

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

BRUNO ROBERTO PETRY

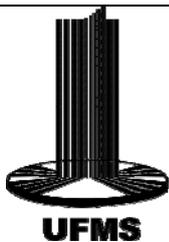
**HIDRÓLISE DE POLIFRUTANOS POR
INULINASE IMOBILIZADA EM
p-NITRO BENZIL XANTATO DE
CELULOSE**

ORIENTAÇÃO : Prof^a. Dr^a. Célia Maria da S. Oliveira

CO-ORIENTAÇÃO: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Marques

Campo Grande (MS)

2008



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

BRUNO ROBERTO PETRY

**HIDRÓLISE DE POLIFRUTANOS POR
INULINASE IMOBILIZADA EM
p-NITRO BENZIL XANTATO DE
CELULOSE**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química, junto ao Departamento de química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a Dr^a. Célia Maria da Silva Oliveira e co-orientação da Prof^a Dr^a. Maria Rita Marques.

Campo Grande (MS)

2008

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| Agradecimentos..... | i |
| Lista de Abreviaturas..... | ii |
| Resumo..... | iv |
| Abstract..... | vi |
| 1. Introdução..... | 01 |
| 2. Revisão Bibliográfica..... | 06 |
| 2.1. Inulina e Polifrutanos..... | 06 |
| 2.2. Propriedades biológicas da inulina..... | 10 |
| 2.3. Propriedades Biológicas da frutose..... | 13 |
| 2.4. Inulinases..... | 16 |
| 2.5. Imobilização de Enzimas..... | 18 |
| 2.6. Métodos de imobilização de enzimas..... | 21 |
| 2.6.1. Ligação a um Suporte..... | 21 |
| 2.6.1.1. Ligação covalente com o Suporte..... | 22 |
| 2.7. Celulose como suporte sólido para imobilização de enzimas..... | 23 |
| 2.7.1. Xantato de celulose..... | 26 |
| 3. Objetivos..... | 30 |
| 4. Material e Métodos..... | 31 |
| 4.1. Equipamentos e Reagentes..... | 31 |
| 4.2. Síntese do suporte p-nitrobenzil xantato de celulose (CelXNB)..... | 32 |
| 4.3. Determinação do Grau de Substituição (GS) do CelXNB..... | 34 |
| 4.4. Extração de Inulina de Raízes de <i>Sterculia chicha</i> A. St. Hil. (Malvaceae)..... | 34 |
| 4.5. Métodos para quantificação da frutose..... | 35 |
| 4.5.1. Método de Taylor..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 4.5.2. Método de Seliwanoff..... | 36 |
| 4.5.3. Método de Somogyi e Nelson..... | 36 |
| 4.5.4. Método Enzimático..... | 37 |
| 4.6. Imobilização da Enzima Inulinase..... | 37 |
| 4.7. Atividade da enzima inulinase em solução e imobilizada em suporte CelXNB..... | 38 |
| 4.8. Ciclos de catálise da enzima imobilizada..... | 38 |
| 4.9. Verificação da resistência do suporte..... | 39 |
| 4.10. Análise da micro-estrutura do suporte CelXNB em M E V..... | 39 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 41 |
| 5.1. Grau de substituição do CelXNB..... | 41 |
| 5.2. Métodos de quantificação de frutose livre..... | 46 |
| 5.3. Rendimento da extração de Inulina de <i>Sterculia chicha</i> | 48 |
| 5.4. Imobilização da Inulinase..... | 49 |
| 5.5. Ciclos de reutilização da inulinase imobilizada em CelXNB..... | 51 |
| 5.6. Análise da micro-estrutura do suporte CelXNB em M E V..... | 54 |
| 6. Conclusões..... | 57 |
| 7. Bibliografia..... | 60 |

AGRADECIMENTOS

A Professora Dr^a. Célia Maria da Silva Oliveira, pela concepção do trabalho e pelas sábias sugestões e objetivas orientações, sem as quais não seria possível a realização do mesmo.

A Professora Dra^a. Maria Rita Marques, por acreditar em mim e no meu trabalho e pelas suas valiosas sugestões e orientações.

Ao Professor Dr. Gilberto Maia pelo acompanhamento, orientações, sugestões esclarecedoras e pelos preciosos ensinamentos nas horas de grandes dificuldades e insegurança.

Aos meus familiares pelo carinho, dedicação e confiança. A vocês, meus amores, toda minha admiração, respeito e gratidão.

Aos professores Neli, Adilson, Denis, Valdir, Sílvio e Angela Delben (Depto. de Física) pela força e atenção.

Aos colegas do LP₅ : Alcides, Andréia, Crislaine , Dante, Edgar João Bosco , Juliano, Hebert, Márcio, Michele, Sandra , Sebastião, e Simone, pela convivência durante a realização deste trabalho.

A PROPP/UFMS, por proporcionar condições para a realização deste trabalho e pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|---|
| A | absorbância a 340 nm |
| AM | agitador mecânico |
| $A_{285\text{nm}}$ | absorbância em 285nm |
| Am | absorbância da solução na micro seringa |
| At | absorbância da solução em um tempo qualquer |
| A_T | absorbância da solução no tubo de reação |
| B | comprimento do caminho ótico |
| Cel | Celulose |
| CelNa | soda de celulose |
| CelX | xantato de celulose |
| CelXNB | p-nitrobenzil xantato de celulose |
| CelTCB | celulose tionocarbamato |
| d | caminho da luz |
| NBT | p-nitrobenziltiol |
| GS | grau de substituição |
| [enz] | concentração da enzima |
| E | espectrofotômetro |
| F | fator de diluição |
| n_{NBT} | número de mols de p-nitrobenziltiol liberados por grama de celulose |
| V_0 | velocidade inicial de transformação do substrato |
| V/V | porcentagem em volume |
| V_c | volume na cubeta |
| V_T | volume total |
| V_m | volume na microseringa |
| ϵ_{285} | absortividade molar do p-nitrobenziltiol em 285 nm |
| ϵ | coeficiente de extinção |
| UV/VIS | ultravioleta e visível |
| PM | peso molecular |
| OPM | oscilação por minuto |

n_T n° de mols de p-nitrobenziltiol liberados no tubo de reação

$\Delta A_{285}/\Delta$ coeficiente angular absorvância em 285nm versus massa de
CelXNB

$\Delta n_T/\Delta m$ variação do n° de mols liberados de NBT pela variação de massa
de CelXNB

kcal quilocaloria

RESUMO

Neste trabalho foi preparado o suporte sólido p-nitrobenzil xantato de celulose (CeIXNB) com grau de substituição (GS) igual a 9,5, posteriormente utilizado para imobilizar inulinase. A reação de imobilização da enzima foi conduzida em pH 4,5, à temperatura ambiente, sob agitação mecânica durante 72 horas para permitir a reação dos resíduos do éster xântico presentes no suporte sólido com os grupos amínicos livres da enzima dissolvida no tampão. Entretanto, uma reação de tiólise poderia, igualmente, ser considerada. A hidrólise dos substratos usados, pela ação da enzima imobilizada e da enzima em solução, foram determinadas pela produção de frutose, nas mesmas condições de pH e temperatura, porém com diferentes tempos de incubação. O branco foi preparado e tratado do mesmo modo, mas sem a adição de inulinase. Os substratos utilizados foram inulina disponível comercialmente e uma mistura de polifrutanos inulínicos extraída de raízes de *Sterculia chicha* A. St. Hil. (Malvaceae). Em presença do substrato polifrutano, obteve-se 36,9 % de frutose com a enzima em solução e 26,4% com a enzima imobilizada. Quando se utilizou inulina comercial como substrato, obteve-se 89,9% de frutose com a enzima em solução, e 88,1% com a enzima imobilizada. Observou-se maior afinidade da enzima pelo substrato mais puro e mais solúvel no meio de reação. As impurezas presentes no polifrutano de *S.chicha* podem ter obstruído alguns sítios catalíticos da inulinase. Uma única amostra de inulinase imobilizada em CeIXNB, isto é o conjunto suporte-enzima, foi reutilizada para hidrolisar inulina comercial, oito vezes, e outra amostra reutilizada onze vezes, para hidrolisar polifrutanos inulínicos com retenção da atividade catalítica. Entretanto, a quantidade de frutose produzida no decorrer das reutilizações do conjunto suporte-enzima, decresceu com ambos substratos. O rendimento das reações quando se utilizou a inulina comercial foi maior. Talvez uma mistura de polifrutanos com pesos moleculares diferentes apresente problemas de difusão, principalmente numa reação que ocorre em uma interfase sólido-líquido, em comparação com a inulina que é mais solúvel. A queda da atividade observada em cada reutilização com os diferentes substratos pode ser explicada pela perda de massa do conjunto suporte-enzima, uma vez que observou-se uma perda de 33% das massas iniciais. Esta perda de massa deve estar relacionada à

mercerização da celulose, que influencia no GS do CelXNB. A hidrólise do CelXNB, com produção de celulose regenerada, sulfeto de carbonila e o tiol correspondente é muito lenta quando realizada em pH 4,5 para ser considerada como problema de perda de massa do suporte-enzima e conseqüentemente da atividade catalítica, ainda que as duas amostras tenham sido agitadas durante 24 dias e 33 dias, com quando inulina e substrato polifrutanos como substratos, respectivamente. É necessária a realização de estudos no sentido de otimizar o GS do CelXNB, e a reação de hidrólise da inulina pela enzima imobilizada. A agitação também deve ser muito mais vigorosa, diminuindo assim o tempo de reação.

ABSTRACT

The preparation of the solid support *p*-nitrobenzyl cellulose xanthate (CelXNB) is showed in this work. The material has a substitution grade (SG) of 9.5 and was employed to immobilize inulinase. The enzyme immobilization reaction was carried out at pH 4.5, at room temperature, under mechanical stirring during 72 hours. This procedure would allow the reaction between the xanthic ester's residues present within the solid support and the free amino groups of the enzyme dissolved in buffer. However, a tiolysis reaction would be equally feasible to consider. The hydrolysis of used substrates by the action of immobilized and enzyme in solution was determined by fructose production, in the same conditions of pH and temperature, although with different incubation time. The control was prepared and treated in the same way though without addition of inulinase. The employed substrates were commercial available inuline and a mixture of inulinic polyfructanes extracted from root of *Sterculia chicha* A. St. Hil. (Malvaceae). In presence of polyfructane, it was obtained 36,9% of fructose with enzyme in solution and 26.4% with immobilized enzyme. The experiment performed with the commercial inuline and substrate resulted in the obtention of 89,9% of fructose with enzyme in solution and 88,1% with immobilized enzyme. It was observed greater affinity of the enzyme to purer and more soluble substrate. Impurities in polyfructane from *S.chicha* may have blocked some catalytic sites of inulinase. A solely sample of immobilized inulinase in CelXNB, i.e. the complex support-enzyme, was reutilized to hydrolyze commercial inuline eight times and another sample reutilized eleven times to hydrolyze inulinic polyfructanes with maintenance of catalytic activity. Nevertheless, the quantity of produced fructose over the reutilization of the complex support-enzyme, decreased with both substrates. The yield

of reactions as commercial inuline was used was greater. Possibly, a mixture of polyfructanes with different molecular weights causes problems of diffusion, mainly in a reaction that occurs at a solid-liquid interface, in comparison with the inuline which is more soluble. The observed low activity in each reutilization with different substrates may be explained by the mass loss from the complex support-enzyme since it is verified 33% of loss from the starting masses. This mass loss might be related to the mercerization of cellulose that influences in the GS of CelXNB. The hydrolysis of CelXNB with production of regenerated cellulose, carbonyl sulfide and the corresponding tyol is very slow as carried out in pH 4.5. Therefore it should not be considered a problem of mass loss from support-enzyme and consequently of the catalytic activity albeit the two samples have been stirred during 24 days and 33 days with inuline and polyfructanes as the substrates, respectively. It is necessary to carry on studies so that to optimize the GS of CelXNB and the reaction of inuline hydrolysis by the immobilized enzyme. In addition, a more vigorous stirring should be required with the purpose of decreasing the reaction time.

INTRODUÇÃO

Este trabalho trata da produção de frutose, por meio da enzima inulinase imobilizada em um suporte sólido derivado de celulose na forma de éster xântico p-nitrobenzil xantato de celulose (CelXNB), composto já utilizado com sucesso na imobilização de várias enzimas (OLIVEIRA, 1983).

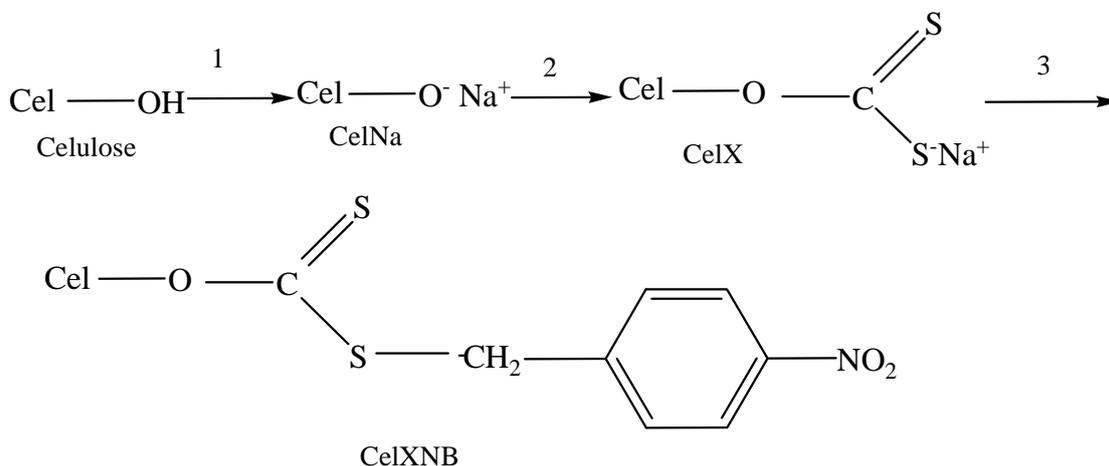
Dentre outros, os principais interesses pela produção de frutose estão: alta tolerância por diabéticos, pois é um açúcar insulino-independente (PESSONI *et al.*, 2004); é considerado um probiótico, pois estimula a ação das bifidobactérias (PESSOA, 1999); aumentam a absorção de ferro, cálcio e magnésio (PESSOA, 1999), pode ser utilizada em dietas de restrição calórica, pois tem poder adoçante quase duas vezes maior que a sacarose (BARREIROS, 2005), entre outros. A frutose é um açúcar de grande importância econômica e ainda não é produzido comercialmente no Brasil. Nos últimos anos vem sendo largamente empregado como adoçante em bebidas, refrigerantes e frutas industrializadas.

O uso crescente de inulina e frutose na alimentação humana, o alto custo de xaropes ricos em frutose e o grande potencial da região Centro-Oeste em produzir plantas que acumulam frutanos inulínicos, foram fatores determinantes para a concepção deste trabalho.

