



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

(11) PI 0703206-4 B1

(22) Data do Depósito: 09/07/2007

(45) Data de Concessão: 05/06/2018



(54) Título: PROCESSO DE HIDRÓLISE PARCIAL CÍTRICA OU FOSFÓRICA DE INULINA PARA A OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS-FOS

(51) Int.Cl.: C08B 37/18; C13K 11/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

(72) Inventor(es): JOSÉ DOMINGOS FONTANA; MAURÍCIO PASSOS; ADELIA GRZYBOWSKI

72

“PROCESSO DE HIDRÓLISE PARCIAL CÍTRICA OU FOSFÓRICA DE INULINA PARA A OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS - FOS”

A presente invenção se refere ao emprego de ácido cítrico
5 $C_6H_8O_7$ e / ou alternativamente de ácido fosfórico H_3PO_4 , rotineiramente diluídos e aquecidos, como catalisadores alternativos aos ácidos minerais fortes como o clorídrico e sulfúrico ou enzimas ditas inulinasas ou frutofuranosidasas para fins da hidrólise parcial de inulina e polifrutoses assemelhadas com o objetivo preferencial de produção de fragmentos
10 hidrolíticos designados de frutooligossacarídeos - FOS e de um teor reduzido de frutose monomérica livre e um teor ainda mais reduzido de co-produtos de degradação como o hidroximetilfurfural - HMF, situação esta que é conseqüência da escolha de parâmetros cinéticos de hidrólise tais como potencial hidrogeniônico ou pH operacional mais brando na faixa
15 preferencial de pH de 1,75 a 2,75 combinado a temperaturas mais amenas do que a de ebulição da água, na faixa preferencial de 75°C a 90°C e tempos de aquecimento na faixa de 5 a 30 minutos, partindo-se de concentração de substrato ou polifrutose entre 1g% e 60g%.

Os polímeros à base de frutose ou levulose, sinopticamente
20 frutopolissacarídios, polifrutoses ou frutanas, podem ser classificados em:
a) inulinas (ou sua variação de menor peso molecular, os frutooligossacarídios ou FOS mais propriamente designados de frutooligômeros) que ocorrem em plantas, algas e bactérias nas quais a união das unidades de frutose em forma furanosídica se dá, essencialmente
25 de forma linear, através de ligações do tipo β -2,1; b) as levanas que

ocorrem em bactérias e gramíneas nas quais tais ligações inter-frutose se dão por ligações do tipo β -2,6 e c) o subgrupo das graminanas, pelo critério de estrutura polissacarídica e não pelo tipo botânico de fonte de origem, pois são polifrutoses altamente ramificadas – misto de ambos tipos de

5 ligações - e oriundas de gramíneas. Para os fins deste pedido de patente de invenção, em linguagem mais concisa os considerandos e pleitos serão baseados em inulinas posto serem os frutopolissacarídios mais bem conhecidos e de mais ampla aplicação industrial tais como as inulinas obtidas, por exemplo, de dália, chicória, batata yacon , aspargo, alho-poró

10 dentre outras fontes de maior conteúdo nativo em inulina. Uma particularidade estrutural de uma inulina nativa, ou seja, quimicamente integral é que ela, independentemente do numeroso conjunto de unidades de frutose, contem uma única unidade inicial de glucose, como reminiscência do processo de biossíntese que principia com a sacarose, ou seja, um

15 dissacarídeo de glucose e frutose. A literatura e a linguagem industrial no campo da nutrição humana vêm consagrando a expressão “FOS” ou frutooligossacarídios para os oligossacarídios derivados de inulina constituídos exclusivamente de frutose unida por ligações β -2,1 tais como a

20 cestose (um frutotrissacarídeo), nistose (um frutotetrassacarídeo) e frutosilnistose (um frutopentassacarídeo) embora o termo FOS, na acepção correta do ponto de vista químico, deva abranger outros oligossacarídios similares tais como aqueles em que a glucose permaneça unida a duas ou

25 mais unidades de frutose ou mesmo a mesma série de oligofrutoses puras mas unidas por ligações do tipo β -2,6 ou seja oriundas da fragmentação hidrolítica de levanas. A dimensão molecular de uma inulina ou seus

derivados mais simples pode ser expressa pelo grau de polimerização – GP, acrônimo vernáculo para o consagrado na língua inglesa como DP – *Degree of Polymerization*, que corresponde, para as polifrutoses, ao número de unidades de frutose ou mais propriamente resíduos de frutose. Nas inulinas o GP médio se situa entre 10 a 60, e apenas excepcionalmente se aproxima ou ultrapassa 100. Há, todavia, a ocorrência de oligofrutoses de GP muito baixo tais como < 5 , como é o caso da população de oligofrutossacarídeos presentes em bananas maduras. O nome inulina foi adotado a partir do primeiro isolamento do polissacarídeo obtido no extrato aquoso a quente da planta *Inula helenium* conforme Rose, V., Über eine eigenthümliche vegetabilische Substanz, *Gehlens Neues Allgem. Jahrb. Chem.* 3, 217, 1804. É muito antigo - 1874 - o primeiro registro de propriedades terapêuticas da inulina de dália ou seja a redução de açúcar livre - glucose - na urina de diabéticos após a ingestão de 50 a 120 g de tubérculos de dália / dia conforme Külz, E. *Beitrage zur Pathologie und Therapie der Diabetes, Jahrb. Tierchem.*, 4, 448, 1874. Diferentemente das inulinas de origem vegetal que são de baixo grau de polimerização, por exemplo, GP = 10 a 60, o GP da inulina bacteriana pode variar desde 10.000 até 100.000 unidades frutose e é bem mais ramificada, na ordem de 15%. Em chicória *Cichorium intybus* e alcachofra de Jerusalém *Helianthus tuberosus*, 83 e 94% das cadeias, respectivamente, tem GP < 40 . Estes dois vegetais da família Asteraceae ou Compositae juntamente com a dália *Dahlia* spp. são as três fontes mais importantes para o processamento industrial de inulinas. Nas duas primeiras fontes o teor de inulina – base úmida - nas raízes úmidas pode alcançar 17% e na dália um pouco menos.

75

Devido à configuração β entre as unidades frutósila, a inulina é resistente à hidrólise por ação das hidrolases do trato gastro-intestinal superior humano e daí sua classificação como fibra não digestível. A inulina é, todavia, totalmente hidrolisada e fermentada ao nível do intestino grosso. O destino

5 catabólico da inulina é então 78% como SCFAs (*Short Chain Fatty Acids*) ou ácidos graxos de cadeia curta na proporção de acetato : propionato : butirato = 64 : 21 : 15, 15% como lactato e 5% como etanol, formato e anidrido carbônico. Se computada a formação da própria biomassa bacteriana, o destino da frutose se repartiria em 40% de biomassa bacteriana

10 ou seja principalmente bifidobactérias, 40% de SCFAs, 15% lactato e 5% de subprodutos menores. Sendo fermentada no intestino grosso ao invés de ser metabolizada no trato digestivo anterior, a inulina tem um conteúdo energético válido de apenas 37% da frutose ou seja apenas 1,5 Kcal / g ou 6kJ/g ao invés de 3,75 kcal/g ou 15,7 kJ/g conforme Roberfroid, M. B.,

15 Slavin, J., Nondigestible oligosaccharides, *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 40, 461–480, 2000 e Bergman, E. N., Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species, *Physiol. Rev.*, 70, 567–590, 1990 e ainda conforme FASEB / LSRO, The evaluation of energy of certain sugar alcohols used as food ingredients, Life Science Research

20 Office, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, MD, 1994. Os SCFAs e especialmente o butirato, desempenham um papel essencial na integridade da mucosa colônica e na proliferação e diferenciação de diferentes tipos de células epiteliais. O catabolismo da inulina provoca no ceco e cólon uma acidificação significativa que é, em

25 média, de 0,9 unidades de pH conforme Sakata, T., Stimulatory effect of

short chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors, *Br. J. Nutr.*, 58, 95-103, 1987. FOS – FrutoOligoSacarídeos com GP entre 2 e 7 - além de frutose livre -

5 preparados por hidrólise enzimática de inulina são comercializados com as designações de Raftilose pela Orafiti Ltd. na Bélgica ou Frutafit pela Imperial-Suikner Unie, na Holanda. Outra família de FOS - frutooligossacarídeos, obtida por transfrutossilacção da sacarose, com GP até

10 5, são comercializados como Neosugar, Profeed, Meioligo e Nutraflora pela Meiji Seika Ltd do Japão e como Actilight pela Béghin-Meiji Industries na Europa. Os FOS – frutooligossacarídeos são reconhecidos, nos Estados Unidos, como GRAS ou seja *Generally Regarded as Safe* ou Geralmente Tidos como Seguros. Além de estimuladores da flora bifidobacteriana do cólon, os FOS - frutooligossacarídeos também previnem

15 a cárie dentária quando substituem a sacarose da dieta e estão implicados na redução dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos. Os FOS - frutooligossacarídeos e mais especificamente a mistura de cestose, nistose, frutosilnistose, representados na Figura 3, e membros de maior GP da mesma série apresentam cerca de um terço do poder edulcorante da

20 sacarose mas diferentemente desta não são considerados carboidratos calóricos pois seu metabolismo se dá exclusivamente no trato digestivo final ou cólon onde existe a microflora bacteriana apta a hidrolisá-los, já que os FOS - frutooligossacarídeos não são hidrolisados pelas enzimas hidrolíticas humanas conforme Passos L. M. L. and Park Y. K..

25 Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em

alimentos. *Cienc. Rural* vol.33(2), 385-390, 2003. Estudos clínicos têm demonstrado que a alimentação com FOS – frutooligossacarídeos ou inulina aumenta a população de bactérias amigáveis no cólon tais como o gênero *Bifidobacterium* e em menor extensão o gênero *Lactobacillus* enquanto

5 simultaneamente há uma redução da população de bactérias ditas potencialmente daninhas ou patogênicas como o gênero *Clostridium* e outros coliformes como os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* conforme Gibson G.R., Beaty E.R., Cummings J.H.. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin.

10 *Gastroenterology* 108 : 975-82,1995 e Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR & Rastall RA. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol.* 2001 91:878-87.

Outros benefícios resultantes da ingestão de FOS - frutooligossacarídeos e / ou inulina são o aumento da produção no cólon de ácidos graxos de cadeia

15 curta como o butirato, absorção aumentada de cálcio e magnésio e eliminação melhorada de compostos tóxicos conforme Tomomatsu H.. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology*, October: 61-5 1994.

No que tange ao ácido butírico gerado por bifidobactérias fermentando FOS - frutooligossacarídeos ou inulina, cabe ressaltar que o butirato provê 70%

20 da energia das células epiteliais colônicas ou colonócitos e sem este aporte de energia os colócitos atrofiam com a conseqüente perda da integridade da barreira da mucosa o que então permite a danosa translocação de bactérias, inclusive as patogênicas conforme Cummings J.H. & Macfarlane G.T.. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin. Nutr.* 1, 16:3-11, 1997.

25 butirato adicionalmente reverte a resistência à apoptose ou morte

programada em células colônicas cancerosas conforme Bornet FR & Brouns F. Immune-stimulating and gut health-promoting properties of short-chain fructo-oligosaccharides. *Nutr Rev.* 2002 60:326-34 e aumenta a imunogenicidade e em combinação com interleucina 2 causa completa
5 limpeza do carcinoma de cólon induzido em ratos conforme Perrin P., Cassagnau E. & Burg C.. An interleukin 2 / sodium butyrate combination as immunotherapy for rat colon cancer peritoneal carcinomatosis. *Gastroenterology* 107:1697-1708, 1994, cabendo ainda apontar que os FOS - fructooligosacarídeos também são utilizados como prebióticos na
10 alimentação de suínos e aves conforme Fishbein, L., Kaplan, M., Gough, M. Fructooligosaccharides: a review. *Vet. Hum. Toxicol*, Washington, v.30 (2), 104–107, 1988. As bifidobactérias, uma vez alimentadas com estas oligofrutoses ou oligossacarídeos de frutose secretam um peptídeo que é inibitório para a maioria dos microrganismos patogênicos causadores de
15 diarreia aguda conforme Wang, X., Gibson, G. R., Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine, *J. Appl. Microbiol.*, 75,373–380, 1993. A possibilidade de que inulina ou fructooligosacarídeos – FOS - possam ser de utilidade na prevenção de neoplasias malignas ou câncer foi extensivamente testada em
20 ratos e camundongos pré-expostos a DMH - dimetilhidrazina ou seu derivado alquilado AOM - azoximetano que atingem preferencialmente o cólon e ali danificam o ácido desoxirribonucléico - DNA - gerando então o início de um processo de carcinogênese. Nas semanas iniciais surgem as fossas crípticas aberrantes - ACFs - na mucosa e nas seguintes, os tumores.
25 Em paralelo aos controles, animais receberam inulina ou oligofrutoses na

condição de prebiótico ou *Bifidobacterium* sp. ou *Lactobacillus* spp. na
condição de probiótico ou ainda a mistura de prebiótico e probiótico, ou
seja, um simbiótico. Os resultados mostraram que a inulina reduziu o risco e
ocorrência quantitativa de ACFs e de tumores de longo termo e portanto do
5 câncer de cólon sendo que a inulina de maior peso molecular foi mais
eficiente do que as oligofrutoses e a administração de simbiótico é ainda
mais eficiente do que a inulina isolada conforme Magnuson, B., Carr, I.,
Bied, R. P., Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic
tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.*, 53, 4499–4504, 1993.

