60/855,250

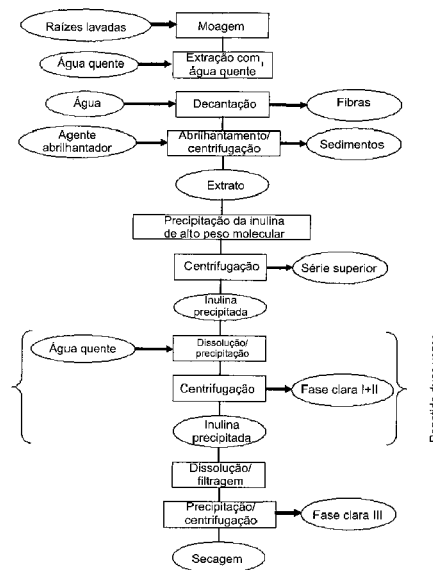
(73) Titular(es): Bayer CropScience AG

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

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007004029 de 27/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/128560 de 15/11/2007



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"INULINA DE CADEIA LONGA, PROCESSO PARA OBJEÇÃO DA MESMA, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO DE DIETA, PREPARAÇÃO COSMÉTICA, USO DA INULINA, PASTA AQUOSA DE INULINA E USO DA MESMA"**.

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

10 A demanda por gêneros alimentícios que contenham pouca gordura e matérias-primas mais naturais aumentou bastante nas últimas décadas. Muitas substâncias já foram propostas como substitutos para gorduras, tal como produtos à base de carboidratos ou proteína ou substitutos para
15 gordura sintéticos tal como poliésteres de açúcar de ácidos graxos. No entanto, esses sempre têm desvantagem tal como uma estabilidade térmica baixa, uma "sensação na boca" insatisfatória ou um efeito indesejado sobre as pessoas ou o ambiente.

Sabe-se há muito tempo que inulina é adequada para uso em produtos alimentícios. A inulina tem um valor energético muito baixo disponível para humanos e então o uso de inulina como um substituto para gordura
20 assegura uma redução grande no valor calorífico do produto final. Ainda, inulina é usada como um agente de adição e de massa prebiótico em gêneros alimentícios.

A inulina é um polissacarídeo pertencente ao grupo frutano. Ela
25 consiste em uma cadeia beta-2-1-ligada de moléculas de frutose, e esta cadeia pode ter uma unidade alfa-D-glicose na extremidade de redução. A inulina acontece em quantidades economicamente recuperáveis em várias plantas tal como, por exemplo, raízes de chicória, alcachofra Jerusalém e tubérculos Dahlia. Os comprimentos de cadeia médios das várias inulinas e
30 suas propriedades físico-químicas diferem de espécie de planta para espécie de planta.

As inulinas empregadas até agora no setor de gênero alimentício

são totalmente satisfatórias em suas propriedades de processamento tal como, por exemplo, viscosidade em forma de pasta aquosa, estabilidade térmica e estabilidade a ácido, capacidade emulsificável e ligação à água.

Há ainda uma necessidade de inulinas com propriedades de fermentação aperfeiçoadas e um efeito prebiótico maior.

Um problema maior é que quando da extração de inulina com água quente do tecido de planta o extrato contém além da inulina bruta de polímero também monossacarídeos tal como glicose e frutose, dissacarídeos tal como sacarose e fruto-oligossacarídeos (DP 3-10). Esses subprodutos (mono- e dissacarídeos, fruto-oligossacarídeos (DP 3-10) podem interferir com processamento adicional da inulina. Por exemplo, mono- e dissacarídeos são indesejados na fabricação de produtos alimentícios dietéticos. O gosto doce dos mono- e dissacarídeos e fruto-oligossacarídeos (DP 3-10) interfere com certas aplicações no setor de produtos alimentícios. Fruto-oligossacarídeos (DP 3-10) podem, por causa de sua higroscopicidade e pegajosidade, interferir muito com o uso de inulina bruta em produtos alimentícios ambos durante processamento e durante armazenamento. Durante processamento adicional da inulina bruta, por exemplo, através de derivatização química, mono- e dissacarídeos e fruto-oligossacarídeos (DP 3-10) podem levar a misturas indefinidas de produtos que podem ser purificados apenas através de métodos caros ou não podem de modo algum. Ainda, uma alta proporção de açúcares de redução tem a desvantagem que em processos térmicos na presença de compostos amino pode haver reações que ficam marrons indesejadas, a formação de sabores estranhos e a produção de acrilamida (reação Maillard).

A presente invenção é baseada no objeto de provisão de uma inulina com a qual é possível resolver os problemas definidos acima.

A intenção era particularmente atingir propriedades de processamento vantajosas para aplicações na indústria de cosmético e gêneros alimentícios. Seus exemplos são um comportamento de viscosidade vantajoso, uma estabilidade térmica alta e estabilidade a ácido, uma capacidade de emulsificação boa e uma capacidade de ligação à água alta.

Um problema ao qual a invenção se dirige foi prover adicional-

mente uma inulina tendo propriedades de fermentação aperfeiçoadas e efeito probiótico aperfeiçoado para aplicações de gêneros alimentícios.

Finalmente, era desejável prover uma inulina que, através de comparação com inulina bruta, tivesse um teor menor de mono- e dissacáridos e de fruto-oligossacarídeos (DP 3-10).

Os problemas acima são revolidos através da provisão das modalidades definidas nas reivindicações.

A presente invenção refere-se a uma inulina que tem um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103, de preferência entre 84 e 100, com mais preferência entre 83 e 98, com mais preferência ainda entre 85 e 98, com mais preferência ainda 85 e 95, com mais preferência ainda entre 86 e 97 e com mais preferência entre 86 e 94.

Com relação a isso e com relação à presente invenção, o termo "entre" pretende também incluir os limites numéricos respectivamente indicados.

O termo "inulina" pretende significar em conexão com a presente invenção um polifrutano que consiste em cadeia beta-2-1-ligada de moléculas de frutose. Esta cadeia tem de preferência como sua extremidade uma unidade alfa-D-glicose de redução.

Em conexão com a presente invenção, o termo "grau de polimerização médio DP_w " (peso DP médio) significa o quociente da massa molecular ponderal média M_w e da massa molecular do monômero M_0 . A massa molecular ponderal média 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 de preferência medido em conexão com a presente invenção através do método de "cromatografia de permeação em gel com espalhamento de luz e detecção de índice refrativo (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito a seguir.

A inulina da invenção exhibe, em comparação com inulinas descritas na técnica anterior, a surpreendente desvantagem que ela pode ser

processada para cremes que exibem estabilidade raramente alta em tratamento com calor ou tratamento ácido, de modo que eles são mais adequados, por exemplo, para aplicações industriais particulares ou aplicações nas indústrias cosmética e/ou de produtos alimentícios. Ainda, cremes compreendendo a inulina da invenção mostram uma estabilidade inesperadamente alta com relação a forças de cisalhamento. A inulina da invenção então exibe a vantagem adicional, comparado com inulina convencional, que ela pode ser processada melhor em processos industriais onde forças de cisalhamento fortes agem.

10 A inulina da invenção é ainda notável pelas propriedades de viscosidade particularmente vantajosas e uma resistência de gel alta e uma solubilidade muito baixa, o que é vantajoso para aplicações de gêneros alimentícios.

15 Ainda, a inulina da invenção mostra surpreendentemente boas propriedades como substituto de gordura em gêneros alimentícios com excelentes propriedades sensoriais na boca.

20 A inulina da invenção também mostra através de comparação com produtos previamente empregados uma fermentação mais lenta, que é vantajosa na prevenção de doenças no intestino grosso posterior. A fermentação mais lenta é acompanhada por uma formação reduzida de gás no intestino, especialmente hidrogênio.

25 A inulina da invenção tem adicionalmente através de comparação com produtos previamente empregados um efeito prebiótico maior. Em particular, a inulina da invenção estimula a geração de bifidobactérias de uma maneira vantajosa com uma redução simultânea de bactérias indesejadas e/ou patogênicas. A inulina da invenção é então adequada para uso em gêneros alimentícios e/ou medicamentos para a prevenção e tratamento de disfunções e doenças do intestino, especialmente no intestino grosso posterior.

30 Finalmente, a inulina da invenção também confere várias propriedades de uso vantajosas de gêneros alimentícios tal como, por exemplo, aumento da viscosidade, capacidade emulsificável, capacidade de ligação de água e formação de miolo. A inulina da invenção surpreendentemente

confere propriedades de cozedura aperfeiçoadas a produtos de padaria e aumenta o rendimento da massa. A inulina da invenção é, além disso, um meio eficaz para modificação de sabor e estabilização de espuma.

Em uma modalidade adicional, a inulina da invenção tem um teor de fruto-oligossacarídeos (oligofrutanos) tendo um DP de a partir de 3 a 10 que é menos do que 3%, de preferência menos do que 1,5%, particularmente de preferência menos do que 0,7%, muito particularmente de preferência menos do que 0,3%.

Em uma modalidade adicional, a inulina da invenção tem um teor de glicose de menos do que 2%, de preferência menos do que 1%, particularmente de preferência menos do que 0,5%, muito particularmente de preferência menos do que 0,2% e com mais preferência menos do que 0,1%.

Em uma modalidade adicional, a inulina da invenção tem um teor de frutose de menos do que 2,5%, de preferência menos do que 1,5%, particularmente de preferência menos do que 1,0%, muito particularmente de preferência menos do que 0,3% e com mais preferência menos do que 0,15%.

Em uma modalidade adicional, a inulina da invenção tem um teor de sucrose de menos do que 2%, de preferência menos do que 1%, particularmente de preferência menos do que 0,5%, muito particularmente de preferência menos do que 0,3% e com mais preferência menos do que 0,1%.

Em uma modalidade da inulina da invenção que é particularmente vantajosa para aplicações de gêneros alimentícios, o teor de mono- e dissacarídeos é menos do que 0,5%.

Todas as porcentagens são, a menos que de outro modo indicado, porcentagem em peso com base no peso seco total de inulina e substâncias adicionais. "Substâncias adicionais" são todas as substâncias na mistura seca que são diferentes de inulina.

O teor de frutose, glicose e sucrose é medido em conexão com a presente invenção através do método enzimático óptico descrito abaixo (métodos gerais: "determinação de açúcar").

Em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades anteriores, a inulina da invenção tem um peso molecular ponderal médio M_w entre 13.400 g/mol e 16.700 g/mol, de preferência entre 13.600 e 16.200 g/mol, com mais preferência entre 13.750 g/mol e 15.900 g/mol e particularmente de preferência entre 13.900 g/mol e 15.750 g/mol e com mais preferência entre 13.900 g/mol e 15.250 g/mol.

O peso molecular ponderal médio M_w é de preferência medido em conexão com a presente invenção através do método de "cromatografia de permeação em gel com espalhamento de luz e detecção de índice refrativo (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito a seguir.

Em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades anteriores, a inulina da invenção tem um grau médio de polimerização DP_n (GPC) medido através de cromatografia de permeação em gel (GPC) entre 66 e 89, de preferência entre 68 e 85, particularmente de preferência entre 70 e 85 e com mais preferência ainda entre 72 e 84.

O "grau médio de polimerização DP_n " é medido em conexão com a presente invenção de preferência através do método de "cromatografia de permeação em gel com espalhamento de luz e detecção de índice refrativo (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito a seguir.

Em conexão com a presente invenção, o termo "grau médio de polimerização DP_n " (significa número DP) significa o quociente da massa molecular numérica média M_n e da massa molecular do monômero ligado M_0 (anidrofrutose = 162 g/mol). A massa molecular numérica média M_n resulta de

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

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

Em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades anteriores, a inulina da invenção tem uma distribuição de peso molecular na faixa de a partir de 650 a 48.000, com mais preferência 970 a 40.000 g/mol, com mais preferência ainda 1.300 g/mol a 34.000 g/mol e com mais preferência de a partir de 4.000 g/mol a 26.800 g/mol.

Ainda em uma modalidade adicional, que pode incluir as modalidades anteriores, a inulina da invenção mostra uma massa total de moléculas de inulina tendo um peso molecular de < 10.000 g/mol com base na massa total de todas as moléculas de inulina de 20-36% e uma massa total de moléculas de inulina tendo um peso molecular de > 20.000 g/mol com base na massa total de todas as moléculas de inulina de 7-23%. É ainda mais preferido que a massa total das moléculas de inulina tendo um peso molecular de < 10.000 g/mol com base na massa total das moléculas de inulina seja 25-31% e a massa total das moléculas de inulina tendo um peso molecular de > 20.000 g/mol com base na massa total de todas as moléculas de inulina seja 12-18%.

A distribuição de peso molecular é de preferência medida em conexão com a presente invenção através do método de "cromatografia de permeação em gel com espalhamento de luz e detecção de índice refrativo (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito a seguir.

Em uma modalidade da inulina da invenção com propriedades particularmente vantajosas, o grau de ramificação é 0,5-2,0% em mol, com mais preferência 0,7-2,0% em mol, com mais preferência ainda 0,9 a 2,0% em mol e com mais preferência 1,1 a 2,0% em mol. O grau de ramificação é definido aqui como o número percentual de monômeros de frutose beta-2-1-ligada com ponto de ramificação adicional na posição 6 do monômero de frutose (também abreviado para "2-1,6-" a seguir) com base no número total de todos os monômeros de inulina medidos em uma amostra da inulina da invenção com pesos moleculares aleatoriamente distribuídos. Na sua posição 6, um monômero de "2-1,6-" frutose dentro de uma cadeia de polifrutose é ligado a outra cadeia de polifrutose, consistindo em pelo menos dois monômeros de frutose beta-2-1-ligada, ou a um monômero de frutose único. O termo "ponto de ramificação" designa uma posição de um monômero de frutose, com uma cadeia de polifrutose, ao qual outra cadeia de polifrutose consistindo em pelo menos dois monômeros de frutose beta-2-1-ligada ou um monômero de frutose unido é ligada. O grau de ramificação é medido através do método de análise de metilação padrão ou alternativamente através do método de degradação redutiva após metilação. Ambos métodos são

descritos em detalhes nos exemplos apensos.

Uma modalidade da inulina da invenção que é particularmente vantajosa em suas propriedades e que pode incluir as modalidades previamente descritas tem uma distribuição de peso molecular particularmente estreita expressa pelo quociente entre o grau de peso médio de polimerização e o grau de número médio de polimerização DP_w/DP_n . Esta quantidade é também referida como um índice de polidispersidade. Em uma modalidade preferida, o quociente DP_w/DP_n é menos do que 1,25, em uma modalidade mais preferida é menos do que 1,20, em uma modalidade ainda mais preferida é menos do que 1,15 e na modalidade mais preferida é menos do que 1,10. Os valores de DP_w e DP_n são nesta conexão medidos através do método de "cromatografia de permeação em gel com espalhamento de luz e detecção de índice refrativo (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito a seguir. O peso molecular de um monômero para cálculos de conversão é ajustado igual a 162 g/mol.

A invenção refere-se ainda a uma pasta aquosa da inulina da invenção que é obtenível através de dispersão da inulina em água, cisalhando a dispersão resultante até homogênea, armazenando o produto obtido desta maneira a 4-15°C por 12-24 horas e, após condicionamento para temperatura ambiente, agitar para dar uma pasta homogênea. Uma pasta preferida compreende água e 1-40% em peso, com mais preferência 1-35% em peso, com mais preferência ainda 1-30% em peso, com mais preferência ainda 2-25% em peso, com mais preferência ainda 2-20% em peso e particularmente de preferência 10-20% em peso de inulina com base 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. Deste modo, o termo "pasta aquosa" deve ser compreendido como uma suspensão de inulina cristalina e/ou amorfa em fase aquosa. A fase aquosa é baseada em água que pode opcionalmente compreender substâncias dissolvidas ou suspensas adicionais, tal como sais, outros carboidratos, proteínas, aminoácidos. Em uma modalidade vantajosa a inulina na pasta é uma inulina seca com pulverização, isto é, uma inulina que foi seca com pulverização antes da formação da pasta.

A pasta descrita acima pode ser usada como um componente em sistemas aquosos. Sistemas aquosos preferidos são gêneros alimentícios em base aquosa e cosméticos, onde o termo "gênero alimentício" é definido em outro lugar na presente descrição. Exemplos de gêneros alimentícios preferidos são também listados em outro lugar na presente descrição. Em gêneros alimentícios e cosméticos, uma pasta de acordo com a invenção pode ser usada como componente de oferecimento de estrutura, agente de espessamento, agente de estruturação, agente de aumento da estabilidade ou agente de formação de viscosidade, onde a pasta nesta conexão pode realizar uma ou mais das funções acima mencionadas. Em gêneros alimentícios, uma pasta de acordo com a invenção pode ser também usada como um substituto para gordura, substituto para óleo, agente prebiótico e/ou componente de fibra dietética, onde a pasta nesta conexão pode realizar uma ou mais das funções acima mencionadas. O uso mais preferido é o uso como um óleo ou substituto para gordura. Os gêneros alimentícios mais preferidos onde uma pasta de acordo com a invenção é usada como um componente são produtos laticínios tal como iogurte, bebidas de iogurte, creme fresco, coalhada, manteiga, leite, especialmente leite desnatado, soro de leite, leite azedo, bebida láctea ácida, queijo, tal como queijo cremoso, queijo mole, queijo fatiado, queijo duro, soro, leite em pó, bebidas à base de leite.

A inulina da invenção mostra uma estabilidade surpreendentemente alta a ácido. Em particular, uma pasta aquosa da inulina da invenção mostra uma alta estabilidade a ácido. A estabilidade a cisalhamento de uma pasta de inulina aquosa da invenção é da mesma maneira excepcional através de comparação com produtos comercialmente disponíveis.

A inulina da invenção é distinguida de outras inulinas comercialmente disponíveis por uma resistência de gel surpreendentemente alta. Resistências de gel de 4-100 N, mais vantajosamente 10-100 N, ainda mais vantajosamente 20-100 N e mais vantajosamente 40-100 N, são conseguidas em uma concentração de 1-35% (p/p), com mais preferência 1-30% (p/p), com mais preferência ainda 2-25% (p/p), com mais preferência 2-20% (p/p), com mais preferência cerca de 20% (p/p) da inulina da invenção em

água quando inulina é dissolvida a 90°C e então armazenada em temperatura ambiente (23°C) por um período de 24 horas. Resistências de gel altas conforme indicado previamente podem ser conseguidas particularmente bem com inulinas da invenção que são secas com pulverização e então empregadas para formação de gel. Os géis obtidos desta maneira de preferência mostram um caráter de partícula (géis de partícula). O método de medição para determinação da resistência de gel é descrito em detalhes na seção de exemplos (formação de estrutura por inulinas após aquecimento em água).

A presente invenção refere-se em um aspecto adicional a um processo para obtenção de inulina onde

- a) raízes de alcachofra são moídas,
- b) um extrato é obtido através de tratamento das raízes moídas com água,
- c) constituintes de coloração são removidos do extrato obtido,
- d) inulina é precipitada do extrato,
- e) a inulina é reprecipitada pelo menos uma vez.

O processo é particularmente adequado para obtenção das inulinas previamente descritas da invenção, mas não é restrito a elas.

Raízes de alcachofra são usadas como material de partida, mas o processo não é restrito a uma variedade particular. A moagem é vantajosamente precedida por remoção de quaisquer contaminantes aderentes das raízes, por exemplo, através de lavagem vigorosa com água com um limpador de alta pressão. É vantajosamente possível lavar as raízes em estado congelado profundo a fim de minimizar a perda de massa de material de raiz.

Se necessário, as raízes são inicialmente moídas de modo grosso, por exemplo, cortando. Picadores são preferidos para a moagem adicional. O produto obtido é material de raiz moído na forma de lascas fibrosas.

Na modalidade mais vantajosa do processo, raízes de alcachofra com as características que seguem são usadas: raízes maduras com relação à formação de massa seca e inulina. O grau de maturação pode ser estabelecido a partir da razão do teor de inulina para teor de matéria seca e a razão de teor de frutose para teor de inulina. O teor de inulina está de preferência na faixa de 30-70% em peso, com mais preferência 40-65% em pe-

so, com mais preferência ainda 50-60% em peso, com base no peso total da matéria seca de raízes, e a razão de frutose/inulina está de preferência na faixa de 3-24% em peso, com mais preferência 3-12% em peso, com mais preferência menos do que 6% em peso. O teor de matéria seca das raízes de alcachofra limpas é de preferência 20-50% em peso, com mais preferência 30-40% em peso, com mais preferência 30-35% em peso, com base no peso total de raízes limpas.

No caso de raízes de alcachofra terem que ser armazenadas antes de usá-las no processo da presente invenção, as raízes devem ser conservadas a fim de prevenir contaminação microbiana, enraizamento ou diminuição de peso molecular de inulina devido à degradação enzimática. Métodos preferidos para conservação das raízes são congelamento ou secagem com ar quente de raízes moídas para armazenamento.

Após a moagem, o material de raiz moído é extraído com água, de preferência em uma temperatura de 60°C a 95°C, com mais preferência 80-95°C. A extração de preferência acontece na faixa de pH neutro a ligeiramente alcalino. Uma temperatura de pelo menos 60°C em pH 7-9 é vantajosa porque neste caso hidrólise enzimática e ácida é suprimida. A concentração de material de raiz moído na água é de preferência 10-40% em peso, com mais preferência 20-30% em peso, medida em peso fresco de raízes com base no peso total da mistura de extração.