A reação de imobilização da inulinase foi conduzida a temperatura ambiente, sob agitação mecânica durante 72 horas, reagindo CelXNB, preparado de acordo com Humeres (1991) e inulinase de *Aspergillus niger*, obtida da Sigma Chemical Co, em tampão acetato 0,05M pH 4,5. Esta reação ocorre numa interfase sólido-líquido.

A preparação do suporte sólido, CelXNB, foi realizada tratando-se a celulose na forma de tecido de algodão, primeiramente, com

hidróxido de sódio, obtendo a soda de celulose. Em seguida foi realizada uma xantação em meio alcalino, produzindo o xantato de celulose. O xantato obtido foi esterificado com brometo de p-nitrobenzila, produzindo assim o CelXNB. As etapas desta síntese são mostradas no Esquema 1.

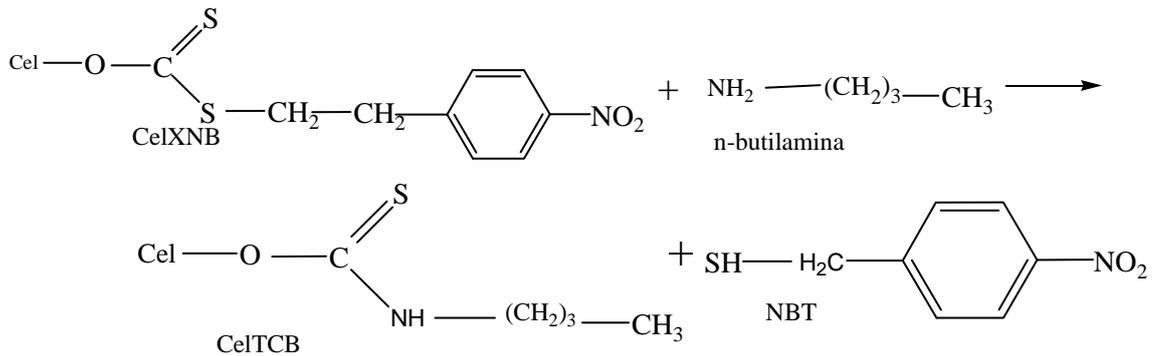


- (1) Tratamento da celulose com hidróxido de sódio (mercerização), obtendo-se soda celulose (CelNa)
- (2) Xantação da celulose em meio alcalino, obtendo-se o xantato de celulose (CelX)
- (3) Esterificação com brometo de p-nitrobenzil para formar o xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB)

ESQUEMA 1 - Síntese do CelXNB

O CelXNB preparado foi caracterizado pelo grau de substituição (GS), definido como o número de grupos xantatos introduzidos em cada 100 unidades anidroglicopiranosicas da celulose (RYDHOLM, 1985).

O número de mols dos grupos xantatos ligados na cadeia da celulose foi calculado pela n-butilaminólise do CelXNB, conforme reação mostrada no Esquema 2



ESQUEMA 2 - Reação do CelXNB com n-butilamina

A reação apresentada no Esquema 2 foi acompanhada espectrofotometricamente pelo aparecimento do p-nitrobenziltiol (NBT) em 285 nm até o valor constante, o que possibilitou determinar o número de mols de NBT liberados na solução cinética. Como a reação é 1:1, considerou-se que o número de mols de NBT liberados é igual ao número de grupos xantatos que se ligaram aos anéis anidroglucopiranosícas da celulose. Por meio de n-butilaminólise, com diferentes quantidades de CelXNB, calculou-se o número de mols de grupos xantatos ligados a celulose por grama de suporte n_{NBT} . O GS é calculado pela Equação 1, onde $1,62 \times 10^4$ é a massa molar de 100 unidades anidroglucopiranosícas.

$$\text{GS} = 1,62 \cdot 10^4 \times n_{\text{NBT}} \quad (1)$$

Vários métodos foram testados para quantificar a frutose liberada na hidrólise da inulina tanto pela ação da inulinase imobilizada como em solução. Os métodos de Seliwanoff (SELIWANOFF, 1887; CHANG, 1994), Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945) e de Taylor (TAYLOR, 1994) estão descritos na literatura como eficientes para a quantificação de frutose livre produzida pela ação de inulinases (ZAIA, 1998). Porém, pelos experimentos realizados neste

trabalho, os reagentes utilizados nos métodos acima citados para determinação de frutose, hidrolisam completamente a inulina presente no meio reacional, não permitindo distinguir a frutose produzida por hidrólise enzimática daquela produzida pela hidrólise química. Esses métodos são úteis apenas para quantificação de frutose total.

Neste sentido, objetivando-se verificar a eficácia da inulinase imobilizada em CelXNB no que se refere a produção de frutose, por meio da hidrólise enzimática do suporte, utilizou-se um método enzimático, desenvolvido por Campuzano (2003), através de um kit comercializado pela Sigma Co (FA-20) para determinação específica de frutose livre. Desse modo, foi possível medir a quantidade de frutose produzida pela hidrólise enzimática dos dois substratos utilizados comparando-se a inulina disponível comercialmente com a de uma mistura de polifrutanos inulínicos extraída da planta *Sterculia chicha*, de modo inequívoco. Esse mesmo método foi também usado para quantificar a frutose produzida pela hidrólise dos referidos substratos por ação da inulinase em solução.

Determinou-se também, em outro estudo, o número de ciclos de reutilização da inulinase imobilizada. As reações de hidrólise do substrato inulina e de hidrólise do polifrutanos inulínicos pela inulinase imobilizada em CelXNB foram conduzidas várias vezes com a mesma amostra suporte-enzima. Nas hidrólises da inulina comercial realizaram-se oito ciclos com retenção da atividade catalítica, enquanto que nas hidrólises dos polifrutanos, o conjunto suporte-enzima, foi reutilizado onze vezes com retenção da atividade enzimática. Os rendimentos das reações foram menores quando usou-se polifrutanos inulínicos como substrato.

Após estas reações, os conjuntos suporte-enzima foram secados e pesados, constatando-se que aproximadamente 33% da

massa de ambos foi perdida no processo. Esta perda de massa pode ser atribuída pelo tempo de agitação (24 dias na reação com inulina comercial e 33 dias na reação com o polifrutano), já que a velocidade da hidrólise espontânea do CeIXNB em pH 4,5 é muito lenta (HUMERES e OLIVEIRA 1999).

Finalmente realizou-se a caracterização do CeIXNB e do conjunto suporte-enzima por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises das micro-estruturas mostram que há diferenças significativas entre ambos. No entanto, é necessário o desenvolvimento de uma técnica que utilize corantes específicos para proteínas, o que possibilitará visualizar e elucidar a fixação de enzimas imobilizadas na superfície do CeIXNB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Inulina e Polifrutanos

Em algumas espécies vegetais, os produtos fotossintéticos são armazenados na forma de polifrutanos. Frutano é a denominação geral para qualquer carboidrato no qual um ou mais frutofuranosil ligados constituem a maior parte das ligações glicosídicas. Espécies vegetais que contem frutanos são encontradas em várias famílias de mono e dicotiledôneas, tais como Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae e Compositae – cerca de 15% das angiospermas (HENDRY & WALLACE, 1993). Muitas espécies são comestíveis tais como aspargo, alho, cebola, alcachofra, raízes de chicória e alho-poró (MEIER & REID, 1983). Em Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae e Compositae os frutanos são usualmente armazenados em órgãos tais como túberos, raízes tuberosas e bulbos, e devido à ausência de outros componentes são facilmente extraíveis e processados a produtos purificados (VAN LOO *et al.*, 1995).

Além do papel de reserva energética, os frutanos atuam na manutenção do gradiente de sacarose no floema e tecidos adjacentes, atuando nos processos de osmorregulação, devido às rápidas relações de polimerização e despolimerização (TERTULIANO & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993) e na resistência de plantas à seca e ao frio (HENDRY & WALLACE, 1993; MORVAN *et al.*, 1997). De fato, a presença de frutanos em Asteraceae tem sido bem documentada para floras que exibem padrões de crescimento sazonal em regiões temperadas (POLLARD & AMUTI, 1981) e em áreas restritas dos trópicos, como o cerrado, um bioma onde as espécies estão sujeitas a

períodos de secas severos (FIGUEIREDO-RIBEIRO *et al.*, 1986; TERTULIANO & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993).

Existem diferentes tipos de frutanos, dependendo da ligação glicosídica que apresentam: inulina que têm ligações do tipo β 2,1; os levanos que são β 2,6 ligados e graminanos que apresentam ligações do tipo β 2,1 e β 2,6. Frutanos do tipo inulina são comumente encontrados em Asteraceae, enquanto os demais frutanos estão distribuídos entre outros grupos que apresentam a síndrome de frutanos; ou seja, espécies que armazenam preferencialmente frutanos ao invés de amido ou outros carboidratos de reserva. (ASEGA & CARVALHO, 2004).

A inulina já foi detectada em várias espécies vegetais e recebeu esta denominação por ter sido encontrada pela primeira vez em raízes da espécie *Inula helenium* (Asteraceae). São polímeros compostos por uma cadeia linear de unidades de frutose com aproximadamente 35 resíduos de β -D - frutofuranose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(2,1), com uma terminação de alfa - D glucopirranose idêntica à da sacarose (Figura 1). Sua fórmula geral é $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$, com massa molecular entre 3.500 e 5.500 Da, devido às variações no tamanho da cadeia (ASHOK *et al.*, 1999). A inulina pode ter a descrição geral **GF_n**, onde **G** representa a molécula de glicose, **F** a molécula de frutose e **n** o número de unidades de frutose (VAN LOO *et al.*, 1995; SILVA, 1996).

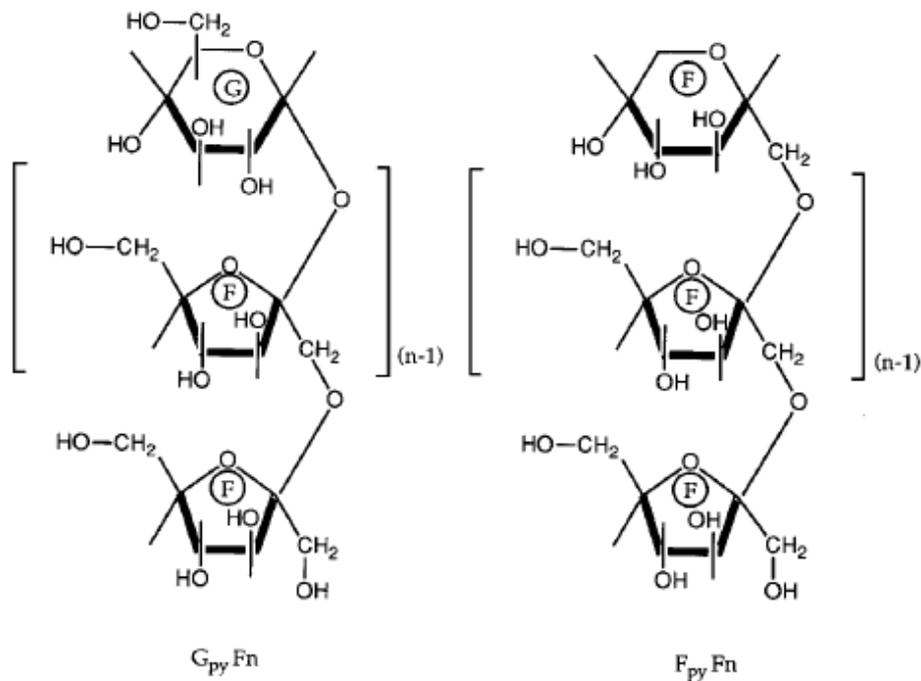


Figura 1: Estrutura química de um frutano tipo inulina $G_{py}F_n$ e $F_{py}F_n$, onde n é o grau de polimerização ou o número de β -D-frutofuranose; G e F simbolizam glicose e frutose respectivamente. $G_{py}F_n$ simboliza o oligômero α -D-glicopiranosil- $[\beta$ -D-frutofuranosil] $_{n-1}$ -D-frutofuranose e $F_{py}F_n$ simboliza o oligômero β -D-frutofuranosil-[D-frutofuranosil] $_{n-1}$ -D-frutofuranose. Fonte: ROBERFROID & DELZENNE (1998)

Silva (1996) e Lorenzo e colaboradores (1999) definem a inulina como um frutooligossacarídeo (FOS) composto por uma mistura de oligômeros de diferentes graus de polimerização (GP) que ocorrem naturalmente em produtos vegetais como cebola, alho, alcachofra de Jerusalém, dália e raízes de chicória. De acordo com os autores, as inulinas produzidas em diferentes estágios do ciclo de crescimento da planta, ou sob diferentes condições abióticas, irão apresentar diferentes graus de polimerização. Outros fatores como época de plantio, época da colheita, espaçamento entre plantas e período de armazenamento também influenciam o GP e outras

propriedades físicas como viscosidade, capacidade de formação de gel e na pureza do xarope obtido após a hidrólise (NAKAMURA, 1995). A Tabela 1 mostra a porcentagem de inulina e frutose em diferentes espécies vegetais comestíveis.

Tabela 1: Níveis de inulina e frutose em vegetais da dieta humana (SILVA, 1996).

| Espécie Vegetal | Inulina (%) | Frutose (%) |
|---|--------------------|--------------------|
| Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 2,5 | 2,35 |
| Cebola (<i>Allium cepa</i>) | 4,0 | 3,76 |
| Alho-poró (<i>Allium porrum</i>) | 12,5 | 11,75 |
| Aspargos (<i>Asparagus officinalis</i>) | 12,5 | 11,75 |
| Raiz de chicória (<i>Chicorium intybus</i>) | 16,5 | 15,51 |
| Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) | 17,5 | 16,46 |
| Raiz de barba de bode (<i>Cyperus compressus</i>) | 17,5 | 16,46 |
| Alcachofra de Jerusalém (<i>Helianthus tuberosus</i>) | 17,5 | 16,46 |
| Tubérculos de Dália (<i>Dahlia juarezii</i>) | 17,5 | 16,46 |
| Alho (<i>Allium sativum</i>) | 20,0 | 18,8 |
| Mel | 43,6 | 41,0 |

O modelo mais aceito para a biossíntese de inulina é baseado nos estudos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Asteraceae) (EDELMAN & JEFFORD, 1968). Segundo estes e outros autores, duas frutossiltransferases são responsáveis pela biossíntese de inulina – a sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), que catalisa a produção de trissacarídeos 1-cestose e glicose a partir da sacarose. A outra enzima é a frutano: frutano frutossiltransferase (1-FFT), que transfere resíduos frutossil entre moléculas de frutano (WAGNER & WIEMKEN, 1986; KOOPS & JONKER, 1994; LUSCHER *et al.*, 2000). De acordo com este modelo, a degradação da inulina é catalisada por uma frutano exo-hidrolase (1-FEH), a qual libera frutose livre a partir da porção não redutora e a 1-FFT, pela transferência de unidades frutossil a partir de moléculas de alta massa molecular.