10 A solubilidade da inulina em água é limitada com um
máximo de 10% à temperatura ambiente mas aumenta bastante com
aquecimento, enquanto que a de FOS – frutooligossacarídeos pode alcançar
80%. No que tange ao poder edulcorante, a inulina é muito levemente doce
ou seja apenas 10% do poder adoçante da sacarose enquanto que os
15 frutooligossacarídeos alcançam 35%. A inulina apresenta sinergia com a
maioria dos agentes gelificantes como gelatina, alginato, k- e i-
carragenanas, goma gelana e maltodextrinas. A inulina melhora a
estabilidade de espumas e emulsões como sobremesas aeradas ou *mousses*,
sorvetes e molhos conforme Franck, A., Coussement, P., Multi-functional
20 inulin, *Food Ingred. Anal. Int.*, October, 8–10, 1997. Algumas aplicações
em tecnologia de alimentos para a inulina e oligofrutoses ou FOS –
frutooligossacarídeos são: produtos lácteos, sobremesas congeladas, pastas e
geléias, pães e outros panificáveis, cereais para desjejum, preparações à
base de frutas, produtos cárneos e chocolate. Os efeitos visados são o corpo

e palatabilidade, estabilidade de espumas e emulsões, substituição de sacarose, sinergia com adoçantes sintéticos, textura e ponto de fusão, retenção de umidade, substituição de gorduras e resistência ao calor. A detecção do perfil cromatográfico total das sub-populações de inulinas e oligofrutoses ou FOS é levada a cabo através de cromatografia líquida de alta resolução em coluna de troca iônica e detecção amperométrica de pulso, técnica consagrada como HPAEC-PAD. Com este método a frutana ou inulina total extraída de chicória exhibe, além de glucose, frutose e sacarose, um total de até 60 picos distintos. Já a despolimerização hidrolítica parcial da inulina, como por exemplo aplicando o escopo deste pedido de patente que é a hidrólise cítrica ou fosfórica, fornece um cromatograma muito mais simplificado como exemplificado nas Figuras 6 e 7. As fibras dietéticas são materiais vegetais, a maior parte advindo de paredes celulares e que tem como natureza química carboidratos, que diferem nas propriedades físicas, químicas e fisiológicas mas que não podem ser digeridos pelas enzimas humanas e portanto não são absorvidas como tal embora possam ser metabolizadas pela microflora do ceco e do intestino grosso. São pois os seguintes os atributos das fibras dietéticas: componentes das células vegetais comestíveis; carboidratos do ponto de vista químico; resistentes à hidrólise pelas enzimas humanas de absorção no nível de duodeno e jejuno; passíveis de hidrólise e fermentação parcial ou total no cólon conforme Kritchevsky, D., *Dietary fibre, Annu. Rev. Nutr.*, 8, 301–328, 1988.

Não obstante a extensiva consagração na literatura de hidrólises ácidas de polissacarídeos, os ácidos minerais fortes clorídrico HCl

81

e sulfúrico H_2SO_4 vão entrando em progressiva obsolescência para este fim e isto por conta de novos insumos hidrolíticos facultados pela Biotecnologia, quais sejam as enzimas hidrolíticas e específicas tais como amilases, celulasas, hemicelulasas e pectinases, dentre outras, em que pese

5 o componente de custo, mais elevado na alternativa enzimática. Há contudo, relato muito recente do uso de ácido sulfúrico para a hidrólise de inulina em autoclave – 121°C; 15 min – conforme Saha, B.C., *Enzyme and Microb. Technology*, 39(5), (2006) 991-995. Sem necessidade de avançar mais do que está descrito no *The Merck Index – 10th edition*, o ácido

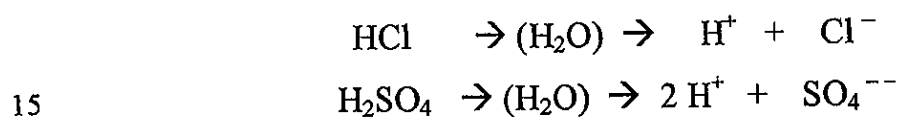
10 clorídrico mesmo na solução mais concentrada possível não ultrapassa 38% e nesta condição pode provocar queimaduras severas além desprender vapores fumegantes e tóxicos, o que limita sua manipulação pelo homem, dado o risco de dano ocular, dermatites e fotossensibilização no contato dentro do ambiente industrial. Outra limitação, quando se pretende a

15 recuperação do HCl é a formação de azeótropo com a água, agravada pela temperatura de ebulição constante que sobe a 108,6°C por conta dos 20,2% de HCl presente. Todavia, é ainda um reagente analítico clássico para a hidrólise da renitente da ligação peptídica de proteínas e curiosamente, na

20 forma diluída que corresponda a pH na faixa de 2, compõe o suco gástrico do homem, com a ressalva de que nesta condição de acidez somente é encontrado no estômago. Na mesma fonte bibliográfica, o ácido sulfúrico já

25 faculty concentração comercial na faixa de 93 a 98% o que o torna, nestas condições, extremamente corrosivo e intensamente afim de água, o que explica a facilidade com que desidrata e carboniza a madeira e outros substratos biológicos enriquecidos em água e hidrogênio, como é também o

caso das polifrutoses. O derrame de água sobre o ácido concentrado provoca reação fortemente exotérmica e ejeção da massa líquida, razão pela qual se recomenda, na diluição, a operação inversa ou seja adição lenta e cautelosa do ácido sulfúrico sobre a água. É corrosivo para todas as partes do corpo e a inalação de vapores, no caso de ácido concentrado saturado com anidrido sulfuroso que lhe dá origem, causa dano pulmonar sério, além do que o contato com os olhos pode resultar em perda total da visão e na pele causa necrose. Mesmo o contato com soluções diluídas, se freqüente, tem causado dermatites. Por conta das razões brevemente expostas, o uso dos ácidos clorídrico e sulfúrico no âmbito laboratorial e industrial, requer extremo cuidado. São designados de ácidos fortes por conta da pronta e completa dissociação de prótons quando em meio aquoso: ou seja não são definíveis em termos de pKa(s) :

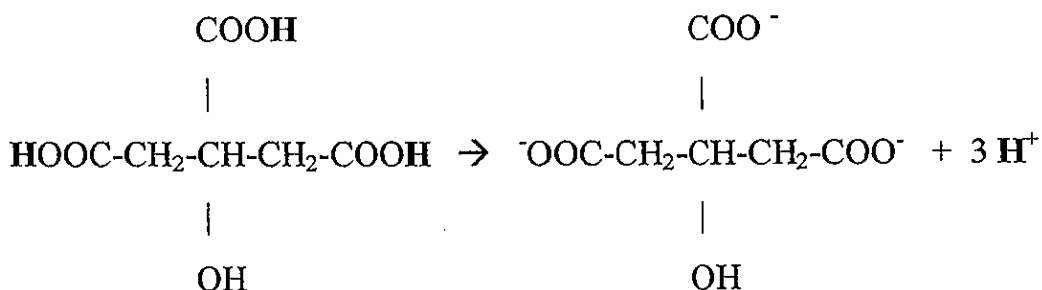


Por conta desta força hidrogeniônica estes ácidos mesmo em solução diluída, se não controlado o aquecimento e tempo de reação promovem a degradação dos açúcares livres – e ainda mais facilmente da frutose, um cetoaçúcar – até furfural (caso das pentoses como xilose e arabinose) ou até hidroximetilfurfural (caso das hexoses como glucose, frutose e manose). Por esta razão podem até ser empregados para a preparação industrial de hidroximetilfurfural – HMF ou seja hexoses triplamente desidratadas, um insumo importante para a indústria química de aldeídos, glicóis, éteres, aminoácidos e acetais, mas sendo o HMF altamente indesejável se presente, como subproduto de degradação, na preparação de frutose ou seus

83

frutooligossacarpídeos – FOS quando se usa a hidrólise catalisada por ácidos. Aqui não se faz ênfase a um terceiro ácido forte, o ácido nítrico HNO_3 , pois sua forma concentrada acumula e libera vapores amarelo - avermelhados mutagênicos de dióxido de nitrogênio NO_2 e tetróxido de nitrogênio N_2O_4 , considerados gases dos mais insidiosos, razão pela qual uma das formulações comerciais do ácido nítrico é de apenas 65%. A presente invenção explora então catalisadores ácidos ou doadores de prótons mais facilmente administráveis – caso dos ácidos cítrico ou fosfórico - todavia sem perda da capacidade hidrogeniônica passível de ser explorada para a quebra hidrolítica de ligações polissacarídicas mais lábeis como é o caso das polifrutoses inulina e levana. Exatamente nisto se fundamenta o ato de inovação ou atividade inventiva, ficando o estabelecimento das condições ótimas para o objetivo principal – qual seja obter frutooligossacarídeos – FOS como produtos dominantes e não frutose livre como tal – por conta da cuidadosa manipulação dos demais parâmetros cinéticos, tais quais pH efetivo de cada ácido no ato de hidrólise, temperatura de aquecimento e tempo de reação. O ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ é produto de fermentação industrial usando cepas selecionadas do fungo *Aspergillus niger* e também pode ser extraído de frutas como laranja e maçã, correspondendo a um triácido com $\text{pK}_{a1} = 3,13$, $\text{pK}_{a2} = 4,76$ e $\text{pK}_{a3} = 6,40$ ou seja dissocia sequencialmente 3 prótons a cada molécula em ionização - o primeiro deles mais ácido - conforme equação simplificada abaixo:

84



5 O ácido cítrico é também amplamente encontrado nos reinos vegetal e animal em vista de ser o metabólito de entrada do ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos, atuante no metabolismo da quase totalidade dos organismos vivos conforme consta em qualquer livro-texto de Bioquímica

10 como conhecimento universal. Na forma pura é um sólido cristalino e a 20°C já alcança 59,2% de solubilidade em água, o que incrementa para 84% quando a água entra em ebulição. As soluções diluídas são agradavelmente ácidas de acordo ao Index Merck e daí sua indicação para compor alimentos, bebidas e até medicamentos como acidulante, co-reagente de

15 tabletes efervescientes e até como anti-oxidante sinérgico ou ainda melhor na co-formulação de frutooligossacarídeos como se defende neste pedido de patente de invenção, já que o catalisador cítrico não precisa ser necessariamente eliminado após a hidrólise de inulina. Contrariamente, hidrolisados ácidos de polissacarídeos mais comuns como amido, quando se

20 utiliza ácido sulfúrico ou clorídrico, usualmente requerem uma etapa a mais ou seja a eliminação do catalisador ácido forte seja na forma de precipitados insolúveis como é o caso do sulfato de cálcio para o ácido sulfúrico ou via emprego de resinas de troca iônica como é o caso de ambos ácidos fortes. O ácido fosfórico, mais precisamente ácido ortofosfórico, H_3PO_4 , é

25 comercializado mais frequentemente com um teor de 85%, p/v, densidade

entre 1,69 e 1,71, xaroposo, estável, relativamente inerte à temperatura ambiente, correspondendo a um triácido com $pK_{a1} = 2,15$, $pK_{a2} = 6,82$ e $pK_{a3} = 12,38$, em valores logarítmicos derivados das respectivas constantes de dissociação dos hidrogênios na forma de prótons ou seja, tal qual o ácido cítrico, libera também sequencialmente os 3 prótons de cada molécula em meio aquoso:



- 10 O Index Merck lhe atribui sabor ácido agradável quando convenientemente diluído ou seja, tal qual o ácido cítrico, apresenta propriedades organolépticas compatíveis com bebidas, alimentos e medicamentos, razão pela qual o autor principal desta invenção (J. D. Fontana) já fez uso do ácido fosfórico para a hidrólise controlada de amidos com o objetivo de
- 15 obter tanto glucose quanto maltooligossacarídeos como está detalhado no pedido de patente ao INPI de registro PI 0002001-0 publicado na Revista da Propriedade Industrial número 1617 de 2 de janeiro de 2002 na pagina 132, o que obviamente, corresponde a outro tipo de substrato polissacarídico da biomassa e também a outros produtos de hidrólise do ponto de vista de
- 20 definição química além do emprego de parâmetros cinéticos muito mais severos por conta de o amido ser um polímero muito mais ácido-resistente do que a inulina ou levana frente à hidrólise ácida. Os sais do ácido fosfórico estão amplamente disseminados nos seres vivos na forma de ácidos nucleicos, coenzimas e açúcares fosforilados além de fosfatos
- 25 minerais como tal (ossos) e são assimiláveis por humanos, animais e

microrganismos a partir de variadas fontes vegetais e animais pois também constituem o principal sistema tamponante mineral do sangue e plasma. Ao ácido fosfórico, mesmo concentrado, não se atribui os danos antes apontados para os ácidos clorídrico e sulfúrico, embora a solução

5 concentrada possa irritar a pele e mucosas. O processamento hidrolítico de polissacarídeos de biomassa com os ácidos cítrico e / ou fosfórico – como a inulina, aqui defendido - é pois vantajoso pois consumada a hidrólise estes catalisadores não precisam ser obrigatoriamente eliminados dos hidrolisados como é o caso dos hidrolisados feitos com ácidos clorídrico ou

10 sulfúrico uma vez que os ácidos cítrico e fosfórico são aceitos e amplamente utilizados como acidulantes e / ou flavorizantes em vários alimentos e bebidas como reportado no The Index Merck, 10ª. edição, verbetes 7228 e 2297 respectivamente nas páginas 330 e 1059. De fato pode se encontrar ácido cítrico e fosfórico ou seus sais em alimentos comerciais

15 tais como os iogurtes Original da Yoplait USA Inc., de Minneapolis, Minnesota, USA e Creamy Fruit Blends da Dannon Co., Inc., USA comercializados nos Estados Unidos da América e mesmo em pastas dentífricas nacionais como Sensitive e Prevent Anti-Placa ambas da Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, de São Bernardo do Campo,

20 São Paulo, Brasil.

No que tange particularmente a hidrólise de inulina e polifrutoses assemelhadas, estas podem ser parcial ou totalmente hidrolisadas até frutose, e inulooligossacarídeos, respectivamente, se usando duas alternativas: A. hidrólise enzimática e B. hidrólise ácida. Para fins de

25 hidrólise enzimática as inulinases ou β -frutofuranosidades mais empregadas

são aquelas obtidas do fungo do gênero *Aspergillus*. Tendo em conta o mecanismo de reação hidrolítica e a natureza dos produtos liberados na reação, há dois tipos de inulinases: as exoinulinases que liberam sucessivamente resíduos de frutose e, portanto são monomerizantes e as

5 endoinulinases, que hidrolisam a molécula de inulina quebrando ligações frutósídicas ao acaso e gerando inulotriose, inulotetraose e inulopentaose e a série subsequente ou seja frutooligossacarídeos – FOS como produtos principais de hidrólise. O fungo *Aspergillus ficuum*, por exemplo, produz os dois tipos de inulinases conforme W. Jing, J. Zhengyu, J. Bo and A.