De preferência uma razão entre a matéria seca do material picado usado e a água como meio de extração é estabelecida que leva a um teor de matéria seca no extrato de 8-12% em peso e um teor de inulina de mais do que 6% em peso, de preferência 6-8% em peso, com base no peso do extrato. Uma escolha correspondentemente adequada de condições de extração, tal como a razão de água para peso de raiz, pode levar a uma transferência de 80-90% 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, com base na observação que a inulina de alto peso molecular cristaliza do extrato mesmo em uma concentração tão baixa quanto 5% em peso, com base no peso do extrato.

Não há nenhuma restrição especial quanto ao equipamento de extração, e técnicas de extração convencionais para material de planta podem ser aplicadas. É mais preferido de acordo com a invenção que a extração aconteça em um extrator aquecido com revestimento com agitador. Em
5 outra modalidade altamente preferida uma tina de filtragem (*launter tun*) que pode ser aquecida é usada como extrator agitado. Então, a extração da inulina das raízes é combinada com a separação do extrato das lascas usadas através de filtragem, conforme descrito abaixo. O tempo de extração após equilíbrio da mistura de raiz/água é de preferência 30 minutos – 4 horas, de
10 preferência 1-2 horas. Após este tempo, o extrato é separado das lascas usadas, por exemplo, bombeando ou coando ou filtrando.

Após separação do extrato das lascas usadas, onde apropriado, materiais fibrosos e fragmentos de planta podem permanecer como materiais suspensos no extrato. Se presentes, esses materiais suspensos são provavelmente removidos do extrato. Nesta variante do processo, a etapa b) do
15 processo é então seguida, antes da etapa c), por uma etapa onde materiais suspensos, principalmente consistindo em fibras, são removidos do extrato. A quantidade aceitável de materiais suspensos e se remoção vai acontecer serão decididas pelo versado na técnica de caso para caso. Remoção dos
20 materiais suspensos pode acontecer através de técnicas de separação convencionais, com centrifugação ou filtragem. Um separador deslodante provou ser particularmente adequado. Uma tela ou filtro com finura apropriada pode ser também usada.

Em uma modalidade altamente preferida, o material suspenso
25 pode ser filtrado usando as lascas usadas como o material de filtro. Nesta modalidade as lascas usadas são precipitadas no fundo do recipiente de extração equipado com uma peneira no fundo, igual a uma tina de filtragem. A peneira é de preferência uma peneira com fenda. As lascas usadas precipitadas são usadas como um leito de filtragem através do qual o extrato flui.
30 Usando esta técnica uma remoção quase quantitativa de material suspenso é possível sem uso de etapas de filtragem adicionais antes de refinamento ou abrilhantamento adicional do extrato ou cristalização da inulina.

Os extratos são coloridos devido ao seu teor de constituintes de

coloração e matéria colorizada coloidalmente suspensa. Os constituintes de coloração consistem, *inter alia*, em taninas e flavonoides e geralmente conferem uma cor amarela ou amarelo-amarronzado e/ou amarronzado-escuro ao extrato. As inulinas que podem ser obtidas diretamente a partir de tais extratos não estão de acordo com as condições necessárias com relação à cor neutra. É então necessário remover os constituintes de coloração do extrato na etapa c) do processo. A etapa c) do processo da invenção para remoção de constituintes de coloração dos extratos de planta é geralmente também referida como descoloração, clarificação ou "abrilhantamento" de extratos de planta. Esses termos são equivalentes no contexto da presente invenção.

O abrilhantamento pode acontecer de acordo com a invenção adicionando cal e subsequente combinação (adição de CO_2). O processo de adição de cal é conhecido da técnica anterior e é usado, por exemplo, na obtenção de sucrose a partir de beterraba açucareira. Em um processo de abrilhantamento alternativo, os constituintes de interferência são removidos usando um trocador de íon.

Em uma modalidade particularmente vantajosa do processo, os constituintes de coloração são removidos na etapa c) através de

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

As etapas i) - iv) nesta variante particularmente preferida são subetapas de etapa c) do processo.

Esta variante de processo torna descoloração mais eficaz do extrato possível comparado com o processo de abrilhantamento de cal. Ainda, os auxiliares empregados, sais de magnésio e álcalis, são de custo baixo. O processo é então de menos custo do que o uso de um trocador de íon. O gasto com aparelho e tempo para realizar esta etapa do processo é também particularmente baixo. Finalmente, este tipo de abrilhantamento também remove simultaneamente materiais causando turbidez do extrato.

Íons de magnésio (Mg^{2+}) são misturados de acordo com a in-

venção ao extrato de planta aquoso. É possível em uma variante de etapa i) adicionar uma solução aquosa de um sal de magnésio ao extrato de planta. Em uma variante adicional, mais preferida, um sal de magnésio é adicionado diretamente em forma sólida ao extrato de planta e dissolvido nele.

5 Se sal de magnésio for adicionado, é preferido um sal que, devido ao seu produto de alta solubilidade, é muito prontamente solúvel em água. Sais de magnésio particularmente adequados são selecionados de cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, nitrato de magnésio, sais de magnésio de ácidos graxos inferiores tal como acetato de magnésio e propionato, e
10 suas misturas.

Um componente alcalino em ii) significa de acordo com a invenção um componente que compreende íons de hidróxido (OH^-) ou forma íons de hidróxido no extrato após combinação com o extrato de planta. O componente alcalino pode ser líquido, sólido ou gasoso. Um componente alcalino
15 líquido é de preferência empregado.

Quando da adição de íons de magnésio e um componente alcalino conforme descrito nas etapas i) e ii) do processo, um precipitado é formado através de uma reação de precipitação. As etapas i) e ii) podem no contexto do presente processo a princípio ser realizadas simultaneamente,
20 especialmente se uma solução de íons de magnésio for usada na etapa i) e um líquido alcalino for usado na etapa ii). No entanto, é preferido realizar a etapa i) primeiro e então a etapa ii) do processo.

É vantajoso para a etapa c) do processo que ambos íons de magnésio e o componente alcalino sejam distribuídos o mais homogênea-
25 mente possível no extrato de modo que a reação de precipitação no extrato seja também homogênea e o mais quantitativa possível. É então preferido empregar como componente alcalino líquidos alcalinos aquosos tal como, por exemplo, soluções alcalinas ou suspensões alcalinas que podem ser rapidamente e homogêneamente misturadas no extrato de planta.

30 Uma solução ou suspensão alcalina compreende de acordo com a invenção íons de hidróxido (OH^-) ou os forma após combinação com o extrato de planta.

Em uma variante de processo muito preferida, um sal de mag-

nésio é homogeneamente dissolvido no extrato primeiro na etapa i). Subsequentemente, na etapa ii), uma solução ou suspensão alcalina aquosa é adicionada.

5 Em uma modalidade, o componente alcalino é uma solução ou suspensão aquosa de um hidróxido de metal alcalino ou metal alcalinoterroso. O hidróxido é de preferência selecionado dos hidróxidos dos metais alcalinos e alcalinoterrosos, tal como hidróxido de lítio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio e hidróxido de bário.

10 Em uma variante muito particularmente preferida, o componente alcalino é uma suspensão de hidróxido de cálcio. A vantagem de uso de hidróxido de cálcio é que uma quantidade particularmente pequena de centrifugado é obtida na etapa iii). Ainda, a precipitação simultânea de hidróxido de magnésio e sulfato de cálcio atinge uma taxa de sedimentação maior e uma compressibilidade maior do precipitado. O precipitado tem consistência
15 particularmente pouco gelatinosa. A ligação de inulina no precipitado então permanece particularmente baixa nesta variante de processo.

Um componente alcalino adicional que pode ser usado é amônia, de preferência em solução aquosa. Nem é excluído a princípio usar amônia gasosa, mas isto é menos preferido do que o uso de uma solução
20 aquosa.

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

Sais de ácidos orgânicos fracos tal como acetatos de metal alcalino ou metal alcalinoterroso, especialmente acetato de sódio, acetato de potássio, acetato de cálcio e acetato de magnésio, podem ser também usa-
25 dos.

Hidróxido de magnésio é formado como precipitado. Os constituintes de coloração do extrato aquoso permanecem de acordo com a inven-
30 ção no precipitado e são então separados da fase líquida. Um extrato substancialmente descolorido é obtido. As quantidades de íons de Mg^{2+} e componente alcalino empregado, e então a quantidade de precipitado formado, determinam *inter alia* quão quantitativa a descoloração é. Otimização das

quantidades dos reagentes está dentro da competência de um versado na técnica. No caso de sulfato de magnésio, a concentração preferida está na faixa de 0,5-3% em peso, com mais preferência 0,5-2% em peso do extrato aquoso.

5 Na variante preferida de etapa c), conforme acima descrito, a razão molar de íons de hidróxido para íons de magnésio $\text{OH}^-:\text{Mg}^{2+}$ é de preferência de a partir de 2,2:1 a 1,8:1. É mais preferido que a razão seja exatamente estequiométrica, isto é, $\text{OH}^-:\text{Mg}^{2+} = 2:1$. A quantidade de componente alcalino deve então ser escolhida de modo que a quantidade apropriada
10 de íons de hidróxido esteja presente para os íons de magnésio.

A dissolução do sal de magnésio e mistura do componente alcalino nas etapas i) e ii) de processo de preferência acontecem com agitação a fim de atingir dissolução e homogeneização o mais rápido possível e então uma reação rápida. No entanto, não há quaisquer restrições adicionais particulares sobre as técnicas de mistura. Então, o processo pode ser realizado,
15 por exemplo, também através de outras técnicas de mistura familiares ao versado na técnica.

Para promover o processo, a etapa i) é de preferência realizada em uma temperatura de 60-80°C. O tempo de reação após adição do componente alcalino é geralmente de a partir de cerca de 1 a 15 minutos, em
20 média cerca de 10 minutos.

A etapa de remoção iv) de preferência acontece através de sedimentação ou filtragem. A sedimentação pode ser tornada mais rápida através de uma centrífuga, de preferência uma centrífuga de disco, em particular
25 uma centrífuga de deslodamento. No entanto, outras técnicas de separação familiares ao versado na técnica podem ser também usadas. Essas podem ser também realizadas em combinação umas com as outras, por exemplo, deslodamento centrífugo do extrato abrilhantado com filtragem subsequente do extrato deslodado, por exemplo, com um filtro de placa.

30 A etapa c) toda do processo da invenção pode se necessário ser também realizada mais de uma vez. Se a variante da etapa c) preferida previamente descrita com subetapas i) – iv) for usada, é também possível que as subetapas individuais i) – iv) sejam realizadas mais de uma vez.

Após a etapa c), inulina é um precipitado do extrato na etapa d). A precipitação pode ser realizada, por exemplo, adicionando álcoois tal como etanol, metanol ou isopropanol. Neste caso, dependendo da quantidade de álcool adicionada ou da polaridade ajustada da fase líquida, frações de inulina de peso molecular inicialmente alto são precipitadas, de modo que é possível influenciar, através da quantidade de álcool adicionada, quão quantitativamente a inulina presente no extrato é precipitada e quais frações de peso molecular são predominantemente obtidas. Além do álcool, é possível empregar outros líquidos orgânicos não-polares que sejam miscíveis com água.

Para este propósito, em uma modalidade particularmente vantajosa desta etapa de processo, para limitar o uso de álcool, especialmente etanol e isopropanol, o extrato preparado é inicialmente concentrado, de preferência para um quarto a um quinto de seu volume inicial. A concentração pode acontecer através de evaporação ou filtração em membrana e uma combinação de ambos processos. Deve-se tomar cuidado neste caso que o concentrado seja mantido quente durante a concentração, de preferência a 60-95°C, a fim de evitar precipitação da inulina. Uma vantagem de filtração de membrana é a depleção, associada com ela, em substâncias de peso molecular baixo acompanhando a inulina. A precipitação subsequente da inulina do concentrado pode ser controlada pela escolha de concentrações de álcool altas de modo que a inulina é fracionada de acordo com as faixas de tamanho molecular que são caracterizadas, por exemplo, pelo grau de peso médio de polimerização (DP_w). Dependendo da escolha das condições de precipitação, o resultado são frações que têm o DP_w de acordo com a invenção. Dependendo da pureza desejada.

É mais preferido obter inulina esfriando o extrato do que através de precipitação alcoólica. As condições preferidas são tais de modo que o extrato é esfriado para uma temperatura de 2-10°C, com mais preferência 2-8°C e mantido nesta temperatura durante um período de a partir de 6 a 140 horas, de preferência 6 a 48 horas, durante o qual a inulina precipita. A taxa de esfriamento e a temperatura e a duração do esfriamento influenciam a precipitação da inulina a partir do extrato e a largura da distribuição de peso

molecular e então ao mesmo tempo a quantidade. Escolha de um período mais longo e temperatura menor resulta em precipitação de inulinas de peso molecular mais baixo e uma distribuição de peso molecular mais ampla e então um peso molecular médio menor da fração precipitada. A inulina precipitada é separada da fase líquida através de técnicas de separação convencionais tal como, por exemplo, centrifugação, decantação, filtragem.

Em uma modalidade preferida, inulina é cristalizada pela primeira vez após a etapa de extração b) e antes da etapa c) do processo acima descrito. Tal cristalização é de preferência feita conforme descrito anteriormente. Cristalização antes da etapa c) leva a um aumento no rendimento de inulina de peso molecular alto comparado com abrillhantamento direto do extrato, e economiza o uso dos agentes de abrillhantamento, isto é, composto de magnésio e o componente alcalino. É vantajoso abrillhantar o extrato após a primeira cristalização da inulina como neste caso apenas os constituintes de coloração ligados aos cristais de inulina têm que ser removidos, o que leva a uma quantidade similarmente menor de inulina ligada ao sedimento de abrillhantamento.

Uma primeira precipitação e remoção da inulina precipitada pode ser seguida por esfriamento renovado do extrato ou adição de álcool a fim de obter quaisquer frações de inulina que estejam ainda dissolvidas. Uma decisão sobre repetição é feita de caso para caso de acordo com quão quantitativamente a inulina deve ser obtida das plantas e qual distribuição de peso molecular no produto final é desejada.

A concentração de inulina no extrato depende substancialmente do teor de inulina das raízes e da concentração das raízes moídas no extrato e é uma variável adicional que tem um efeito sobre a precipitação da inulina através de esfriamento do extrato. A dependência da precipitação sobre a concentração pode então ser utilizada a fim de concentrar a fase líquida após a primeira precipitação, por exemplo, através de evaporação, a fim de também precipitar as frações de peso molecular baixo se isto for desejado.

Na última etapa de processo e), a inulina precipitada é reprecipitada. "Reprecipitação" significa no contexto da presente invenção que a inulina sólida, resultante da etapa de processo anterior, é redissolvida e então

precipitada e/ou cristalizada da solução novamente. Então, a etapa e) do processo pode ser também expressa como: a inulina é dissolvida e precipitada e/ou cristalizada novamente, onde esta etapa é feita pelo menos uma vez. A cristalização difere da precipitação pelo fato de que estruturas predominantemente cristalinas são obtidas.

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

A precipitação na etapa e) pode acontecer através de precipitação alcoólica conforme previamente descrito. No entanto, a inulina é de preferência obtida esfriando a solução para 2-10°C, com mais preferência 2-8°C durante um período de 6 a 140 horas, de preferência 12-48 horas.

A precipitação da inulina dissolvida na etapa e) pode ser repetida a fim de obter a inulina ainda restante na fase líquida. Uma decisão sobre repetição deve ser feita de caso para caso de acordo com quão quantitativamente a inulina deve ser obtida das plantas e qual distribuição de peso molecular no produto final é desejada. A fase líquida pode ser concentrada a fim de simplificar a precipitação.

Após reprecipitação, o sólido de inulina resultante é separado da fase líquida através de técnicas de separação convencionais tal como, por exemplo, centrifugação, decantação, filtração.

A fim de influenciar a distribuição de massa molecular e pureza do produto de inulina resultante, a etapa de processo e) pode ser realizada mais de uma vez. Aconteceu que as médias do peso molecular e as médias do grau de polimerização são mudadas para valores mais altos quando da repetição da etapa de reprecipitação e). É então possível ajustar várias médias do peso molecular/grau de polimerização da inulina da invenção dentro da faixa reivindicada.

Se impurezas de partícula fina estiverem ainda presentes, é vantajoso inserir uma ou mais das etapas de filtração no processo. Quaisquer impurezas de partícula fina presentes são removidas na filtração. A finura do filtro é escolhida pelo versado na técnica dependendo do tamanho de partícula da impureza.

A(s) etapa(s) de filtração pode(m) ser inserida(s) em qualquer lugar no processo após obtenção do extrato. Uma etapa de filtração diretamente após obtenção do extrato na etapa b), por exemplo, é vantajosa. A etapa de filtração deve ser distinguida da remoção de materiais suspensos conforme descrito previamente, porque as partículas removidas pela filtração são mais finas do que os materiais suspensos, que consistem principalmente de fibras. Em uma modalidade preferida adicional, a etapa de filtração é realizada antes da etapa d).

A etapa de filtração é de preferência combinada com uma reprecipitação conforme descrito para a etapa e) do processo. Isto confere a inulina sendo dissolvida conforme previamente descrito para a etapa e), e a solução então sendo filtrada. Após a filtração, a inulina é precipitada ou cristalizada da solução filtrada. A inulina sólida resultante após a precipitação ou cristalização pode ser separada da fase líquida através de técnicas de separação convencionais, tal como, por exemplo, centrifugação, decantação e filtração.

Em alguns casos a inulina resultante pode ser descolorida por substâncias que não podem ser removidas através de filtração. Em tais casos, é preferido remover as impurezas de coloração através de um tratamento com carbono ativado. Em uma modalidade o carbono ativado é suspenso em água e adicionado a uma solução de inulina em uma temperatura de cerca de 80°C, de preferência acima de 90°C. No caso de uma solução de inulina de 20% em peso, a quantidade de carbono ativado está de preferência em uma faixa de 1-10% em peso, de preferência 2-6% em peso, com mais preferência 2-3% em peso, com base no peso da solução de inulina. Após adsorção das impurezas de coloração, o carbono ativado é removido através de centrifugação e/ou filtração. A suspensão de carbono ativado pode ser pré-clarificada através de separação centrífuga do sedimento de carbono ativado e então clarificada por filtração de dois estágios, por exemplo, com uma combinação de um filtro de diatomito de pré-revestimento e um filtro de folha. É importante que durante a separação do carbono ativado da solução de inulina a temperatura seja mantida acima de 80°C, de preferência acima de 90°C, a fim de manter a inulina em solução. Após remoção do carbono ati-

vo, a inulina pode ser precipitada ou cristalizada e separada da fase líquida conforme acima descrito.

Após separação da fase líquida, o produto final pode ser lavado novamente com água ou uma mistura de água/álcool. Lavagem com água
5 fria em uma temperatura de 2-10°C é preferida. Para este propósito, o precipitado de inulina é transformado em pasta fluida em água e a inulina é então sedimentada novamente.

A inulina resultante é de preferência seca em uma última etapa de processo, adicional. A secagem pode acontecer através de secagem por
10 congelamento, secagem por pulverização ou secagem por tambor.

Em uma modalidade preferida, a inulina da invenção está em forma seca por pulverização. Parâmetros de secagem por pulverização adequados são descritos nos exemplos apensos. É evidente que no caso de um
15 processo de secagem por pulverização uma inulina precipitada ou cristalizada deve ser trazida para suspensão (em água abaixo de 80°C) ou em solução (em água acima de 80°C) novamente. Alternativamente, uma última etapa de precipitação ou cristalização, conforme acima descrito, pode ser omitida e a inulina suspensa ou dissolvida do processo pode ser diretamente seca por pulverização. É possível adicionar inulinas secas com pulverização da
20 invenção a produtos alimentícios preparados líquidos para que a viscosidade seja aumentada particularmente eficazmente. Da adição de quantidades iguais de inulina da invenção, um aumento maior em viscosidade é conseguido com uma inulina seca com pulverização comparado com uma inulina seca de outro modo (por exemplo, secagem por congelamento).

25 Em ainda uma modalidade preferida adicional, a inulina da invenção está em uma forma granulada por pulverização. Inulina granulada por pulverização é obtida através de processos conhecidos, por exemplo, introduzindo um material previamente seco por pulverização como semente de granulação e secagem por pulverização de inulina adicional. Uma inulina
30 com um tamanho de partícula de 10-100 µm, por exemplo, pode servir como uma carga inicial. Condições de granulação por pulverização adequadas são, por exemplo, uma composição de alimentação de 70% de água e 30% de inulina e uma temperatura de alimentação de 90°C.

A inulina da invenção tem muito particularmente de preferência um diâmetro de partícula médio de 50-350 μm , com mais preferência 80-300 μm , com mais preferência ainda 100-250 μm e com mais preferência 100-200 μm . Tal inulina é então um aspecto adicional da presente invenção.

5 O diâmetro de partícula médio pode ser determinado ambos através de análise de peneira de uma amostra seca e através de espalhamento de luz. O método preferido é, no entanto, análise de peneira de modo que a inulina da invenção tem de preferência um diâmetro de partícula médio de 50-350 μm , com mais preferência 80-300 μm , com mais preferência
10 ainda 100-250 μm e com mais preferência 100-200 μm , determinado através de análise de peneira.

Em uma modalidade, a inulina da invenção tendo os tamanhos de partícula descritos é obtida através de processo de secagem por pulverização ou granulação por pulverização. Uma inulina seca por pulverização ou
15 granulada por pulverização tendo os tamanhos de partícula previamente descritos é então um aspecto adicional da presente invenção.

É possível ajustar o diâmetro de partícula médio preferido de uma inulina seca por meio de fracionamento por peneira no caso de, após secagem, ela estar ainda fora da faixa preferida. Seleção do tamanho de
20 peneira adequado se encontra dentro da competência do versado comum na técnica.