2.2) Propriedades biológicas da inulina

Devido à β -configuração do carbono anomérico C 2 dos monômeros de frutose, a inulina resiste à hidrólise das enzimas digestivas do intestino delgado humano, e são classificadas como carboidratos não digeríveis, sendo considerados como componentes fibrosos da dieta (ROBINSON, 1995). Pelo aumento da biomassa fecal e do conteúdo de água nas fezes, estes carboidratos aumentam a atividade intestinal e apresentam características diferentes de outras fibras, apresentando inúmeros benefícios a saúde humana.

A inulina afeta as funções gastrointestinais principalmente pelos seus atributos fisiológicos. São rapidamente fermentados no cólon e convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (SCFA - *short-chain fatty acids*). Os SCFAs estimulam o crescimento seletivo das bifidobactérias (e possivelmente alguns outros poucos gêneros),

causando mudanças significativas na composição da microbiota intestinal, levando a um aumento das colônias saudáveis e diminuindo as colônias potencialmente patogênicas (ROBERFROID *et al.*, 1993; HEWITT, 1994; ROBERFROID, 2005).

A inulina e seus produtos de hidrólise (FOS) são pré-bióticos. Estes polímeros induzem mudanças no epitélio do cólon estimulando a proliferação das criptas, aumentando a concentração de poliaminas, mudando o perfil das mucinas e modulando as funções endócrina e imunológica (ROBERFROID, 2005). Além disso, são carboidratos de baixa caloria, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Valor calórico de diferentes componentes alimentares (PARK, 2002)

| Valor Calórico (kcal/g) | |
|--------------------------------|-----|
| Inulina | 1,5 |
| Açúcar | 4,0 |
| Triacilgliceróis | 9,0 |

Verificou-se que inulinas aumentam a absorção de cálcio e magnésio. Diferentes inulinas apresentam provavelmente diferentes respostas biológicas, sendo considerado o produto mais ativo as inulinas enriquecidas de oligofrutoses. Polímeros que apresentam menos de dez unidades de frutose são denominados frutooligossacarídeos ou oligofrutose, sendo utilizados como adoçantes. Aqueles que apresentam mais de dez unidades não apresentam sabor doce, sendo usados apenas para melhorar a textura dos alimentos em substituição às matérias graxas (ROBERFROID & DELZENNE, 1998; LOBO, 2004). A Tabela 3 mostra

a estrutura geral e o GP de inulinas de fontes naturais e sintéticas, presentes na dieta humana.

Tabela 3: Frutanos da dieta: nome, origem e estrutura geral (LOBO, 2004)

| Nome | Origem | Estrutura Química | |
|-------------------------|---|---|---------------------------------|
| | | Fórmula Geral | (GP _n) ^a |
| Inulinas (INU) | Planta (<i>Chicorium intybus</i>) | G _{py} F _n | 2-70 (média 10-20) |
| Oligofrutose (OFr) | Hidrólise parcial de INU | G _{py} F _n + F _{py} F _n | 2-10 (media 5) |
| Frutano sintético (SFr) | Síntese enzimática a partir da sacarose | G _{py} F _n | 2-4 (media 3,5) |

^aGP: grau de polimerização; n: número; INU: inulina nativa de chicória; G_{py} F_n: α-D-glicopiranosil-[β-D-frutofuranosil]_{n-1}-D-frutofuranose; F_{py} F_n: β-D-frutofuranosil-[D-frutofuranosil]_{n-1}-D-frutofuranose; OFr: oligofrutose produzida por hidrolisato enzimático parcial de inulina de chicória; SFr: frutanos sintéticos produzidos por síntese enzimática a partir da sacarose

Uma série de estudos com animais demonstraram que frutanos tipo inulina afetam o metabolismo de lipídeos diminuindo a triglicidemia e a colesterolemia, pela redução de partículas de VLDL no plasma. Inúmeros trabalhos mostram que a inulina reduz o risco de câncer de cólon e de intestino grosso (KOK *et al.*,1996).

No Brasil ainda não existe produção de inulina em nível comercial, porém várias instituições de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de metodologias que garantam a produção comercial desta substância, não sendo mais necessária realizar a sua importação.

A inulina pode ser hidrolisada para obtenção de frutose, pois apresenta um teor muito elevado deste monômero (cerca de 94% de frutose). Na hidrólise ácida ocorre caramelização e baixo rendimento de reação com formação de substâncias indesejáveis os quais tornam o produto de baixo valor comercial. Estes aspectos têm motivado

diversos pesquisadores na busca de outras formas de hidrólise da inulina para a produção de frutose (LOBO, 2004).

2.3. Propriedades Biológicas da Frutose

Frutose ou levulose é um monossacarídeo levorrotatório, isômero da glicose, de composição química $C_6H_{12}O_6$. Embora seja uma hexose, geralmente se apresenta como um anel de cinco membros do tipo furanose (hemiacetal) (IBRAIM *et al.*, 2006) (Figura 2).

Foi isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar (WANG,1981). É encontrada em muitos alimentos e é um dos três açúcares mais importantes do sangue, juntamente com a glicose e a galactose. Mel, frutas e algumas raízes de vegetais contêm frutose usualmente em combinação com glicose formando a sacarose. Frutose pode ser, portanto, derivada da hidrólise da sacarose por glicosidases específicas durante a digestão. A frutose é encontrada como componente de vários alimentos, sendo o mel o que apresenta a maior concentração deste monossacarídeo (Tabela 1).

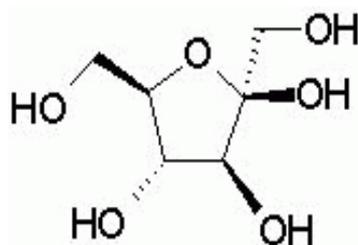


Figura 2: Fórmula estrutural da frutose

Há muitos estudos sobre as vantagens do uso de frutose na dieta dos humanos e animais e na preparação de alimentos industrializados. É muito bem tolerada por pacientes diabéticos, uma

vez que grande parte da frutose ingerida é fermentada pelas bifidobactérias intestinais e a porção absorvida, uma vez na corrente sanguínea, não necessita da insulina para ser transportada para o fígado ou tecidos periféricos. Por estas peculiaridades metabólicas a frutose é recomendada como adoçante alternativo pela OMS (Organização Mundial de Saúde) O uso de frutose na dieta de diabéticos foi preconizada desde 1893, quando Minkowski observou a independência da frutose em relação à insulina para a sua metabolização (AKGÜN & ERTEL, 1980 ; PESSOA-JR & VITOLO, 1999).

Pessoni e colaboradores (2004) avaliaram a ação da frutose obtida da inulina de *Vernonia herbaceae* sobre o nível de glicose plasmática de ratos diabéticos. Os autores verificaram que não houve mortalidade entre os animais tratados, ocorrendo redução em média, de 46% dos níveis de glicose plasmática dos animais tratados, quando comparados com o controle.

A frutose pode ser usada por pessoas que desejam perder peso, pois apesar de apresentar o mesmo valor calórico da sacarose (16 kJ ou 4 kcal/g) é ingerida em menor quantidade, pois tem poder adoçante de 1,2 a 1,8 vezes maior do que a sacarose (CRUZ, 1998; ObtidoPESSOA-JR & VITOLO, 1999 ; BARREIROS, 2005).

Entre outras vantagens do uso de frutose na alimentação humana, pode-se citar: aumento da absorção de ferro, cálcio e magnésio em crianças (PESSOA-JR & VITOLO, 1999; LOBO, 2004); favorece a remoção do etanol do sangue dos alcoólicos (PESSOA-JR & VITOLO, 1999) e não apresenta problemas de cristalização como a sacarose (PESSONI *et al.*, 2004).

A principal desvantagem da frutose para humanos está correlacionada ao consumo excessivo deste monossacarídeo, que por saturação da via glicolítica, leva à formação de elevadas quantidades de acetil-CoA, o que aumenta a biossíntese de ácidos graxos,

provocando acúmulo de triacilgliceróis no tecido adiposo (HALLFRISCH, 1991; LEHNINGER, 2002). No entanto, este desvio metabólico que culmina em aumento da gordura corporal é igualmente provocado pelo consumo de sacarose e glicose, não sendo, portanto um processo desencadeado unicamente pela frutose. Para evitar o ganho de peso o consumo de frutose deve ser rigorosamente controlado, assim como de outros carboidratos (BRAY *et al.*, 2004).

A frutose é um açúcar que apresenta grande importância comercial e ainda não é produzido comercialmente no Brasil. Nos últimos anos vem sendo largamente empregada como adoçante em bebidas, refrigerantes e frutas industrializadas.

Na década de 70, a separação da frutose e da glicose a partir de soluções compostas por açúcares invertidos foi conseguida por meio da cromatografia de troca iônica. A utilização desse método aumentou a produção de frutose pura e diminuiu o seu preço. Ao mesmo tempo, o isolamento de isomerases capazes de transformar a D-glicose em D-frutose levou à introdução comercial de xaropes derivados de amido, ricos em frutose (BARREIROS, 2005). A frutose produzida comercialmente por isomerização da glicose do amido de milho é um processo de alto custo o qual envolve três etapas enzimáticas usando a α -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase (PESSONI *et al.*, 2004). Nesta reação o rendimento é insatisfatório, apresentando apenas 42% de frutose, 50% de glicose e 8% de oligossacarídeos, devido a ocorrência da inibição da enzima frutossiltransferase em meio ácido (ZITTAN, 1981).

Outra fonte importante de frutose são os polifrutanos do tipo inulina. Esta pode ser hidrolisada em condições de pH ácido (1,5) e alta temperatura (entre 80 e 100°). Entretanto a frutose obtida por este método é facilmente degradada, apresentando alteração na cor e ocorrendo formação de sub-produtos indesejáveis como o anidrido de

difrutose o qual não tem capacidade adoçante (ZITTAN, 1981; VANDAMME, 1983; GUPTA *et al.*, 1994).

Uma alternativa é a obtenção de frutose a partir da hidrólise da inulina, em uma única etapa, formando glicose e frutose. Tal processo pode ser químico ou enzimático. A hidrólise enzimática da inulina oferece vantagens em relação à hidrólise química, proporcionando um produto final organolepticamente desejável, livre de resíduos químicos e com melhores propriedades funcionais e nutricionais (CABRAL *et al.*, 2003). A produção de frutose proveniente da inulina requer o uso de hidrolases denominadas inulinases (NAKAMURA, 1995; PESSONI *et al.*, 2004).

2.4. Inulinases

Inulinase é o termo genérico para enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β 2 -1 entre resíduos de frutose ou entre frutose e glicose, tendo portanto atividade invertásica. Podem ser do tipo exo-inulinase (exo-D-frutosidase, EC 3.2.1.80) ou endo-inulinase (2,1- D-frutano-fructanoidrolase, EC 3.2.1.7). Estas enzimas têm sido amplamente investigadas como fonte para produção de xarope de frutose, pela ação da exo-inulinase ou pela ação sinérgica de exo e endo-inulinase (ETTALIBI & BARATTI, 1987; AZHARI, 1989; ETALLIBI & BARATTI, 2001, MILLER *et al.*, 2006).

A ação destas enzimas produz um conjunto de oligossacarídeos, comumente reportados como inulo-oligossacarídeos (IOS), fruto-oligossacarídeos (FOS), oligofrutanas ou oligofrutoses. Os produtos da hidrólise por endoinulinases incluem compostos do tipo Fn como inulobiose (n=2), inulotriose (n=3) e inulotetraose (n=4) e compostos do tipo GF(n), como sacarose (n=1), cestose (n=2), nistose (n=3) e frutofuranosil nistose (n=4). A hidrólise completa da

inulina por exo-inulinases resulta na formação de glicose e frutose (ROBERFROID, 2005).

Inúmeros trabalhos descrevem a presença de inulinases em plantas (SHIOMI, 1993; CARVALHO & DIETRICH, 1993; ENDE *et al.*, 2004), bactérias (KATO *et al.*, 1999; GERN *et al.*, 2000), fungos (AZAHARI *et al.*, 1989; CORDEIRO-NETO *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 1998; KOCHHAR *et al.*, 1999; ARAND *et al.*, 2002; JING *et al.*, 2003; PESSONI *et al.*, 2004) e leveduras (ROUWENHORST *et al.*, 1988; PESSOA-JR & VITOLLO, 1999). Enzimas que degradam inulina foram inicialmente purificadas a partir de plantas, mas as quantidades obtidas eram insuficientes para serem exploradas comercialmente. Por esse motivo, inulinases produzidas por microrganismos, que podem ser induzidas pelas condições de cultivo, têm recebido especial atenção nas últimas décadas.

Nas décadas de 70 e 80 foram concentrados esforços na purificação e caracterização de inulinases produzidas por leveduras da espécie *Kluyveromyces fragilis* e do gênero *Cândida*, e por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* devido à alta produção e atividade destas enzimas por estes microrganismos (NEGORO & KITO, 1973; NAKAMURA & NAKATSU, 1977; MARUYAMÁ & ONODERA, 1979; GROOT-WASSINK & FLEMING, 1980).

Pandey e colaboradores (1999) e Singh e Gill (2006) elaboraram uma revisão minuciosa das principais fontes de inulinase a partir de microrganismos. Os autores ressaltam uma vantagem importante, que é a capacidade destes organismos em exsudar enzimas para o meio de cultura, o que simplifica sua extração e purificação, diminuindo os custos de produção. Além disso, muitos microrganismos termofílicos e mesofílicos são capazes de produzir inulinases, suportando altas temperaturas, tornando-as atrativas para uso comercial.

A Tabela 4 mostra as propriedades de algumas inulinases isoladas de microrganismos. Observa-se que as inulinases diferem de forma considerável quanto à massa molecular, inibição por metais e afinidade pelo substrato (K_M). No entanto a maioria delas apresenta pH ótimo entre 4,0 e 7,0 e temperatura ótima em torno de 45°C. Singh e Gill (2006) descrevem vários trabalhos onde foram realizados seqüenciamentos de várias inulinases, a partir de genes clonados de diferentes espécies de fungos e bactérias. Estes trabalhos mostram que existem vários *motifs* conservados entre as inulinases analisadas, principalmente na extremidade carboxil e os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico.

2.5. Imobilização de Enzimas

A imobilização de biocatalizadores consiste na fixação ou encerramento de uma enzima em suportes e tem sido utilizada como ferramenta em pesquisa básica, processos industriais, métodos analíticos, aplicações biomédicas ou na produção de compostos de elevado valor agregado, como, por exemplo, compostos quirais (KOURKOUTAS *et al.*, 2004). A vantagem de utilização de enzimas imobilizadas em comparação com as mesmas em solução é o seu confinamento a uma região restrita garantindo a retenção da atividade catalítica, e assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida ou contínua (ROSEVEAR *et al.*, 1987; CAO *et al.*, 2004; HUMERES *et. al*, 1991; OLIVEIRA, 1983). Além disso, reações catalisadas por enzimas imobilizadas são mais facilmente controladas, possibilitam a automação dos processos, diminuem os riscos de contaminação do produto com a enzima, entre outros (BICKERSTAFF, 1997; KRAJEWSKA, 2004).