10 Augustine. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum* *Process Biochemistry* 39 (1), 5-11, 2003. Quando não há interesse na produção ou co-produção de frutose e sim apenas na produção de frutooligossacarídeos – FOS as enzimas deste mesmo fungo exigem uma etapa preliminar de purificação das endoinulinases conforme J.

15 Zhengyu, W. Jing, J. Bo and X. Xueming. Production of inulo-oligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Research International* 38 (3) 301-308, 2005. Opostamente, quando é visada a produção exclusiva de frutose, são as exoinulinases o objeto de prévia purificação, como no caso de *Aspergillus fumigatus*, que podem

20 inclusive ser immobilizadas para aumentar a termoestabilidade conforme Gill P.K., Manhas R.K. and Singh P. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Food Engineering* 76 (3): 369-375, 2006. A produção industrial de enzimas e ainda mais seu isolamento e / ou purificação são

25 procedimentos de alto custo como é do conhecimento científico e

88
E

tecnológico básicos, pois se trata de uma população molecular nobre ou seja as proteínas com atividade enzimática. Como tais processos envolvem seleção de microrganismos, manipulação gênica ou mesmo transgênese, os custos dos produtos finais, as enzimas, são proporcionalmente elevados e, portanto muito acima de catalisadores minerais simples mas que nem por isto deixam de comportar elemento inovador tais como os ácidos cítrico e fosfórico, propostos e defendidos neste pedido de patente. A título de exemplo, a companhia Sigma-Aldrich, uma das maiores provedoras mundiais de reagentes, cotizava, em junho de 2007, três produtos ilustrativos produzidos por sua fornecedora BioChemika Ultra, quais sejam: 50 mg de pó bruto de inulinase de *Aspergillus niger* contendo 25 unidades de enzima / mg por US\$ 107.50 enquanto o preço de 50 g – massa 1.000 vezes maior – de ácido cítrico 99,5% puro era de US\$ 18.70 e um volume ainda maior de ácido fosfórico 85% ou seja, 250 mL, valia apenas US\$ 38.10. Outra fonte de inulinases são as leveduras e principalmente aquelas do gênero *Kluyveromyces*. Em *K. marxianus*, o teor secretado de inulinase pode ser aumentado em 5 a 6 vezes quando se usa inulina caproilada como indutor conforme relatado pelo autor principal deste pedido de patente em Fontana J.D. , Baron M., Diniz A.C.P., Franco V.C. “Microbial inulinase secretion using chemically-modified inulins”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45-6: 257-268,1994. O uso de mutantes desta levedura também garante uma atividade inulinolítica aumentada conforme Campos, D. et al (1990). "A multipotential hydrolytic reactor using the yeast *Kluyveromyces marxianus*". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24:25, 511-519. A terceira fonte de inulinases são as bactérias. A partir de 32 isolados de solo

se caracterizou 20 como *Flavobacterium multivorum* produtoras de inulinas ou β -frutofuranosidases ativas tanto em inulina quanto sacarose conforme Allais, J.J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C. and Baratti, J.C. Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity. 5 *Applied and Environmental Microbiology* 52 (5), 1086-1090. Outra fonte bacteriana de enzimas capazes de hidrolisar frutanas, as levanases, é o gênero *Bacillus*. A enzima de *B. subtilis* foi clonada e superexpressa em *Escherichia coli* e manteve a capacidade hidrolítica sobre levana, inulina e sacarose conforme Wanker, E., Huber, A. and Schwab, H. Purification and 10 characterization of the *Bacillus subtilis* levanases produced in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5), 1953-1958, 1995. Uma alternativa para a obtenção de FOS – frutooligossacarídeos que não seja a hidrólise parcial de inulina – enzimática com endoinulinas ou ácida mineral – é a transfrutossilação via enzimática. Para tanto a enzima 15 frutossiltransferase obtida de *Aspergillus oryzae* é incubada com alta concentração de sacarose na faixa de 60%. A baixa atividade de água faz com que um ou mais resíduos frutósila de uma ou mais moléculas de sacarose sejam transferidos para outras moléculas de sacarose criando então preferencialmente tri- e tetrassacarídeos do tipo cestose (G1-F2; 20 monoglucose-difrutose) e nistose (G1-F3; monoglucose-trifrutose) ou conforme Sangeetha P. T., Ramesh M. N. and Prapulla S. G.. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. *Process Biochemistry* 40(3-4),1085-1088, 2005. A etapa de preparação prévia da transfrutossilase é 25 também de alto custo. Um produto da ação hidrolítica de enzimas de

90
P

microrganismos completamente diferente de frutose e seus oligossacarídeos também pode ser obtido usando enzimas bacterianas do gênero *Arthrobacter* e outro isolado bacteriano não taxonomicamente caracterizado, mas ambos diferenciados pela reação de RAPD-PCR –

5 *Random Amplification of Polymorphic DN –Polymerase Chain Reaction.* Tal produto da hidrólise da inulina é o DFA III ou difrutose anidrido III ou seja o menor dos FOS, mas molecularmente desidratado. Trata-se de um dissacarídeo, a inulobiose, que sofre na mesma reação de hidrólise, uma desidratação entre os 2 resíduos de frutose conforme relatado por um dos

10 autores deste pedido de patente em Fontana J.D., Rogelin R., Kaiss J., Haully M.C.O., Franco V.C., Baron M. PCR protocol-based and inulin catabolism-based differentiation of inulinolytic soil bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45-6: 269-282, 1994. Estes anidridos de frutose, de poder edulcorante mais singelo do que a frutose livre, também

15 podem surgir como produtos secundários em hidrólises ácidas de polifrutoses ou inulinas, dependendo da severidade dos parâmetros cinéticos.

A sacarose é extremamente lábil à hidrólise ácida conforme J. O'Brien, *Journal of Food Science* 61(4) (1996), 679-682 e se presta como

20 modelo de labilidade sacarídica para inulina – sucessivas unidas β -frutofuranosilas - até mesmo porque a sacarose é a unidade inicial única de inulinas com integridade molecular. Logo, do ponto de vista de inovação no campo da hidrólise ácida de polifrutoses como a inulina, há que se pensar no emprego de ácidos mais suaves e isto é o que exatamente contempla este

25 pedido de patente utilizando então os ácidos cítrico e / ou fosfórico. No

91
Z

tocante à hidrólise ácida de inulina a literatura disponível é escassa seja em razão do avanço experimentado pela via biotecnológica ou enzimática seja por conta da alta labilidade ácida das frutanas $\beta(1\rightarrow6)$ -ligadas e a conseqüente, e também facilitada conversão, em meio ácido, da frutose livre em HMF - HidroxiMetilFurfural por conta de um mecanismo de uma tripla desidratação, a qual ocorre com muito mais facilidade em frutose do que em glucose conforme Antal, M.J., Mok, W.S.L. and Richards, G.N. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from fructose and sucrose. *Carbohydrate Research* 199(1), 91 - 109, 1990.

10 Dado este inconveniente da ação de catalisadores ácidos fortes como os sulfúrico e clorídrico a aplicação de ácidos hidrogenionicamente mais suaves, tais como o cítrico e fosfórico, é desejável e inovadora. Ainda no estado da técnica, a hidrólise ácida forte da inulina de alcachofra de Jerusalém foi efetuada com vistas à produção de inulobiose purificada, um

15 frutodissacarídeo conforme Dickerson A. G. and Moor J.. Purification of inulobiose obtained by acid hydrolysis of inulin. *Carbohydrate Research* 39(1), 162-163, 1975. A mesma matéria-prima foi alvo de hidrólise ácida com vistas à produção de etanol conforme Kim K. and Hamdy M.K.. Acid-

20 hydrolysis of Jerusalem-artichoke for ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 28(1): 138-141, 1986. As hidrólises ácidas com vários ácidos ou resinas e enzimática, com inulinase de *Saccharomyces fragilis*, foram comparativamente aplicadas à alcachofra de Jerusalém com vistas a obter hidrolisados enriquecidos em frutose os mais isentos possíveis de hidroximetilfurfural e de cor para fins de ulterior fermentação alcoólica se

25 concluindo que o método enzimático é mais vantajoso conforme Fleming

S.E. and GrootWassink J.W. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke *Helianthus tuberosus* L. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.*12(1):1-28, 1979. Alternativamente às hidrólises ácidas convencionais, inulina de alcachofra de Jerusalém ou de chicória pode ser transformada, conforme método protegido por patente, em xaropes enriquecidos em frutose ou HFS, acrônimo da língua inglesa para *High Fructose Syrups*, mediante percolação por colunas recheadas com resinas trocadoras de cátions do tipo ácido-forte, combinada a ciclos de aquecimento do eluato acidificado conforme Yamazaki, H. and Matsumoto, K.. Production of fructose syrup United States Patent 4,613,377 ; September 23, 1986. Uma outra alternativa de hidrólise de inulina até frutose é com o emprego de zeólitos ou silicatos complexos. Segundo os autores a hidrólise é preferencial para liberar frutose minimizando a conformação de produtos de degradação conforme Abasaced A. E. and Lee Y. Kinetics of inulin hydrolysis by zeolite LZ-M-8. *Hung. J. Ind. Chem.* 24, 149-154, 1996. Não é objetivo básico deste pedido de patente a produção de xarope de frutose a partir de inulina ou levana. O que se visa, inovadora e preferencialmente, com a catálise cítrica ou fosfórica são fragmentos de inulina de maior grau de polimerização ou seja os frutooligossacarídeos – FOS. Em alguma condição cinética mais severa que resulte em co-produção mais substancial de frutose – seja esta o produto reacional dominante ou não – certamente o procedimento exigirá um passo adicional qual seja o pós-tratamento do hidrolisado com carvão ativo ou outros absorventes com o escopo específico de remover algum teor menor mas inevitável de hidroximetilfurfural – HMF, uma consequência natural de desidratação de

parte da frutose liberada. Por conta das considerações comparativas antes explicitadas para ácidos fortes e fracos, é óbvio que, em igualdade de condições cinéticas de temperatura e tempo de reação, na experiência dos autores deste pedido de patente, se os ácidos são normalizados para uma
5 mesma concentração, a co-geração de HMF será maior no caso clorídrico ou sulfúrico em comparação com o cítrico ou fosfórico.