As partículas de inulina da invenção de preferência têm uma fração cristalina de menos do que 45%, com mais preferência menos do que 40%, com mais preferência ainda menos do que 35%. Em uma modalidade preferida adicional, menos do que 20%, com mais preferência ainda menos
25 do que 10%. Na modalidade mais preferida, o grau de cristalização é menos do que 1%. Os graus declarados de cristalinidade são determinados através do método de Ruland-Vonk (W. Ruland, *Acta Cryst.*, 14, 1180 (1961); C.G. Vonk, *J. Appl. Cryst.* 6, 148 (1973)). O método para determinação do grau de
30 cristalinidade é descrito em detalhes nos exemplos apensos. Um grau baixo de cristalinidade confere melhores propriedades de dissolução à inulina, o que é vantajoso em certas aplicações de gêneros alimentícios.

Em um aspecto adicional, a invenção também se refere a com-

posições que compreendem a inulina previamente descrita da invenção e um ou mais ingredientes comestíveis ou farmacologicamente aceitáveis. Composições típicas incluem gêneros alimentícios para humanos e animais, bebidas, gêneros alimentícios funcionais, medicamentos e composições farmacêuticas (incluindo composições profiláticas e composições terapêuticas) e seus intermediários.

Um gênero alimentício funcional significa no contexto da presente invenção um gênero alimentício que além de nutrientes tradicionais compreende um ingrediente que podem ter um efeito de promoção de saúde (definição do Institute of Medicine of the National Academy of Sciences, USA, 1994).

Os ditos ingredientes comestíveis ou farmacologicamente aceitáveis são de preferência selecionados do grupo consistindo em açúcares (por exemplo, glicose, frutose, sucrose, lactose, galactose, maltose, isomaltose, povidexose), polióis (por exemplo, sorbitol, lactitol, maltitol, isomalte, manitol, xilitol), maltodextrinas, adoçantes, xaropes de glicose hidrogenada, adições a alimentos humanos e animais, intermediários para alimentos humanos e animais, produtos alimentícios humanos e animais, líquidos comestíveis, bebidas, fontes disponíveis de animais, veículos farmacologicamente aceitáveis, substâncias farmacologicamente e terapêuticamente ativas, composições farmacêuticas e medicamentos.

Uma composição particularmente preferida da presente invenção inclui a inulina da invenção na presença de uma fonte de minerais bio-disponível, comestível ou farmacologicamente aceitável, especialmente uma fonte de cálcio e/ou magnésio e/ou ferro, tal como, por exemplo, produto lácteos e sais e complexos de cálcio, magnésio e ferro.

Conforme acima explicado, o objetivo da presente invenção era prover uma inulina com propriedades particularmente vantajosas para uso em gêneros alimentícios, com os termos produto alimentício e gêneros alimentícios sendo equivalentes de acordo com a invenção. Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se então também a gêneros alimentícios e suplementos de dieta que compreendem a inulina previamente descrita. Os termos gêneros alimentícios incluem de acordo com a presente inven-

ção ambos gêneros alimentícios para humanos e gêneros alimentícios para animal ou alimento para animal. Os suplementos de dieta incluem suplementos de dieta para humanos e para animais.

Um gênero alimentício particularmente preferido é selecionado de produtos de laticínio, iogurtes, sorvetes, sorvetes à base de leite, guarnições à base de leite, pudins, *milkshakes*, creme de ovos, queijo, barras de cereais, barras de energia, barras de café da manhã, doce, produtos de padaria, *crackers*, bolachas, biscoitos, cereais, lanches, chá gelado, sorvete feito de suco de fruta, bebidas *diet*, bebidas acabadas, bebidas esportivas, bebidas de estamina, misturas de bebida energética para suplementação dietética, alimento para criança e bebê, suco de laranja suplementado com cálcio, pão, *croissants*, cereais para café da manhã, talharins, geléias, biscoitos e chocolates sem açúcar, comprimidos mastigável de cálcio, produtos de carne, maionese, molhos para salada, manteiga de noz, refeições congeladas, molhos, sopas e refeições prontas para servir. O gênero alimentício compreendendo a inulina da invenção é com mais preferência um produto laticínio, especialmente um iogurte. A inulina da invenção mostra um efeito particularmente bom sobre a estabilidade, a textura, o corpo e a sensação na boca de produtos laticínios, especialmente iogurte, possibilidades sendo iogurte ou bebidas de iogurte agitadas ou fermentadas no pote.

Outros produtos laticínios úteis de acordo com a presente invenção são creme, creme fresco, coalhada, manteiga, leite, especialmente leite desnatado, soro de leite, leite azedo, bebida láctea ácida, queijo, tal como queijo cremoso, queijo mole, queijo fatiado, queijo duro, soro, leite em pó, bebidas à base de leite.

Um nível preferido de inulina em gêneros alimentícios, especialmente em iogurte, é 0,2-5% em peso, de preferência 0,5-4,5% em peso de inulina seca, com base no peso total de todos os componentes do gênero alimentício, laticínio ou iogurte.

Em uma modalidade da invenção, o gênero alimentício é um gênero alimentício fabricado através de um processo de extrusão, tal como, por exemplo, um cereal de café da manhã.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a pre-

preparações cosméticas que compreendem a inulina previamente descrita. A preparação cosmética particularmente de preferência toma a forma de cremes, em particular cremes para a pele e face.

5 Em um aspecto adicional, a presente invenção também se refere ao uso da inulina previamente descrita como adição em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais e preparações cosméticas. O uso também se refere em particular a todos os gêneros alimentícios específicos e preparações cosméticas conforme acima mencionado.

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

A inulina da invenção pode vantajosamente ser usada em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais, composições farmacêuticas ou medicamentos que servem para modificar ou regular a composição da flora bacteriana no intestino grosso, especialmente na região distal do intestino grosso, de humanos, mamíferos e outros vertebrados.

20 É da mesma maneira possível usar a inulina da invenção em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais, composições farmacêuticas ou em medicamentos que servem para modificar ou regular o padrão de fermentação de inulina no intestino grosso, especialmente na região distal do intestino grosso, de humanos, mamíferos e outros vertebrados.

Um uso preferido adicional da inulina da invenção é o uso como substituto de gordura ou óleo e/ou como uma fibra de dieta em gêneros alimentícios, onde o termo "gênero alimentício" compreende pelo menos todos os gêneros alimentícios acima mencionados, especialmente todos os produtos laticínios acima mencionados. É vantajoso que as propriedades sensoriais, especialmente a sensação na boca, sejam excelentes comparado com inulinas convencionais. Então, inulina da presente invenção pode ser também usada como um aumentador de propriedades sensoriais, especialmente como um aumentador de sensação na boca, em gêneros alimentícios.

30 Um uso adicional de inulina da invenção é o uso como um agente texturizante, agente de aumento de estabilidade, agentes de formação de viscosidade, especialmente em gêneros alimentícios e cosméticos. O termo

"gênero alimentício" compreende pelo menos todos os gêneros alimentícios acima mencionados, especialmente todos os produtos laticínio acima mencionados.

Finalmente, a inulina da invenção pode ser usada em gêneros alimentícios, gêneros alimentícios funcionais, composições farmacêuticas ou em medicamentos que têm os efeitos vantajosos que seguem: efeitos de material áspero, regulação de função intestinal, efeito prebiótico e/ou bifidogenicidade, absorção de minerais aumentada, por exemplo, de cálcio, magnésio e ferro, aumento em densidade mineral óssea, aumento no teor de mineral do osso, aumento na massa óssea máxima, melhora em estrutura óssea, redução na perda de densidade mineral óssea, redução na perda de estrutura óssea, regulação de metabolismo de lipídeo, estimulação do sistema imune, prevenção de câncer e redução do risco de câncer, prevenção de câncer do intestino grosso e redução do risco de câncer do intestino grosso e prevenção de câncer de mama.

A invenção é explicada abaixo por meio de exemplos que não pretendem restringir o conceito inventivo geral.

Exemplos

Métodos Gerais

20 1. Determinação de Frutano

1.1 Determinação de frutano através de hidrólise com exoinulinase

As soluções de inulina a serem medidas são preparadas pesando 50,0 +/- 5,0 mg de inulina precisamente em um frasco graduado de 1 ml. 700 µl de H₂O dd são adicionados para dissolver. A amostra é então agitada a fim de separar o material de amostra bem como possível da base do recipiente, e é então posta em um banho de água quase fervente (~99°C) por 8 minutos. Durante a incubação, o frasco graduado é agitado a cada 30 segundos. Após a incubação, a amostra é deixada esfriar para temperatura ambiente e é então levada até a marca de 1 ml com H₂O dd. A solução de amostra tem uma concentração de inulina de 5,0 +/- 0,5%.

Para determinação de açúcar antes da digestão, 200 µl são removidos e congelados a -20°C. Antes da medição de açúcar, esta amostra é descongelada em temperatura ambiente, misturada, dissolvida agitando a

140 rpm em um bloco de aquecimento a 95°C por 5 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 2 minutos. Para a hidrólise, 50 µl de solução de inulina de aproximadamente 5% de resistência são postos na mistura de digestão consistindo em 50 µl de citrato de Na a 1M pH 4,6, 25 µl de exoinulinase (Megazyme International Ireland, Ltd. Wicklow, Ireland, artigo No. E-EXO1, 2,5 U/µl) e 375 µl de H₂O dd. A digestão é misturada e centrifugada a 4000 rpm por 1 minuto. A digestão é então incubada em um bloco de aquecimento a 40°C por 4 horas. Todas as amostras digeridas são congeladas a -20°C. Antes da medição de açúcar, essas amostras são descongeladas em temperatura ambiente, misturadas e centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos. Para a medição de frutose, uma diluição 1:10 é preparada adicionando 10 µl de digestão a 90 µl de H₂O dd.

Para determinar a frutose e a glicose liberadas na digestão, uma medição fotométrica de glicose e frutose é realizada em todas as amostras conforme descrito sob "determinação de açúcar (glicose, frutose, sucrose)". Além de glicose e frutose, também sucrose é determinada na amostra antes da digestão.

A solução de inulina de resistência a 5% não-diluída é usada para medição de açúcar antes da 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 de frutose nas amostras digeridas, 10 µl de amostras diluídas 1:10 são adicionados a 200 µl de tampão de medição.

O cálculo é baseado, como na determinação de açúcar, em um coeficiente de extinção molar de 6,23 l*mmol⁻¹*cm⁻¹ para a conversão de NADP em NADPH. A concentração de glicose e frutose presentes antes da digestão é subtraída das concentrações de glicose e frutose nas amostras digeridas. Da mesma maneira, a glicose e a frutose que seriam liberadas da sucrose hidrolisada presentes na amostra antes da digestão são subtraídas.

As concentrações de frutose e glicose formadas durante a digestão de inulina são então obtidas. O teor de frutano é obtido através da adição dos teores de glicose e frutose e com inclusão do fator 162/180 para conversão das hexoses livres medidas nas hexoses ligadas no frutano.

2. Determinação de açúcar (glicose, frutose e sucrose)

Os teores de glicose, frutose e sucrose foram determinados através de fotometria em um ensaio enzimático através de conversão de NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) em NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida). O caráter aromático do anel nicotinamida é perdido na redução, e então o espectro de absorção é mudado. Esta mudança no espectro de absorção pode ser detectada através de fotometria.

Glicose e frutose são convertidas por meio da enzima hexocinase e adenosina trifosfato (ATP) em glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato é então oxidada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase em 6-fosfogluconato. NADP⁺ é reduzido em NADPH nesta reação, e a quantidade de NADPH formada é medida através de fotometria. A razão de NADPH formado para a glicose presente no extrato é 1:1, de modo que o teor de glicose pode ser calculado do teor de NADPH usando o coeficiente de extinção molar de NADPH ($6,23 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acordo com a lei de Lambert-Beer.

Após a oxidação da glicose 6-fosfato estar completa, a frutose 6-fosfato que é da mesma maneira produzida na solução é convertida pela enzima fosfoglucoisomerase em glicose 6-fosfato, que por sua vez é oxidada em 6-fosfogluconato. A razão de frutose e a quantidade de NADPH formada é também 1:1. O teor de frutose é calculado a partir da quantidade de NADPH formado, conforme descrito para glicose.

Subsequentemente, a sucrose presente no extrato é clivada pela enzima sucrase (da Megazyme) em glicose e frutose. As moléculas de glicose e frutose liberadas são então convertidas pelas enzimas acima mencionadas na reação dependente de NADP⁺ em 6-fosfogluconato. Duas moléculas de NADPH são formadas na conversão de uma molécula de sucrose em 6-fosfogluconato. A quantidade de NADPH formado é da mesma maneira medida através de fotometria, e o teor de sucrose é calculado a partir dela usando o coeficiente de extinção molar de NADPH.

Uma solução de inulina de 5% de resistência conforme descrito sob "Determinação de frutano através de 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 acontece como determinação duplicata em placas de microtitulação usando os fotômetros SPECTRAMax (Molecular Devices). Todas as soluções de enzima usadas são feitas em tampão de medição consistindo em HCl de imidazol a 50 mM pH 6,9, MgCl₂ a 2,5 mM, 5 ATP a 1 mM e NADP a 0,4 mM. A conversão de NADP em NADPH é seguida em um comprimento de onda de 340 nm.

A determinação de glicose acontece adicionando 2 µl de mistura de hexocinase (de levedura, 0,3 U/µl) e glicose-6-fosfato desidrogenase (de levedura, 0,14 U/µl). Após conversão da glicose estar completa, 2 µl de fosfoglicose isomerase (de levedura, 0,14 U/µl) são adicionados para determi- 10 nar frutose. Quando a frutose está completamente convertida, 2 µl de sucra- se (da Megazyme, 0,2 U/µl) são adicionados para clivar a sucrose presente. O cálculo de glicose, frutose e sucrose acontece conforme descrito.

3. Análise da distribuição de peso molecular

15 3.1 Cromatografia de permeação em gel com espalhamento de luz e detec- ção de índice refrativo (sistema GPC-RI-MALLS)

As inulinas/frutanos são dissolvidos em água extrapura em uma concentração de 1% (p/v). Entre 5 e 10 mg são pesados em 2 ml de recipi- entes Eppendorf. As soluções são aquecidas a 95°C em um agitador térmico 20 (Eppendorf) a 300 rpm por 10 minutos. Após esfriar para temperatura ambi- ente, soluções a 0,5% (p/v) são preparadas através de diluição 1:2 com á- gua extrapura. Filtragem acontece através de filtros centrífugos de 0,22 µm (Spin-x, Costar) a 4000 rpm por 2 minutos. Os polímeros são analisados u- sando um Dionex System (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA) consistindo 25 nos componentes que seguem: Bomba de HPLC P680, Autoamostrador AS50, compartimento de coluna termoajustada TCC-100. Um detector de espalhamento de luz DAWN-EOS (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA) com $\lambda_0 = 690$ nm e 15 detectores na faixa de ângulos de 25,9 a 163,3° e fluxo de célula K5 acoplado a um detector Shodex RI-101 (Shodex Denko, 30 K.K., Kanagawa, Japão) é usado para a detecção. Os polímeros são fracio- nados em uma pré-coluna e três colunas (Suprema 30, Suprema Lux 1000, Suprema 30000) (Suprema-Gel, PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemanha). 90 µl de solução são injetados. O fracionamento aconte-

ce em uma temperatura de 30°C e uma taxa de fluxo de 0,8 ml/minuto com NaNO₃ a 0,05M como eluente. O programa Astra V 5.1.8.0 (da Wyatt Technology, Santa Barbara, USA) é usado para analisar a distribuição de peso molecular das amostras.

5 3.2 Cromatografia de permeação em gel com detecção de índice refrativo (sistema GPC-RI)

As inulinas são dissolvidas no eluente (DMSO+NaNO₃ a 90 mM) em uma concentração de 1% (p/v) agitando suavemente em um agitador térmico a 95°C por 10 minutos. Após breve resfriamento, a solução de inulina é diluída para 0,1% com eluente (100 µl de solução de inulina + 900 µl de eluente) e imediatamente posta em um autoamostrador a 60°C. Os polímeros são analisados usando o aparelho que segue: Bomba Dionex P580, autoamostrador 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). Os polímeros são fracionados em um PSS GRAM, 10 µ, pré-coluna e a PSS GRAM 3000, 10 µ e PSS GRAM 100, colunas de separação de 10 µ (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemanha). 50 µl da solução de inulina a 0,1% são injetados para a análise.

20 O fracionamento acontece no forno de coluna em uma temperatura de 60°C e com uma taxa de fluxo de 0,7 ml/min com o eluente DMSO+NaNO₃ a 90 mM. Para determinar as massas moleculares, o sistema é calibrado com os padrões dextrano que seguem (No. do produto 31430, Fluka Riedel-deHaen, Seelze, Alemanha): dextrano T1 (M_w 1270), T5 (M_w 5220), T12 (M_w 11600),

25 T25 (M_w 23.800), T50 (M_w 48.600), T80 (M_w 80.900), T150 (M_w 147.600), T270 (M_w 273.000), T410 (M_w 409.800), T670 (667.800). O programa V.6.20 compacto PSS-WinGPC (PSS, Mainz, Alemanha) é usado para analisar a distribuição de peso molecular das amostras.

4. Determinação do teor de água

30 O teor de água é determinado usando um titulador AQUA 40.00 Karl-Fischer (da analytikjena AG). Hydranal-Coulomat AG (Riedel-deHäen, artigo No. 34 863) é usado como anólito. A substância de referência usada é diidrato de tartrato de sódio dibásico (Riedel-deHäen, artigo No. 32 323) com

um teor de umidade de 15,61-15,71%. 10-20 mg de amostra são pesados em garrafas de amostra de 5 ml (N20-5DIN, Machery-Nagel, artigo No. 702 04.36), as garrafas são fechadas com *crimped caps* (N20 TS/ao, Machery-Nagel, artigo No. 702 815) e o teor de água da amostra é determinado usando o titulador Karl-Fischer.

5. Determinação do grau de ramificação

As inulinas são inicialmente permetiladas e o término da metilação é checado através de espectroscopia ATR-IR (vide abaixo quanto a aparelho e condições). As amostras foram então decompostas por hidrólise ácida (análise de metilação padrão) ou alternativamente através de degradação redutiva em seus blocos de formação de monômero, e a composição molar relativa foi determinada através de cromatografia de gás (vide abaixo quanto a aparelho e condições) e espectroscopia de massa por cromatografia de gás (GC-MS, vide abaixo quanto a aparelho e condições) dos alditol acetatos parcialmente metilados e anidroalditol acetatos.

ATR-IR

Aparelho: Bruker Tensor 27

Técnica: Diamond ATR

GC:

20 Aparelho: Carlo Erba HRGC 5160 Mega Series

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

DI: 0,25 mm FD: 0,25 µm

Gás veículo: He (80 kPa)

25 Detector: FID

Injetor: na coluna

Integrador: Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrator

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

30 GC-MS

GC: Aparelho: Agilent 6890 GC

Coluna: HP-5, 30 m

Gás veículo: He

Injetor: Split 5:1
Prog. de Temp.: 60°C (1 min isotérmico), 10°C/min a 170°C, 3°C/min a 230°C, 20°C/min a 290°C (20 min isotérmico)
MS: Aparelho: espectrômetro de campo de setor de foco duplo JEOL
5 GCmate
Modo: EI, 70 eV
Avaliação: AMDIS32, Wsearch32

5.1 Permetilação

(de acordo com Ciucanu e Kerek/Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984)

10 "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates", *Carbohydr. Res.* 131, 209-217).

Cerca de 50 mg de amostra são dissolvidos em 2,5 ml de sulfóxido de dimetila. Então 3 eq/OH de hidróxido de sódio finamente moído e 3 eq/OH de iodeto de metila são adicionados e agitados em temperatura ambiente por 24 horas. Então metade da quantidade de cada um dos reagentes é adicionada novamente. As amostras são subsequentemente dialisadas contra água destilada por quatro dias (Dialysemembran Spectra/Por MWCO 3500, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) e secas com congelamento. O término da metilação é checado através de espectroscopia de ATR-IR. A vibração de estiramento de OH na faixa de 3300-3400 cm^{-1} deve ter desaparecido se houver permetilação.

5.2 Análise de metilação padrão

Hidrólise

25 Cerca de 2 mg de inulina permetilada são misturados em um frasco V de 1 ml com 0,9 ml de ácido trifluoracético a 0,5M e hidrolisados através de agitação a 90°C por uma hora. Após a solução ter esfriado ela é evaporada até secar em uma corrente de nitrogênio. Resíduos de ácido trifluoracético são removidos através de codestilação com tolueno.

Redução

30 A amostra hidrolisada é misturada com 500 μl de uma solução de NaBD₄ a 0,5 M em NH₃ a 2M e aquecida a 60°C por uma hora. Após esfriar, boroidreto de sódio em excesso é decomposto através da adição de algumas gotas de ácido acético glacial. Borato resultante é removido através

de co-destilação com ácido acético metanólico a 15% de resistência.

Acetilação

Os álcoois de açúcar parcialmente metilados resultantes da redução são misturados com 200 µl de anidrido acético e 50 µl de piridina e acetilados a 90° C por 2 horas. A solução é esfriada e então solução de bicarbonato de sódio saturada é adicionada até que nenhuma formação de gás adicional seja observada. Ela é então extraída quatro vezes com 15 ml de diclorometano cada vez. As fases orgânicas combinadas são lavadas duas vezes com 15 ml de solução de NaHCO₃ saturada cada vez, uma vez com 20 ml de HCl a 0,1M frio e uma vez com 25 ml de água destilada. A solução é então seca em cloreto de cálcio e concentrada a vácuo, e absorvida em diclorometano para a medição de GC.