A escolha do suporte a ser usado nas reações de imobilização é muito importante, alguns fatores como reatividade , morfologia , restrições difusionais e custos foram levados em consideração para a escolha de um derivado de celulose . Enzimas como fosfatase alcalina e bacteriana foram imobilizadas em CelXNB com sucesso como relata (Silva ,1983 ; Dilkin,2003).

Esta metodologia tem sido aplicada a uma vasta gama de biocatalizadores, abrangendo desde extratos enzimáticos purificados a células inteiras de origem microbiana, tecidos vegetais ou animais. A utilização de enzimas isoladas conduz à obtenção de níveis elevados de atividade catalítica por unidade molar, especificidade elevada e limitação de reações secundárias (ROSEVEAR *et al.*, 1987).

Tabela 4: Propriedades de inulinases produzidas por alguns microrganismos (Pandey *et al.*, 1999; Singh & Gill, 2006).

| Fonte | Massa Molecular | pH ótimo | Temperatura ótima (°C) | K _M (mmol/L) | Atividade específica (U/mg) | Inibição por metais |
|--|-----------------|----------|------------------------|--|-----------------------------|---|
| Fungos | | | | | | |
| <i>Penicillium sp</i> | 60.000 | 4,5 | 50 | 1,12/0,47 ^a 1,63/0,75 ^b | - | Ag ⁺ , Cu ⁺ |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | 250.000 | - | 55 | - | - | - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (isoforma 1) | - | 5,5-6,5 | 37,45 | 0,25/0,44 ^{a,b} | - | - |
| <i>Alternaria alternata</i> | | | 55 | | | |
| <i>Crtysopannorum sp</i> | 58.000 | 6,0-7,0 | 50 | 570 ^b | 150 | - |
| <i>Aspergillus sp</i> | 53.000 | | | -- | - | - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (isoforma 2) | 300.000 | 6,2 | 37 | - | 63,3 | - |
| <i>Penicillium rugulosum</i> | | 5,5-5,6 | 55 | - | - | - |
| <i>Aspergillus niger</i> | 70.000 | 5,0 | 50 | 0,48 ^b | 350 | - |
| <i>Panaeollus papillonaceus</i> | | | 60-65 | | | |
| Bactérias | | | | | | |
| <i>Thermotoga maritima</i> | - | - | 90 | - | - | - |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | - | - | 60 | - | - | - |
| <i>Bacilus subtilis</i> | - | 6,0-7,0 | 45-50 | - | - | Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Mg ⁺ , Co ²⁺ , Na ⁺ |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | - | 4,8 | - | 0,012 ^b | - | - |

a: K_M para sacarose

b: K_M para inulina

2.6. Métodos de imobilização de enzimas

A literatura propõe diferentes tipos de classificação de métodos de imobilização de enzimas, um dos quais é apresentado na Figura 4.

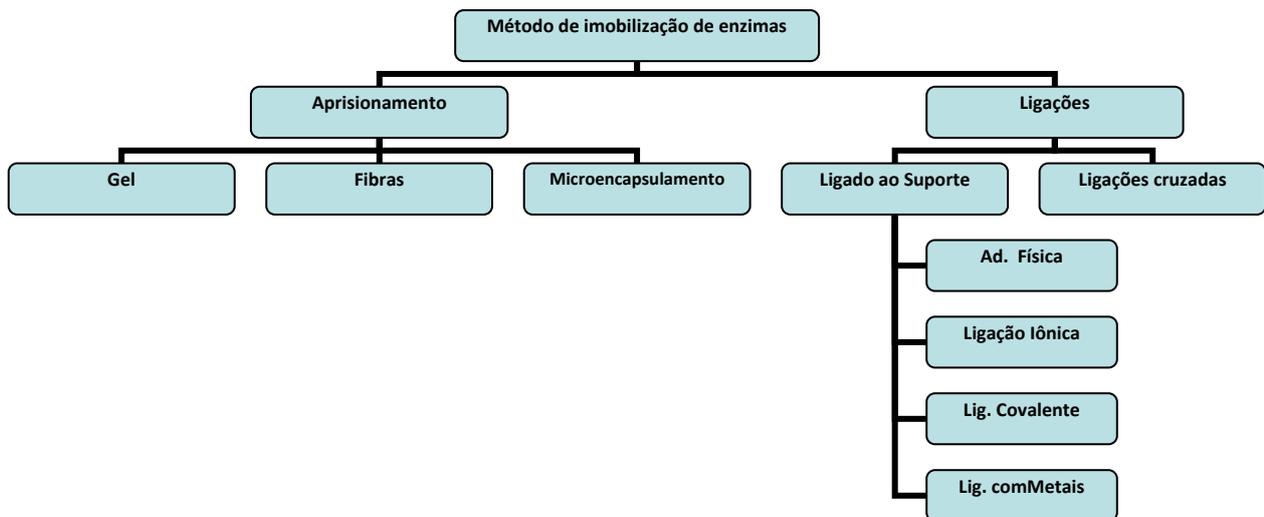


Figura 4: Métodos para a imobilização de biocatalizadores (WISEMAN, 1985)

2.6.1. Ligação a um suporte

A imobilização de uma enzima em um suporte insolúvel é o método mais antigo e o que mais prevalece entre os métodos (YOUNG, 1986). Ela pode ser subclassificada em adsorção física, ligação iônica com metais e ligação covalente. Os materiais utilizados

como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, variando apenas a metodologia e o tipo de ligação pela qual a enzima será imobilizada. O suporte ideal para uma dada aplicação é aquele que pode aumentar a interação com o substrato, diminuir a inibição, alterar o pH aparente ótimo para um valor desejado, não propiciar crescimento microbiológico e ser facilmente recuperado para a reutilização (WISEMAN, 1985).

Para uso em reator, o suporte deve ser estável na solução e não deteriorar sob as condições de reação. Para uso em reatores de leito fixo, deve ser mecanicamente rígido e apresentar baixa compactação em altas velocidades de fluxo. Em aplicações médicas, a enzima imobilizada não pode provocar respostas imunológicas, devendo ser biocompatível (WISEMAN, 1985).

2.6.1.1. Ligação covalente com o Suporte

A técnica mais intensamente estudada é a formação de ligação covalente entre a enzima e a matriz-suporte (WISEMAN, 1985). Quando se tenta selecionar o tipo de reação pelo qual uma dada proteína deve ser imobilizada, a escolha é limitada por duas características:

- a) A reação deve ser realizada sob condições que não causem perda da atividade enzimática:
- b) O sítio ativo da enzima não pode ser afetado pelos reagentes utilizados. Os grupos funcionais das enzimas tomam parte na ligação podendo ter os seguintes grupos funcionais: amino, carboxila, sulfidríla, imidazol, fenólico, tiol, treonina e indol.

As condições para imobilização por ligações covalentes são muito mais complicadas e menos amenas do que nos casos de adsorção física e ligação iônica. Portanto, a ligação covalente pode

alterar a estrutura conformacional e o centro ativo da enzima, resultando em maior perda de atividade e ou mudanças no substrato. Entretanto, a força de ligação entre a enzima e o suporte é muito mais forte, não ocorrendo perda de enzima mesmo na presença de um substrato ou de uma solução com força iônica alta.

A fixação covalente a uma matriz-suporte deve envolver somente grupos funcionais da enzima que não são essenciais na ação catalítica. O sítio ativo da enzima não pode ser impedido, de modo tal que exista um amplo espaço entre a enzima e o suporte. Altas atividades resultam da prevenção de reação de inativação com resíduos de aminoácidos dos sítios ativos. Um número de métodos de proteção tem sido planejados, tais como:

- a) Fixação covalente da enzima na presença de um inibidor competitivo ou de substrato.
- b) Um complexo reversível ligado covalentemente enzima-inibidor.
- c) Uma enzima solúvel quimicamente modificada, cuja ligação covalente com a matriz é obtida por meio de novos resíduos incorporados.
- d) Um precursor zimogênio (inativo).

2.7. Celulose como suporte sólido para imobilização de enzimas

A celulose é uma fibra vegetal composta de resíduos β -D-glicose unidos por ligações β 1,4 que interagem através de pontes de hidrogênio (HEINZE & LIEBERT, 2001). É o carboidrato mais abundante em plantas, mas também ocorre em algas e algumas bactérias (YOUNG, 1986). É o componente estrutural primário das paredes celulares das plantas e responsável por cerca da metade do carbono da biosfera. Estima-se que a quantidade de celulose

sintetizada e degradada anualmente seja da ordem de 10^{15} Kg (JARVIS, 2003).

Comercialmente, as duas fibras celulósicas mais importante são a polpa de madeira e algodão, constituindo, respectivamente, a base das indústrias de papel e celulose, e têxtil. (YOUNG, 1986; ROSEVEAR & KENNEDY, 1987). Por ser um material abundante, proveniente de uma fonte de biomassa renovável e apresentar boas propriedades mecânicas e químicas, a celulose é um polímero versátil, apresentando uma grande variedade de derivados e aplicações (HEINZE & LIEBERT, 2001).

A celulose é um polissacarídeo com a fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ formado por unidades β - D - anidroglucopiranosícas, que se ligam através dos carbonos 1 e 4, dando origem a um polímero linear. Na molécula de celulose, cada unidade anidroglucopiranosíca contém três grupos hidroxilas livres, ligados aos carbonos 2, 3 e 6, havendo uma tendência a formar pontes de hidrogênio intramoleculares (entre as unidades monoméricas da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de moléculas adjacentes) (RYDHOLM, 1985).

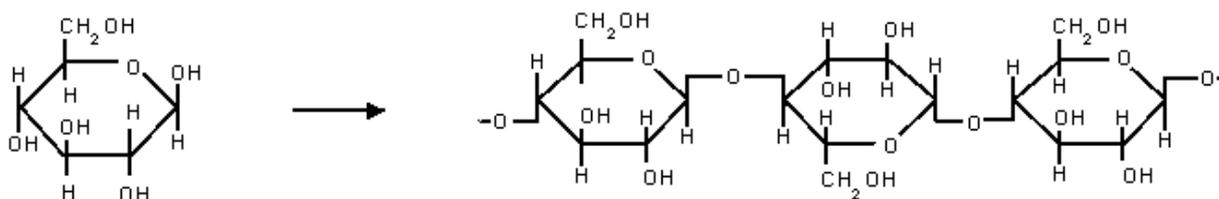


Figura 5: Representação esquemática da estrutura da celulose.

Por aplicação de métodos físicos como osmometria, ultracentrifugação e viscosimetria, obtiveram-se para a celulose pesos moleculares entre 250.000 e 1.000.000 ou mais. De um modo geral, não se pode determinar um peso molecular uniforme e definido a compostos poliméricos, pois estes compostos são polidispersos, isto é, as moléculas de um polímero, como a celulose, apresenta

diferentes tamanhos . Porém o grau de polimerização médio (DP), que é o peso molecular médio do polímero dividido pelo peso molecular da unidade monomérica, varia de 4.000 a 5.000, o que corresponde a um peso molecular médio entre 650.000 e 800.000 g.mol⁻¹ (RYDHOLM, 1985). Além de estar relacionada com o peso molecular médio, a distribuição dos pesos moleculares influencia em diversas propriedades de polímeros tais como, tenacidade, módulo de relaxação, resistência à tração, deformação e capacidade de fiação (BILMEYER, 1984).

Celulose de diferentes origens e tratamentos apresentam diferentes graus de cristalinidade, segundo estudos de difração de raio X (WADA *et al.*,2004 ; ISOGAI & ATALL, 1998). Estimativas das proporções de material cristalino e material amorfo mostram que a porcentagem de cristalinidade varia entre 50 e 90%. A reatividade da celulose depende dessa porcentagem, porque as hidroxilas de regiões cristalinas, por estarem formando ligações de hidrogênio, apresentam menor acessibilidade a reagentes do que as de regiões amorfas (ISOGAI, & ATALL, 1998 ; RYDHOLM ,1985).

As propriedades físicas e a reatividade da celulose dependem diretamente da distribuição do peso molecular, do grau de polimerização e da estrutura supermolecular do polímero. Mesmo apresentando uma grande polaridade devido aos grupos hidroxila, somente uma fração limitada do polímero estará disponível para interagir com os reagentes. Portanto, a maioria das hidroxilas e grupos acetais estarão inacessíveis aos reagentes, a menos que a estrutura supermolecular seja modificada por tratamento com agentes que expandam a estrutura da celulose, rompendo as ligações de hidrogênio, tais como soluções de ácido ou base forte, ou que transformem as regiões cristalinas em regiões amorfas, como a amônia (CHAPLIN, 2004; YOUNG ,1986; RYDHOLM, 1985; OLIVEIRA, 1995).

Os grupos hidroxilas reagem com agentes de adição, substituição e oxidação e os grupos acetais sofrem hidrólise tanto em meio ácido como em meio básico. Os grupos aldeídos terminais podem ser reduzidos a álcool, oxidados a ácido carboxílico ou rearranjados sob influência de álcalis para formar grupos álcool ou ácido carboxílico terminais. Pode também ser feita a grafitização da cadeia polimérica, formando copolímeros de celulose (RYDHOLM, 1985; CZAJA *et al.*; 2006).

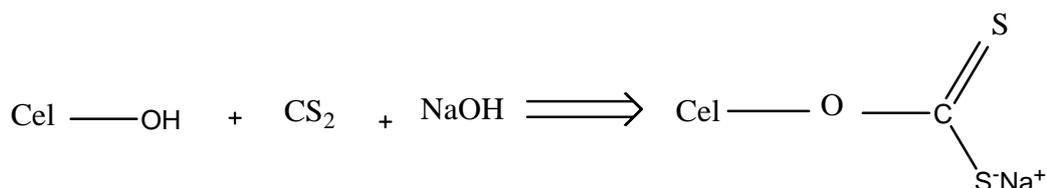
A celulose mercerizada é denominada de soda celulose, formada através da reação da celulose com o hidróxido de sódio. A mercerização ocorre em uma concentração bem definida e completa-se em um intervalo de 2% (m/v) de NaOH. À temperatura ambiente, este fenômeno ocorre até 10% (m/v) de NaOH. A expansão intermicelar ocorre preferencialmente na fase amorfa do polímero, isto é, nas regiões mais desordenadas do material enquanto a expansão intramicelar ocorre nas regiões cristalinas, onde haverá quebra das ligações de hidrogênio e mudança da estrutura cristalina necessitando para isso uma maior concentração de álcalis (RYDHOLM, 1985; CZAJA *et al.*, 2006).

2.7.1. Xantato de Celulose

O xantato de celulose está presente no processo de obtenção da celulose regenerada, que recebe o nome comercial de viscose, sendo este o seu principal produto. A celulose regenerada é a fase intermediária para a dissolução da celulose, que é um processo químico que foi desenvolvido no final do século XIX (RYDHOLM, 1985). O xantato de celulose também pode ser usado para fornecer maior agregação às partículas do solo, estabilizando-as e evitando processo de erosão (MARCONCINI, 2000). Outras aplicações incluem suporte para imobilização de enzimas, como material de partida na

síntese de ésteres xânticos, na complexação com metais, na flotação de minérios e na eliminação de metais pesados de resíduos químicos (KENNEDY, 1975).