Ainda no que tange o estado da técnica e mais particularmente em relação às aplicações e usos de frutooligossacarídeos – FOS, conforme a *US Patent 5,843,922* um meio de nutrição especial para
10 bifidobactérias foi preparado submetendo um substrato sacarídico contendo unidade frutose à ação de fluxo rápido e termólise na presença de vários ácidos minerais e orgânicos. Na peça descritiva da patente tal substrato é sistematicamente identificado como sacarose embora haja também uma única menção à frutose, rafinose e estaquiase, as duas últimas sendo
15 oligossacarídeos frutossilados. Não há menção à inulina e / ou outras frutanas como substratos ou matérias-primas. Com relação aos catalisadores ácidos para a etapa de transfrutossilagem – técnica oposta à hidrólise - que transforma a sacarose – mas não a inulina - em oligofrutoses tais como cestose e nistose estão mencionados, além do ácido cítrico, também os
20 ácidos tartárico, benzóico, láctico e fosfórico, além de sais potássicos e sódicos do ácido fosfórico. A faixa de temperatura ideal do processo se situa entre 125°C e 145°C – muito acima do ponto de ebulição da água e ainda mais acima da faixa ideal defendida neste pedido de patente - e ainda está também contemplada a adição de sacarose cristalina no meio reacional,
25 condições que somadas diferenciam a técnica radicalmente daquilo que é

descrito e reivindicado em nosso pedido proposto como inovação. Nessa *US Patent 5,843,922* a pré-preparação da matéria prima é mais compreensivelmente descrita como semelhante ao fabrico de algodão doce, um confeito popular no Brasil, o que fornece então o açúcar na forma anidra, com menor ponto de fusão e menos sujeita à degradação antes do tratamento ácido. Como sumarizado pelos autores, esta patente permite obter, pirolizando sacarose, uma mistura de produtos frutossilados que inclui 1-cestose, 6-cestose, neocestose, frutooligossacarídeos e anidridos de frutose conforme Whistler, R. L. and BeMiller, J. N. Preparation of oligosaccharides and products therefrom. *US Patent 5,843,922*, December 1, 1998. Ainda na busca bibliográfica específica, inulina e / ou FOS – frutooligossacarídeos foram incorporados a uma solução de edulcorantes artificiais, no caso aspartame ou acesulfame K, mais outros insumos vegetais como o chá, mantendo-se o pH na faixa de 3 a 3,5 graças à adição de ácido fosfórico, cítrico ou málico. Após 4 semanas à temperatura ambiente ou controlada (32,2°C , 21,1°C e 4,4°C) foram medidas as porcentagens residuais de inulina, FOS e frutose. A lenta e progressiva hidrólise dos substratos frutossilados e a emergência acumulada de frutose garante o poder edulcorante da bebida conforme Aldrich J. A.; Hanger L. Y.; Ritter G., *US Patent 6,713,116*, March 30, 2004. Este caso – diferentemente daquele que postulamos – tem como escopo a geração, a longo prazo e baixas temperaturas, de frutose como produto principal. Esta obtenção preferencial e otimizada do monômero frutose a partir do polímero inulina de dália, excluindo ou minimizando a co-produção de frutooligossacarídeos - FOS, hidroximetilfurfural – HMF e de anidridos de

95

difrutose - DFAs, também é possível utilizando-se soluções diluídas de ácido fosfórico de modo a garantir no meio reacional um pH em torno de 2,0 e fervura conforme relatado por um dos autores deste pedido de patente em Haully M.C.O., Bracht A., Beck R and Fontana J.D. Fructose and fructose-anhydrides from dahlia inulin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34-5: 297-308, 1992. Conforme relatado por pesquisadores da Universidade Autônoma de Taulmalipas, México, frutose – monômero – também pode ser obtida do polímero inulina de agave *Agave americana* mediante hidrólise com ácido sulfúrico a 1% a 100°C. O mesmo grupo de pesquisadores, em ano subsequente, examinou o efeito da concentração de ácido fosfórico, temperatura e tempo de hidrólise para obter oligossacarídeos de agave. Concluíram que os resultados obtidos demonstram que o ácido fosfórico não é necessário para levar a cabo a hidrólise – o que difere de um dos exemplos que embasam nosso pedido de patente - e que um máximo de oligossacarídeos de agave foi obtido mediante simples aquecimento a 80°C durante 90 minutos – conforme Ayala, R. C. G., Jacques, C., Leon, J. A. R.. RESPYN – *Revista de Salud Pública y Nutrición*, edición especial 1-2004; [http:// www. uanl. mx/publicaciones / respyn/especiales/ee-1-2004/51.htm](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/ee-1-2004/51.htm)) e conforme Gomez-Ayala R. C., Ramírez J. A., Jacques C., Vázquez M. and Téllez-Luis S. J. Extraction of inulin oligosaccharides from *Agave Americana*. 2005 IFT - Institute of Food Technologists, July 15-20 - New Orleans, Louisiana, poster 54E-10 e [http:// ift. confex.com/ift/2005/techprogram/paper_28819.htm](http://ift.confex.com/ift/2005/techprogram/paper_28819.htm). Nossa experimentação laboratorial, parcialmente ilustrada nos desenhos e figuras adiante

apresentados e explicados, demonstra o oposto, qual seja, a catálise cítrica ou alternativamente a fosfórica, se bem combinados os parâmetros de concentração de substrato ou inulina, a concentração ou pH efetivo do ácido catalisador, a escolha de faixa de temperatura de aquecimento e ainda o tempo de hidrólise nestas condições, faculta modular a obtenção otimizada de uma mistura de frutooligossacarídeos – FOS sem que a frutose livre atinja dominância no elenco de produtos reacionais da hidrólise e menos ainda o HMF – hidroximetilfurfural. Aliás, em que pese a restrição da presença de HMF em hidrolisados a serem destinados para algumas fermentações industriais, este composto furanóide é um dos principais componentes de alimentos condimentadores clássicos tais como o apreciado e caro vinagre designado de “Aceto Balsâmico di Modena” conforme Theobald, A., Muller, A. & Anklam, E., Determination of 5-hydroxymethylfurfural in vinegar samples by HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, 46(5), (1998), 1850-1854.

Ainda com vistas ao estado da técnica de hidrólise ao uso de catalisadores ácidos não convencionais como é o caso da exploração de ácido fosfórico para fins de hidrólise ácida total ou parcial de polissacarídeos de fitobiomassa, cabe registrar a hidrólise seletiva de hemiceluloses ou heteroxilanas de bagaço de cana e sorgo e a hidrólise de amido de mandioca até maltossacarídeos de diversos graus de polimerização, modulável pela concentração do ácido e pelas condições de termopressurização conforme um dos autores deste pedido de patente em Fontana J.D., Correa J.B.C., Duarte J.H., Barbosa A.M., Blumel M. Aqueous phosphoric-acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and

97
E

sorghum bagasses. *Biotechnology and Bioengineering* 14, 175-186, 1984 e em Fontana, J.D. "Hidrólise fosfórica de amidos" PI-0002001-0, *Rev. Propr. Ind.* 1617, pg. 132, 02-janeiro-2002. Nestes dois procedimentos tecnológicos o parâmetro cinético de temperatura também se situa em faixa
5 muito mais elevada, ou seja, bem acima do ponto de ebulição da água, o que não é a mais aconselhável metodologia na hidrólise de inulina ou levana.

No que diz respeito ao estado da técnica em conceituação mais ampla ou seja a visão dos frutooligossacarídeos – FOS como um bem
10 alimentício, nutricional ou medicinal de maior valor agregado, o banco de dados do INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial registra a patente PI0404152-6 tratando respectivamente de composição alimentícia à base de soja contendo ou não FOS – frutooligossacarídeos; a PI0401407-3 tratando de módulo alimentício fibroso contendo sete fibras dentre elas a
15 inulina e / ou frutooligossacarídeos; a PI0202602-3 tratando de produção enzimática de frutooligossacarídeos a partir de sacarose com enzima de levedura; a PI0115311-0 tratando da composição nutricional para condição imunológica à base de vitaminas, sais, inulina e frutooligossacarídeos; a PI0108828-9 tratando do uso de um prebiótico para aumentar defesa
20 imunológica, preferencialmente um frutooligossacarídeo; a PI9609619-5 tratando uso de FOS - frutooligossacarídeos e análogos à base de outros açúcares simples tais como xilose e galactose, ou seja, os XOS e GOS para tratamento de otite média; a PI0108341-4 tratando de produtos de inulina com propriedades nutricionais aperfeiçoadas sendo um facilmente
25 fermentável e outro dificilmente fermentável; a PI9913658-9 tratando de

98


frações de inulina de diferentes faixas de pesos moleculares e produtos nos quais as mesmas são aplicadas; a PI9902934-0 processo para a fabricação de inulina de chicória e produtos / derivados aperfeiçoados e a PI9700887-7, tratando sinopticamente da preparação de produtos de inulina. Não há, nestes dez pedidos de patentes, menção à hidrólise ácida cítrica ou fosfórica de inulina para a obtenção de FOS – frutooligossacarídeos, o que não cria confronto, obviamente, com o processo defendido como escopo no presente pedido de patente, qual seja o refinamento de uma hidrólise parcial de inulina empregando ácidos não convencionais e compatíveis com o metabolismo humano, animal vegetal, e de microrganismos com vistas à obtenção de FOS – frutooligossacarídeos como produtos preponderantes. Nesta mesma linha de enfoque do estado da técnica, *lato sensu*, no banco de dados dos Estados Unidos da América – USPTO – as patentes US 5,127,956 e US 5,254,174 sequencialmente tratam do método de preparação de uma mistura de carboidratos contendo frutose, glucose e frutooligossacarídeos que parte de extratos aquosos de alcachofra de Jerusalém e de chicória, com ajustes de pH com anidrido carbônico ou ácido fosfórico após alcalinização com cal e operações físicas como filtração e hiper-filtração mas sem alterar a constituição química nativa ou seja sem intenção ou menção a processos de hidrólise – intenção esta que é clara em nosso pedido de patente - e ainda da extração de tubérculos de alcachofra de Jerusalém ou de raízes de chicória tanto para inulina polimérica quanto para FOS - frutooligossacarídeos naturais de menor peso molecular e sendo então as distintas frações separadas por métodos físicos. A patente US 4,613,377 trata da obtenção de xaropes enriquecidos em

99

frutose, contendo também FOS –frutooligossacarídeos mas mediante hidrólise de extrato aquoso de plantas ricas em inulina tais como alcachofra de Jerusalém com resinas trocadoras de cátions ou seja outro tipo de catalisador. A patente US 7,084,131 trata da preparação de uma

5 composição polissacarídica polidispersa que utiliza inulina previamente tratada com enzima ou misturada a ácido cítrico com ou sem aquecimento suave entre 10°C e 41,1°C, portanto sem intenção de hidrólise da polifrutose original dada a baixa faixa de temperatura e sim com a intenção de prevenir a floculação ou *clumping* da inulina por ação do dito ácido. A patente US

10 6,982,093 apenas versa sobre um sistema de liberação de fibras na forma de tablete de goma de mascar contendo inulina de viscosidade controlada ou FOS – frutooligossacarídeos. A patente US 6,855,358 descreve um processo de preparação de uma bebida esterilizada com prévia ozonização e adicionada de um diterpenóide ativador da adecilato ciclasa, de um

15 nutracêutico, no caso, um frutooligossacarídeo mais ácido hidroxicítrico, ou seja, se refere à formulação de ingredientes distintos, sem nenhuma intenção hidrolítica. A Patente US 6,461,650 trata de preparações para suplementação de bebidas, envolvendo estas a adição de citrato e / ou fosfato de cálcio ou magnésio e opcionalmente um frutooligossacarídeo ou

20 inulina pré-fervida em água, prestando-se os ácidos cítrico ou fosfórico para a adequação do pH entre 2,5 até 4,5 na referida bebida (*drink*). Não há menção, nas mencionadas reivindicações, da palavra-chave “hidrólise” ou “aquecimento”, ou seja, mesmo no caso do emprego de um determinado frutossacarídeo, entra este na formulação modificadora da bebida como

25 produto pré-acabado e independentemente dos ácidos mencionados,

situação que difere substancialmente de nosso pedido presente de patente onde a intencionalidade hidrolítica, mediante exploração de pH efetivo e aquecimento, são marcas implícitas e explícitas. Por outro lado, a patente US 5,334,516 corresponde a um método de preparação de FOS -
5 frutooligossacarídeos ramificados usando microrganismos ou suas enzimas ou seja procedimento biossintético usando ferramentas biotecnológicas, completamente distinto de nosso procedimento com ácidos fracos ou moderados.

Em nosso pedido de patente, a utilização de catalisadores
10 ácidos de potência moderada – entretanto modulando o alcance de sua ação hidrolítica através da temperatura, pH efetivo de hidrólise, tempo de reação e concentração de inulina - visa intencionalmente fragmentar inulina nativa até subfrações mais simples, os FOS – frutooligossacarídeos, seja no conceito de dimensão molecular – GP entre 2-3 até 18 ou mais – seja no
15 conceito de completa hidrossolubilidade, o que obviamente acaba incrementando também o poder edulcorante ou adoçante que na inulina nativa é praticamente nulo, ou seja, drasticamente discrepante daquele da frutose, sua unidade monomérica, a qual adoça com eficiência *ca.* 70% superior à da sacarose, ficando como via de consequência, os
20 frutooligossacarídeos – FOS numa faixa intermediária de poder adoçante.

Portanto, inexistem, tanto nos pedidos de patentes registrados no Brasil quanto naqueles no exterior e logo acima mencionados e o presente pedido de patente de invenção, qualquer correlação ou dito em outras palavras, a hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina e
25 polifrutoses assemelhadas com a intencionalidade de produção de

fragmentos menores, hidrossolúveis, na faixa de 3 a 18 ou mais unidades monoméricas é original pela seletiva escolha de catalisadores, oferece inovação no campo de conhecimento pelo aproveitamento concomitante dos catalisadores e garante a mesma natureza qualitativa de produtos hidrolíticos quais sejam os FOS – frutooligossacarídeos de já consagrada aplicação industrial. Uma vantagem inicial do processo ora descrito é que a hidrólise cítrica ou fosfórica pode ser aplicada com ampla flexibilização da concentração de substrato, e.g., inulina, desde soluções muito diluídas na faixa de 1 a 2% p/v até o extremo de simplesmente umedecimento da inulina com a solução aquosa do catalisador, ou seja, acima de 50% p/v, pois com o aquecimento incipiente e progresso do mecanismo hidrolítico, o substrato, já nos minutos iniciais de hidrólise vai experimentando progressiva solubilização no meio reacional.