5.3 Degradação redutiva

Cerca de 1 mg da amostra permetilada é dissolvido em 500 µl de diclorometano em um frasco de vidro de tampa de atarraxar, misturado com 6 eq/glicosídeo ligado em trietilsilano e 4 eq de triflato de TMS e agitado em temperatura ambiente por 2 horas. Após adição de 20 µl de anidrido acético, agitação é continuada em temperatura ambiente por 2 horas. A reação é então parada através da adição de solução de NaHCO₃ aquosa saturada e agitação é continuada por 1 hora. Processamento acontece através de extração com diclorometano e subsequente lavagem das fases orgânicas combinadas com solução de NaHCO₃ aquosa saturada e água destilada. A solução é finalmente seca em cloreto de cálcio, concentrada em uma corrente de nitrogênio e absorvida em diclorometano para a medição de GC.

5.4 Análise qualitativa e quantitativa

Os produtos de degradação foram analisados quantitativamente através de cromatografia de gás com injeção em coluna e detector de ionização de chama (FID). As áreas de pico foram corrigidas de acordo com sua resposta de carbono eficaz. Os picos foram designados com base em seu espectro de massa (GC-MS) e os tempos de retenção de amostras de comparação conhecidas.

6. Calorimetria de varredura diferencial de inulina

40 ml de uma solução de inulina de 15% de resistência (p/v) fo-

ram preparados em 50 ml de tubos de polipropileno graduados (30,0 x 115 mm, da Greiner, número de ordem 227261). Isto foi feito adicionando o respectivo pó à água duplamente destilada e agitação. Subsequentemente, todas as suspensões preparadas são postas em um banho de água (95°C) e dissolvidas agitando várias vezes. Após 20 minutos, é estabelecido visualmente que todas as suspensões foram completamente dissolvidas. As soluções preparadas são então divididas em partes iguais para dois tubos de polipropileno graduados de 50 ml (30,0 x 115 mm, da Greiner, número de ordem 227261) e imediatamente congeladas profundamente em nitrogênio líquido. As soluções congeladas foram então secas por congelamento por dois dias (teor de água de cerca de 10%) e moídas em um pilão. O teor de água das amostras é determinado usando um titulador Karl-Fischer automático (vide métodos gerais 4 abaixo).

Para uma medição de DSC, cerca de 10 mg de substância seca de inulina são pesados em um cadinho de aço inoxidável (volume de 50 µl), o peso exato é encontrado, e 30 µl de água destilada são adicionados. Os cadinhos são então hermeticamente vedados. Um cadinho de aço inoxidável vazio é usado como referência. A amostra é aquecida em um aparelho de DSC com autoamostrador (Perkin Elmer; Diamond) de 10-160°C em uma taxa de aquecimento de 10°C/min. A análise de dados é realizada pelo programa *software* PYRIS 7.0 (Perkin Elmer, 63110 Rodgau-Jugesheim, Alemanha). Isto conferiu determinação de T_o (início) e a entalpia livre dH.

7. Determinação de viscosidade

Soluções de inulina aquosa de várias concentrações (peso por volume de água destilada) foram preparadas agitando a 98°C, e as soluções claras foram medidas imediatamente após um tempo de dissolução não excedendo 13 minutos. As medições foram realizadas em um BOHLIN Gemini Advanced Rheometer (Malvern Instruments; Herrenberg, Alemanha) usando o modo de viscosimetria isotérmica (90°C) em uma sistema de cone-placa CP4^o/40 mm. A lacuna de medição foi coberta com uma camada de óleo de parafina extraleve. Uma taxa de cisalhamento de 10 s⁻¹ por 60 s com um tempo de relaxamento de 10 s foi usada para pré-cisalhamento. O cisalhamento foi medido em etapas logarítmicas em um modo de taxa de cisalha-

mento. A taxa de cisalhamento inicial era 20 s^{-1} , a taxa de cisalhamento final era 30 s^{-1} em um aumento com um tempo de detenção de 20 s e um tempo de integração de 10 s. Os dados são baseados nos valores médios na faixa de a partir de 20 s^{-1} a 30 s^{-1} e são as médias de três medições independentes por ponto de dados. Todas as medições especificadas como discrepantes não são incluídas nos valores médios. A definição de "discrepante" acontece pelo chamado "método quartile". Essas discrepâncias conferidas sendo especificadas como todas as medições que estão fora do critério de faixa $Q_2 - k^*(Q_3 - Q_1) \leq$ nenhuma discrepância $\leq Q_2 - k^*(Q_3 - Q_1)$ (SACHS, Lothar: *Angewandte Statistik*, 10ª edição, Springer-Verlag Berlin (2002), pp. 364 et seq.). Q_1 e Q_3 aqui são o 1º quartil e o 3º quartil, respectivamente, e Q_2 é a média (50% quartile) dos dados medidos. Um valor de 1,5 foi usado para o fator k.

8. Determinação de resistência de gel e comportamento viscoelástico

70 g de uma suspensão a 17% em peso de inulina em água (destilada) foram postos em um copo de medição MV de um viscosímetro Haake Rotovisco VT 550. Um agitador de pá foi então inserido e montado no aparelho preaquecido (90°C , revestimento de aquecimento). A mistura foi então aquecida com agitação a 128 rpm por 15 minutos.

Após 15 minutos, a mistura foi transferida a 90°C para um recipiente que consistia em uma base e uma parede composta de dois anéis cilíndricos de folha acrílica (cada uma de 20 mm de altura, 30 mm de diâmetro) que foram postos um em cima do outro e foram unidos por meio de uma fita adesiva (19 mm de largura). A mistura foi introduzida no recipiente sem bolhas até que o nível fosse cerca de 5 mm abaixo da borda superior. O recipiente foi então hermeticamente coberto com uma folha de alumínio e deixado descansar em temperatura ambiente (23°C) da noite para o dia.

A resistência do gel foi medida após armazenamento em temperatura ambiente (23°C) por cerca de 20 horas usando um analisador de textura TA XT2. Para tornar a medição da resistência de gel possível em uma superfície não-seca, lisa, primeiro a fita adesiva que mantida dos dois anéis cilíndricos do recipiente juntos foi removida. O gel foi então dividido com uma lâmina de barbear entre os dois anéis de modo que a parte inferior do gel exibiu uma superfície lisa.

A resistência do gel foi medida com um analisador de textura TA XT2 por um uma cúpula de nível (diâmetro 24,5 mm) penetrando (1 mm) no gel. Os ajustes no analisador de textura foram como segue:

Princípio de medição: força em direção de pressão

5 Velocidade para a frente: 2 mm/s

Velocidade de teste: 2 mm/s

Valor de disparada: 0,01 N

Velocidade reversa: 2 mm/s

Movimento: 1 mm

10 O valor máximo com uma penetração única da cúpula em newtons é indicado.

Exemplo 1

Caracterização da inulina a partir de raízes de alcachofra

1. Cultivo das plantas de alcachofra

15 As plantas de alcachofra da variedade Madrigal foram cultivadas na vizinhança de Valência, Espanha. As sementes foram semeadas em abril de 2005 e as plantas foram colhidas em agosto/setembro 2005. As raízes foram separadas da parte acima do solo, tiveram solo aderente retirado e secas. As raízes foram então transportadas sem esfriamento da Espanha
20 para a Alemanha. As raízes foram armazenadas a -20°C até que inulina fosse extraída.

2. Preparação de inulina a partir de raízes de alcachofra

Raízes de plantas de alcachofra da variedade Madrigal de cerca de 4-5 meses de vida são usadas para preparar a inulina, 60 kg de raízes
25 têm os constituintes do solo aderidos a elas retirados através de lavagem no estado de congelamento profundo com um limpador de alta pressão (Kärcher 240) antes delas serem processadas mais em lascas em um picador (picador de jardim Gloria Universal natura 2800L). As lascas são postas
em um extrator aquecido encamisado com agitador "gate" contendo água
30 preaquecida para 80-90°C. A quantidade total de água adicionada é 180 kg. O pH do extrato é ajustado para 9,0 através da adição de NaOH. Após aquecimento rápido da malha de lasca de 40°C a 80-85°C através do revestimento do extrator, a malha é agitada a 80-85°C por cerca de 60 minutos a

fim de extrair a inulina das lascas (frutano). Após este tempo, o extrato bruto é separado das lascas através de bombeamento.

O extrato bruto é descolorido em um processo de dois estágios através de formação de um total de 0,7 g de $Mg(OH)_2/100$ ml de extrato. No primeiro estágio, 3400 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (equivalente a 0,5 g de $Mg(OH)_2/100$ de extrato) são dissolvidos em 170 L de extrato colorido marrom-escuro com agitação durante o curso de 10 minutos. Subsequentemente, 1015 g de $Ca(OH)_2$ de resistência a 96% são adicionados como suspensão em 3 L de água e agitados por 10 minutos. Um pH de 9,4 é ajustado. A mistura de precipitação toda é quantitativamente clarificada em um separador de placa (tipo GEA Westfalia SC-606-076) durante o curso de 120 minutos. A solução de extração descolorida tem uma cor amarelo-pálida e é livre de materiais que causam turbidez. Uma fase sólida na forma de uma pasta espessa é obtida como fração de sedimento removido. Toda a etapa de descoloração é repetida na solução de extração obtida desta maneira e compreendendo 150 L com $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (equivalente a 0,2 g de $Mg(OH)_2/100$ ml de extrato) de 410 g de $Ca(OH)_2$ de resistência de 96% como suspensão em 1,5L de água. Toda a mistura de precipitação é quantitativamente clarificada em um separador de placa durante o curso de 30 minutos. A solução de extração descolorida com um pH de 9,4 é clara, tem uma cor amarelo pálido e é livre de materiais que causam turbidez. Um centrifugado na forma de uma pasta espessa é novamente obtido como fração de sedimento.

Inulina sólida é obtida do extrato abrilhantado deste modo através de esfriamento em uma temperatura de 4°C durante um período de 48 horas. A inulina é obtida como um sedimento tipo lodo através de deposição centrífuga usando o separador de placa.

O sedimento é purificado mais duas vezes em sucessão na mesma concentração conforme apresentado no extrato abrilhantado através de dissolução da inulina em água quente e precipitação renovada através de armazenamento a 2°C por 48 horas. O sedimento de inulina finalmente obtido é novamente completamente dissolvido na mesma concentração conforme previamente usado em água com entrada de calor. A solução quente é então filtrada através de um filtro de placa com camadas de filtro. A inulina é

subsequentemente precipitada através de esfriamento da solução (2°C, 48 h) e o produto final é seco com congelamento.

A Figura 1 mostra uma representação diagramática do progresso da extração.

5 Durante o processo de extração, a distribuição de polímero foi analisada após as etapas de extração e purificação individuais através de cromatografia de permeação em gel com detecção de índice refrator e calibragem com padrões dextrano (GPC-RI, vide Método 3.2 em "Métodos Gerais"). Como evidente a partir da Figura 2, a distribuição de polímero de ex-
10 trato (B) após a extração com água quente é comparável com aquela nas raízes lavadas (A). A Figura 2 mostra uma análise GPC-RI da distribuição de polímero nas raízes de alcachofra lavadas (A) e o extrato após a extração com água quente de inulina (B).

Análise da distribuição de polímero após o fracionamento a frio
15 (4°C) da inulina mostrou que uma fração de inulina de peso molecular alto (C) foi separada de uma fração de peso molecular baixo (D) (Figura 3). A Figura 3 mostra uma análise GPC-RI da distribuição de polímero no extrato após a extração com água quente de inulina (B), no sedimento após a precipitação de inulina a 4°C (C) e na série superior obtida após centrifugação da
20 inulina após precipitação (D).

Um enriquecimento adicional de inulina de alto peso molecular e uma depleção de substâncias de baixo peso molecular, especialmente mono- e dissacarídeos, foram conseguidos através de reprecipitação da fração de inulina de alto peso molecular (Figura 4). A Figura 4 mostra uma análise
25 GPC-RI da distribuição de polímero na inulina precipitada a 4°C (C), na sedimentação após a primeira reprecipitação (F) e na fase clara I após a primeira reprecipitação (E).

Inulina com um grau menor de polimerização permaneceu na fase clara da mesma maneira após a precipitação renovada de inulina após a
30 filtragem em água quente (Figura 5). A Figura 5 mostra uma análise GPC-RI da distribuição de polímero na solução de inulina após filtragem (G), a inulina sedimentada após a cristalização (K) e a fase clara III após a cristalização (H).

3. Determinação da pureza da inulina preparada

A pureza da inulina de alcachofra obtida na seção 2 foi determinada através da determinação dos teores de frutano e água do material seco com congelamento. O teor de água determinado para a inulina de alcachofra foi 2,9% (vide método "Determinação do teor de água"). O teor de frutano foi determinado através de hidrólise da inulina com a enzima exoinulinase (vide método "Determinação de frutano através de hidrólise com exoinulinase"). A pureza baseada em matéria seca (DM) foi encontrada a partir do teor de frutano e o teor de água. Pureza = teor de frutano x 100 / (100 – teor de água).

Como é evidente a partir da Tabela 1, o grau médio de pureza da inulina de alcachofra preparada é 96% da matéria seca (DM).

Material	Teor de água [%]	Digestão de exo-inulinase	
		Frutano [% de peso inicial]	Pureza [% de TM]
Inulina de alcachofra	2,9	93% ± 7%	96%

Tabela 1: Determinação da pureza da inulina de alcachofra preparada

4. Determinação de peso molecular através de GPC-RI-MALLS

Soluções aquosas a 0,5% (p/v) foram preparadas a partir da inulina de alcachofra purificada obtida na seção 2, e das amostras de referência compradas da Raftline HP (da Orafiti, batelada: HPBNH4DNH4) e inulina de tubérculos dahlia (da Sigma, número do artigo I-3754, batelada: 75H7065) e a distribuição da massa molecular das inulinas foi determinada através de cromatografia de permeação em gel (vide método 3.1). Esta distribuição é mostrada na Figura 5, e as massas moleculares (anidrofrutose = 162 g/mol) e comprimentos de cadeia médios calculados a partir delas foram sumarizados na Tabela 2.

Análise da distribuição de peso molecular usando o sistema GPC-RI-MALLS resultou em uma massa molecular ponderal média M_w de 13.995 g/mol e uma massa molecular numérica média M_n de 11.620 g/mol para a inulina de alcachofra. Isto corresponde a um comprimento de cadeia médio de 86 para DP_w e de 72 para DP_n . Os comprimentos de cadeia da inulina de alcachofra purificada são em média distintamente mais longos do que aqueles de Raftline HP ($DP_w=36$, $DP_n=29$) e de inulina de dahlia

($DP_w=41$, $DP_n=33$). Isto é também refletido nas massas moleculares mínimas e máximas, que são distintamente maiores para inulina de alcachofra.

Material	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	Distribuição de polímero (min-max) [g/mol]	DP_w	DP_n	Dispersidade molecular
Inulina de alcachofra	13.995	11.620	1.377-33.099	86	72	1,19
Raftiline HP	5.823	4.759	999-15.162	36	29	1,24
Inulina de Dahlia	6.678	5.358	1.139-19.569	41	33	1,24

Tabela 2: Distribuição de massa molecular de várias inulinas

5. Resultados de determinação de glicose, frutose e sucrose

5 A proporção de glicose, frutose e sucrose na inulina de alcachofra obtida na seção 2 foi determinada através de determinação fotométrica dos açúcares em soluções de inulina de 5% de resistência conforme descrito no Método 3 ("Determinação de açúcar").

10 Como é evidente a partir da Tabela 4, os teores de glicose, frutose e sucrose na inulina de alcachofra purificada são menos do que 0,1% do pó de inulina.

Material	Glicose (g/100 g de pó de inulina)	Frutose (g/100 g de pó de inulina)	Sucrose (g/100 g de pó de inulina)
Inulina de alcachofra	< 0,1%	<0,1%	< 0,1%

Tabela 3: Teor de glicose, frutose e sucrose em inulina de alcachofra purificada

6. Grau de ramificação

15 6.1 Análise de metilação padrão

O grau de ramificação foi medido em uma amostra de inulina da invenção tendo um DP_w de 90 e um DP_n de 84.

Os exemplos comparativos usados foram Raftline HP (da Orafti, bateladas HBPNO3DNO3 e HPBNH4DNH4) e inulinas de tubérculos dahlia

(da Sigma, número do artigo I-3754, batelada: 022K7045 ou 75H7065) e raízes de alcachofra Jerusalem (Sigma, número do artigo I-2880 bateladas 111H7045 e 88F7220) o grau de ramificação foi determinado por meio de análise de metilação (vide Métodos Gerais, 5.1).

5 Hidrólise, redução e acetilação de frutanos 2-1-ligados resultaram em 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil-D-manitol e –sorbitol. Os radicais frutósila terminais deram 2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol e –sorbitol. Uma unidade glucopiranosila terminal resulta em 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-sorbitol. Blocos de formação adicionalmente ramifi-
10 cados na posição 6 dão os 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metilalditóis.

 Além dos produtos indicando ligação 2-1, era possível detectar em todas as amostras de frutano aqueles dos blocos de formação de frutose e glicose terminais. Os cromatogramas mostraram adicionalmente dianidrido difrutose (DFDA, aproximadamente 3% em mol) que é formado da remoção
15 de TFA em uma corrente de nitrogênio de frutose 2-1 ligada.

 A partir dos espectros de massa foi adicionalmente possível identificar produtos resultantes de uma ligação 2-1,6 em todas as amostras. Compostos 1,3- e 1,4-acetilados foram também identificados, que poderiam surgir com ramificações nas posições 3 e 4, respectivamente, mas podem
20 também derivar de metilação incompleta. A ocorrência não-específica de produtos 1,3- e 1,4-acetilados é um indicador de submetilação. Supondo que posição 6 seja afetada por submetilação ao mesmo ponto 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 2-1,6. A Tabela 4
25 abaixo mostra os resultados disto.

Tabela 4

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

Avaliação da análise de metilação revelou um grau de ramificação de 1,4% em mol para a inulina de alcachofra. O grau de ramificação desta inulina é então distintamente maior do que aquele nas inulinas das amostras de referência de chicória (Raftiline HP), alcachofra dahlia e Jerusalem.

6.2 Degradação redutiva

De acordo com a análise de metilação padrão, é possível identificar através de clivagem de glicosídeo redutiva os produtos correspondentes de glicopirranose terminal (1,5-anidro-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-sorbitol), de frutofuranose terminal (2,5-anidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol e –sorbitol) e frutofuranose 2-1 ligada (1-O-acetil-2,5-anidro-3,4,6-tri-O-metil-D-manitol e –sorbitol) em todas as amostras. É também possível para todos os frutanos detectar a partir dos espectros de massa os produtos resultantes quando uma ligação 2-1,6 está presente (1,6-di-O-acetil-2,5-anidro-3,4-di-O-metil-D-manitol e –sorbitol). Ainda, 2,6-di-O-acetil-1,5-anidro-3,4-di-O-metilmanitol acontece, a qual é um produto de rearranjo resultante de unidades de frutose 2-1,6-ligada.

Mais uma vez, produtos de submetilação não-específica (vide 6.1) foram detectados na GC-MS. Uma pequena proporção de alditóis de cadeia aberta não-separados também apareceu. Essas pequenas proporções foram levadas em consideração na ligação 2-1. Subtração das proporções não-específicas resulta em um grau de ramificação (=proporção de frutose 2-1,6-ligada) de 1,7% em mol para a inulina da invenção.

Exemplo 2

25 Propriedades da inulina de raízes de alcachofra

Todas as investigações que seguem referem-se à inulina de al-

cachofra da invenção previamente detalhada na Tabela 2. As inulinas Raftiline HP e Dahlia são da mesma maneira aquelas detalhadas no Exemplo 1.

1. Investigação de calorimetria de varredura diferencial de inulina

Análise calorimétrica de varredura diferencial de inulina (quanto ao procedimento: vide métodos) mostrou diferenças distintas entre os vários materiais (vide Tabela 5) em relação ao comportamento de fusão. Ambas amostras de inulina diferenciavam muito em relação à entalpia de fusão. Isto era acima de 25,2 J/g para inulina de alcachofra e apenas 22,8 J/g para Raftiline HP. As diferenças em $T_{\text{início}} (T_o)$ eram da mesma maneira pronunciadas. A temperatura de fusão inicial para inulina de alcachofra era 41,4°C que era mais do que 3°C maior do que para a inulina de chicória comparativa. Esta estabilidade térmica aumentada de 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.

Material	T_o [°C]	Entalpia de fusão dH [J/g]
Inulina de alcachofra	41,4	25,2
Raftiline HP	37,8	22,8

Tabela 5

2. Viscosidade

Tabela 6: Comparação da viscosidade dinâmica de inulina de chicória e inulina de alcachofra em água como uma função da concentração ($T=90^\circ\text{C}$)

% de Concentração (p/v)	Viscosidade (mPas)	
	Raftiline HP (chicória)	Inulina de alcachofra
10	2,4	2,3
24	4,3	6,8
26	4,2	7,5
28	4,5	26,3

Como é evidente a partir da tabela acima, ambas inulinas mostraram em concentrações de até 24% (p/v) viscosidades muito baixas a 90°C (água = 1 mPas). A inulina da invenção se tornou viscosa em concentrações de 26% (p/v) e especialmente em 28%, enquanto Raftiline HP permaneceu

muito similar em sua viscosidade para água até 28% (p/v).