A formação de ésteres xânticos de celulose é realizada através do tratamento da celulose com dissulfeto de carbono (CS₂) em meio alcalino formando o xantato de celulose (CelX) (OLIVEIRA, 1983; ADACHI, 1997; SILVA, 1995). (Esquema 3)

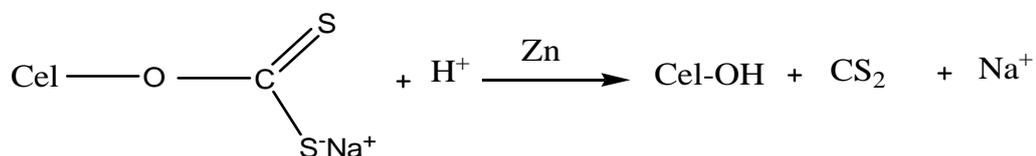


ESQUEMA 3

Porém, há indicações de que o dissulfeto de carbono não é propriamente o reagente, mas sim a sua forma hidratada, CS₂. H₂O ou HOCS₂H. Por esse fato, a xantação da celulose mercerizada é dificultada em altas concentrações de hidróxido de sódio, apesar da maioria dos éteres de celulose ocorrerem nesta condição, pois haverá poucas moléculas de água livres na reação. Paralelamente ocorre a hidrólise do agente de xantação, levando a íons biditiocarbonatos, que reagem novamente formando sulfeto, carbonato, tritiocarbonato, entre outros (OLIVEIRA ,1983; SJOSTRÖN, 1981; ADACHI, 1997).

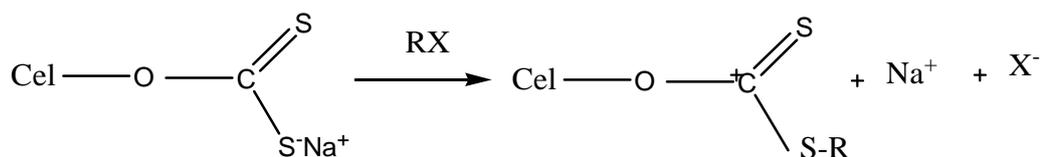
Em contraste com os éteres de celulose, o xantato de celulose não é estável em soluções alcalinas. A acetilação e a xantação são reações controladas por equilíbrio, enquanto as esterificações normais têm controle cinético. Portanto, no processo da viscose, há a hidrólise contínua e rexantação, ambas causando uma distribuição mais uniforme dos grupos xantato e diminuindo continuamente o grau de substituição devido às reações paralelas. Devido a estas instabilidades, os xantatos são usados como intermediários na manufatura de diferentes tipos de celulose

regenerada no processo da viscose. A regeneração consiste na hidrólise ácida do éster xântico catalisada por zinco, obtendo-se celulose com menor peso molecular que a inicial, como mostra o Esquema 4 (LICKLIDER, 1995).



ESQUEMA 4

Na síntese de ésteres xânticos de celulose, ocorre a reação do xantato de celulose com haletos (RX) obtendo-se desta forma o éster xântico (Esquema 5) (OLIVEIRA, 1983; LABROU, 1995).



ESQUEMA 5

Dentre os xantatos, o p-nitrobenzil xantato de celulose apresenta características físicas e químicas apropriadas e além de ter um baixo custo. Tem sido extensamente utilizado como suporte para imobilização de enzimas, tais como: α -amilase, fosfatase alcalina e albumina de soro bovino (OLIVEIRA, 1983).

Tendo em vista os benefícios do uso de inulina e frutose na alimentação humana, e devido ao alto valor comercial dos xaropes concentrados de frutose (high fructose corn syrups – HFCS) obtidos a partir da isomerização da glicose em frutose (GODFREY, 1996) ou pela hidrólise enzimática da inulina, este trabalho teve por objetivos a imobilização de uma inulinase produzida por *Aspergillus niger* em suporte de xantato de celulose. Além disso, objetivou-se avaliar a

qualidade do suporte, realizar comparações entre a enzima em solução e imobilizada, e testar diferentes métodos de quantificação de frutose.

Neste trabalho foram utilizados duas fontes de inulina, a comercial e outra extraída de raízes de *Sterculia chicha*, uma espécie nativa do cerrado, largamente distribuída nos ecossistemas do Mato Grosso do Sul. Em estudos anteriores observou-se que esta espécie é capaz de acumular grandes quantidades de inulina, podendo ser potencialmente utilizada como fonte de inulina para diversos propósitos, na indústria, aumentando o valor agregado da biodiversidade do nosso estado (OLIVEIRA, 1983).

3. OBJETIVOS

- ◆ Obter o p-nitrobenzil xantato de celulose (CeIXNB) com grau de substituição (GS) que permita a imobilização da inulinase.
- ◆ Imobilizar a inulinase em CeIXNB.
- ◆ Extrair os polifrutanos inulínicos de raízes de *Sterculia chicha* para ser usada como substrato da inulinase em solução e imobilizada em CeIXNB.
- ◆ Comparar a eficiência da produção de frutose pela enzima imobilizada em CeIXNB e em solução, utilizando, como substrato os polifrutanos inulínicos de raízes de *Sterculia chicha* e os adquiridos comercialmente.
- ◆ Determinar o número de ciclos de reutilização da enzima imobilizada com os diferentes substratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e Reagentes

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro UV/VIS da marca HITACHI, modelo U-3000. As medidas foram feitas em cubetas de vidro ou quartzo. Para a reação de imobilização das enzimas foi usado um agitador da marca Certomat modelo MO II.

As reações de hidrólise enzimática e a secagem das raízes foram realizadas em uma incubadora com agitador mecânico, da marca Certomat modelo BS – 1.

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro marca Schott modelo Titrolife Alfa. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um microscópio da marca JEOL, modelo JSM – 6380 LV. As regressões lineares foram realizadas com o auxílio do software Microcal Origin versão 6.0.

Para as medidas volumétricas foram usadas micropipetas da marca Oxford. A água utilizada foi destilada, desmineralizada e quando necessário desoxigenada. Todos os reagentes empregados foram de marcas tradicionais e de Grau PA, sem purificação prévia, com exceção da n-butilamina, que foi previamente destilada.

A enzima inulinase [EC 3.2.1.7] (endoinulinase) (DERYCKE, 1984) foi isolada de culturas de *Aspergillus niger*. O substrato inulina, obtida de tubérculos de dália (*Dahlia pinnata*) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Utilizou-se também polifrutanos inulínicos proveniente da planta *Sterculia chicha*, extraída conforme método descrito por Silva (1996).

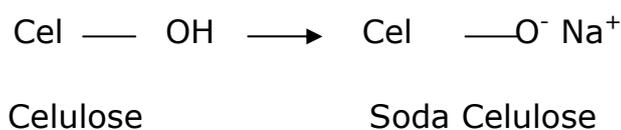
A soluções tampão carbonato (pH 11) e acetato (pH 4,5) foram preparadas no laboratório e usadas logo após o seu preparo, ou guardadas a 5°C até o momento do uso.

Para quantificação da frutose pelo método enzimático foi utilizado o "kit assay fructose", comercializado pela Sigma Chemical Co.

4.2- Síntese do suporte p-nitrobenzil xantato de celulose (CeIXNB)

Aproximadamente 50 g de tecido de algodão foi tratado com uma solução de HCl 1,0 M e submetidos à agitação mecânica durante 3 h. Em seguida o tecido foi lavado várias vezes com água destilada e secado em estufa a 40°C durante 24 h, para retirada das impurezas do processo de fabricação. O tecido foi cortado em pedaços quadrados de cerca de 10 cm de lado.

Para a obtenção da soda celulose, conforme mostra o Esquema 6, tomou-se um destes pedaços de tecido e este foi agitado mecanicamente a 250 opm (oscilações por minuto) por 4h juntamente com 200 mL de solução de NaOH 3,0 M .



ESQUEMA 6

A 15 mL de dissulfeto de carbono foram adicionados 100 mL de acetona pura. A mistura foi submetida à agitação mecânica a 250 opm, por mais de 3 h. Ao final obteve-se uma solução de coloração alaranjada. A reação de formação do xantato de celulose (CeIX),

4.3. Determinação do Grau de Substituição (GS) do CeIXNB

Para a determinação do GS, massas de 13,68; 22,48; 31,39; 43,27; 56,23 e 62,79 mg de CeIXNB foram colocadas em frascos de vidro com tampa de borracha, os quais continham 5,0 mL de solução tampão carbonato 0,05 M, pH 11,0 10% (v/v) de etanol aquoso e 1,0 mL de solução aquosa de n-butilamina 1,0 M. Com auxílio de uma agulha passou-se gás nitrogênio por 10 minutos, a fim de expulsar o gás oxigênio evitando oxidações. Os frascos foram vigorosamente agitados mecanicamente à temperatura ambiente por 20 minutos, retirando-se amostras periodicamente para análise. As absorbâncias foram lidas a 285 nm até o valor constante. O valor de n_{NBT} foi obtido a partir do gráfico da absorbância em 285 nm versus massa de CeIXNB (MARCONCINI, 2000).

4.4. Extração de Inulina de Raízes de *Sterculia chicha* A. St. Hil. (Malvaceae)

As raízes de *Sterculia chicha* foram coletadas no Município de Três Lagoas MS em 16/04/2006. O material vegetal foi lavado com água corrente, descascado, fatiado e secado em incubadora BS-1, a 50°C, por 48h. Após a secagem, o material foi triturado em um almofariz até a obtenção de um pó fino de aspecto parcialmente homogêneo.

A extração da inulina das raízes da *Sterculia chicha* foi realizada pelo método de extração por difusão a quente descrito por Silva (1996). Para tanto, 1g de raízes pulverizadas foi tratada com 150 mL de etanol 98% durante 10 dias a 70°C, sob agitação de 250 opm. Após este período o material foi filtrado e a solução resultante foi evaporada sob pressão reduzida. Ao soluto foram adicionados 150 mL de água destilada e novamente submetido à

agitação, a 250 opm, a 70°C, por mais 10 dias. Após nova filtração, os solventes (água e etanol) foram misturados e concentrados à pressão reduzida.

O produto final decorrente da extração com etanol e da extração com água apresentou uma aparência semelhante a uma goma de cor marrom escuro e cheiro adocicado. Esta goma foi considerada como extrato bruto de inulina de *Sterculia chicha*.

4.5. Métodos para quantificação da frutose

4.5.1. Método de Taylor

Para avaliação da quantidade de frutose total da goma de *Sterculia chicha*, um dos métodos utilizados foi proposto por Taylor (TAYLOR, 1995). Massas de 10,79; 17,17 e 10,01 mg de goma da *Sterculia chicha* foram pesadas e colocadas em tubos de ensaio contendo 2,8 mL de uma solução aquosa de H₂SO₄ 75% (V/V) e 0,1 mL de solução aquosa de cisteína a 2,5% (V/V) .

Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 45° C por 10 minutos e adicionando-se, em seguida, 1,0 mL de solução aquosa de triptofano contendo HCl 0,1 M. Como relata Taylor o triptofano em presença de açúcares redutores em meio ácido forte apresenta uma coloração vermelho púrpura. Após permanecer por 20 minutos em repouso à temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas em 518 nm em espectrofotômetro U-3000, até valor constante. A massa de frutose total foi calculada utilizando-se uma curva de calibração onde para a sua construção foram realizadas leituras da absorbância em 518 nm de alíquotas de soluções de frutose pura em

concentrações crescentes, nos valores de: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 mg/mL.

4.5.2. Método de Seliwanoff

Amostras do extrato bruto da *Sterculia chicha* foram adicionadas a tubos de ensaios nos quais continham o reagente de Seliwanoff. Para a obtenção deste reagente dissolve-se 0,05g de resorcina em 100 ml de HCl (1:2), esta solução em presença de frutose dá uma coloração vermelha (SELIWANOFF, 1887).

4.5.3. Método de Somogyi e Nelson

Neste trabalho também foi utilizado o método de Somogyi e Nelson (SOMOGYI, 1945) para dosagem de açúcares redutores. O mesmo tem como princípio a redução dos glicídeos redutores aquecidos em meio alcalino que se transformam em enodíóis. Estes reduzem o íon cúprico presente a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz a reação arsênio-molibídico a óxido de molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de açúcar redutor presente na amostra.

4.5.4. Método Enzimático

O método enzimático utilizado neste trabalho foi descrito por Campuzano *et al.* (2003) e comercializado pela Sigma Chemical Co. (código FA-20). Os fundamentos deste método serão detalhados posteriormente.

4.6. Imobilização da Enzima Inulinase

Quantidades de CelXNB, cada um com massa aproximada de 35,55; 31,66 e 22,72 mg, foram colocados em frascos de vidro com tampa de borracha no qual continha 13,56 mg de inulinase comercial dissolvida em 10 mL de solução tampão acetato pH 4,5, 0,05 M. Este material foi tratado com gás nitrogênio por 10 minutos, para evitar a oxidação e ativar a superfície do suporte (CABRAL *et al.*, 2003). A mistura foi agitada por 72h, a temperatura ambiente, para aumentar a eficiência da interação covalente entre enzimas e suporte, pois se trata de uma reação que ocorre numa interfase solido-líquido.

Cessada a agitação as amostras do conjunto suporte-enzima imobilizada, foram lavados em funil de Büchner, com solução tampão acetato pH 4,5 e com água destilada ambas geladas, para remoção das moléculas de inulinase que não foram imobilizadas nas fibras de xantato. Este material foi acondicionado em tampão acetato pH 4,5 a 5°C até o momento do uso.

4.7. Atividade da enzima inulinase em solução e imobilizada em suporte CelXNB

Os ensaios enzimáticos foram realizados, utilizando-se como substrato inulina comercial ou polifrutanos inulínicos extraídos de raízes de *Sterculia chicha*. A massa de inulina comercial foi de 3,3 mg (em presença de 1,8 mg de inulinase) e a massa dos polifrutanos inulínicos de *Sterculia chicha* foi de 8,8 mg (em presença de 1,5 mg de inulinase). Ambas as massas foram diluídas em 10 mL de tampão acetato pH 4,5, 0,05 M (ROUWENHORST *et al.*, 1988) e aquecidas a 80°C para completa homogeneização dos polissacarídeos (HOEHN *et al.*, 1983). Os ensaios foram realizados com a inulinase comercial em tampão acetato ou com a inulinase comercial imobilizada no suporte CelXNB -enzima. Como controle foram preparados os mesmos meios de reação na ausência de inulinase.

Os diferentes substratos com as enzimas em solução foram incubados (incubadora certomat BS-1) por três horas, a 50°C, sob agitação (100 opm) (ROUWENHORST *et al.*, 1988). Para os ensaios com a enzima imobilizada foram repetidas as mesmas condições, exceto o tempo de incubação que foi de 72h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a incubação, com auxílio de uma micro pipeta, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL da mistura de reação e foi realizada a quantificação de frutose liberada pelo método enzimático descrito no item 4.5.4 (CAMPUZANO *et al.*, 2003).