Uma das vantagens do uso de ácido cítrico ou fosfórico para a despolimerização, parcial ou total, de glicopolímeros de fitobiomassa mais ácido-lábeis como é o caso das frutanas inulina ou levana – como proposto e defendido em nosso pedido de patente - é que o ácido pode permanecer no hidrolisado se este não é muito ácido ou mesmo no caso de o hidrolisado requerer algum grau de neutralização com bases fortes como os hidróxidos de sódio ou potássio ou bases fracas como amônia ou hidróxido de cálcio ou de zinco. No primeiro caso, a leve acidez dos xaropes açucarados obtidos é totalmente compatível com a preparação ou formulação de produtos alimentícios ou farmacêuticos já que a leve ou moderada sensação de acidez valoriza o poder edulcorante ou adoçante, como é do conhecimento popular, geral e industrial. No segundo caso, a

geração parcial de sais mediante neutralização parcial ou total do catalisador ácido é vantajosa para fins fermentativos industriais tal como o caso de fosfato de amônio como fonte de nitrogênio e fósforo, após prévia neutralização do ácido fosfórico com amônia e este tipo de subproduto

5 tampouco é incompatível com produtos alimentícios, até pelo contrário. Como exemplo de prática industrial nos países mais desenvolvidos estavam amplamente distribuídos em supermercados da costa oeste norte-americana em dezembro de 2004, mais especificamente em San Diego, Califórnia, duas marcas de iogurtes: Original da Yoplait e Creamy Fruit Blends da

10 Dannon. Em ambas a edulcorância ou poder adoçante é garantida pela presença de *HFC - High Fructose Corn syrup* ou xarope de milho enriquecido em frutose e, no caso da primeira marca, ainda reforçada pela adição de frutose e tal formulação alimentícia inclui também fosfato de cálcio e ácido cítrico ou citrato de sódio. A formulação de tais produtos ou

15 outros assemelhados com a inclusão de frutooligossacarídeos – ao invés de xarope de frutose - ainda contendo ácido cítrico ou fosfórico ainda seus sais oriundos de neutralização parcial seria então duplamente vantajosa, conforme aqui delineado em nosso pedido de patente. Cabe registro do medicamento designado de “Emetrol” da McNeil-PPC, Inc. / Pfizer

20 formulado à base de frutose, glucose e ácido fosfórico ao qual se atribui ação curativa para náuseas associadas com perturbações estomacais (<http://www.pfizerch.com / product.aspx?id = 408>) e que fontes naturais de ácido cítrico e citratos tais como sucos de laranja, limão, lima e toranja ou

25 urânio conforme Ortega, A. et al., Treatment of experimental acute uranium

posiononing by chelating agents. *Pharmacology and Toxicology* 64 (1989) 247-251. Aliás, o ácido fosfórico e seus sais derivados estão presentes, como componentes quimicamente unidos, na base mais nobre da população molecular humana: os ácidos nucleicos, DNA e RNA, além de o ácido

5 fosfórico ser o composto ativador dos principais açucares metabólicos, glucose e frutose – na forma de glucose-6-fosfato e frutose-6-fosfato -, em sua entrada na via glicolítica e ainda estar o fosfato covalentemente ligado também ao mais importante coenzima ou “moeda energética” das células animais e vegetais, o ATP - adenosina trifosfato. Paralelamente, o ácido

10 cítrico, na forma de seu ânion citrato, é o metabólito de alimentação do ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarbóxicos, presente em praticamente todos os seres vivos. Estas considerações e o comportamento salutar dos ácidos cítrico e fosfórico, sobretudo quando conveniente e naturalmente modulados pelo eficiente sistema tamponante típico de qualquer ser vivo,

15 estão claramente disponíveis em qualquer livro texto de Bioquímica como, por exemplo, Stryer, L. *Biochemistry*, W.H. Freeman & Co., New York, 3rd Edition. Esta circunstância qual seja o uso e aproveitamento direto do catalisador fosfórico ou cítrico é inovadora comparativamente à hidrólise levada a cabo por meio de catalisadores ácidos clássicos e mais fortes tais

20 como os ácidos clorídrico ou sulfúrico, pois estes últimos requerem na etapa pós-hidrólise dos substratos polissacarídicos, a remoção do ácido seja através do emprego de resinas trocadoras de íons seja através da precipitação na forma de sal insolúvel como, por exemplo, o sulfato de cálcio. A mesma circunstância não recai em obviedade decorrente do estado

25 da arte, pois o prévio conhecimento da extrema labilidade de inulina à

104
E

hidrólise ácida – quando comparada com amido, pectina, hemicelulose, celulose ou gomas polissacarídicas – exige um marcante conhecimento da química estrutural destes glicopolímeros, o que é o caso do autor principal deste pedido de patente cuja filosofia inventiva já foi explorada na PI 000-5 2001-0 como “Hidrólise fosfórica de amidos”. Ainda como reforço no que tange à nossa atividade inventiva diferencial, a ocorrência natural de inulina, um polímero de frutose, evoca a possibilidade de hidrolisá-la por via enzimática, com exoinulinases, até o monômero frutose, mesmo objetivo que se alcança, com alguma co-produção paralela e indesejável de 10 HMF – hidroximetilfurfural um subproduto de desidratação energética da frutose livre, mediante hidrólise ácida com ácidos minerais clássicos como o clorídrico e sulfúrico. A hidrólise parcial da inulina pode igualmente ser alcançada com outro tipo de enzimas hidrolíticas, as endoinulinases e / ou ao uso dos referidos ácidos fortes – sulfúrico e clorídrico - em condições 15 cinéticas mais brandas de concentração de ácido, temperaturas mais baixas que não a de ebulição da água ou ainda mediante tempos reduzidos de hidrólise. Todavia, a produção de FOS – oligossacarídeos ao emprego de ácidos mais fracos como o cítrico ou fosfórico, cujos cátions são essencialmente fisiológicos para o organismo humano ou animal não 20 decorre de maneira evidente nem é obviamente derivada do estado da arte do processamento de inulina. Logo, a falta de relato consistente do uso de ácidos cítrico ou fosfórico com a intencionalidade de produção de FOS – frutooligossacarídeos como produtos dominantes na hidrólise caracteriza o presente pedido como novidade tecnológica e igualmente lhe garante 25 elevado potencial – pelas demais vantagens apresentadas – de aplicação

industrial. No que tange a aplicação industrial ou comercial, por se tratarem os FOS – frutooligossacarídeos de substratos ideais para a flora humana colônica benéfica de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., ou seja, os FOS serem prebióticos reforçadores da população bacteriana probiótica, os

5 FOS podem e são aplicáveis em variados tipos de alimentos como fermentados lácteos, como por exemplo, os iogurtes e bebidas ligeiramente ou intensamente adocicadas, dependendo do teor final que se imponha nestes alimentos. Adicionalmente, como os FOS vem acompanhados de uma certa porcentagem de frutose livre cujo poder edulcorante é 70%

10 superior ao da sacarose, os FOS – frutooligossacarídios podem ser empregados como edulcorantes menos ou não cariogênicos nos mesmos tipos de alimentos ou outros assemelhados ou até em insumos de interesse odontológico. Com relação a vantagens e melhoramentos em relação às técnicas já existentes, comparativamente às hidrólises enzimáticas – de

15 custo mais elevado - a obtenção de FOS – frutooligossacarídeos por hidrólise fosfórica ou cítrica é muito mais econômica. Ainda comparativamente às hidrólises minerais com catalisadores ácidos fortes tais como os ácidos sulfúrico ou clorídrico as hidrólises fosfórica ou cítrica são também vantajosas em vista de gerarem menor co-produção de subprodutos

20 indesejados como o HMF – hidroximetilfurfural e ainda não necessariamente requererem remoção do catalisador ácido, pois fosfato e citrato são ânions integralmente fisiológicos para os seres humanos, animais e vegetais. Não obstante a permanente polêmica instaurada em escritos da cultura popular, contemporaneamente retratados também nos recursos de

25 mídia eletrônica tais como a InterNet (www) – e.g.,

1106
206

http://en.wikipedia.org/wiki/Coca-Cola_formula) parece não persistir dúvida que a fórmula ou receita industrial da mais famosa bebida refrigerante do mundo – a Coca-Cola – inclui ingredientes como o ácido fosfórico ora substituindo o cítrico, além de edulcorantes como HFCS 5 (*High Fructose Corn Syrup*) ou versões mais baratas deste – a sacarose – em países do 3º. mundo. De fato, o rótulo da lata comercializada como “*Coca Cola Classic 12 oz*” em San Diego, Califórnia, em meados de maio de 2007, explicitava em tal *Coke* a presença, além de outros ingredientes, exatamente para *phosphoric acid e high fructose corn syrup*.

10 Do material bibliográfico compilado e apresentado, o que inclui os pedidos de patentes mais proximamente correlacionados e enquanto elementos descritivos mais detalhados do presente pedido de patente de invenção para um processo e seus usos, se deduz que o emprego dos ácidos cítrico e / ou fosfórico, nas condições cinéticas explicitadas em 15 “Reivindicações” e com base nos exemplos descritos nos desenhos e figuras numeradas de 4 a 8, com o escopo de obtenção de FOS-frutooligossacarídeos hidrossolúveis de faixa média de DP desde 2-3 até 18 ou mais, não decorre do conhecimento até agora acumulado e documentado, contemplando pois os requisitos de originalidade e inovação com aplicação 20 industrial. Ademais, tendo em conta o fator economicidade como co-determinante da aplicabilidade industrial há que se ter conta que, para a obtenção de pHs ou potenciais hidrogeniônicos – e.g., na faixa de pH 2 a 3 – que facultam as hidrólises fosfórica ou cítrica mais produtivas de inulina até 25 de 1 litro, um volume apenas de 0,05 mL ácido fosfórico comercial a 85g%

p/p para se obter um pH 2,45 ou 0,35 mg de ácido cítrico puro para se obter pH = 2,52, sempre em água pura. Quando se incorpora o substrato inulina – substrato purificado e tecnicamente neutro na base de 5g% p/v, ou seja, 50 g / litro de solução aquosa – os valores antes mencionados para aferir o pH

5 desejado em torno de 2,5 sobem apenas para 0,4 mL do mesmo ácido fosfórico xaroposo e, no caso, do ácido cítrico sólido para apenas 1,4 g. Estas moderadas proporções, considerados ainda os modestos valores de mercado para o ácido orgânico mais rotineiramente obtido por fermentações industriais de açúcares – o ácido cítrico – e para um ácido mineral comum –

10 o ácido fosfórico – são, do ponto de vista industrial, convidativas graças ao mínimo custo posto o alto valor agregado que apresentam os FOS – frutooligossacarídeos. Leve-se em conta ainda que tais proporções podem ainda ser convenientemente reduzidas, ou seja, abaixo da razão catalisador ácido: substrato inulina = 0,8 ou 2,8 : 100 para algo em torno de 0,5 ou 1,0

15 : 100 simplesmente adotando pHs menos acídicos para a hidrólise, ou seja, entre 2,6 e 3,0 e mais preferencialmente 2,75 e administrando a influência de outros parâmetros cinéticos em regime alargado tais como a temperatura e tempo de residência na incubação ou reator. De modo inverso mas não menos vantajoso, a hidrólise cítrica ou fosfórica de polifrutoses com a

20 inulina pode, tirando vantagem do que é universalizado no ambiente industrial em termos de disponibilidade de energia e troca de calor, ser conduzida na temperatura de ebulição da água ou mesmo mediante aplicação de vapor combinado a pressão (e.g., 1 atm., 121°C), nestes casos compensando-se cineticamente o pH para faixas menos acídicas (e.g., entre

25 3 e 4) e / ou tempos de hidrólise reduzidos até mesmo a apenas um par de

108

minutos, um minuto ou mesmo fração dele, dependendo apenas do grau de polimerização – GP que se deseje para os produtos de cada hidrólise.