3. Tamanho de partícula após secagem por congelamento

A amostra seca por congelamento do exemplo 1 $DP_w = 86$ foi moída em um moedor de faca (Grindomix GM200, Retsch Technologie GmbH, Haan, Alemanha) e o tamanho de partícula foi determinado através de análise de peneira (máquina de peneira vibratória "Analysette 3" da Fritsch, frequência 2.0, auxiliares de peneiramento: 8 bolas de ágata (10 mm Ø)/peneira, tempo de peneiramento 1-2 min, quantidade carregada cerca de 50 g). O resultado é mostrado na Tabela 7 abaixo. Foi possível determinar o diâmetro de partícula médio através de análise de peneira como 108 μm . Uma inulina preparada em analogia ao Exemplo 1 e tendo um DP_w de 93-94 foi também seca por congelamento, moída em um moedor de faca e investigada através de análise de peneira (Tabela 8). Um tamanho de partícula médio de 160 μm resultou.

15 Tabela 7: Análise de peneira de inulina $DP_w = 86$:

Largura da malha / μm	Massa/g	%
<63	14,00	28,97
<90	6,35	13,14
<125	7,54	15,60
<160	5,53	11,44
<200	4,75	9,83
<500	10,05	20,79
>500	0,11	0,23
Total	48,33	100,00

Tabela 8: Análise de peneira de inulina $DP_w = 94$:

Largura da malha / μm	Massa/g	%
<63	8,33	16,74
<90	3,92	7,88
<125	6,17	12,40

Tabela 8: -continuação-

Largura da malha / μm	Massa/g	%
<160	6,05	12,16
<200	7,60	15,28
<500	17,62	35,42
>500	0,06	0,12
Total	49,75	100,00

4. Secagem por pulverização

A inulina ($DP_w = 86$, Tabela 2) preparada no Exemplo 1, No. 2, foi, após uma secagem por congelamento intermediária, redissolvida e então seca por pulverização em uma unidade de secagem por pulverização de leite fluidizado Glatt GPCG3.1. Para este propósito, inulina seca por congelamento foi introduzida em água, aquecida para 85-90°C e dissolvida. A solução aquecida foi seca com pulverização com temperatura de ar de saída variável, e as propriedades do processo e propriedades do produto foram observadas. A temperatura de entrada foi mantida constante a 120°C.

Tabela 9. Parâmetros de secagem por pulverização

Teste/Amostra	Composição de alimentação		Temp. de alimentação °C	Temp. de saída/°C	Umidade residual KFT/%
	água/%	inulina/%			
Teste 1	80	20	85-90	85	3,1
Teste 2	80	20	85-90	80	2,1
Teste 3	80	20	85-90	70	5,1
Teste 4	70	30	85-90	60	6,1

Uma granulação por pulverização (Teste 5) foi também realizada em adição à secagem por pulverização. Os parâmetros de processo relevantes são detalhados na tabela abaixo. Inicialmente introduzidos como sementes de granulação foram 70 g de material seco por pulverização que foi preparado como segue: secador por pulverização Buchi B-191, alimentação: 20 g de água e 4 g de inulina ($DP_w: 86$), T (alimentação) = 80-90°C, T (entrada) = 120°C, T (ar de saída) = 93-94°C, taxa de aspirador 80%, taxa de bomba 10%, bocal de fluxo de ar 450 l/h. Os grânulos resultantes eram de muito

boa qualidade em forma e consistência. A granulação foi possível até uma temperatura de ar de saída de 52°C.

Tabela 10: Granulação por pulverização

Teste/Amostra	Composição de alimentação		Temp. de alimentação/°C	Temp. de saída/°C	Umidade residual KFT/%
	Água/%	inulina/%			
Teste 5	70	30	90	variável	5,3

Uma análise de peneira conforme acima descrito revelou os diâmetros de particular médios que seguem:

Teste 2 85 μm

Teste 5 300 μm

5. Cristalinidade

Amostras de inulina em forma de pó foram preparadas sem pré-tratamento adicional em um veículo de amostra de 2 mm de espessura (padrão) entre duas películas de cobertura de PET. Um veículo de amostra de 1 mm foi usado para amostra 2 (vide abaixo). As medições de raios x foram realizadas com um difractômetro de dois círculos D5000 da Bruker-AXS em transmissões simétricas usando radiação de Cu-K α monocromática (monocromador Ge(111)). Os registros foram feitos a 30 mA e 40 kV na faixa de ângulo de 2θ de 3-29° (largura da etapa $\Delta 2\theta = 0,1^\circ$) e 29,5-104 (largura da etapa/ $\Delta 2\theta$: 60 segundos).

Software baseado no método Ruland-Vonk (WAXS 7, desenvolvido pelo Fraunhofer Institut für angewandte Polymerforschung, Potsdam (Alemanha), descrito no http://edocs.tuberlin.de//diss/2003/rihm_rainer.pdf, pp. 19 e seq.) foi usado para encontrar o grau de cristalinidade x_c , os tamanhos de cristalinidade $D_{(hkl)}$ e o parâmetro de desordem k , que é uma medida da perturbação do látice nos cristalitos, dos gráficos de difração. O gráfico de difração para a amostra 2 (vide abaixo) foi usado como arquivo de *background* amorfo. Frutose foi usada como base química, calculada com uma densidade de 1,65 g/cm³. Os tamanhos de cristalito $D_{(hkl)}$ foram determinados a partir das meias-larguras das reflexões de raios x pela fórmula Scherrer nas duas primeiras interferências principais a $2\theta = 8^\circ$ e 12° .

As amostras dos testes de secagem por pulverização 1-5 deta-

lhadas acima, e as amostras que seguem, foram medidas:

Teste 6: Inulina com $DP_w = 86$, preparada conforme descrito no Exemplo 1, No. 2 e secam por congelamento.

Teste 7: Amostra 1 dissolvida em água a 80-90°C e seca por pulverização sob as condições que seguem:

Secador por pulverização Buchi 190, T (alimentação) = 80-90°C, T (entrada) = 120°C, T (ar de saída) = 80°C, fluxo de ar 450 l/h, concentração de inulina = 20% em peso.

Teste 8: Amostra 1 suspensa em água a 25°C e seca por pulverização sob as condições que seguem:

Secador por pulverização Büchi 190, T (alimentação) = 80-90°C, T (entrada) = 120°C, T (ar de saída) = 80°C, fluxo de ar 450 l/h, concentração de inulina = 20% em peso.

Os graus medidos de cristalinidade e parâmetros de distúrbios são indicados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11

	Cristalinidade x_c [%]	Parâmetro de distúrbio k [10^{-2} nm^2]	$D_{(hkl)} 2\theta = 8^\circ$ [nm]	$D_{(hkl)} 2\theta = 12^\circ$ [nm]
Teste 1	amorfa	--	--	--
Teste 2	amorfa	--	--	--
Teste 3	5-10	--	--	--
Teste 4	38	2,9	7,0	9,6
Teste 5	45	2,9	6,9	9,4
Teste 6	33	4,4	5,5	7,1
Teste 7	amorfa	--	--	--
Teste 8	15	3,2	8,1	9,9

6. Formação de estrutura das inulinas após aquecimento em água

Porções de 15 ml de suspensões de 20% de resistência da inulina em água foram cada uma constituídas em béqueres de alumínio (béqueres RVA-3d da Winopal Forschungsbedarf GmbH; volume de cerca de 70 ml, diâmetro 38 mm), agitadas e equipadas com uma barra de agitação magné-

tica e finalmente cobertas. As suspensões foram aquecidas usando um agitador multitérmico (VARIOMAG Multitherm 15 da H+P Labortechnik AG) com agitação. A temperatura foi controlada neste caso usando uma sonda PT 100 (acessório para o VARIOMAG Multitherm 15) que ficou em um béquer de referência coberto com água destilada no bloco de aquecimento. O agitador multitérmico foi preaquecido de modo que a temperatura da amostra de referência permaneceu estável a 90°C. As suspensões a serem aquecidas foram postas no agitador multitérmico e agitadas a 90°C por 8 minutos. As amostras foram então removidas do agitador multitérmico armazenadas em temperatura ambiente por 24 horas. A resistência dos géis resultantes foi então medida usando um analisador de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems). Esta medição foi realizada usando o êmbolo de penetração SMSP/0,5 R076 (Stable Micro Systems) com um diâmetro de 12 mm como sistema de medição. Os parâmetros que seguem foram aplicados para a medição de TA com a célula de medição de 5 kg:

- Opções: medir força em direção de pressão
- Teste único
- Parâmetro: velocidade adiante 2,00 mm/s
- Velocidade de teste: 0,50 mm/s
- Velocidade reversa: 0,50 mm/s
- Curso (profundidade de penetração): 3 mm
- Força de disparo: 2 g

O comportamento de formação de estrutura de várias inulinas após tratamento térmico em água foi investigado. Ficou evidente a partir disto que a inulina de chicória (Raftiline HP® e Beneo HPX®) não forma estruturas do tipo gel sob essas condições (Tabela 12). Em contraste com elas, as inulinas da invenção ($DP_w = 86$ ou 94 de secagem por congelamento) formam estruturas muito fortes. Surpreendentemente, a amostra onde a inulina seca por pulverização com $DP_w = 86$ foi usada também formou géis consideravelmente mais fortes do que as amostras comparáveis onde a inulina foi seca por congelamento. Isto é particularmente claro a partir do fato de que as resistências de gel encontradas com concentração de apenas 15% (p/p) de inulina empregada foram ainda distintamente maiores do que aquelas

com as amostras comparativas secas por congelamento a 20%.

Tabela 12: Formação de estrutura da inulina após aquecimento em água

	Concentração de inulina, % (p/p)	Resistência do gel [g]	Desvio padrão
Raftiline HP® DPw = 36	20	Nenhum gel	-
Beneo HPX® DPw = 33	20	Nenhum gel	-
Inulina DPw = 86	20	353	92**
Inulina DPw = 94	20	493	31*
Inulina DPw = 86, seca por pulverização	20	1182	347**
Inulina DPw = 86 seca por pulverização	15	539	93*

* - n = 2

** - n = 4

5 7. Propriedades prebióticas

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

1. Materiais e métodos:

a) Sistema de cultura de três estágios contínuo:

Um sistema de cultura de três estágios contínuo que foi anteriormente descrito por Pereira e outros (2003) *Appl. Environ. Microbiol* 69(8), 4743-4752 e Probert e outros (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4505-4511, foi usado neste estudo. O modelo de intestino consistia em três recipientes de cultura V1, V2 e V3 com volumes de trabalho de 0,28, 0,30 e 0,30 litro que foram dispostos em série. Cada recipiente foi provido com um agitador magnético, a temperatura foi mantida a 37°C por meio de um banho de água e o pH nos recipientes individuais foi controlado por um controlador de pH Electrolab. O sistema todo (incluindo reservatório de meio) foi operado sob condições anaeróbicas passando nitrogênio livre de oxigênio estéril pelo

líquido. O pH nos três recipientes foi ajustado adicionando a quantidade apropriada de HCl a 0,5M-NaOH a 5,5 (V1), 6,2 (V2) e 6,8 (V3). O recipiente 1 simulou as condições bacterianas no intestino grosso anterior. Ele era relativamente rico em nutrientes, tinha um pH relativamente mais ácido e um tempo de residência mais curto do que o recipiente 3 com um pH mais neutro e comparativamente pouco substrato. O recipiente 3 simulou a parte posterior do intestino grosso. O recipiente 2 serviu de modelo para a parte transversal, central, do intestino grosso (colo transverso).

Nitrogênio livre de oxigênio foi continuamente soprado no meio de cultura estéril, e ele foi introduzido por meio de uma bomba peristáltica em V1 que levou sequencialmente a V2 e V3. O meio de cultura consistia nos componentes que seguem em água destilada (g/L): amido de batata, 5,0; pectina (citrus), 2,0; caseína (sal de sódio), 3,0; Raftiline LS (Orafti, Tienne; BE), 1,0; xilano (casca de aveia), 2,0; arabinogalactano (Fluka), 2,0; goma guar, 1,0; mucina (tipo gástrico de porco III), 4,0; triptona (Oxoid), 5,0; água peptona (Oxoid), 5,0; extrato de levedura (Oxoid); 4,5; sais de bile No. 3 (Oxoid), 0,4; HCl L-cisteína, 0,8; NaHCO₃ (Fisher Scientific), 1,5; hemina, 0,05; NaCl (Fisher Scientific), 4,5; KCl (Fisher Scientific), 4,5; CaCl₂·6H₂O (BDH), 0,15; KH₂PO₄ (BDH), 0,5; FeSO₄·7H₂O (BDH), 0,005; MgSO₄·7H₂O (Fisher Scientific), 1,25. Ainda, 1,0 ml de Tween 80 (BDH) e 10 microlitros de vitamina K foram adicionados. Uma concentração de 4 ml de uma solução a 0,025% (p/v) de resazurina foi adicionada ao meio de crescimento como indicador de condições anaeróbicas. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e esfriado sob uma atmosfera de nitrogênio. A menos que de outro modo indicado, todos os agentes químicos foram comprados da Sigma Chemical Co., UK.

Coleta e preparação de material fecal:

O volume restante de cada recipiente foi composto com suspensão fecal recém-preparada de um homem de 30 anos de idade que não tinha tomado quaisquer antibióticos por três meses antes do teste. A suspensão fecal fresca a 20% (p/v) foi preparada com solução salina tamponada com fosfato reduzida previamente (PBS) e digerida em velocidade normal por 2 minutos em um aparelho de digestão (estômago). Resíduos de comida

grandes foram removidos através de um saco do filtro. Cem ml da suspensão resultante foram então empregados ao inoculato de cada um dos três recipientes de fermentação. O sistema foi inicialmente operado como cultura em batelada usando o meio de cultura durante 48 horas. Após 48 horas de fermentação de cultura em batelada, o meio de cultivo complexo que simula a composição de fluido intestinal foi introduzido em V1 e então em V2 e V3 através da bomba peristáltica. O tempo de residência (R) foi calculado como taxa de diluição recíproca para cada recipiente. O tempo de residência foi ajustado em 27,1 horas, e o sistema foi operado por 12 dias após o período de equilíbrio de 48 horas para assegurar um estado uniforme. 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 obtida após fermentação por 24 horas. A fermentação continuou até que um estado uniforme fosse atingido (após 10-12 dias) (SS1). Neste estágio, amostras do líquido de cultura foram removidas de cada recipiente para análise subsequente de bactérias e ácidos graxos de cadeia curta e usadas como indicador de SS1. Após SS1 ter sido atingido, o substrato de teste foi posto no recipiente 1 cada dia por um período adicional de 10-12 dias. A fermentação foi continuada até que um estado uniforme adicional (SS2) foi atingido e novamente amostras foram obtidas do líquido de cultura de cada recipiente para análise subsequente.

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

Amostras de recipientes individuais do sistema de fermentação foram tratadas conforme mostrado abaixo. Preparação da amostra: Amostras (375 μ l) foram removidas das culturas de batelada, adicionadas a 1125 μ l de solução de paraformaldeído filtrada 4% (p/v) (pH 7,2), misturadas e armazenadas a 4°C da noite para o dia a fim de fixar as células. As células fixadas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes em solução tampão de fosfato filtrada e ressuspensas em 150 μ l de PBS. Etanol (150 μ l) foi adicionado e a amostra foi misturada e armazenada a -20°C até ser usada, mas não por mais de 3 meses.

Hibridização:

As células fixadas (16 µl) foram adicionadas a 264 µl de tampão de hibridização filtrado preaquecido (forno) (preaquecido em X (Tris-HCl a 30 mM, NaCl a 1,36 M, pH 7,2, dodecilsulfato de sódio a 0,1% v/v, SDS) e misturadas. A mistura foi adicionada à sonda marcada com Cy3 (50 ng/µl) em uma razão de 9:1 (v/v), misturada e posta no forno de hibridização em uma temperatura adequada da noite para o dia.

Lavagem e filtragem:

A amostra hibridizada (alíquotas adequadas para atingir de 30 a 150 células por campo de visão) foi adicionada a 5 ml de tampão de hibridização filtrado, preaquecido (Tris-HCl a 20 mM, NaCl a 0,9M, pH 7,2) junto com 20 µl de DAPI (4',6-diamono-2-fenilindol, 500 ng/µl) e deixada na temperatura de hibridização adequada por 30 minutos. A mistura foi posta em um filtro de membrana preto com um tamanho de poro de 0,2 µm (GTPB 01300, Millipore Corporation). Slowfade-Light Antifade (Molecular Probes Europe, Leiden, NL) foi posto no filtro a fim de prevenir desaparecimento da fluorescência, e os apoios foram armazenados no escuro a 4°C por um máximo de 3 dias.

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

A fórmula que segue 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 de visão

q: volume de mistura de hibridização usada

14.873.74: constante de ampliação

15,56: fator para todas as diluições feitas

Sondas de oligonucleotídeo direcionadas a rRNA de 16S específicas de gênero marcadas com corante fluorescente Cy 3 que tinham sido previamente projetadas e validadas foram usadas para contar grupos importantes de bactérias. As sondas usadas foram Bif164, específica para *bifidobacterium*

(Langedijk (1995), *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3069-3075), Bac303, específica para *bacteroides* (Manz e outros (1996) *Microbiology* 142, 1097-1106), His150, específica para o subgrupo *Clostridium histolyticum* e Erec482, específica para o grupo retal *Clostridium coccoides-Eubacterium* (Franks e outros (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3336-3345), Lab158, específica para *Lactobacillus/Enterococcus* (Harmsen e outros (1999) *Microb. Ecol. Health Dis.* 11, 3-12), Ato291, específica para grupo *Atopobium*. O corante de ácido nucleico 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) foi usado para contagem de célula total (Tabela 13).

10 Tabela 13

Sonda	Gênero-alvo	Sequência (5' a 3')	T-hibridização/°C
Bif 164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CATCCGGCATTACCACCC	50
Bac 303	<i>Bacteroides</i> spp.	CCAATGTGGGGGACCTT	45
Chis 150	Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	TTTCCYTCTAATTATGGCGTATT	50
Lab 158	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp.	GGTATTAGCATCTGTTTCCA	50
Ato 291	Grupo <i>Atopobium</i>	GGTCGGTCTCTCAACCC	50
Erec 482	Grupo <i>Clostridium coccoides-E. rectale</i>	GCTTCTTAGTCARGTACCG	2

Análise de ácidos graxos de cadeia curta:

Ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) em amostras obtidas de vários recipientes do modelo de intestino foram analisados conforme descrito em Pereira e outros, *Appl. Environ. Microbiol.* (2003) 69(8), 4743-4752. As amostras foram centrifugadas (6000 g, 10 minutos) a fim de remover bactérias e sólidos e então filtradas em um filtro de HPLC de polissulfona com um tamanho de poro de 0,2 µm. Então 200 µl de cada sobrenadante filtrado foram diluídos com 800 µl de acetonitrila (1:4) que continha ácido 2-etilbutírico a 3,7 µM como padrão interno. Os ácidos graxos foram determinados através de cromatografia de gás usando um sistema de GC HP 5890 série II

mento não-significante foi observado nos outros recipientes. Um aumento em bifidobactérias no recipiente 1 foi observado, mas não foi significativo, com a amostra comparativa. A população de lactobacilos no recipiente 3 foi significativamente maior ($P < 0,05$), mas nenhuma mudança foi observada na população de *Clostridia*. Grupo de *bacteroides* e *Clostridium coccoides-E. rectale* foi significativamente menor no recipiente 2 ($P < 0,05$).

A Figura 12 mostra uma comparação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) em todos os recipientes entre estado uniforme 1 (linha de base) (SS1) e estado uniforme 2 (SS2) após tratamento com inulina da invenção. Os ácidos graxos individuais são postos em gráfico em cada caso como diagrama de bile para cada recipiente e estado uniforme (por exemplo, V1-SS1). Da esquerda para a direita: ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido n-valérico, ácido caproico.

A Figura 13 mostra a comparação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) em todos os recipientes entre o estado uniforme 1 (linha de base) (SS1) e estado uniforme 2 (SS2) após tratamento com a amostra comparativa.

Houve um aumento na concentração propiônica em todos os três recipientes após adição de inulina da invenção, e o aumento no recipiente 2 foi significativo. A concentração de butirato aumentou nos recipientes 1 e 2. Adição da amostra comparativa ao modelo de intestino levou a um aumento na concentração de acetato, propionato e butirato em todos os recipientes, mas isto foi significativo apenas no recipiente 2.

8. Massa e propriedades de cozedura

Material

O material usado para os testes de cozedura compreendia misturas de farinha compostas da farinha de trigo Americana "King Midas"[®] mais Raftiline HP[®] fornecida pela Orafti ou inulina da invenção com $DP_w = 86$, 8% da farinha foram substituídos com inulina. A farinha misturada e o controle sem substituição foram então submetidos a medições de reologia de massa e testes de cozedura.

Métodos:

5 provido com uma coluna capilar envolvida com sílica fundida (Permabon FFAP, Macherey Nagel, DE) (25 m x 0,32 mm, espessura da película 0,25 μm). Hélio foi usado como gás veículo com um fluxo volumétrico de 2,42 ml/min. A temperatura da coluna era 140°C e a temperatura do injetor e detector era 240°C. 5 minutos após injeção da amostra, a temperatura da colu-
na foi aumentada em etapas de 20°C/min para 240°C e o sistema foi deixa-
do ativar por mais 5 minutos. A composição do gás foi analisada usando um
ChemStation Apg-top Software HP 3365 série II, Versão A0.03.34. Os ácidos
que seguem foram usados como padrões externos, cada um com concen-
trações na faixa de a partir de 0,5 a 40 mM: ácido acético, ácido propiônico,
10 ácido n-butírico, ácido n-valérico, ácido isovalérico (Fluka), ácido isobutírico
(Fluka) e ácido n-caproico. A menos que de outro modo indicado, todos os
ácidos foram comprados da Sigma e eram mais de 99% puros. As concen-
trações de SCFA foram calculadas usando uma calibragem padrão interna e
15 expressas em mM por litro.