4.8. Ciclos de catálise da enzima imobilizada

A eficiência da imobilização enzimática foi avaliada através do número de ciclos que o conjunto enzima/suporte hidrolisou os

substratos (inulina comercial e os polifrutanos inulínicos extraídos da *Sterculia chicha*) liberando frutose. Após cada ciclo, o conjunto suporte-enzima foi lavado exaustivamente com água e tampão de ensaio. Repetiu-se os procedimentos descritos no item 4.7, para verificar a eficiência da enzima imobilizada, uma vez que uma das grandes vantagens do processo de imobilização é a estabilidade do sistema.

4.9. Verificação da resistência do suporte

O CelXNB após o final dos ciclos de reutilização foi secado em pistola de Abderhalden e imediatamente pesado, para verificar se houve perda de material na reação de imobilização e hidrólise da inulina.

4.10. Análise da micro-estrutura do suporte CelXNB em MEV

Foram feitas imagens em microscópio eletrônico de varredura, do suporte de celulose na presença e na ausência de inulinase, buscando-se informações sobre as possíveis alterações na micro-estrutura da celulose quando estes catalisadores permanecem covalentemente ligados às fibras do suporte.

As análises no MEV foram feitas no Laboratório Multiusuário de Análises de Materiais -FINEP-CT-INFRA/UFMS, pela Dra. Ângela A. Sanches Tardivo Delben, do Departamento de Física da UFMS. Para a realização da microscopia eletrônica de varredura e microanálise em

microscópio da JEOL-JSM 6380-LV as amostras receberam uma camada condutora de ouro no equipamento de sputtering PELCO - desk III. A voltagem de aceleração consta das micrografias e da microanálise foi de 15 kV. As amostras foram previamente desidratadas em seguida metalizadas a vácuo, e depois colocadas em argônio em baixa pressão para aumentar a eficiência da metalização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

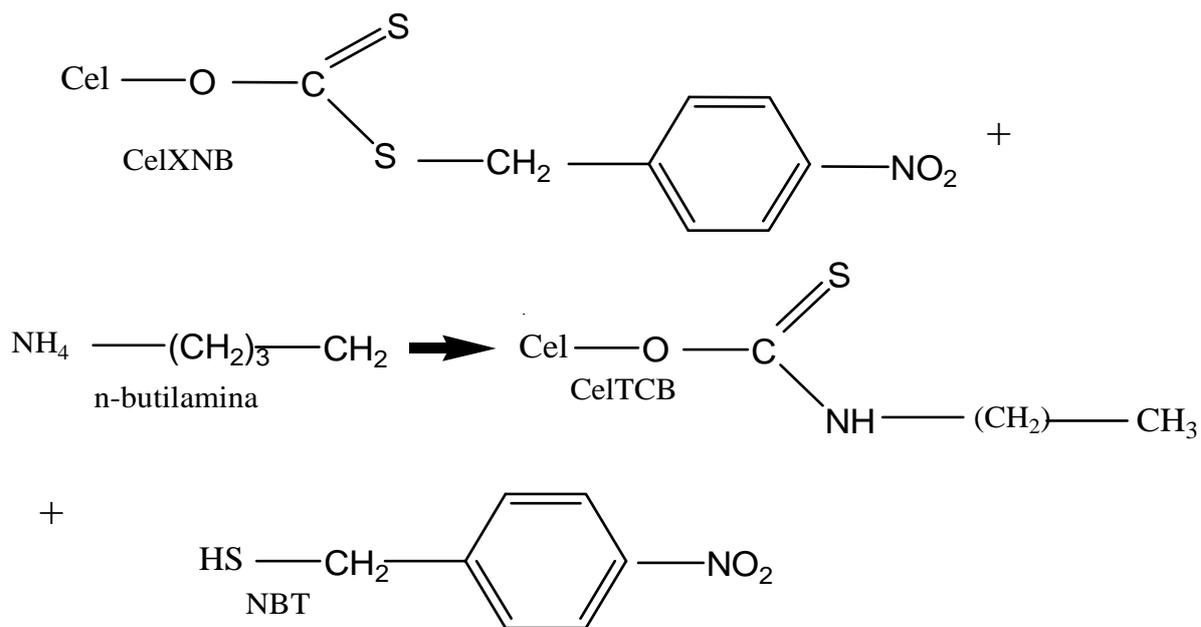
5.1- Grau de substituição do CeIXNB

O grau de substituição (GS) é o número de grupos xantatos introduzidos em cada 100 unidades anidroglicopiranosíca da celulose (OLIVEIRA 1983; HUMERES, 1998). Foi calculado através da equação 2, mostrado no esquema 9.

$$GS = 1,62 \cdot 10^4 \cdot n_{NBT} \quad (2)$$

Onde:

- ♦ $1.62 \cdot 10^4$ é a massa molar de 100 unidades anidroglicopiranosícas.
- ♦ n_{NBT} é o número de mols de p-nitrobenziltiol (NBT) liberados por grama de CeIXNB na reação de aminólise.



(ESQUEMA 9)

Considera-se que o número de moles do p-nitrobenziltiol (tiol) liberados na equação acima é igual ao número de grupos xantatos introduzidos na fibra. Na reação de aminólise uma molécula de NBT é liberada para cada grupo xantato introduzida na celulose. A reação entre CelXNB e n-butilamina tem como produto um composto sólido chamado de celulose tionocarbamato (CelTCB). Desta forma foi possível calcular o GS do CelXNB uma vez que o número de mols de NBT liberados pode ser medido por meio do gráfico apresentado na Figura 6.

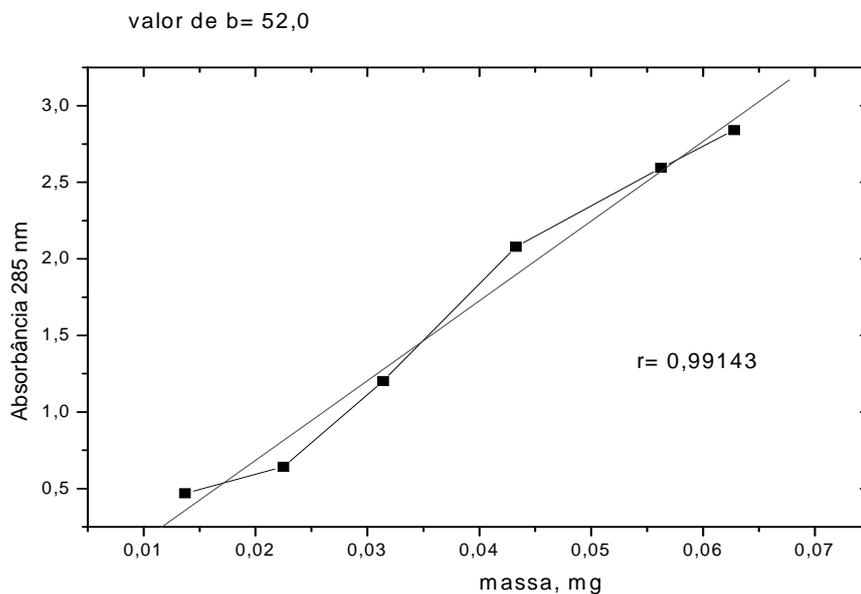


Figura 6: Diagrama de absorvância em 285 nm versus massa (g) de CeIXNB.

Uma amostra de CeIXNB de massa m quando reage com n -butilamina libera n_T mols de NBT no tubo de reação. Obtendo-se os valores de n_T para diversas amostras de CeIXNB de massas diferentes calcula-se $n_{NBT} = \Delta n_T / \Delta m$. Pela lei de Lambert-Beer, a absorvância no tubo de reação é dada pela **Equação 3**.

$$A_T = b \cdot \epsilon_{285} [NBT] = b \cdot \epsilon_{285} \frac{n_T}{V_T}$$

(3)

Onde:

A_T = absorbância no tubo de reação

b = caminho ótico

ϵ_{285} = absortividade molar do p-nitrobenziltiol lida em 285 nm

$[NBT]$ = concentração de p-nitrobenziltiol no tubo de reação

V_T = volume no tubo de reação

n_T = Número de mols

Das condições experimentais, $A_T = A_m = A_{285} \cdot V_c / V_m$. Substituindo esta relação em (3) e isolando-se n_T obtém-se a **Equação 4**.

$$n_T = \left[\frac{V_T \cdot V_c}{\epsilon_{285} V_m b} \right] \cdot \left[\frac{\Delta A_{285}}{\Delta m} \right]$$

(4)

Onde:

A_{285} = absorbância da amostra em 285nm

V_c = volume na cubeta

V_m = volume na micro seringa

Substituindo a equação 4 na definição de $n_{[NBT]}$ obtém-se a

Equação 5.

$$n_{[NBT]} = \frac{\Delta n_T}{\Delta m} = \left[\frac{V_T \cdot V_c}{b \cdot \epsilon_{285} \cdot V_m} \right] \cdot \left[\frac{\Delta A_{285}}{\Delta m} \right]$$

(5)

Onde:

$\left[\frac{\Delta A_{285}}{\Delta m} \right]$ é igual ao coeficiente angular do gráfico de absorvâncias lidas em 285 nm versus massa de CelXNB (Figura 6).

A partir do gráfico mostrado na Figura 6, foram obtidos os valores $A_{285}/\Delta m$, calculando-se n_{NBT} e GS. Em todos os experimentos $b = 1,0 \text{ cm}$, $\epsilon_{285} = 8,15 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $v_T = 6,0 \text{ mL}$.

O grau de substituição de CelXNB é uma estimativa da eficiência global da síntese deste derivado. Portanto as condições em que as reações são efetuadas interferem no resultado do GS. Neste trabalho, as condições estabelecidas para a síntese do CelXNB, foram aquelas que apesar de produzirem um GS médio não danificaram a fibra e permitiram a imobilização das enzimas.

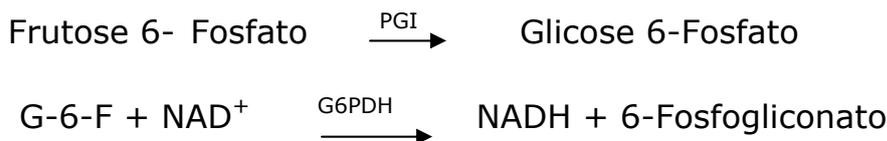
O valor de GS obtido neste trabalho foi de 9,5. Isto significa que em cada 100 unidades anidroglicopiranosicas, 9,5 hidroxilas da celulose foram substituídas por grupos xantatos. Este valor apesar de não ser muito elevado é considerado bom, pois valores baixos de GS indicam que não ocorreu degradação das fibras, permitindo assim a imobilização das enzimas (MARCONCINI, 2000). A medida do GS é experimental e depende das condições em que a reação foi realizada e do solvente utilizado. O valor máximo para este derivado de celulose é de 22 (SJOSTRÖN, 1981).

Estruturalmente, a celulose é um polissacarídeo formado por unidades β -D- anidroglicopiranosicas, que se ligam por meio dos carbonos 1 e 4. Na molécula de celulose, cada unidade anidroglicopiranosica contém 3 grupos hidroxila livre, presentes nos carbonos 2, 3 e 6, o grupo xantato quando introduzido no carbono 6 é muito mais estável devido ao forte sistema de ressonância na estrutura da molécula de celulose (LIEBERT, 2001).

5.2. Métodos de quantificação de frutose livre

Os métodos químicos de determinação de açúcares redutores utilizados neste trabalho (Taylor, Seliwanoff e Somogyi-Nelson) descritos no item "Material e Métodos" envolvem o uso de ácidos e/ou bases fortes. No entanto, observou-se que os polifrutanos utilizados neste trabalho são facilmente hidrolisáveis em meio muito ácido ou muito básico. Pelos métodos químicos descritos estaríamos, certamente, incorrendo em erros de avaliação, pois os reagentes utilizados nos ensaios, provocariam hidrólise ácida ou básica, o que implicaria em uma superestimativa da atividade da inulinase em solução ou aderida ao suporte sobre a inulina comercial e/ou extraída de *Sterculia chicha*. Muitos autores utilizaram métodos químicos para quantificação de frutose liberada enzimaticamente, tais como Nakamura *et al.* (1994), Gupta *et al.* (1994), Nakamura *et al.* (1995), Pessoni *et al.* (2004). Consideramos que tais resultados podem superestimar a atividade das enzimas estudadas. Os métodos químicos podem ser utilizados somente quando o objetivo é realizar a quantificação de frutose total de um determinado açúcar, que não envolva estimativas de hidrólise por enzimas. Para estes últimos casos, optou-se então pela utilização de um método que não envolvesse o uso de reagentes que pudessem causar hidrólise dos substratos. O método enzimático selecionado (CAMPUZANO *et al.*, 2003) utiliza as reações descritas no Esquema 10.





(ESQUEMA 10)

A frutose é fosforilada pela hexoquinase, que transfere um grupo fosfato da adenosina trifosfato (ATP) para a frutose, convertendo-a em frutose 6-fosfato. Esta é convertida em glicose 6-fosfato pela ação da fosfoglicose isomerase (PGI). A glicose-6-fosfato (G-6-P) é então oxidada para 6-fosfogluconato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) numa reação catalisada por glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Durante esta oxidação uma quantidade equimolar de NAD é reduzida para NADH. As absorvâncias lidas a 340 nm são diretamente proporcionais à concentração de frutose (BERGMEYER, 1974). A massa de frutose obtida foi calculada através das **Equações 6 e 7**.

$$\text{mg de frutose} = \frac{(\Delta A)(TV)(\text{Massa mol de frutose})(F)}{(\epsilon)(d)(SV)(\text{Fator de conv. } \mu\text{g para mg})} \quad (6)$$

$$\text{mg de frutose} = \frac{(\Delta A)(2,12)(180,2)(F)}{(6,22)(1)(0,1)(1000)} \quad (7)$$

Onde:

A = Absorvância das amostras em 340 nm

TV = Volume total

F = Fator de diluição

ε = Coeficiente de extinção para o NADH a 340 nm

d = Caminho óptico

SV = Volume da amostra

5.3- Rendimento da extração de Inulina de *Sterculia chicha*

Foi feita a quantificação de frutose da mistura de polifrutanos extraída de *Sterculia chicha* utilizando-se o método de Taylor (TAYLOR, 1994). Esta quantificação foi obtida utilizando-se como referência a curva de calibração apresentada na Figura 7. Verificou-se que o mesmo contém 11,34% de frutose total. Estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura, como mostra a Tabela 1, que apresenta os níveis de inulina e frutose em alguns alimentos consumidos na dieta humana.