Das vantagens apontadas para o uso de ácidos inócuos ou ainda mais propriamente integrantes do próprio metabolismo, que é o fundamento inventivo mais importante deste pedido de patente, fica igualmente derivado que uma série de outros ácidos fracos ou moderadamente ácidos são qualificados – já que também definíveis pelo menos por um valor de pK_{a1} - para exercer a catálise na hidrólise de inulina e outras polifrutoses e tal qual o citrato e fosfato adicionam ânions estratégicos e co-nutrientes aos hidrolisados. Neste elenco aponta-se – no mesmo escopo filosófico desta invenção – aqueles que como o ácido cítrico também integram o ciclo de Krebs dos animais e plantas quais sejam os ácidos carboxílicos : α -cetoglutárico, isocítrico, fumárico, málico, oxaloacético e succínico. No mesmo elenco, outros ácidos podem cumprir o mesmo papel e ainda são comuns de outras vias metabólicas dos seres vivos, tais como: glicérico, glucônico, glucurônico, glutárico, láctico, malônico, pirúvico, tartárico e mesmo os ácidos carboxílicos da série acético, propiônico e butírico ou hidroxibutírico. Ainda passíveis de inclusão neste elenco de catalisadores potenciais para a hidrólise de inulina e demais polifrutoses, estão os ácidos 2- e 3-glicerofosfóricos e pirofosfórico $H_4P_2O_7$, este, em verdade, se convertendo em ácido fosfórico quando solubilizado em água quente. Para uma melhor compreensão destes desdobramentos a partir do escopo básico deste pedido de patente, tais catalisadores ácidos alternativos são ordenados na tabela abaixo com ênfase para o parâmetro físico-químico que dá a medida das relativas acididades,

109

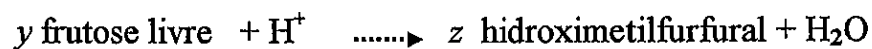
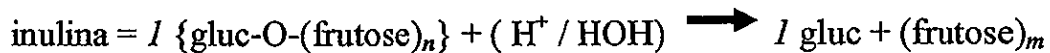
ou seja, os respectivos pKa ou pKa₁ e pKa_n, isto no caso de mono, di, tri ou poliácidos sempre em comparação com os 2 que embasam as reivindicações de base deste pedido de patente, cítrico e fosfórico:

	ÁCIDO	pKa ou pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
5	fosfórico	2,15	6,82	12,38
	cítrico	3,13	4,76	6,40
	(pirofosfórico	0,9	2,00	6,60)
	glicerofosfóricos (3 e 2)	1,37-1,42	3,42-3,55	7,1
	oxaloacético	2,22	3,89	13,03
10	α-cetoglutárico	2,47	4,68	-
	pirúvico	2,50	-	-
	malônico	2,83	5,69	-
	glucurônico	2,96	-	-
	tartárico	2,98	4,34	-
15	fumárico	3,03	4,44	-
	lático	3,08	-	-
	isocítrico	3,29	4,31	6,40
	málico	3,40	5,11	-
	glicérico	3,55	-	-
20	glucônico	3,86	-	-
	succínico	4,16	5,61	-
	glutárico	4,31	5,41	-
	β-hidroxibutírico	4,39	-	-
	acético	4,76	-	-
25	propiônico	4,83	-	-

110
2

ÁCIDO	pKa ou pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
butírico	4,86	-	-

Em todos os casos explicitados na tabela e bem caracterizado o inconveniente do emprego de ácidos fortes como o sulfúrico e clorídrico que conduzem a reação de hidrólise indesejavelmente além do limite de simples sacarificação da polifrutose ou seja à significativa desidratação da frutose livre até hidroximetilfurfural – HMF, o que também se visa na presente inovação é não privilegiar esta inconveniência até mesmo por conta de que a hidrólise branda cítrica ou fosfórica limita até mesmo o teor relativo de frutose livre. Seguindo-se, simplifadamente, a protonação do oxigênio envolvido na ligação éter-frutosídica, se dá a hidrólise “randomizada” mas não total da ligação β-2,1 que se repete na inulina através da entrada dos elementos da água, portanto em favor da formação preferencial de frutooligossacarídeos – FOS ou (frutose)_x, hipoteticamente conforme:



onde as setas \longrightarrow , \longrightarrow e $\dots \longrightarrow$ indicam, decrescentemente, a intensidade de curso de reação; n = um máximo de 60 ou seja a integridade molecular plena da inulina, I = a molécula inteira de inulina e ainda a única unidade de glucose; m = até 18 ou mais, ou seja a população molecular média inicial de frutooligossacarídeos ou FOS de maior peso molecular; x = 2 a 11, população final de frutooligossacarídeos; y = 0

reduzido teor de frutose e $z = 0$ ainda mais reduzido teor de hidroximetilfurfural ou HMF, sendo que $n > m > x > y > z$.

A compreensão da técnica de fragmentação hidrolítica fosfórica ou cítrica de um produto natural – a polifrutose inulina e suas
5 assemelhadas – para a obtenção de FOS – frutooligossacarídeos como produtos reacionais dominantes e a defesa do elenco de reivindicações deste pedido de patente é adicionalmente esclarecida com desenhos e figuras numerados de 1 até 8.

Na Figura 1 se contempla a fórmula química representativa
10 da estrutura nativa das inulinas em que a molécula principia, por conta do processo biossintético dos vegetais produtores de inulina, com um resíduo glucosila ou ainda mais propriamente uma unidade precursora de glucose unida à primeira frutose, ou seja, sacarose. A esta se segue a adição de um número variado de outros resíduos frutosila, deste 11 até 60, finalizando a
15 molécula toda com uma unidade terminal de frutose. Logo, a inulina – diferentemente dos demais ocorrências naturais de polissacarídeos como o amido, a celulose, as hemiceluloses e gomas – não contém uma extremidade redutora.

A título de um primeiro exemplo prático-laboratorial, na
20 Figura 2 aparece um espectro de ressonância magnética nuclear ou RMN de ^{13}C de inulina isolada e purificada a partir de raízes de dália utilizando metodologia de extração com água quente tamponada a pH 7, obtenção da inulina crua mediante precipitação por resfriamento, seguida de purificação por resolubilização em água morna mais reprecipitação com 3 volumes de
25 etanol, nova redissolução do precipitado em água destilada e percolação

por resina de troca aniônica, sendo que os 2 passos finais permitem remoção de contaminantes ácidos e coloridos em metodologia prévia desenvolvida por um dos autores deste pedido de patente conforme Haully M.C.O., Bracht A., Beck R and Fontana J.D. Fructose and fructose-anhydrides from dahlia inulin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34-5: 297-308, 1992. A etapa de precipitação com etanol ademais, permite a eliminação de sesquiterpeno-lactonas, implicadas na geração de dermatite de contato. A amostra de inulina, na base de 50 mg/ mL, foi dissolvida em DMSO- δ -6 ou dimetilsulfóxido deuterado que se presta também para calibrar o espectrômetro Brucker de 400 MHz utilizado para a análise. Os sinais ou picos foram registrados em deslocamentos químicos principais ou ppm de maior intensidade e designados de C-1 = 61,6 ppm, C-2 = 103,1 ppm, C-3 = 77,6 ppm, C-4 = 75,0 ppm, C-5 = 82,0 ppm e C-6 = 61,9 ppm conforme já pré-estabelecido por um dos co-autores deste pedido de patente em Fontana J.D. , Baron M., Diniz A.C.P., Franco V.C. Microbial inulinase secretion using chemically-modified inulins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45-6: 257-268,1994. Estes sinais principais são característicos das unidades anidras e interligadas de frutose ou β -D-frutofuranose, os quais corroborados pelos sinais de muito menor intensidade e designados na Figura 2 coletivamente de (g) ou sejam C-1 = 92,2 ppm, C-2 = 71,8 ppm, C-3 = 73,2 ppm, C-4 = 70,3 ppm, C-5 = 72,8 ppm e C-6 = 61,6 ppm são indicativos de uma singular unidade glucosila ou α -D-glucopirranose, ou seja mais conclusivamente, o conjunto destes 12 sinais indicam a integralidade da molécula de inulina desenhada na Figura 1 e, portanto, sua pureza, aconselhável para os demais exemplos ilustrativos e

respectivas figuras ou desenhos. Nos desenhos e figuras da seqüência, designados de Figuras 4 até 8 que correspondem a exemplos prático-laboratoriais, a inulina utilizada para as hidrólises fosfórica ou cítrica foi portanto da qualidade retratada na Figura 2.

5 Na Figura 3 estão representadas três FOS – frutooligossacarídeos de estrutura mais simples quais sejam cestose – um trissacarídeo, nistose – tetrassacarídeo e frutossilnistose – um pentassacarídeo, os quais correspondem a fragmentos hidrolíticos de inulina respectivamente portando uma, duas ou três unidades
10 frutosila adicionais à sacarose. Cabe aqui a ressalva de que compostos assemelhados que resultem, ao acaso, da hidrólise randomizada da inulina por ácidos suaves como o cítrico e / ou fosfórico que sejam constituídos exclusivamente de unidades frutosila, portanto técnica e quimicamente definíveis como inulotriose, inulotetraose, inulopentaose e ainda membros
15 maiores da mesma série isenta de glucose, seriam também considerados FOS – frutooligossacarídeos, *lato sensu*.

A Figura 4, a partir de uma segunda prática laboratorial, é uma cromatografia em camada delgada – CCD sobre sílica gel 60 como fase estacionária desenvolvida com a mescla isopropanol : acetato de etila : água
20 5 : 2 : 1 como fase fase móvel com corridas parciais de 1/3, 2/3 e 3/3 do *front* e revelada com orcinol : ácido sulfúrico : metanol em proporção 1 : 5 :
94 a 100°C por 5 minutos. Esta figura ilustra o perfil de FOS – frutooligossacarídeos quando se hidrolisa inulina purificada de raízes de dália a 5g% p/v com ácido fosfórico em pH = 2,5 a 85°C durante 15
25 minutos (15), 30 minutos (30) e 45 minutos (45), que é então o exemplo

MS

prático-laboratorial n° 2, indicando que a modulação de um único parâmetro cinético – o tempo de hidrólise – já faculta governar a relação quantitativa de FOS – frutooligossacarídeos > frutose nos casos (15) e (30) ou o inverso, em (45). Estratégia semelhante para FOS > frutose livre são igualmente obtidas modulando os outros parâmetros cinéticos de hidrólise cítrica ou fosfórica, quais sejam o pH efetivo de hidrólise na faixa de 1,75 a 3,75 ou a temperatura de hidrólise na faixa de 50°C até 95°C, como mais detalhado na Figura 5, um gráfico de barras. As notações da Figura 4 (f) e (g) se referem aos padrões de frutose e glucose, livres. Cabe notar que a vantagem das hidrólises cítrica e fosfórica podem efetivamente ser direcionadas para a obtenção de FOS – frutooligossacarídeos em detrimento de frutose – caso do experimento (15) -, já que na condição cinética mais longa – experimento (45) – frutose prepondera mas já acompanhada de um teor indesejável de subprodutos de desidratação desta última, um deles o HMF – hidroximetilfurfural que aparece como mancha com migração cromatográfica logo acima daquele da frutose ou seja mais próximo ao *front* de solvente, sendo que a outra pequena mancha que lhe está justaposta provavelmente se refere a um dianidrido de frutose ou DFA. Como abreviaturas identificatórias da Figura 4 estão ainda FOS = FrutoOligoSacarídeos; GP = Grau de Polimerização e ainda 15, 30 e 45 que são os tempos de hidrólise, em minutos.

A figura 5 é um gráfico de barras no qual se compara o efeito dos parâmetros cinéticos tais como tempo e temperatura de hidrólise fixado o potencial hidrogeniônico em pH = 2,5 e suas respectivas capacidades de modulação sobre a natureza qualitativa dos produtos de hidrólise cítrica ou

fosfórica de inulina de raízes de dália como substrato de hidrólise na concentração de 5 g% p/v, o que corresponde então ao exemplo prático-laboratorial de n.º 3. Em acordo à inovação pretendida neste pedido de patente – produção preferencial de FOS ou frutooligossacarídeos – é notório

5 que, para cada faixa de temperatura de hidrólise ou seja 75°C, 85°C ou 95°C, tanto na hidrólise fosfórica quanto na cítrica, a formação de FOS é sempre preferencial em $8 \times 2 = 16$ ensaios hidrolíticos, com exceção apenas daqueles dois – a 95°C e durante 25 minutos – onde frutose predomina em relação aos FOS. Incidentalmente, estas duas condições excepcionais – que

10 não são o escopo central que embasa este pedido de patente - também já levam à formação de um reduzido percentual de HMF – hidroximetilfurfural, indesejável numa despolimerização ácida de inulina, com o atenuante de que uma metodologia popular e de baixo custo, qual seja a adsorção / filtração por carvão ativo corrige este inconveniente. No que

15 tange à eficiência de hidrólise reportada ao conteúdo inicial de inulina, o ácido fosfórico diluído garante nos tempos de 25 minutos a 85°C e de 15 minutos a 95°C percentagens de hidrólise acima de 80%, a maior parte dos produtos – 76% ou 63%, respectivamente, correspondendo a FOS – frutooligossacarídeos e o restante a frutose, uma vez que nestes casos o

20 HMF – hidroximetilfurfural não é detectável no método empregado. No que diz respeito à catálise hidrolítica através do ácido cítrico, a eficiência total de hidrólise nas mesmas condições cinéticas é algo menor – e.g., 64% ou 76% - mas mesmo assim os FOS – frutooligossacarídeos correspondem a, respectivamente, 78% e 74% dos produtos totais de hidrólise.

A Figura 6, que deriva de um quarto exemplo prático-laboratorial, ilustra uma cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE em coluna Lichrosorb de micropartículas de sílica gel de 10 micras derivatizada com grupo funcional amino – NH₂ – da SpectraPhysics na qual foram aplicados 20 microlitros dos hidrolisados cítricos de inulina a 10g% p/v obtidos a pH 2,5 e a 85°C durante 5 ou 15 minutos sendo que a eluição dos produtos de hidrólise se deu com acetonitrila a 70% em água v/v sob um fluxo de 1 mL / minuto e o monitoramento feito por um medidor de índice de refração diferencial. É perceptível que em ambas as situações de tempo de hidrólise nas aludidas condições de temperatura e pH a inulina é convertida sob a catálise do ácido cítrico em uma variada família de FOS-frutooligossacarídeos com GP – grau de polimerização entre 3 e 18 ou mais - dentro da capacidade analítica do método -, frisando-se ainda que, no tempo de 5 minutos, frutose livre corresponde a menos que a faixa entre 17 e 5 % do teor de FOS e no tempo de 15 minutos este valor ainda resta na faixa minoritária entre 25 e 5%.