2. Resultados

As inulinas que seguem foram testadas no modelo de intestino descrito abaixo:

Inulina da invenção: $DP_w = 95$

20 Amostra de comparação: Raftiline HP[®] (Orafti), $DP_w = 33$

Comparação foi feita entre o segundo estado uniforme (SS2) e o primeiro estado uniforme (SS1) e os dados foram analisados usando o teste t de Student.

25 A Figura 6 mostra a comparação da população bacteriana no recipiente 1 (V1) entre estado uniforme 1 (SS1) e estado uniforme 2 (SS2) após tratamento com inulina da invenção. As Figuras 7 e 8 mostram comparações correspondentes para recipientes 2 (V2) e 3 (V3).

30 A figura 9 mostra a comparação da população bacteriana no recipiente 1 (V1) entre estado uniforme 1 (SS1) e estado uniforme 2 (SS2) após tratamento com a amostra comparativa. As Figuras 10 e 11 mostram comparações correspondentes para os recipientes 2 (V2) e 3 (V3).

Adição da inulina da invenção no modelo de intestino levou a um aumento significativo nas bifidobactérias no recipiente 1 ($P < 0,05$). Um au-

1) Farinograma (obediência aos Padrões ICC e AACC):

O farinograma é usado para averiguar a capacidade de absorção de água da farinha e avaliar as propriedades de amassamento da massa preparada.

5 Reagentes: água destilada

Equipamento:

Farinograph® E com porta USB fornecido pela Brabender, Alemanha
Amassador de 10 g com 2 lâminas para amassamento (Brabender)

Os parâmetros que seguem foram determinados e avaliados
10 quanto às características de qualidade da farinha de teste:

Absorção de água da farinha: definida como a quantidade de água em ml requerida por 100 g de farinha com teor de umidade de 14% quando a massa atingiu uma consistência de massa máxima de 500 FU (Unidades Farinograph).

15 A consistência da massa é a resistência da massa em revoluções constantes (53 rpm), que é mostrada em FU.

O tempo de desenvolvimento da massa é definido como o tempo em minutos entre o início do teste (adição de água) e o pico máximo.

2) Teste de cozedura (pão de forma branco):

20 Equipamento

- Farinograph com câmara de amassamento de farinha de 300 g fornecido pela Brabender, Alemanha

- Forno (MIWE gusto, Alemanha)

- Fermentador completamente automático (Foster RBC Mk3, da
25 Hobart, Alemanha)

- Máquina pesando 2 kg (Sartorius)

- Amassador (Brabender, Alemanha)

Ingredientes para a massa:

300 g de farinha (com 14% de umidade de farinha)

30 12 g de levedura (fresca)

6 g de sal (sal de mesa)

15 g de gordura para forno

3 g de açúcar

Água (equivalente à absorção de massa menos de 2,5%)

Processamento da massa:

As farinhas e os ingredientes foram misturados na câmara de amassamento por 1 minuto e então a quantidade apropriada de água foi adicionada. Após amassar por 2 minutos, o equipamento foi desligado a fim de retornar a massa da parede da câmara de amassamento para a massa. O processo de amassamento foi continuado por 6 minutos ou 12 minutos para as farinhas suplementadas com inulina, de acordo com os dados do farinograma (tempo de desenvolvimento da massa em minutos). A temperatura final das massas era cerca de 26°C. Após o término no amassamento, a massa foi deixada descansar por 10 minutos e então o peso total da massa foi determinado. A divisão e medição do peso dos pedaços de massa aconteceram dentro de 10 minutos. A massa foi dividida em dois pedaços de massa de tamanho igual e amassada em torno do amassador (Brabender) por 10 segundos e então amassada em oblongos. Os pedaços de massa foram postos nos moldes de cozedura de pão e levados a fermentador completamente automático (32°C, umidade 87%) por 60 minutos (tempo de fermentação). O forno foi preaquecido para 250°C. Os pedaços fermentados de massa foram pulverizados com água e postos no forno. Após um tempo de cozedura de 30 minutos em cerca de 200°C, os pães foram removidos e deixados esfriar em temperatura ambiente por 1 hora. O volume do pão foi medido através do deslocamento de sementes de colza. As propriedades de miolo foram investigadas visualmente e usando o analisador de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems). A resistência do miolo foi medida em pedaços de pão de cerca de 1,5 cm de espessura usando o furador de penetração SMSP/0,5 R076 (Stable Micro Systems) com um diâmetro de 12 mm. Os parâmetros que seguem foram usados na medição de TA com a célula de medição de 5 kg. A medição aconteceu após o ajuste que segue:

- Opções: mede de força em direção de pressão
- Teste único
- Parâmetro: velocidade avançada 2,00 mm/s
- Velocidade de teste 0,50 mm/s
- Velocidade reversa 0,50 mm/s

- Curso (profundidade de penetração) 7 mm

Força de disparo 2 g

Resultados:

Definição de termos:

5 Rendimento da massa (DY): é a quantidade de massa de 100 partes em peso de farinha. É uma característica tornar possível comparar a capacidade de absorção de água e resistências de farinha. Uma massa feita de 100 kg de farinha e 60 kg de água com um DY de 160 é um exemplo. O rendimento da massa tem várias definições:

10 Rendimento de massa líquido: é a quantidade de massa de 100 partes em peso de farinha e a água

Rendimento de massa bruto: é a quantidade de massa de 100 partes em peso de farinha, a água e os outros ingredientes

15 Rendimento de massa prático: é o rendimento de massa bruto levando em consideração processamento, fermentação e perdas de peso.

20 Perda de cozedura: a perda de cozedura é compreendida pelo versado na técnica pela perda em peso da massa ou pedaços de massa durante a cozedura. Isto é principalmente composto de água evaporada da massa, e quantidades mínimas de outros constituintes voláteis tal como álcool, ácidos e ésteres orgânicos; o versado na técnica então também fala de "perda de água" da mesma maneira.

A perda de peso (= perda de cozedura) é sempre baseada no peso da massa e representa a razão de peso de massa para peso de pão. Ela é calculada como segue:

25
$$\text{Perda de cozedura} = \frac{\text{peso da massa} - \text{peso do pão}}{\text{peso da massa}} \times 100$$

30 Perdas de cozedura altas têm efeitos desvantajosos sobre o rendimento de produto de padaria e então sobre o peso e número de produtos assados a serem vendidos. Ainda, as perdas de água durante o processo de cozedura têm efeitos desvantajosos sobre o frescor dos produtos assados, que então se tornam velhos, isto é, "envelhecidos", logo.

Rendimento de produto (também rendimento de pão):

O rendimento de pão (BY) é a quantidade de produto assado obtido de 100 partes de farinha. O rendimento de pão é baseado na quantidade de farinha processada.

Exemplo: 40 kg de farinha resultam em 60 kg de pão e um BY de

5 150.

Tabela 14: Dados de farinograma

Parâmetro	Controle	Controle + 8% de Raftiline HP®	Controle + 8% de Inulina DP _w = 86
Umidade da farinha (%)	12,7	12,2	12
Absorção o de água (%)	63,3	57,7	66,3
Tempo de desenvolvimento da massa (min)	8	12,7	8,7

Tabela 15: Resultados de cozedura

Parâmetro	Controle	Controle + 8% de Raftiline HP®	Controle + 8% de Inulina DP _w = 86
Rendimento da massa líquido (%)	161	155	164
Rendimento da massa bruto (%)	171	164	174
Consistência da massa	normal	levemente pegajosa	normal
Rendimento do pão (%)	147,6	143	147,9
Perda de cozedura (%)	13,7	13,9	14,7
Volume do pão (ml/100 g farinha)	616	513	541
Volume do pão específico (mg/g pão)	4,2	3,6	3,7
Miolo do pão:			
Cor	branco	branco	branco
Elasticidade	boa	satisfatória	boa
Porosidade	uniforme	uniforme	uniforme
Desprendimento	um pouco grosso	delicado	lanudo
Resistência do miolo (g):			

Parâmetro	Controle	Controle + 8% de Raftiline HP®	Controle + 8% de Inulina DP _w = 86
Fresco	73	132	82
3 dias	181	221	165
7 dias	222	318	211
Teor de água (%):			
Fresco	43,2	40,4	44
3 dias	43,2	40,6	42,4
7 dias	41,8	37,6	43,4
Tostamento	normal	um pouco forte	um pouco forte

A investigação da reologia da massa revelou um aumento distinto em capacidade de absorção de água da massa com substituição pela inulina da invenção (Tabela 14). Ela é quase 9 por cento maior do que aquela da farinha comparativa que continha Raftiline HP e é ainda 3% maior do que aquela da farinha comparativa onde nenhuma substituição foi feita. O rendimento da massa, que é de interesse comercial particular, é consequentemente claramente maior para a massa contendo a inulina da invenção (Tabela 15). Isto é surpreendente porque a massa à qual Raftiline HP® foi adicionada mostra uma redução maior no rendimento de massa comparado com a massa controle. A consistência da massa com inulina da invenção é também vantajosa em comparação com a massa com Raftiline HP®. O rendimento de pão é o mais alto para o pão com inulina da invenção, enquanto ele é o menor para o pão contendo Raftiline HP®. O volume específico dos dois pães onde há substituição de farinha é similar, enquanto os outros parâmetros de qualidade tal como cor do miolo, elasticidade, porosidade ou despreendimento são um pouco melhores para o pão com inulina da invenção do que para o pão comparativo com Raftiline HP® e o controle sem substituição. O pão contendo inulina da invenção mostra uma vantagem particular em relação à manutenção do frescor. Isto é melhorado conforme mostrado pela resistência do miolo comparado com o pão controle e o pão contendo Raftiline HP. Uma propriedade vantajosa adicional é também o teor de água maior do miolo fresco e armazenado, que está associado em particular com melhora sensorial além de um envelhecimento reduzido.

3) Produção de pasta:

Uma aplicação adicional das amostras de inulina foi testada em produção de pasta. Neste caso, 5% e 10% da farinha de trigo foram substituídos por inulina.

5 1) Material

Farinha de trigo Durum

Inulina da invenção com $DP_w = 86$

Raftiline HP®.

2) Preparação da massa de macarrão:

10 A massa de macarrão foi preparada usando 200 g de mistura de farinha-inulina com adição de 34,5 g ou 35% de água. A massa controle (farinha de trigo sem substituição) foi preparada com adição de 34% de água. Uma vez que as massas com inulina eram ligeiramente mais secas do que aquelas do controle, a adição de água foi conseqüentemente aumentada. As
15 massas de macarrão foram preparadas usando a máquina de macarrão "Luna" da HÄUSSLER. O tempo de fabricação de massa foi 5 minutos. Pasta larga foi produzida usando um molde com uma largura de 9,5 mm.

3) Método:

20 Uma parte dos fios de macarrão recém-extrudados foi, imediatamente após deixar a máquina, tratados com 3 tempos de cozimento diferentes. A segunda parte foi deixada secar ao ar sob condições ambientes por 2 dias. Para o teste de cozimento, em cada caso 3 fios de macarrão (frescos) foram pesados e passados por um falcon (50 ml) carregado com 45 ml de água fervente. O macarrão foi fervido em cerca de 100°C por 2, 3 ou 5
25 minutos e então deixado escorrer em uma peneira por um tempo constante. Os pesos dos fios de macarrão cozidos foram então determinados. O inchamento do macarrão foi determinado a partir dos pesos dos fios de macarrão antes e após cozimento.

30 Os fios de macarrão que tinham secos por 2 dias foram da mesma maneira cozidos, mas pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos. Nesses casos, o índice de inchamento do macarrão foi também determinado.

A fórmula que segue foi usada para calcular o índice de inchamento:

Índice de inchamento: (peso após cozimento/peso antes do co-

zimento)

4) Resultado:

5 A adição maior de água para preparar a massa de macarrão com inulina suplementada correspondentemente aumentou o rendimento da massa de macarrão. O aumento no rendimento é vantajoso em questões comerciais. Pode ser também estabelecido do teste de cozimento que o macarrão com inulina suplementada da invenção deve distintamente aumentar o inchamento comparado com o controle e também com o macarrão suplementado com Raftiline HP®. Este aumento está entre 5 e 20% (vide Tabela 16).

10 Tabela 16:

Teor de inulina	Raftiline	% vs controle	Inulina DP _w = 86	% vs controle
Nenhum	2,06		2,09	
5% 5 min	2,08	101	2,18	105
10% 5 min	2,09	101	2,38	114
Nenhum	2,7		2,68	
5% 10 min	2,73	101	2,9	108
10% 10 min	2,93	109	3,09	115
Nenhum	3,25		3,06	
5% 15 min	3,28	101	3,42	112
10% 15 min	3,38	104	3,70	121

9. Produção de iogurte

15 As receitas de iogurte são listadas na Tabela 17. A inulina da invenção (inulina de cadeia muito longa, VLCI) correspondia à inulina do Exemplo 1/Tabela 2, foi seca por pulverização sob as condições da Tabela 9, Teste 2, e tinha um grau de polimerização médio DP_w de 86; a amostra comparativa Beneo HP® tinha um DP_w de 34. Todas as porcentagens se referem à porcentagem em peso com base na composição total, a menos que de outro modo indicado.

20

Os ingredientes secos foram misturados a fim de facilitar a dis-

persão de inulina e leite em pó sem gordura, e então adicionados ao leite com cisalhamento moderado a fim de formar a base de iogurte. A base padronizada foi mantida a 4°C por 3 horas de modo que o leite em pó sem gordura pudesse dissolver completamente. Cada batelada foi pasteurizada a 80°C por 30 minutos, rapidamente esfriada para 44°C e inoculada com Yo-Flex 88 (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*, da Chr. Hansen Inc.) em uma concentração de 3,6 g/l. Para iogurte fermentado de pote (iogurte estilo creme de ovos), base inoculada foi vertida em embalagens finais antes da incubação. As misturas de base foram incubadas a 44°C por 4-6 horas até que atingiram pH 4,5 (pH inicial de cerca de 6,8). Quando o iogurte atingiu pH 4,5, as amostras de iogurte tipo creme de ovos foram esfriadas para 4°C e mantidas aí por 48 horas a fim de atingir a viscosidade máxima. A viscosidade foi medida com um viscosímetro Brookfield com um adaptador helipath.

A Tabela 17 mostra os resultados com iogurte fermentado em pote (estilo creme de ovos). Inulina seca por pulverização a 2,5% da invenção causou um aumento maior na viscosidade do que 4,5% de inulina do exemplo comparativo. O iogurte com inulina da invenção também tinha uma viscosidade maior do que o iogurte comparativo com um teor de produtos de gordura de 3,35%.

Tabela 17

	Exemplo comparativo 4,5% de inulina comercial	Exemplo 2,5% de inulina seca por pulverização	Exemplo comparativo 1,5% de gordura	Exemplo comparativo 3,35% de gordura
a) Dados sobre os ingredientes individuais				
Leite integral	--	--	--	95,91
Leite 2%	--	--	71,85	--
Açúcar	--	--	--	--

Tabela 17 -continuação-

	Exemplo comparativo 4,5% de inulina comercial	Exemplo 2,5% de inulina seca por pulverização	Exemplo comparativo 1,5% de gordura	Exemplo comparativo 3,35% de gordura
Leite desnatado	91,51	93,44	24,06	--
Leite em pó sem gordura	3,21	3,28	3,37	3,37
Estabilizador CC723	0,69	0,70	0,72	0,72
Beneo HPX®	4,59	--	--	--
Inulina DP _w = 86 seca por pulverização	--	2,58	--	--
b) Dados sobre os sólidos				
Sólidos do leite	11,14	11,37	11,67	11,67
Inulina	4,59	2,58	--	--
Gordura	--	--	1,44	3,36
Sólidos totais	15,73	13,95	13,11	15,03
Viscosidade (centipoise)	302500	335000	281250	320000
pH	4,34	4,45	4,57	4,55

Todos os dados em porcentagem com base na massa total, exceto viscosidade e pH.

REIVINDICAÇÕES

1. Inulina, caracterizada pelo fato de que em um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 98.
2. Inulina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que tem um grau de polimerização médio DP_w entre 85 e 95.
3. Inulina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que tem um grau de ramificação entre 0,5 e 2,0% em mol de monômeros de frutose 2-1,6 ligada com base em todos os monômeros de inulina.
4. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o quociente DP_w/DP_n é menos do que 1,25.
5. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o quociente DP_w/DP_n é menos do que 1,20.
6. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o quociente DP_w/DP_n é menos do que 1,15.
7. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o teor de glicose é menos do que 2% em peso com base no peso seco total.
8. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o teor de glicose é menos do que 1% em peso com base no peso seco total.
9. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o teor de frutose é menos do que 2,5% em peso com base no peso seco total.
10. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o teor de frutose é menos do que 1,5% em peso com base no peso seco total.
11. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que é uma inulina seca por pulverização.
12. Inulina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que está na forma de partículas com um diâmetro médio de 100-250 μm .
13. Processo para obtenção de inulina, caracterizado pelo fato

de que

- a) raízes de alcachofra são moídas,
- b) um extrato é obtido através de tratamento das raízes moídas com água,
- 5 c) constituintes de coloração são removidos do extrato obtido,
- d) 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 filtragem adicional.

- 10 15. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que os constituintes de coloração são removidos na etapa c) através de

- i) mistura de íons de magnésio (Mg^{2+}) ao extrato de planta,
- ii) mistura de pelo menos um componente alcalino ao ex-

15 trato de planta,

- iii) formação de um precipitado, e
- iv) remoção do precipitado que se formou do extrato de planta.

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

- 20 17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado 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 60-80°C.

- 30 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, caracterizado pelo fato de que a quantidade de componente alcalino é escolhida de modo que o ajuste da razão molar de $OH^-:Mg^{2+}$ é 2,2:1 - 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 alcalino 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 de hidróxido de cálcio.

22. Gênero alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende inulina tendo um grau médio de polimerização DP_w dentre 83 e 103.

23. Gênero alimentício de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que é selecionado de produtos de laticínio, iogurtes, sorvetes, sorvete à base de leite, guarnições à base de leite, pudins, *milkshakes*, creme de ovos, queijo, barras de cereais, barras de energia, barras de café da manhã, doce, produtos de padaria, *crackers*, bolachas, biscoitos, cereais, lanches, chá gelado, sorvete feito de suco de fruta, bebidas *diet*, bebidas acabadas, bebidas esportivas, bebidas de estamina, misturas de bebida energética para suplementação dietética, alimento para criança e bebê, suco de laranja suplementado com cálcio, pão, *croissants*, cereais para café da manhã, talharins, geléias, biscoitos e chocolates sem açúcar, cálcio mastigável, produtos de carne, maionese, molhos para salada, manteiga 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 de dieta, caracterizado pelo fato de que compreende inulina tendo um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103.

26. Preparação cosmética, caracterizado pelo fato de que compreende inulina tendo um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103.

27. Uso de inulina tendo um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103, caracterizado pelo fato de ser como adição a gêneros alimentícios.

28. Uso de inulina de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ser como adição com propriedades prebióticas, agente de texturização, agente de aumento de estabilidade, agente de formação de viscosi-

dade e/ou fibra dietética.

29. Uso de inulina tendo um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103, caracterizado pelo fato de ser como substituto de gordura ou óleo em gêneros alimentícios.

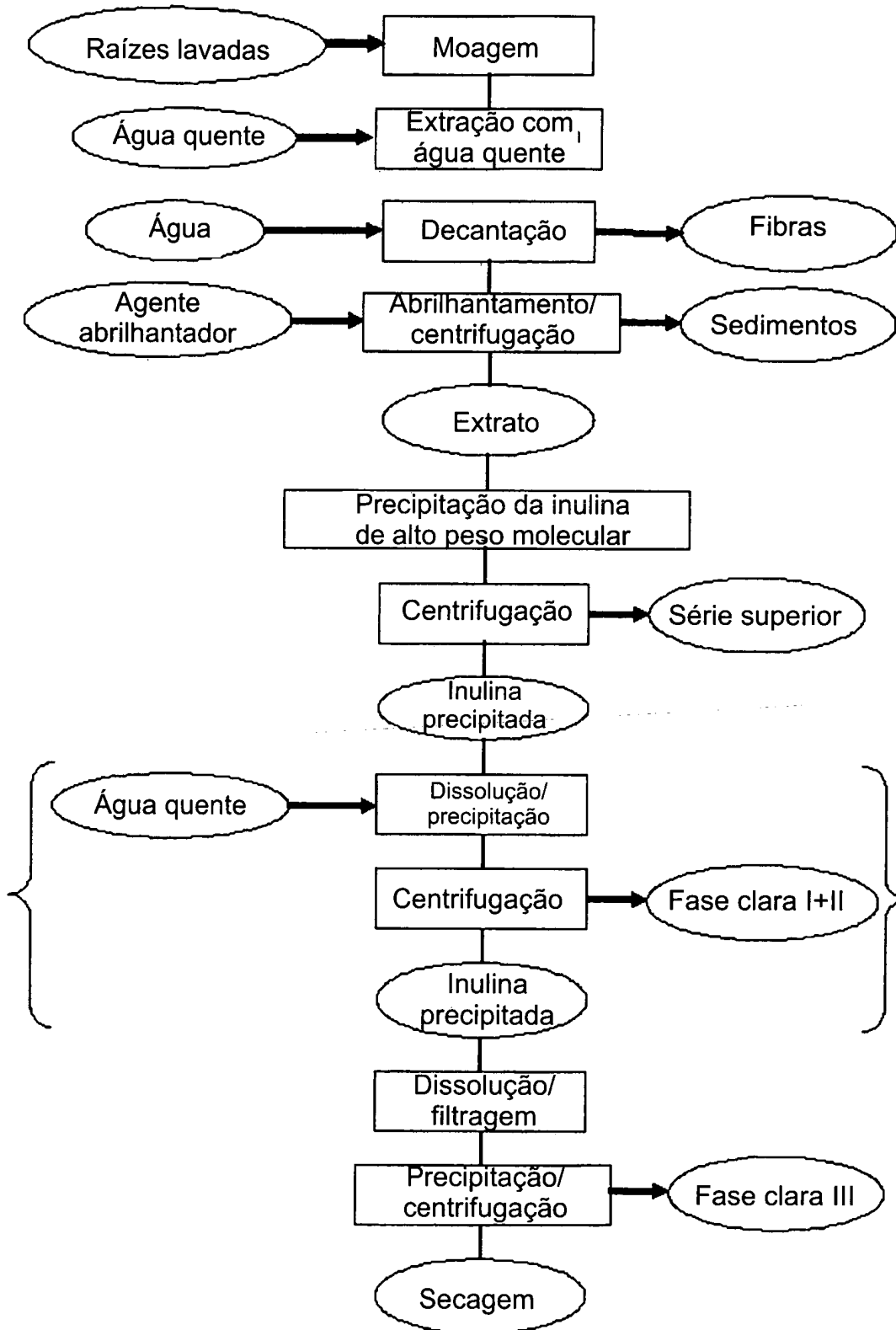
5 30. Uso de inulina tendo um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103, caracterizado pelo fato de ser como adição em preparações cosméticas.