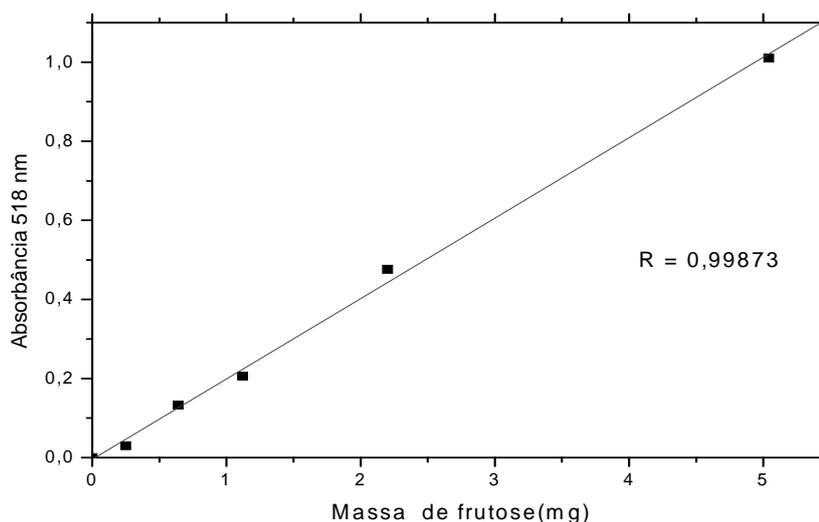


Figura 7: Curva de calibração para cálculo da massa de frutose.

Para verificar se a extração foi realmente eficiente, foi feita a quantificação de frutose no resíduo de quatro extrações da *Sterculia chicha* (o que ficou retido após filtração, conforme descrição no item 4.4.) pelo método de Taylor. Os ensaios, feitos em triplicata, mostraram que a quantidade de frutose do resíduo é menor que 2%, demonstrando que a extração foi realmente eficiente (Tabela 5).

Tabela 5: Massa de frutose presente no resíduo obtidos após extração dos polifrutanos de *Sterculia chicha*.

| Resíduo | Massa (mg) | % de frutose |
|----------------|------------|--------------|
| R ₁ | 13,9 | 1,41 |
| R ₂ | 15,6 | 0,54 |
| R ₃ | 13,5 | 0,68 |
| R ₄ | 16,6 | 0,29 |

5.4 – Imobilização da Inulinase

A eficiência do método empregado para imobilizar enzimas pode ser comprovado pelo rendimento da imobilização (NAKAMURA, 1995) ou pelo coeficiente de imobilização – CI (TOMOTANI , 2002). Neste trabalho o rendimento da imobilização foi avaliada somente pela quantidade de frutose produzida enzimaticamente, utilizando-se o método enzimático descrito por Campuzano (2003). A Tabela 6 mostra a quantidade de frutose liberada após tratamento dos substratos com a inulinase imobilizada e com a inulinase em solução, para fins de comparação. Observa-se que tanto a enzima em solução como a imobilizada, foram mais ativas sobre a inulina comercial do que sobre a inulina obtida de

Sterculia chicha. É provável que além da inulina, também estejam presentes neste extrato, outros carboidratos simples e complexos, o que pode ter dificultado o acesso dos substratos específicos ao sítio ativo da enzima, uma vez que não houve purificação da inulina extraída da *Sterculia chicha*. Observa-se também que a porcentagem de frutose livre presente nos ensaios com a inulina da *Sterculia chicha* na ausência de enzima é maior quando comparada a inulina comercial (Tabela 6). Isto pode ser atribuído provavelmente ao fato de em ambas as inulinas utilizadas como substrato havia, além do polissacarídeo, uma pequena quantidade de frutose livre.

Quando se compara enzima imobilizada e enzima em solução, observa-se que houve diferenças com relação ao tipo de substrato. A diferença entre a degradação da inulina comercial pela enzima imobilizada e pela enzima em solução foi de somente 2%. Quando se utilizou inulina de *Sterculia chicha* esta diferença subiu para 22,8 %. É sugerido que tais diferenças se devam a restrições difusionais do substrato de *Sterculia chicha*. De acordo com Oliveira (1983) estas restrições dificultam o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas.

Tabela 6: Produção de frutose livre pela ação de inulinases em solução e imobilizadas em suporte de CelXNB.

| Frutose Livre (%) | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Substrato | Enzima em Solução | Enzima Imobilizada | Branco^(*) |
| Inulina de (<i>Sterculia chicha</i>) | 36,9 | 26,4 | 9.0% |
| Inulina Comercial | 89,9 | 88,1 | 1.7% |

*Porcentagem de frutose na ausência de inulinase

5.5- Ciclos de reutilização da inulinase imobilizada em CelXNB

A Figura 7 mostra os resultados obtidos, em termos de atividade enzimática, dos ensaios de reutilização da inulinase imobilizada. Quando foi utilizada a inulina comercial houve retenção da atividade até o 8º ciclo. Porém quando utilizou-se a inulina obtida de *Sterculia chicha*, observou-se retenção de atividade até o 11º ciclo. No final do experimento avaliou-se a massa do suporte-enzima e verificou-se que houve perda de 33% da massa do conjunto, o que pode ser explicado em função da queda da atividade a partir do 4º ciclo.

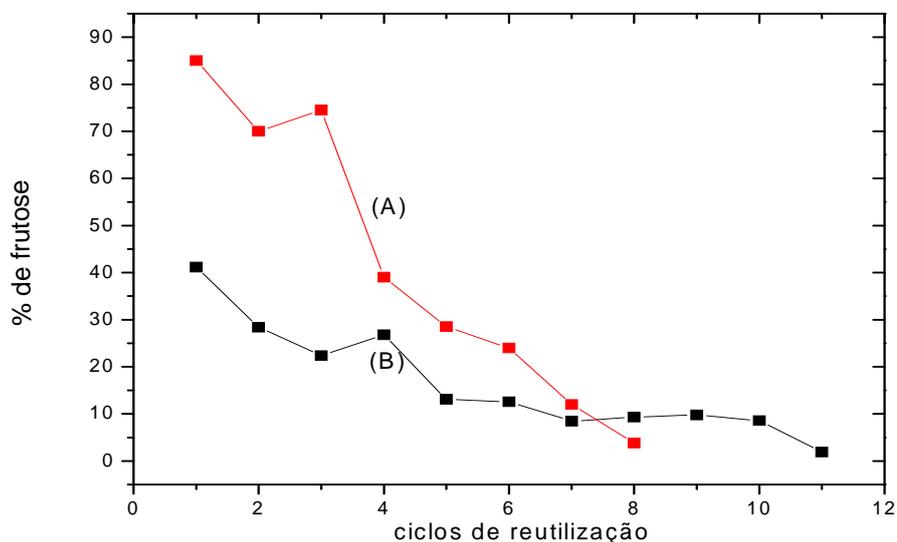


Figura 7: Ciclos de reutilização da inulina imobilizada utilizando (A) inulina comercial e (B) inulina de *Sterculia chicha* como substratos.

Os resultados são expressos como porcentagem de frutose produzida em cada ensaio enzimático.

Observa-se também que o rendimento inicial sobre inulina comercial foi muito maior, mas rapidamente declinou nos ciclos subseqüentes (Figura 7). Já a ação da inulinase sobre inulina de *Sterculia chicha* foi inicialmente menor, mas manteve-se mais estável e por um tempo maior do que sobre a inulina comercial.

Estes resultados sugerem que a inulina comercial é bem mais solúvel que os polifrutanos de *Sterculia chicha*, esta última presente provavelmente, como uma mistura de vários carboidratos e muitas impurezas com diferentes características físicas e químicas, como o grau de polimerização, por exemplo. As inulinas produzidas por diferentes tipos de plantas, em diferentes estágios do ciclo de crescimento da planta, ou sob diferentes condições climáticas, irão geralmente apresentar diferentes graus médios de polimerização, os quais afetam suas propriedades como viscosidade e capacidade de formação de gel (NOGUEIRA, 2002).

A Figura 8 mostra o suporte de CelXNB com a inulina imobilizada após reutilização. Ressalta-se que um conjunto suporte-enzima foi utilizada em todos os experimentos com o substrato inulina comercial e um outro conjunto suporte enzima com o substrato extrato bruto da *Sterculia chicha*.

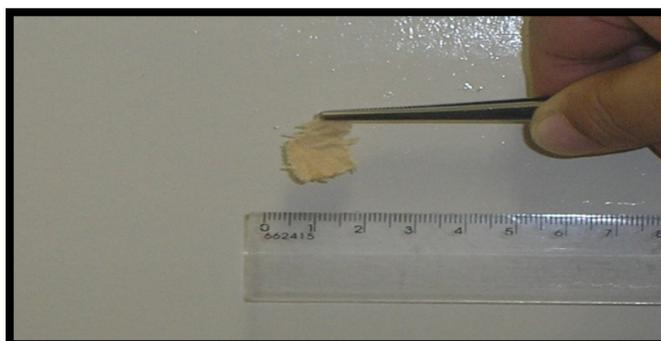


Figura 8: Suporte CelXNB-enzima após o 8º ciclo de reutilização.

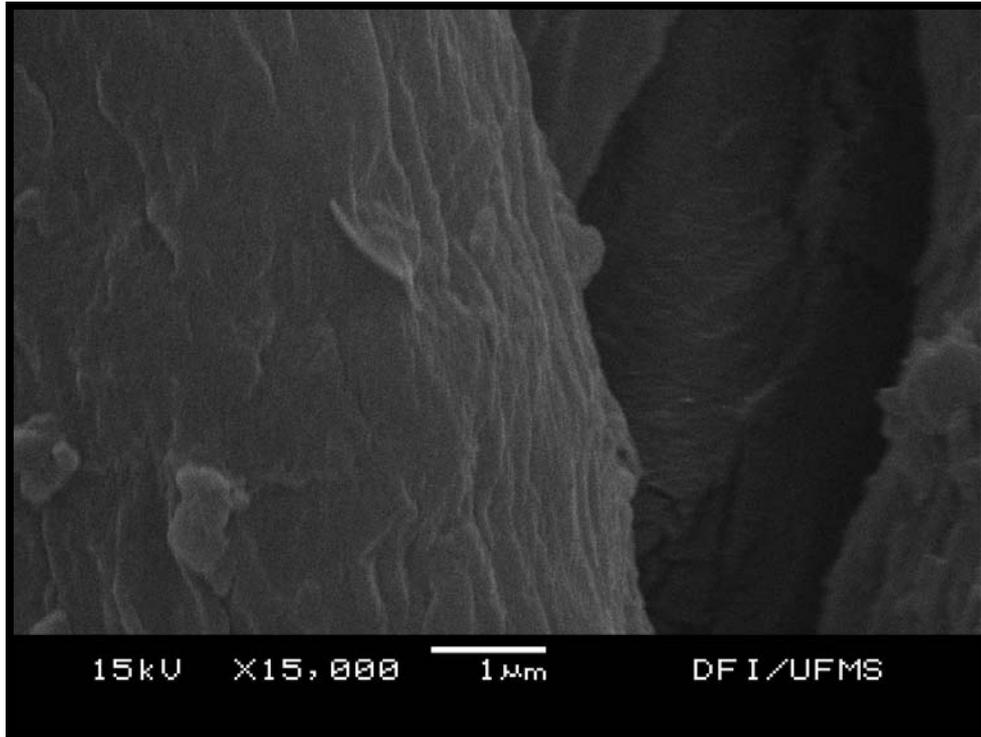
Deve-se considerar que este trabalho se caracteriza pela possibilidade de obtenção de frutose proveniente do extrato bruto da *Sterculia chicha* no qual não foi realizada purificação prévia, isto é os diferentes carboidratos e impurezas interferem na produção deste açúcar. A purificação deste extrato bruto fica como sugestão para trabalhos futuros.

A possibilidade de reutilização de enzimas de maneira contínua, em um processo em que o substrato é adicionado e o produto é removido seqüencialmente, é uma das maiores vantagens do uso de enzimas imobilizadas em relação ao uso de enzimas em solução. Este processo apresenta custos menores, pois possibilita o reaproveitamento das enzimas comerciais, que geralmente são de custo elevado (SHARP,1969).

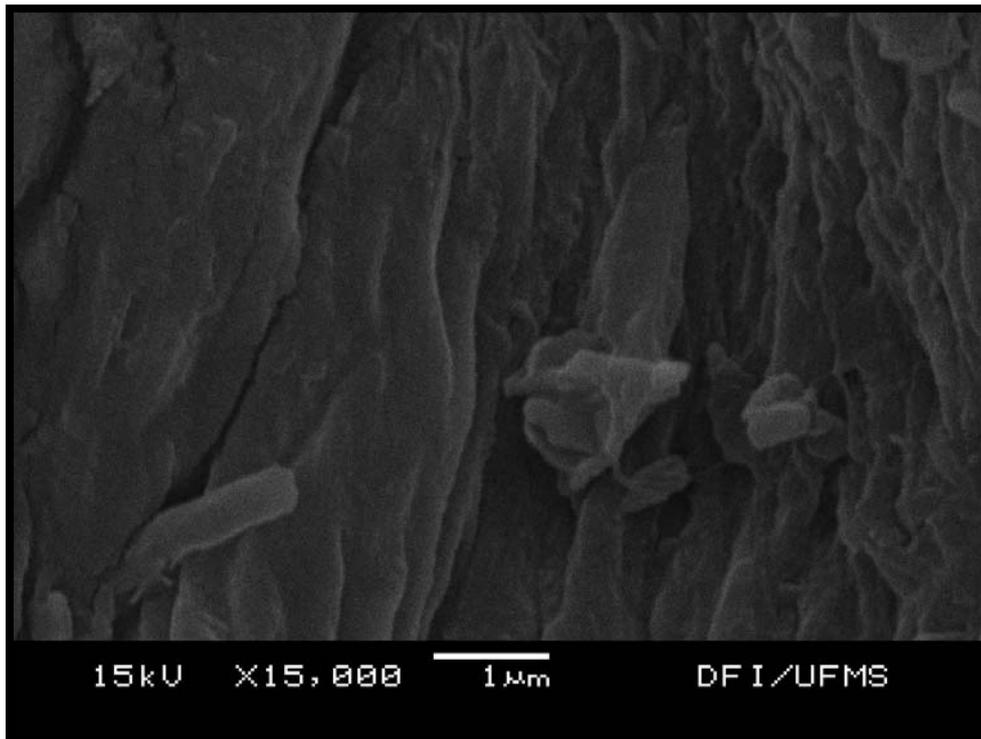
Cabral *et al.* (2003) relatam que enzimas com grande estabilidade apresentam elevados valores comerciais. Estudos relacionados à enzima fosfatase alcalina imobilizada em suporte de xantato de celulose (celulose modificada) apresentou alta atividade até o 8º ciclo de reutilização (DILKIN, 2003). As inulinases geralmente apresentam alta estabilidade nos processos de imobilização em suportes como alginatos, sílicas, resinas de troca iônicas e derivados de celulose (NAKAMURA *et al.*, 1993), tornando-as comercialmente atrativas. Resultados que mostram redução de atividade e da massa do conjunto enzima/suporte comprovam a necessidade de verificação da influencia do grau de substituição do CelXNB na atividade de enzimas imobilizadas neste suporte, havendo a possibilidade de se encontrar o GS ótimo deste derivado de celulose para uso como suporte na imobilização de enzimas em geral.