A Figura 7, consequência de um quinto exemplo prático-laboratorial, é um cromatograma de CLAE semelhante ao da Figura 6 com a ressalva de que as amostras são oriundas de hidrólises fosfóricas mantidas todas as demais condições cinéticas da Figura 6. Há de se notar que o perfil cromatográfico dos produtos preferenciais de hidrólise fosfórica são muito assemelhados com aqueles obtidos na hidrólise cítrica e que a partir de frutooligossacarídeos - FOS com grau de polimerização - GP > 18 a detecção já é bem menos sensível. Em 8 dos nove ensaios realizados, a concentração de frutooligossacarídeos excede à de frutose e no nono, onde o

MF

tempo de hidrólise foi maior – 25 min – ainda os teores de frutooligossacarídeos são equivalentes ao de frutose livre.

A Figura 8, retratando um sexto exemplo prático-laboratorial, tratou do cultivo de uma mescla de microrganismos probióticos quais sejam

5 *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* - BioRich da Chr. Hansen S/A de Hershholm, Dinamarca – através de inóculo de ca. 10×10^5 UFC – Unidades Formadoras de Colônias com densidade ótica final de $A_{650nm} = 0,60$ semeado em hidrolisado fosfórico de inulina de dália obtido previamente em pH 2,5 a

10 85°C durante 15 minutos. Tal hidrolisado, ajustado para 2g% de carboidratos totais ou frutooligossacarídeos - FOS como fonte de carbono e neutralizado com amônia até pH 6,5 foi suplementado com meio MRS e o cultivo da tríplice população bacteriana foi levado a cabo por 48 horas a 42°C. O sobrenadante da centrifugação deste cultivo, em paralelo ao

15 hidrolisado também diluído até 2g% mas em inoculação, foi analisado por CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência aplicável aos FOS originais ou residuais, além de ácidos orgânicos gerados na fermentação, usando uma coluna Rezex-ROA-AO da Phenomenex e fase móvel de ácido sulfúrico 8 mMoles / L, fluxo de 0,5 mL / min e um detector do tipo índice

20 de refração para as amostras injetadas de 20 microlitros. O que se pode notar é que a população microbiana rápida e eficientemente converte os FOS – frutooligossacarídeos originais – além de uma menor proporção de frutose – em ácido acético > ácido láctico seja no hidrolisado fosfórico exemplificado – cujo catalisador foi, na neutralização prévia convertido em

25 fosfato de amônio - seja no hidrolisado cítrico – aqui não apresentado como

118


figura -, confirmando a expectativa de que o pedido de patente ora formulado atenda novas demandas industriais do segmento de alimentos e bebidas, além de possivelmente produtos médico-farmacêuticos e veterinários e ainda mais preferencialmente suplementos alimentares e os
5 alimentos ditos funcionais ou nutracêuticos, no jargão popular já que é inquestionável a fermentabilidade dos hidrolisados fosfóricos e/ou cítricos de inulina por parte de flora bacteriana benéfica e típica do trato intestinal humano e / ou animal.

REIVINDICAÇÕES

1- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, caracterizado pelo fato de, usando o frutopolissacarídeo em concentração de até 50 g% p/v ou no limite de sua solubilidade a quente, a catálise ser feita através do ácido cítrico ou do ácido fosfórico, diluídos e a quente, em concentração de ácido tal que permita um pH efetivo na faixa entre 1,5 até 4,0, mediante aquecimento na faixa de 50°C a 100°C durante um período de 1 até 90 minutos, com vistas à produção de uma população de frutooligossacarídeos – FOS como produtos dominantes na população açucarada do hidrolisado e com grau de polimerização variando na faixa de 2 a 18.

2- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as polifrutoses utilizadas como substrato de hidrólise são oriundas de bulbos, caules subterrâneos, raízes, rizóforos e tubérculos de dália, chicória, batata yacon, alcachofra de Jerusalém ou quaisquer outras plantas produtoras de inulina das famílias das Asteraceae / Compositae, Liliaceae e Gramineae e ainda levanas bacterianas.

3- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH preferencial de hidrólise se situa na faixa entre 2,25 e 2,75 e ainda mais preferencialmente em pH 2,5.

4- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a faixa preferencial de temperatura de hidrólise se situa na faixa entre 75°C e 95°C.

5- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e 4, em que a temperatura da hidrólise é elevada à temperatura de ebulição da água ou aplicação de vapor ainda mais aquecido, compensando o pH de hidrólise para a faixa menos acídica de 3 a 4 e reduzindo-se o tempo de hidrólise para a faixa entre 1 e 4 minutos.

6- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a faixa preferencial de tempo de hidrólise seja entre 5 e 25 minutos.

7- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 3, 4, 5 e 6, caracterizado pelo fato de o processo combinar os parâmetros cinéticos preferencialmente para se frutooligossacarídeos na faixa de grau de polimerização entre 2 até 18 ou seja pH 2,5 para a hidrólise cítrica entre 85°C e 95°C durante 5 a 20 minutos.

8- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 2, 3, 4, 5, 6, e 7, caracterizado

pelo fato de que os hidrolisados cítricos ou fosfóricos, uma vez levada a cabo suas respectivas diluições com água pura e consequente diminuição da acidez, deste modo ou mediante parcial ou total neutralização, sejam empregados diretamente como tal para fins fermentativos ou de consumo humano e animal em produtos de conserva, lácteos, balas e confeitos, bebidas alcoolizadas ou não, alimentos de baixa caloria e dietéticos e ainda outras formulações assemelhadas tais como suplementos alimentícios, alimentos funcionais e insumos odontológicos, sem quaisquer outros pós-tratamentos a não ser aqueles apropriados para sua combinação a outros nutrientes ou ingredientes.

9- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 3, 4, 5, 6, 7 e 8, caracterizado pelo fato de que os hidrolisados cítricos ou fosfóricos são parcialmente neutralizados para a faixa de Ph entre 2,8 e 6,9 ao uso de bases fracas como hidróxidos de amônio, cálcio ou zinco ou bases fortes como hidróxidos de sódio ou potássio antes da incorporação em alimentos, bebidas e pastas dentífricas ou na destinação para etapas fermentativas subsequentes.

10- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, caracterizado pelo fato de o ácido cítrico ou ácido fosfórico serem previamente eliminados dos hidrolisados mediante percolação ou tratamento com resinas de troca aniônica, antes da aplicação em alimentos e bebidas e ainda em processos fermentativos.

11- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, caracterizado pelo fato de que a hidrólise da inulina e/ou outras polifrutoses assemelhadas é levada a cabo com mistura de ácido cítrico com ácido fosfórico diluídos, a quente e em quaisquer proporções.

12- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, caracterizado pelo fato de que os hidrolisados ácidos cítricos ou fosfóricos, sobretudo aqueles obtidos sob maior severidade de parâmetros cinéticos tais como maior acidez ou temperaturas mais elevadas ou tempos mais longos de hidrólise, são tratados com carvão ativo ou outras fases absorventes para a remoção de co-produtos coloridos e do hidroximetilfurfural.

13- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o alvo da aplicação de pós-tratamento com carvão ativo ou outros materiais sólidos ou líquidos absorventes de cor e hidroximetilfurfural são os hidrolisados cítricos ou fosfóricos nos quais haja predominância da frutose em relação ao frutooligossacarídeos.

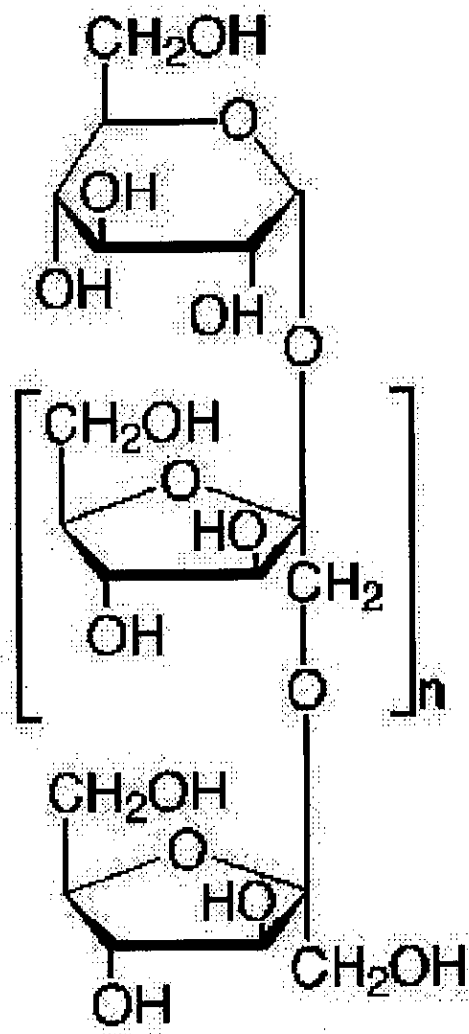
14- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, de acordo com a reivindicação 1 e ainda as reivindicações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e

13, caracterizado pela combinação dos frutooligossacarídeos, isentos ou não de frutose, produzidos das hidrólises cítrica ou fosfórica e tidos como prebióticos, a microorganismos probióticos dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e assemelhados para a formulação de simbióticos destinados à alimentação humana ou animal.

15- Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de frutooligossacarídeos – FOS, em analogia à reivindicação 1, mas utilizando a alternativa de hidrólise mediante a catálise através de outros ácidos orgânicos que não o cítrico e/ou fosfórico e cujas acididades expressas pelo parâmetro físico-químico de pKa1 se situe entre os valores mínimos e máximos de 2,22 e 4,86.