10 31. Uso de inulina de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de ser como agente de texturização, agente de aumento de estabilidade e/ou agente de formação de viscosidade.

32. Pasta aquosa de inulina, caracterizada pelo fato de que tem um grau de polimerização médio DP_w entre 83 e 103.

15 33. Uso de uma pasta aquosa de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de ser como componente de proporcionamento de estrutura, substituto de gordura, substituto de óleo, agente de texturização, agente de aumento de estabilidade e/ou agente de formação de viscosidade em gêneros alimentícios ou preparações cosméticas.

FIG. 1



Repetida duas vezes

FIG. 2

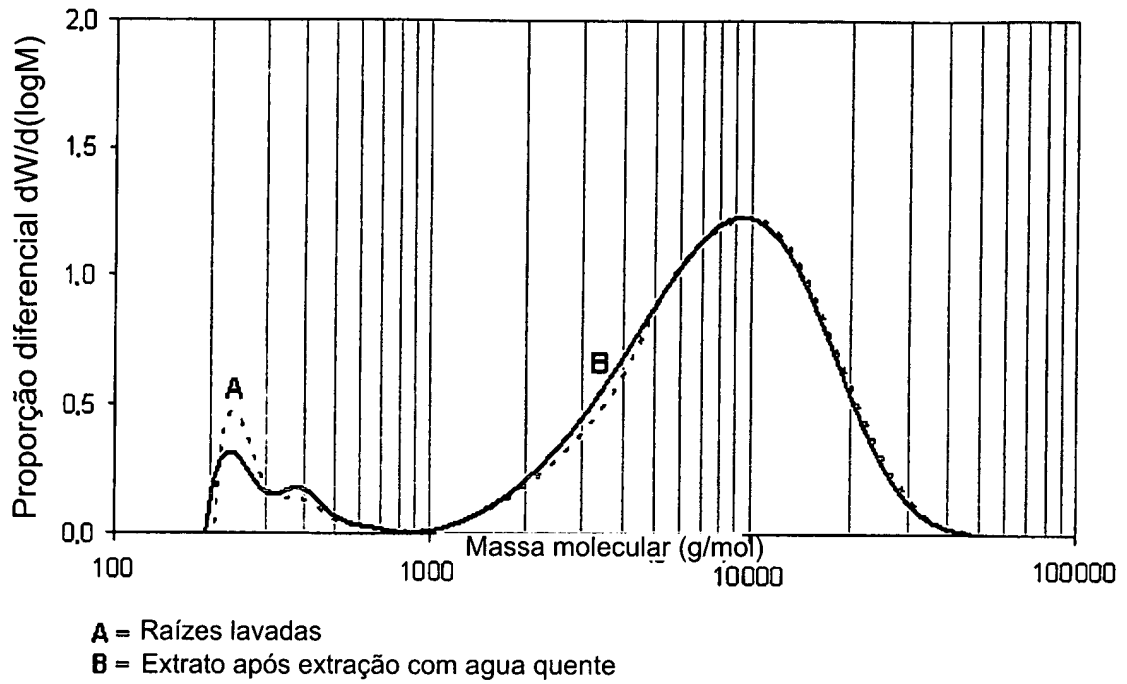


FIG. 3

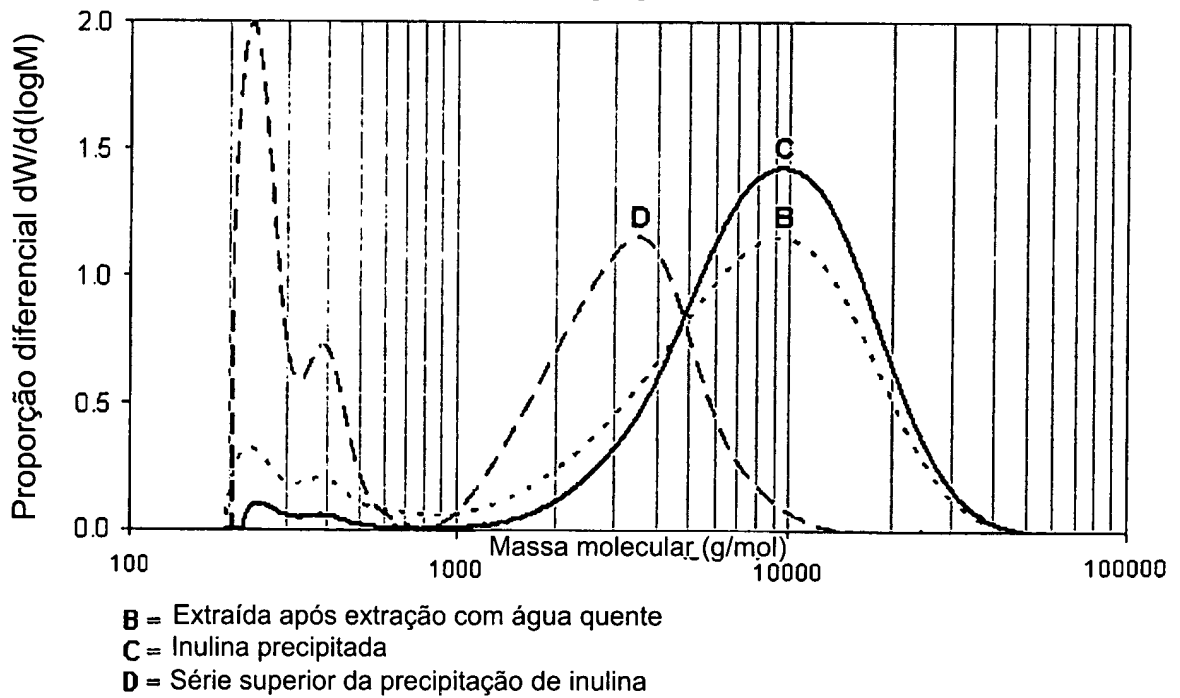
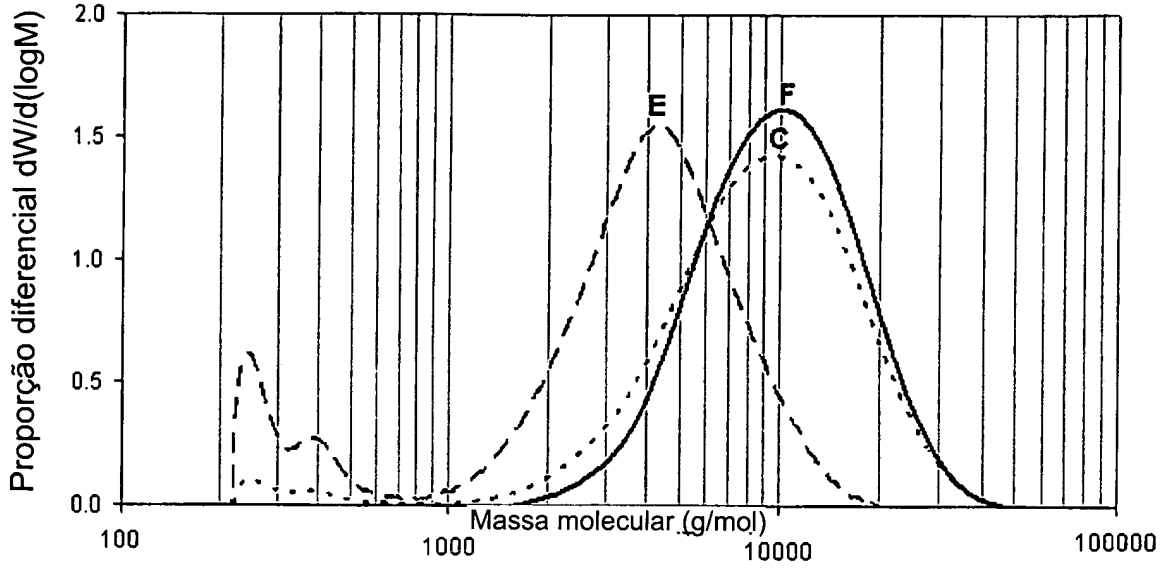
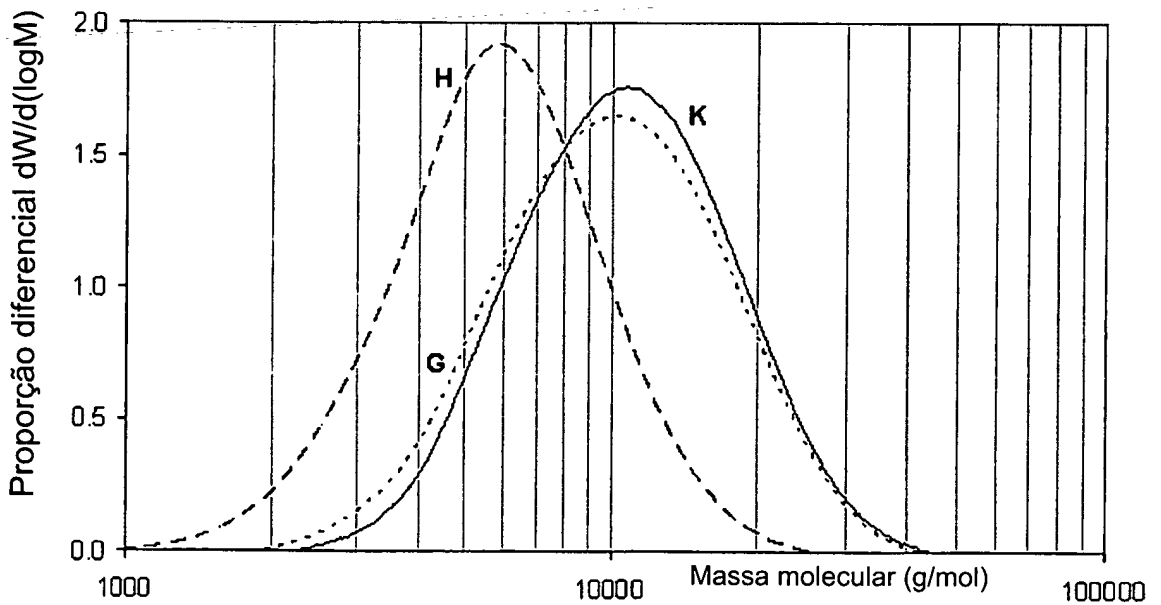


FIG. 4



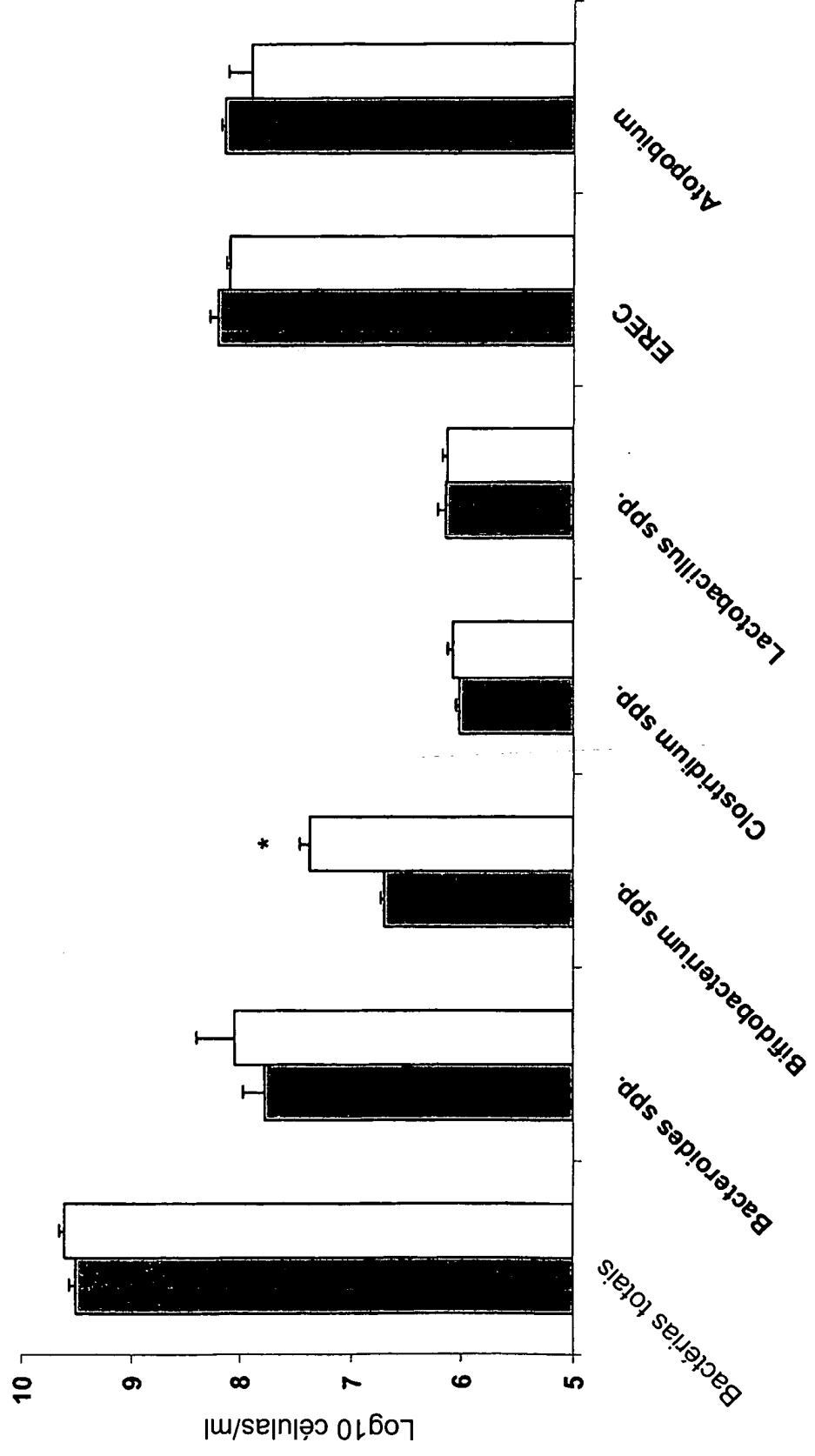
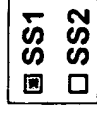
C = Inulina após precipitação a 4° C
 E = Fase clara após 1ª reprecipitação
 F = Inulina sedimentada

FIG. 5



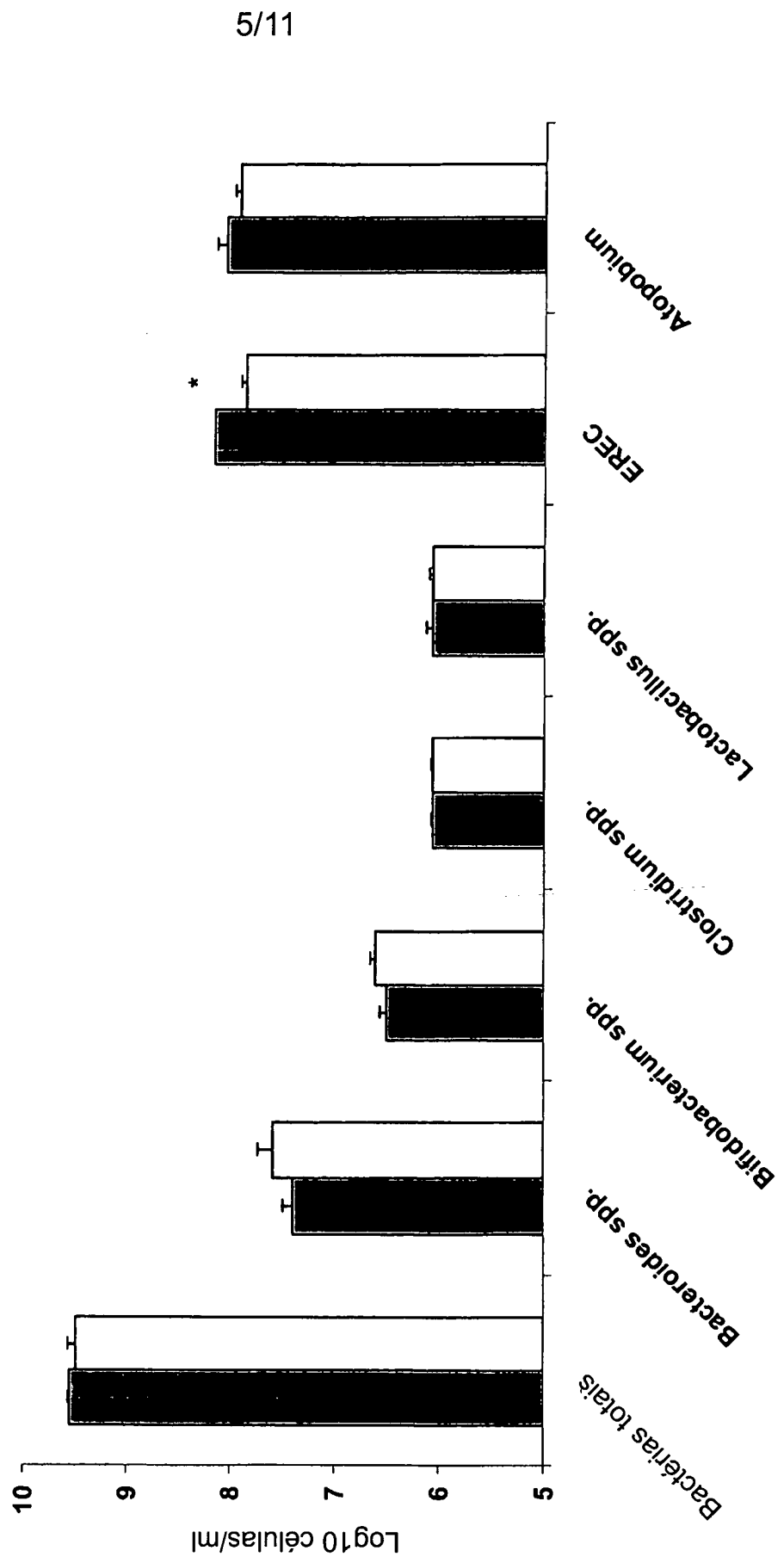
G = Solução de inulina após filtragem
 H = Fase clara III após filtragem e precipitação de inulina
 K = Inulina sedimentada após precipitação