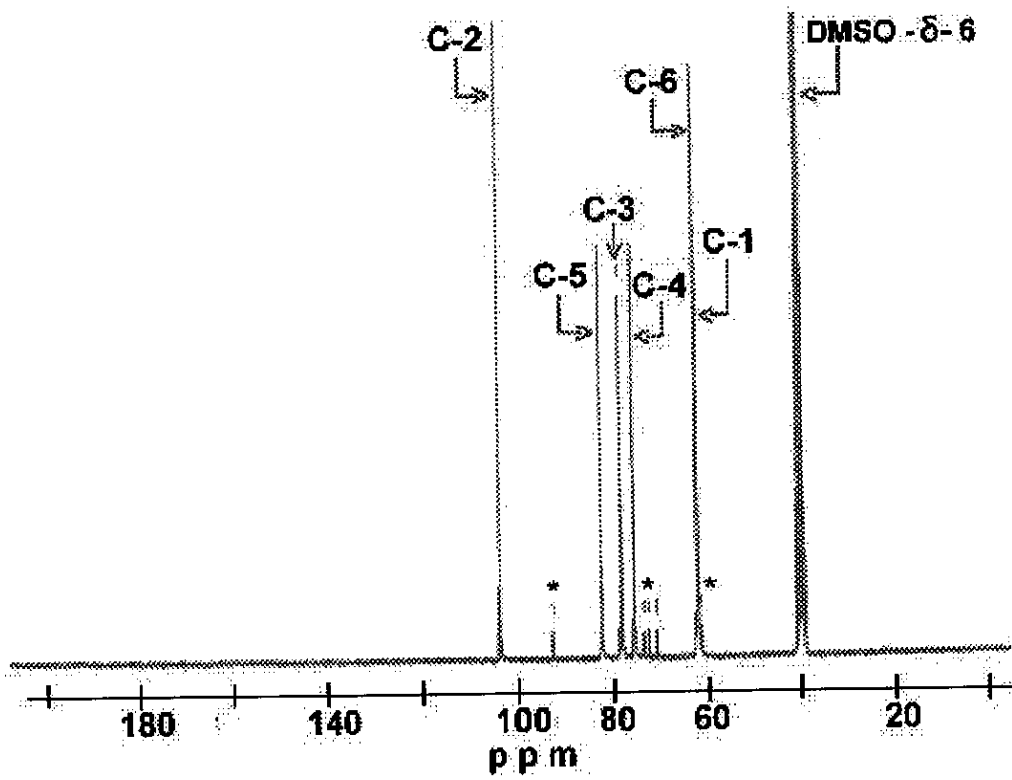
124

Fig. 1



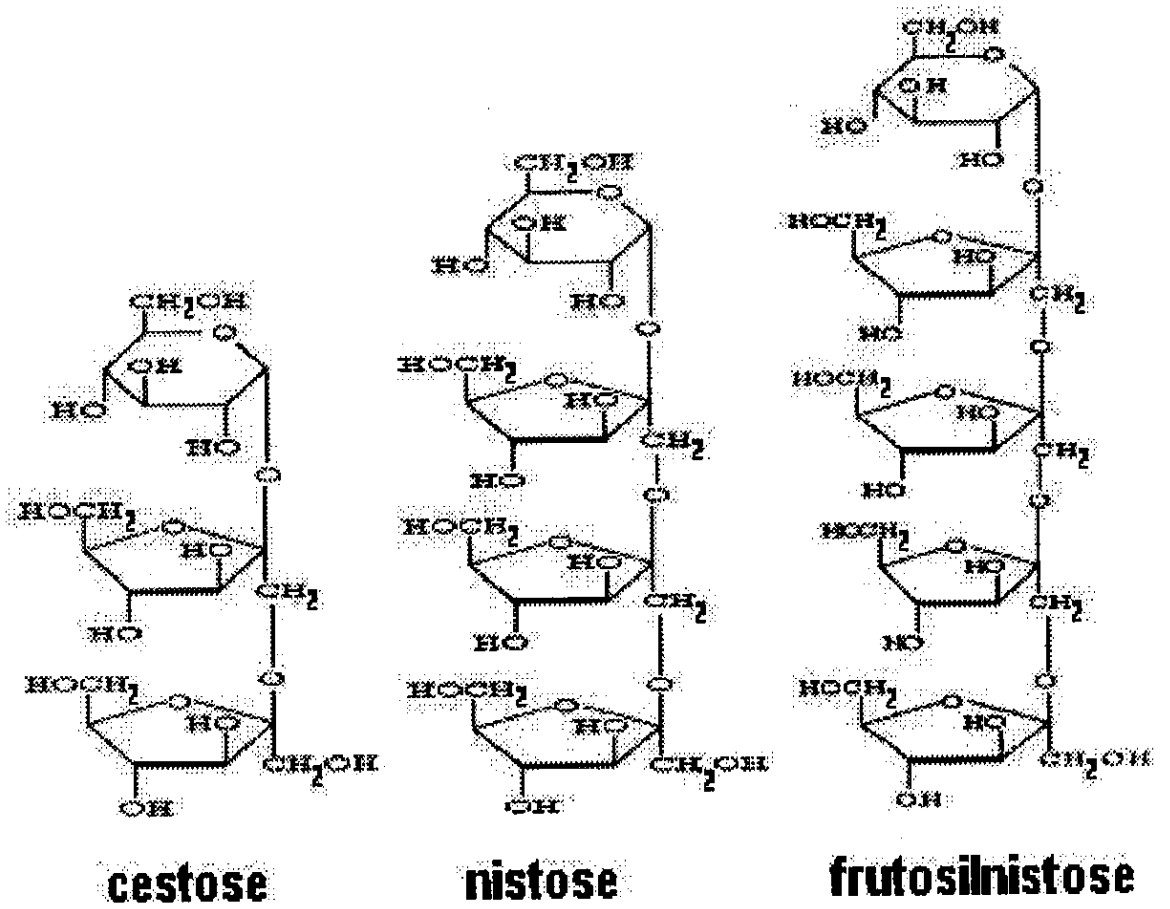
125

Fig. 2



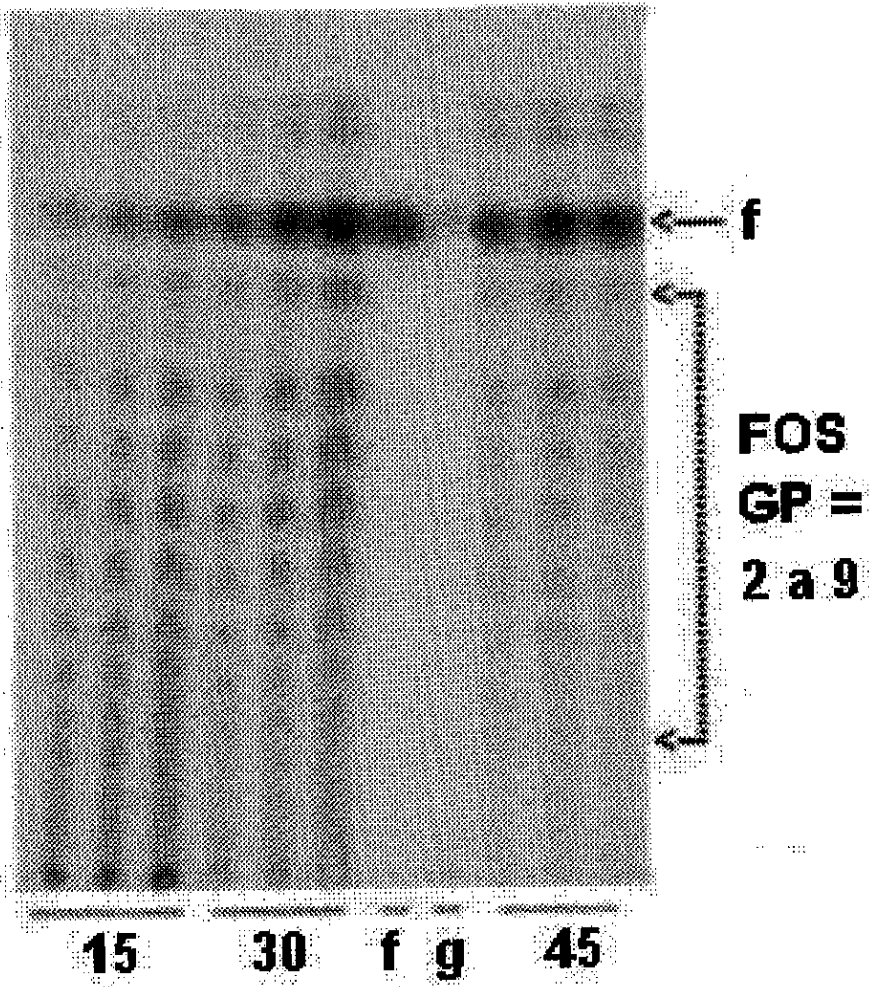
126

Fig. 3



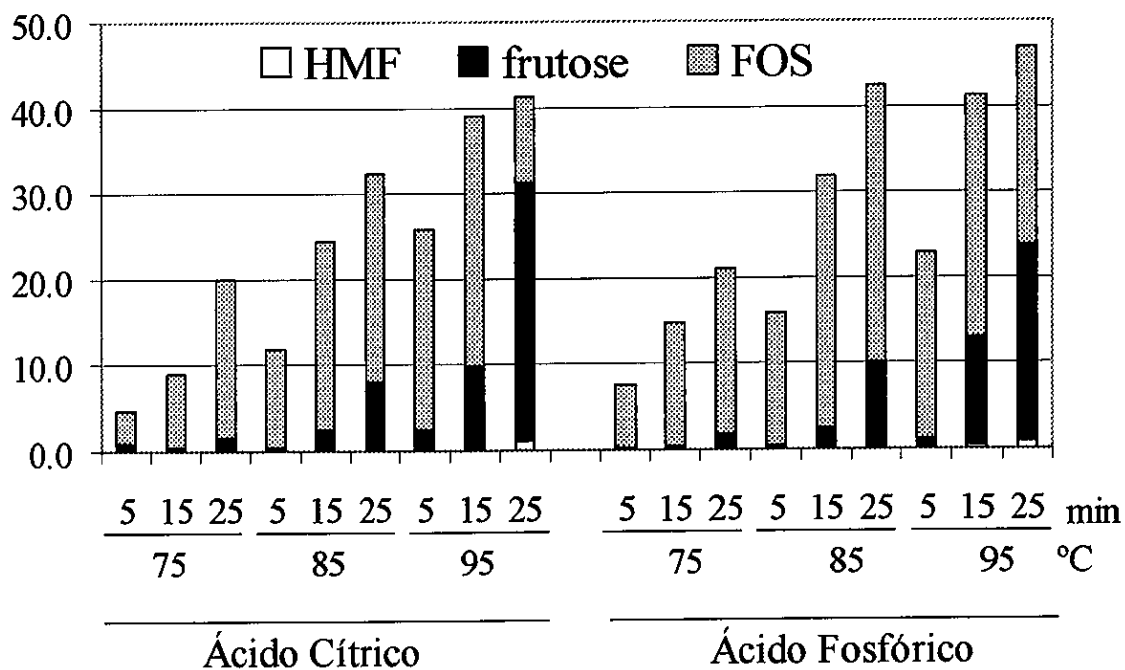
127

Fig. 4



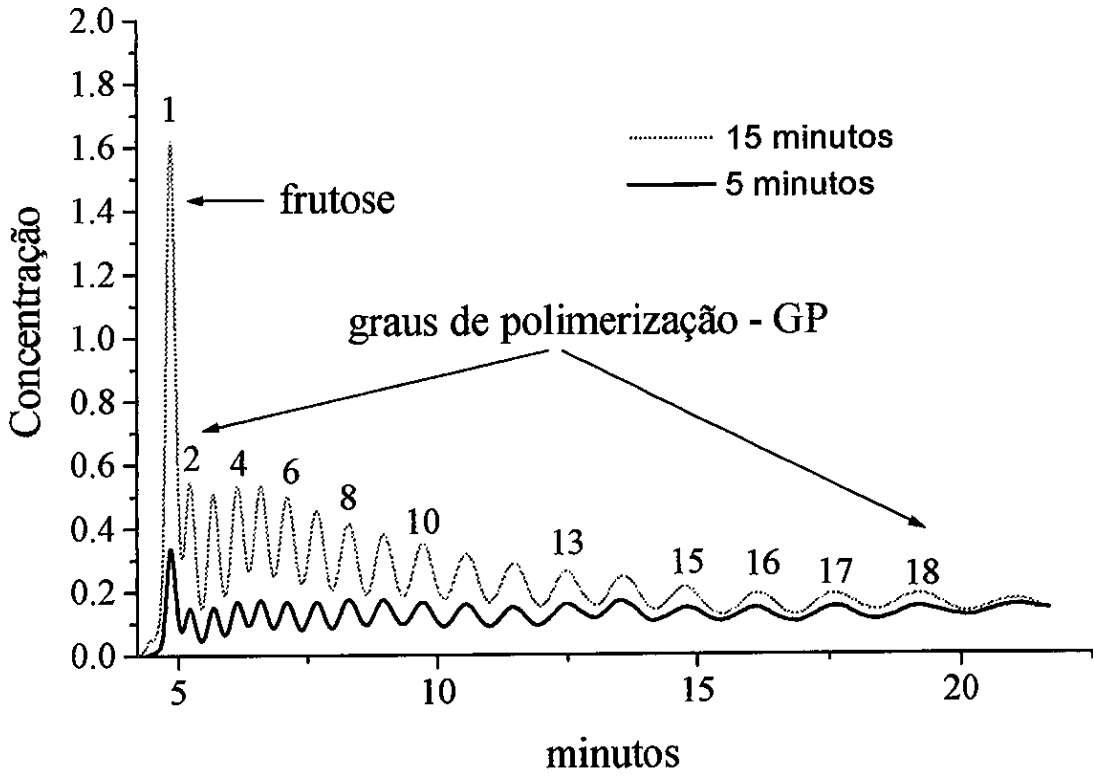
128
E

Fig. 5



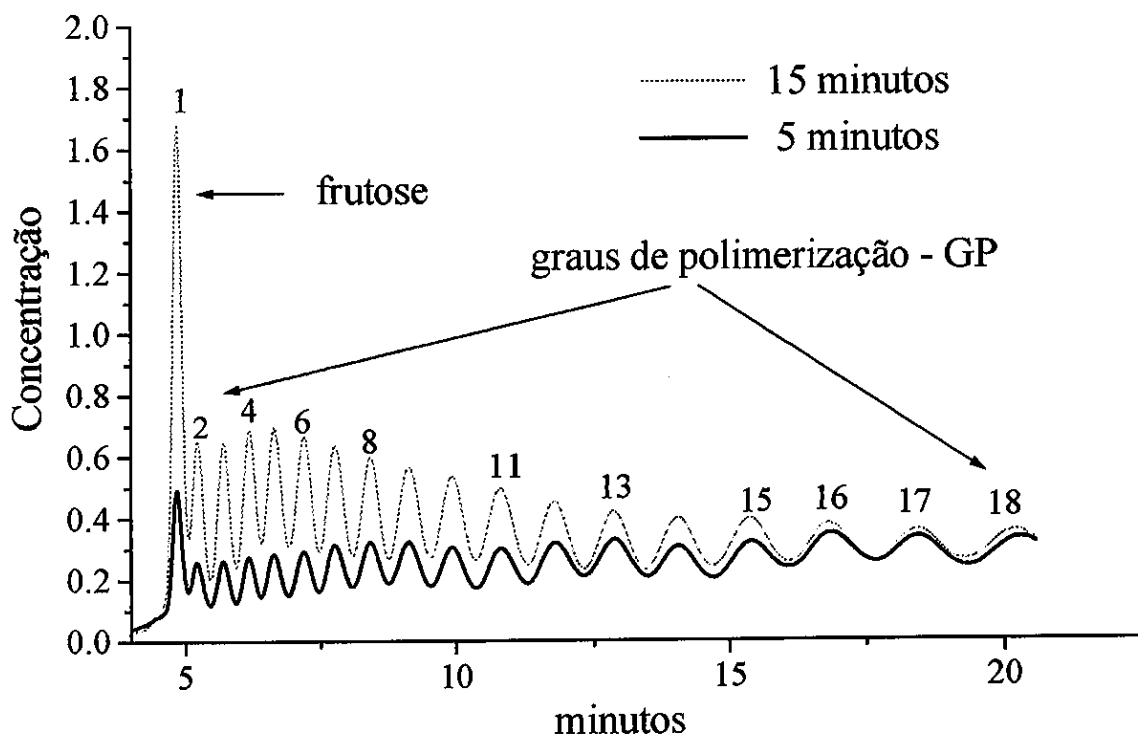
129
Z

Fig. 6



130
9

Fig. 7



131
9

Fig. 8