FIG. 6



■ SS1
□ SS2

FIG. 7



SS1
 SS2

FIG. 8

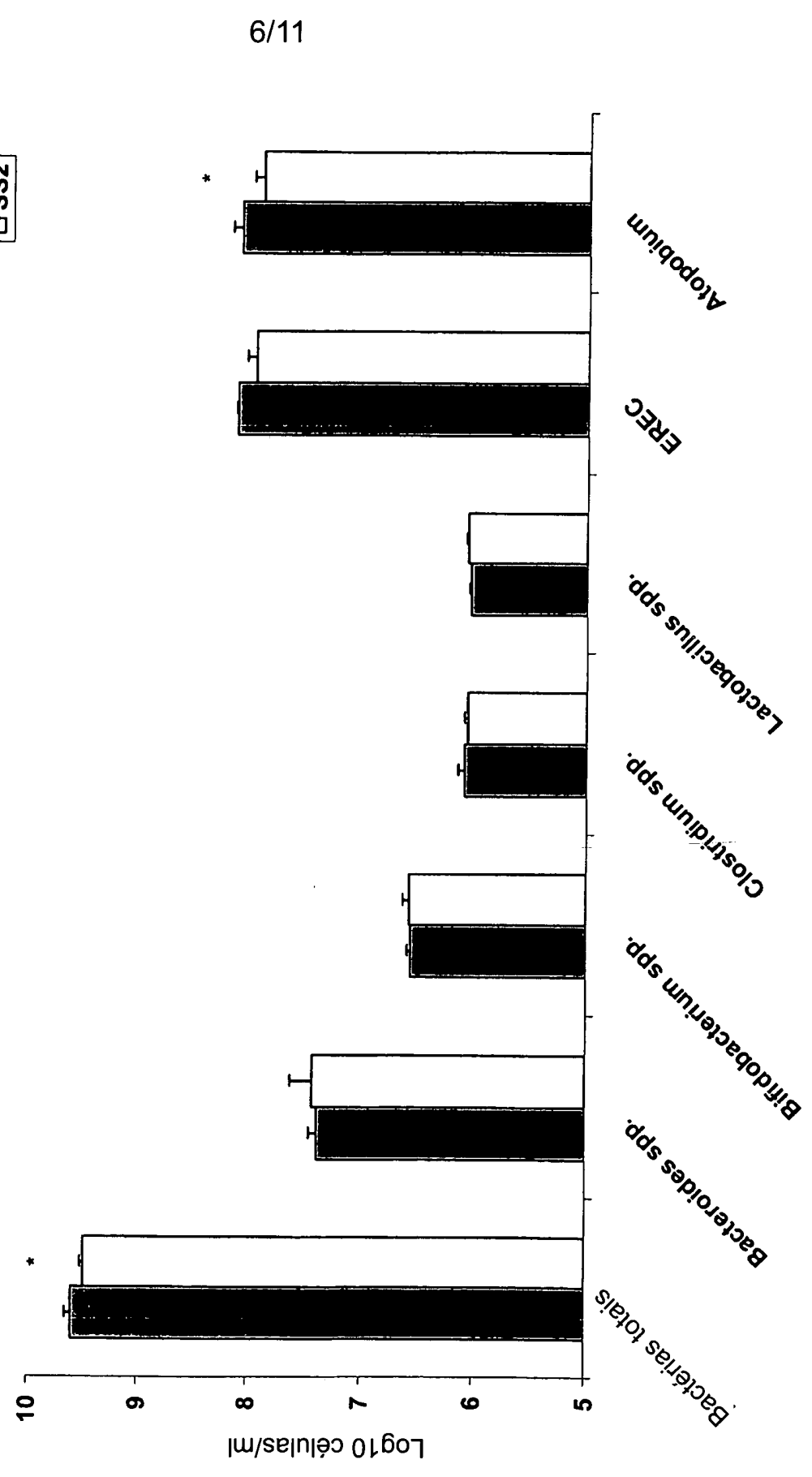
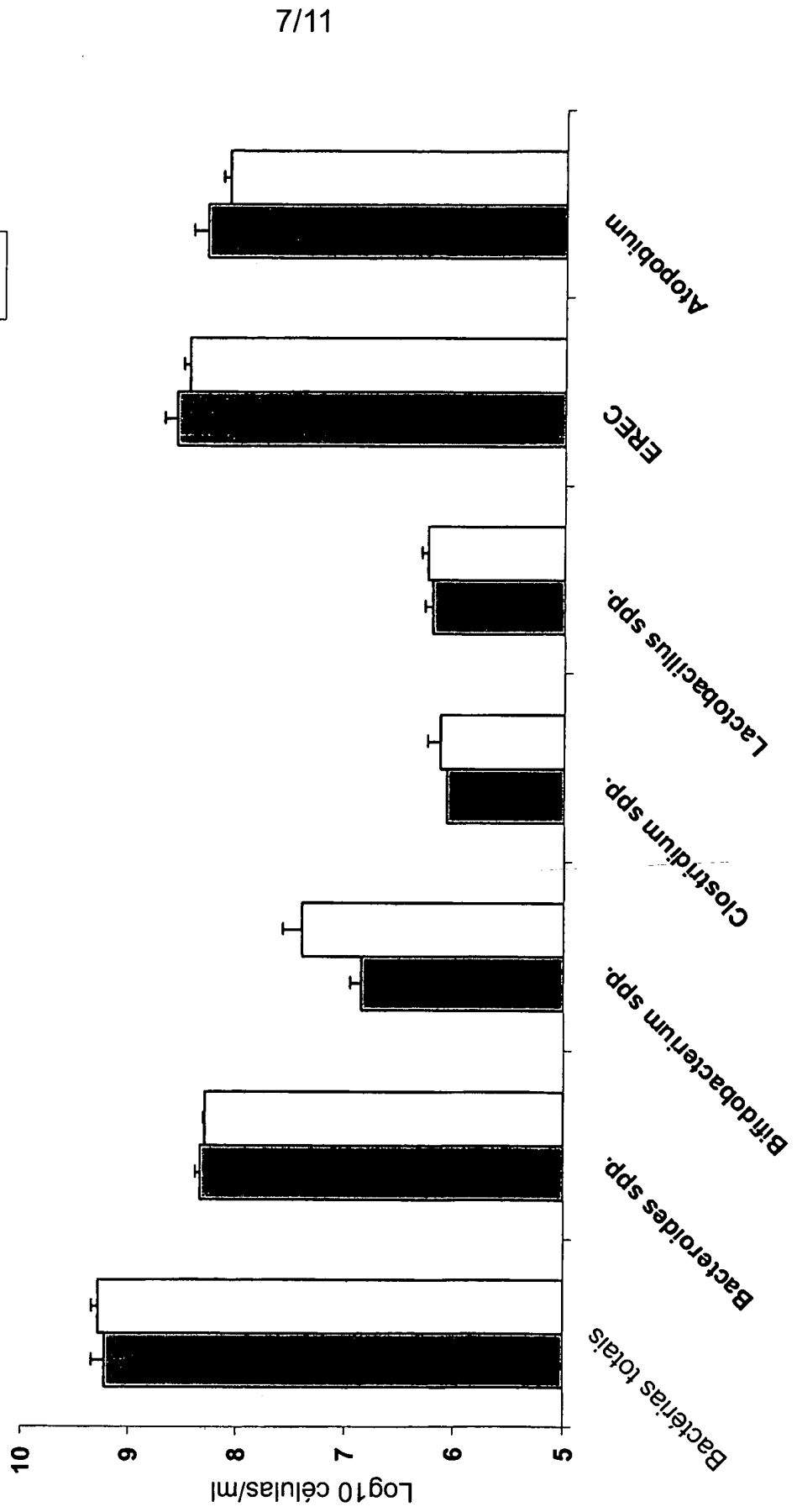
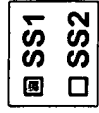


FIG. 9



■ SS1
□ SS2

FIG. 10

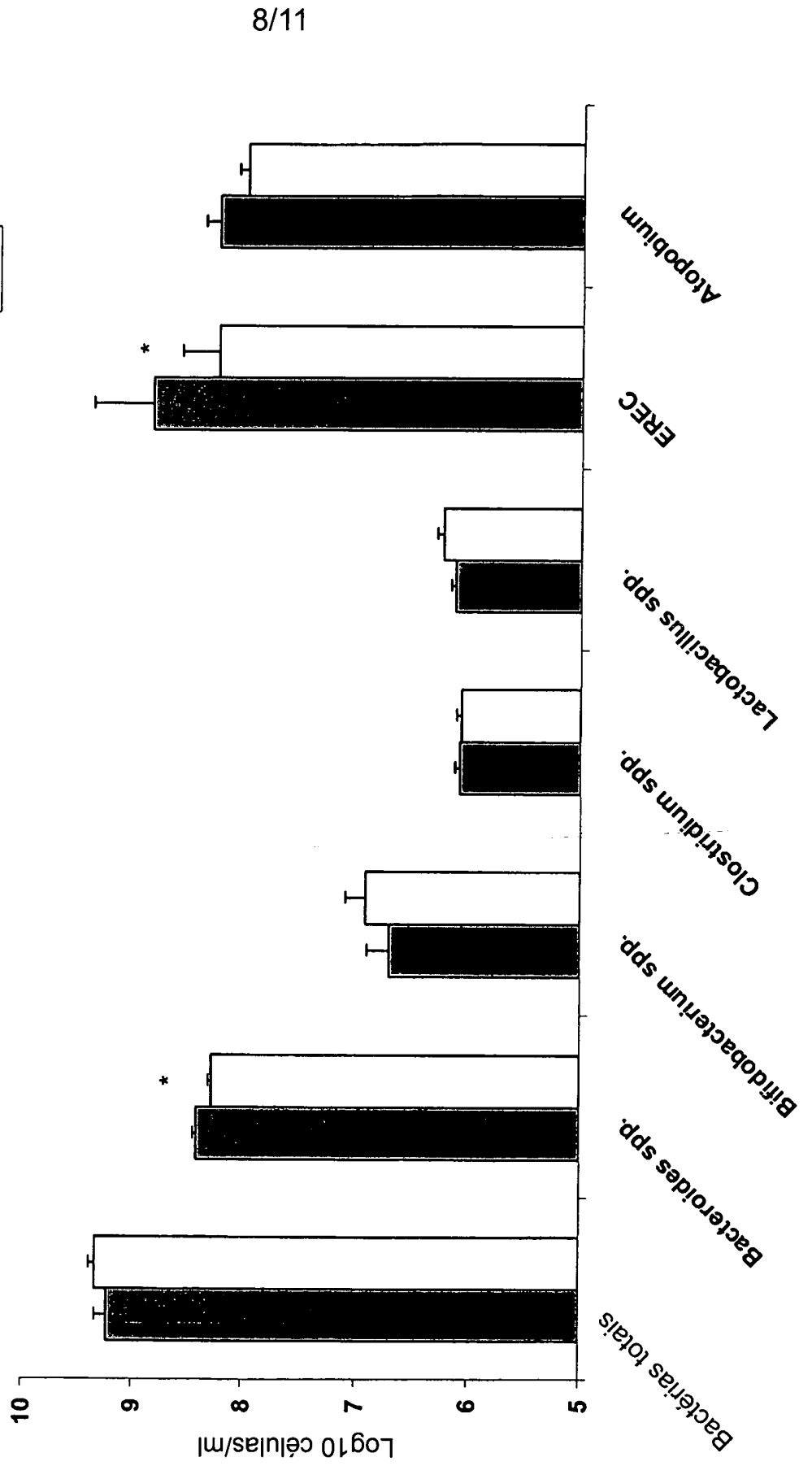


FIG. 11

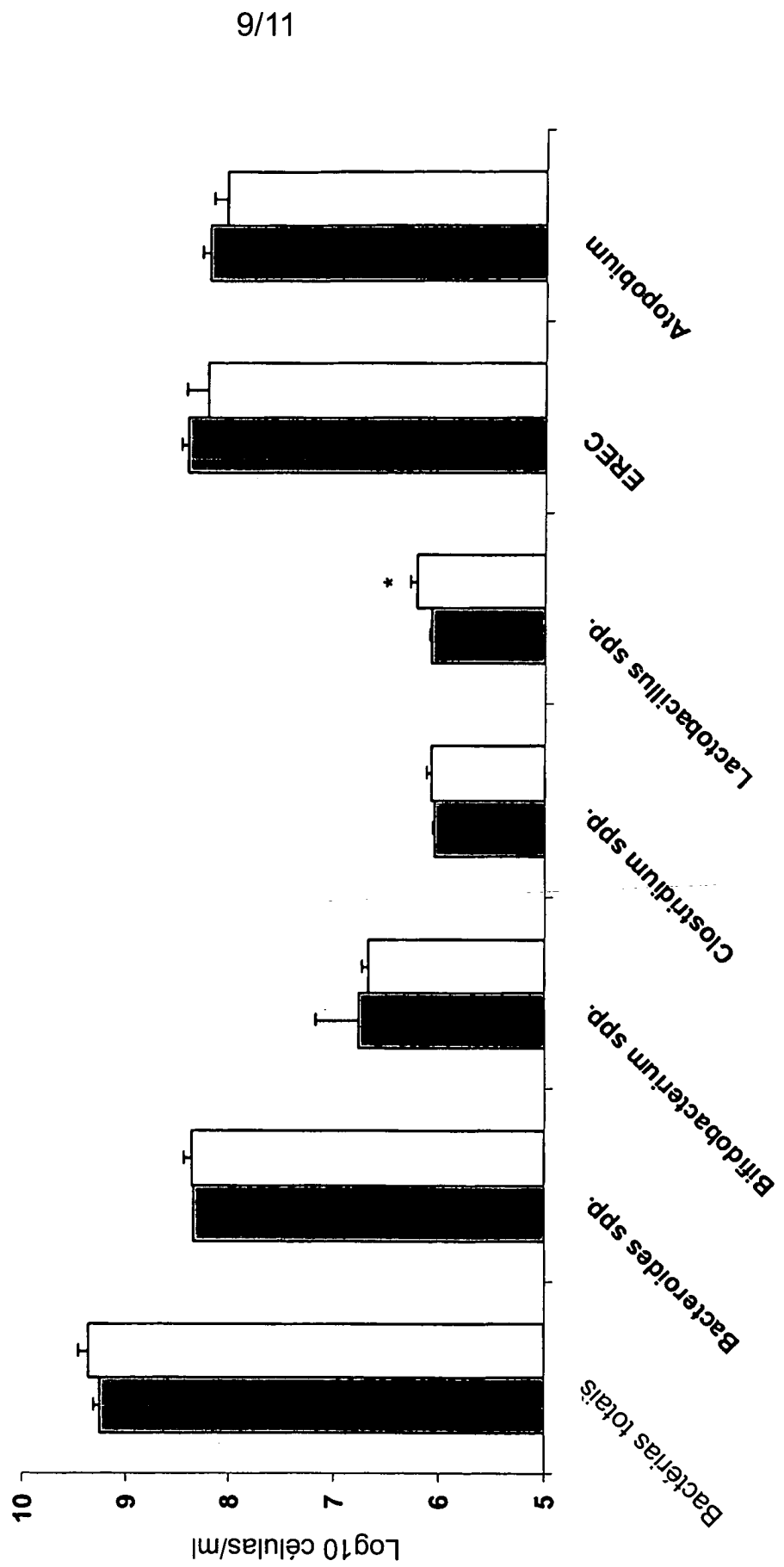


FIG. 12

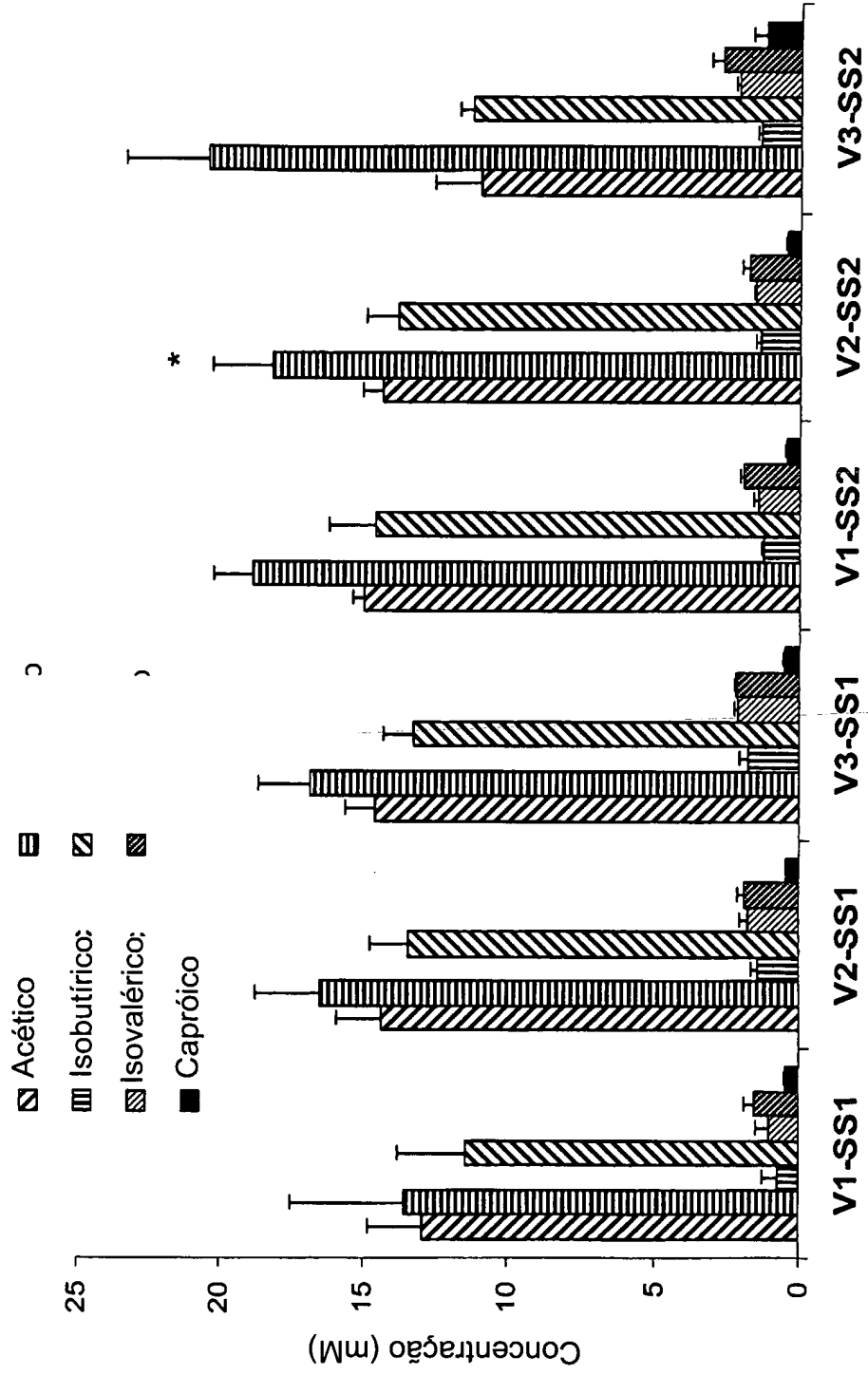
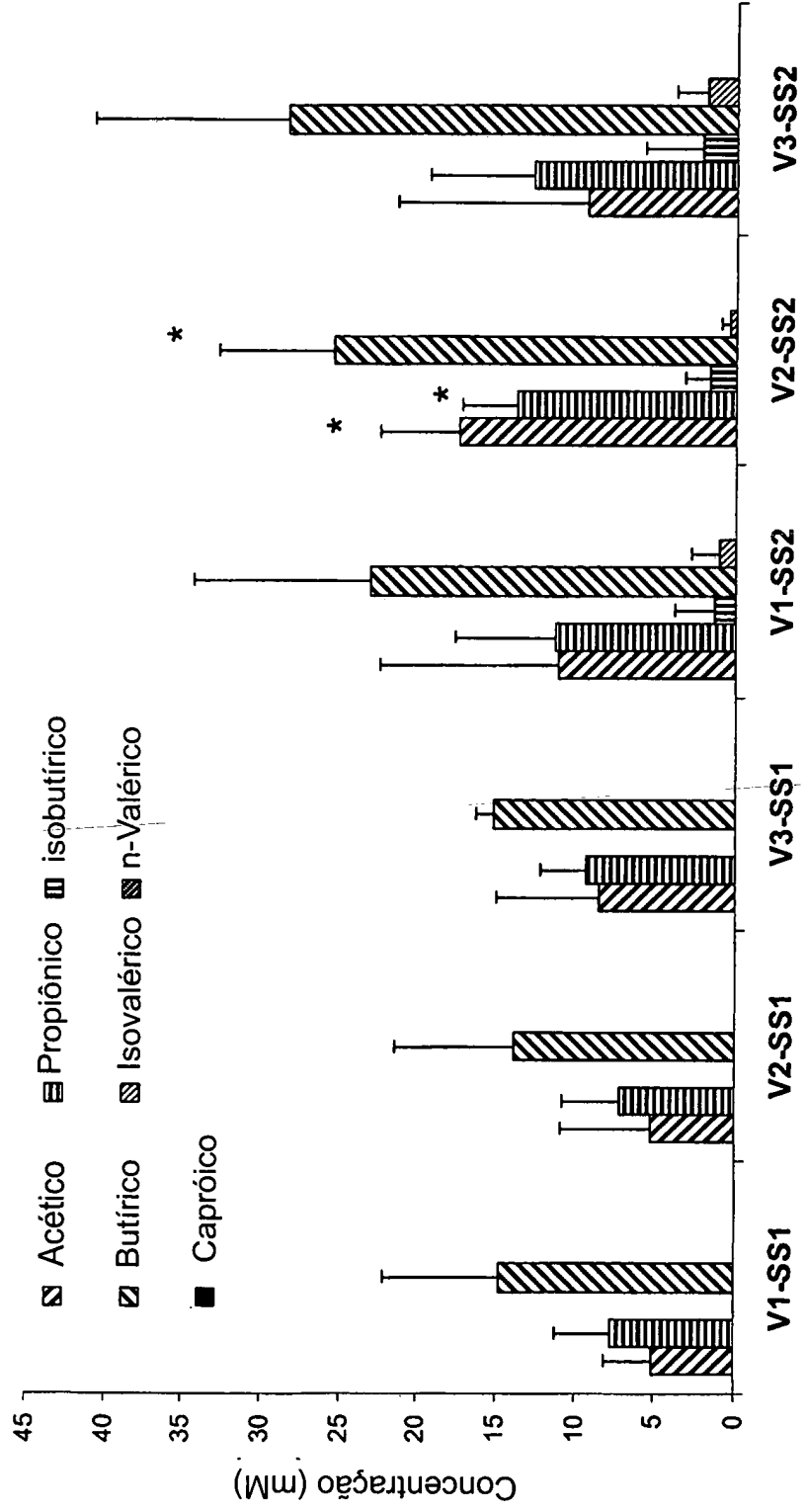


FIG. 13



RESUMO

Patente de Invenção: "INULINA DE CADEIA LONGA, PROCESSO PARA
OBJEÇÃO DA MESMA, GÊNERO ALIMENTÍCIO, SUPLEMENTO DE DIETA,
PREPARAÇÃO COSMÉTICA, USO DA INULINA, PASTA AQUOSA DE
5 INULINA E USO DA MESMA".

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