5.6- Análise da micro-estrutura do suporte CelXNB em M E V

As Figuras 9 e 10 mostram as micrografias eletrônicas feitas em microscópio de varredura do suporte de Cel XNB na ausência e na presença da inulinase, respectivamente. Nota-se que existem diferenças na estrutura do suporte nas diferentes condições. No entanto, não podemos afirmar que as estruturas novas observadas nas micrografias do suporte com enzima, correspondam às estruturas protéicas da inulinase. Futuramente, pretende-se repetir este método utilizando corantes específicos para proteína, o que nos permitirá afirmar a presença destas macromoléculas imobilizadas em suportes. As alterações na estrutura do suporte devem estar relacionadas à mobilização da enzima, uma vez que o grau de substituição em ambas às imagens é o mesmo.

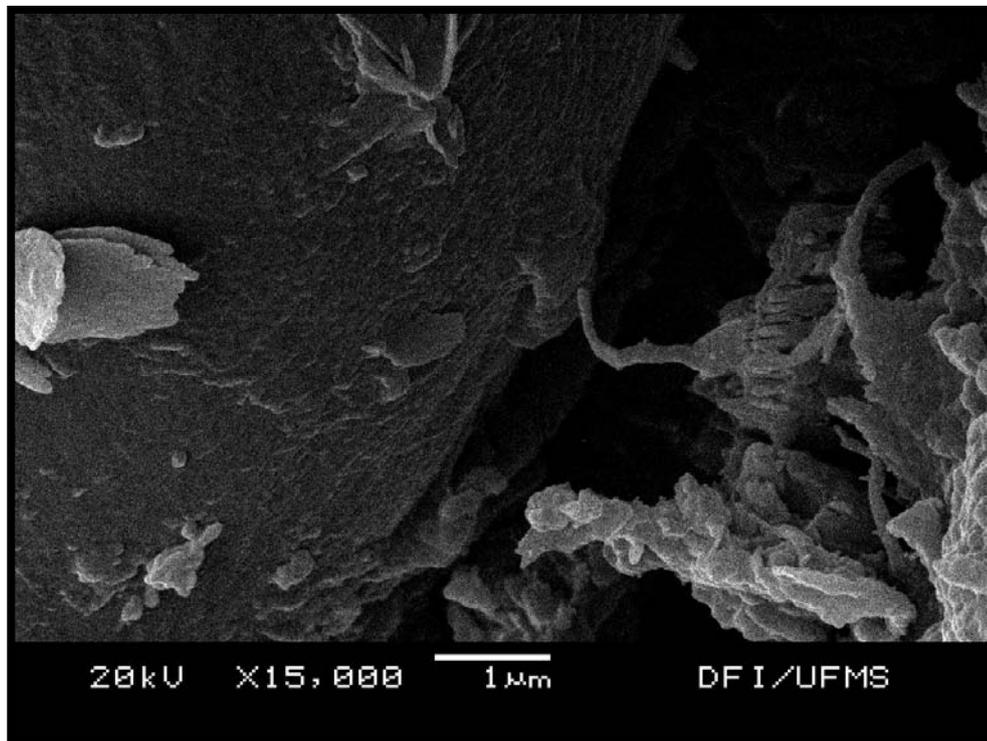


(A)

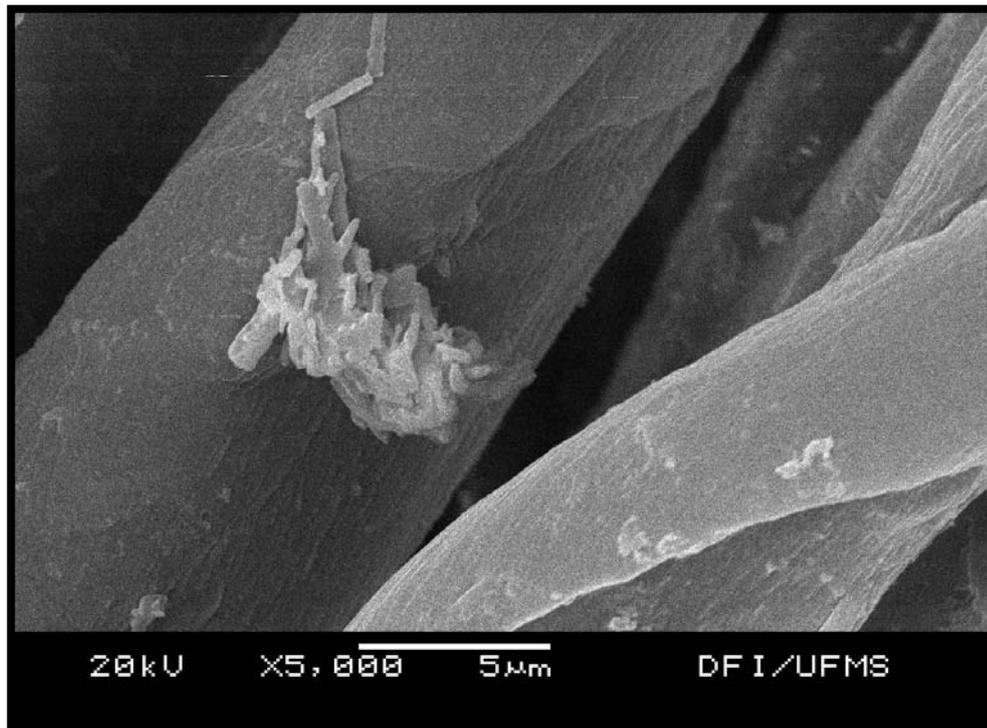


(B)

Figura 9: Micrografia eletrônica do suporte de CelXNB tratado, sem a inulinase imobilizada (A e B).



(A)



(B)

Figura 10: Micrografia eletrônica do suporte de CelXNB tratado, com a inulinase imobilizada (covalentemente ligada) (A e B).

6. CONCLUSÕES

Obteve-se o p-nitrobenzil xantato de celulose (CelXNB), que foi caracterizado pelo grau de substituição (GS) por meio da aminólise com n-butilamina. O valor do GS determinado foi 9,5, o que significa que em cada 100 unidades anidroglicopiranosíca da celulose foram introduzidos 10 grupos xantatos e esterificados pela reação com o brometo de p-nitrobenzil.

Imobilizou-se a inulinase de *Aspergillus niger* em CelXNB. A inulinase imobilizada hidrolisou a inulina, obtida comercialmente e uma mistura de polifrutanos inulínicos, extraído da raiz de *Sterculia chicha* produzindo frutose. As hidrólises enzimáticas desses substratos foram acompanhadas espectrofotometricamente e a frutose liberada foi quantificada por método enzimático.

Extraiu-se polifrutanos inulínicos da raiz de *Sterculia chicha*. Essa planta apresenta altos teores de polifrutanos inulínicos em suas raízes. Por ser uma espécie nativa do Cerrado, propaga-se facilmente em toda a região Centro-oeste, sendo uma fonte importante a ser considerada na produção de frutose. Os ensaios efetuados foram restritos as plantas jovens (mudas), uma vez que se tornam árvores de grande porte quando adultas. A enzima inulinase, tanto em solução, como imobilizada, hidrolisou os polifrutanos extraídos sem purificação prévia. A purificação da mistura de polifrutanos deverá ser realizada por cromatografia de afinidade e não foi realizada neste trabalho pela dificuldade na sua aquisição dos marcadores de peso molecular. Porém, testes realizados comprovaram que a hidrólise completa da "goma" produziu 46% de frutose e 9% correspondente a quantidade de frutose livre presente.

As reações de hidrólises enzimáticas com ambos os substratos foram realizados com a enzima imobilizada e em solução. Em

presença do substrato polifrutano, obteve-se 36,9 % de frutose com a enzima em solução e 26,4% com a enzima imobilizada. O branco, isto é, o teste realizado com todos os reagentes menos a enzima, produziu 9% de frutose. Quando utilizou-se inulina comercial como substrato, obteve-se 89,9% de frutose com a enzima em solução, e 88,1% com a enzima imobilizada 1,7% na ausência de enzima. É importante ressaltar que as medidas foram realizadas usando-se o mesmo método enzimático, e tanto na inulina comercial como no polifrutano de *S.chicha* há frutose livre. O rendimento neste caso também foi menor quando usou-se o polifrutano de *S.chicha*, comprovando maior afinidade da enzima pelo substrato mais puro e mais solúvel no meio de reação. As impurezas presentes no polifrutano podem obstruir alguns sítios catalíticos da inulinase.

Uma única amostra do conjunto, suporte-enzima foi reutilizada oito vezes em hidrólises de inulina comercial com retenção da atividade catalítica, enquanto outra amostra do conjunto suporte-enzima foi reutilizada onze vezes em hidrólises dos polifrutanos de *S.chicha*. A quantidade de frutose produzida na hidrólise enzimática dos polifrutanos pela inulinase imobilizada foi menor do que quando a inulina comercial foi utilizada como substrato, o que pode ser explicado pelo fato das reações ocorrerem em uma interfase sólido-líquido. Além disso, a mistura de polifrutanos de diferentes pesos moleculares pode apresentar maiores problemas de difusão do que a inulina comercial, que é mais solúvel e com grau de pureza analítica. Por consequência disso, a amostra suporte-enzima manteve-se com atividade catalítica durante onze ciclos de reutilização quando o substrato polifrutano foi utilizado.

As quantidades de frutose liberadas pela hidrólise enzimática da inulinase imobilizada com ambos substratos diminuíram após cada ciclo de reutilização. As amostras suporte-enzima foram pesadas após as reutilizações e houve 33% de perda

de massa em comparação com a massa inicial. Considere-se que em cada ciclo as amostras foram agitadas durante 72 horas. As amostras suporte-enzima com o substrato inulina e polifrutano permaneceram sob agitação durante 24 e 33 dias, respectivamente. O problema apresentado deve ser estudado tanto da perspectiva de otimizar o suporte, levando em consideração o grau de substituição do CeIXNB, como otimizar a reação de hidrólise enzimática. Os experimentos poderiam ser feitos, por exemplo, com agitação mais vigorosa, visando a diminuição do tempo de reação. Sabe-se que a hidrólise espontânea do CeIXNB regenera a celulose e produz sulfeto de carbonila e o tiol correspondente o qual contribui para a perda de massa do suporte. Este fator deve ser considerado nos cálculos da perda de massa do suporte. Embora em pH 4,5 a velocidade de degradação espontânea do CeIXNB é muito lenta, é necessário verificar se a presença de carboidratos pode aumentar a velocidade de hidrólise espontânea do CeIXNB.

Conclui-se finalmente que pesquisas publicadas em revistas importantes, referentes a determinações de atividades de inulinase imobilizada em diferentes suportes por meio de métodos colorimétricos, como por exemplo, o de Taylor e de Somogyi e Nelson, devem ser revistos, uma vez que os reagentes envolvidos nesses métodos hidrolisam completamente a inulina, sendo impossível diferenciar a quantidade de frutose produzida somente pela ação da enzima imobilizada.

7. BIBLIOGRAFIA

ADACHI, M., YAMAZAKI, M., HARADA, M., SHIOI, A., KATCH, S. 1997. Bioaffinity separation of trypsin inhibitor immobilized in reverse micelles composed of a nonionic surfactant, *Biotechnology and Bioengineering*, **53 (4)**: 406-408.

AKGUN, S.; ERTEL, N.H. 1980. A comparison of carbohydrate metabolism after sucrose, sorbitol, and fructose meals in normal and diabetic subjects. *Diabetes Care* **3 (5)**: 582-585.

ARAND, M.; GOLUBEV, A.M.; NETO, J.R.B.; POLIKARPOV, I.; WATTIEZ, R.; KORNEEVA, O.S.; ENEYSKAYA, E.V.; KULMINSKAYA, A. A.; SHABALIN, K.A.; SHISHLIANNIKOV, S.M.; CHEPURNAYA, O.V.; NEUSTROEV, K.N. 2002. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochem. J.* **362**: 131-135.

ASEGA, A.F.; CARVALHO, M.A.M. 2004. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 313-319

AZHARI, R.; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; NOAH, L. 1989. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase. *Biotechnol. App. Biochem.* **11**: 105-117.

BARREIROS C. R.; BOSSOLAN G.; TRINDADEP.E.C. 2005. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated errors. *Rev. Nutri, Campinas* **18(3)**: 377-389.

BERGMEYER, H. U.; BERNT E. 1974. Determination with glucose oxidase and peroxidase, p.1205-1215. *In "Methodos of enzymatic analysis"*. Bergmeyer, H. U (ed). 2nd edition, vol.3. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

BICKERSTAFF G.F. 1997. Immobilization of enzymes and cells. Methods. *In "Biotechnology 1"*. Human Press Inc., New Jersey.

BRAY, G.A.; NIELSEN, S.J.; POPKIN, B.M. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* **79**: 537- 43.

CABRAL, J. M. S.; MOTA, M.; TRAMPER, J. 2003. "Multiphase Bioreactor Design". Taylor and Francis Book. London.

CAMPUZANO S.; LOAIZA O. A.; PEDRERO M.; VILLENA F.J.M.; PINGARRÓN J. M. 2003. An integrated bienzyme glucose oxidase

fructose dehydrogenase-tetrathiafulvalene-3-mercaptopropionic acid-gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose. *Bioelectrochem.* **63**: 199-206.

CAO, L.; LANGEN, L. VAN; SHELDON, R. A. 2004. Immobilised enzymes: carrier-bound or carried-free. *Current Opinion Biotechnol.* **14 (4)**: 387-394.

CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbaceae* (Vell.) Rousby at different phenological phases. *New Phytol.* **123**: 735-740.

CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. 2005. Immobilization of unulinase for sucrose hydrolysis. *Food Chemistry* **91 (3)**: 517-520

CHAPLIN, M.F. 2004. Carbohydrate Analysis. In "Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine". R. A. Meyers (Ed) Wiley- UCH, Weinheim. vol. **2**. pp.243-275.

CORDEIRO-NETO, F.; PESSONI, R.A.B.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1997. Fungos produtores de inulinases isolados da rizosfera de asteráceas herbáceas do cerrado. *Rev. Bras. Ci. Solo* **21**: 149-153.

CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; BELLINE, M.Z.; CRUZ, R. 1998. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: Hydrolysis of inulin from several sources. *Rev. Microbiol.* **29**: 301-306.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ A.; BIELECKI S.; BROW R. M. 2006. Microbial cellulose- the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27**:145-151.

DERYCKE, D.G.; VANDAMME, E. J. 1984. Production and Properties of *Aspergillus niger* Inulinase. *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* **343**: 45-51 .

DILKIN E. R.S. 2003. Imobilização da fosfatase alcalina em éster xântico derivado de celulose. Dissertação de Mestrado em Química. UFMS. Campo Grande.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*, *New Phytol.* **67**: 517-531.

ENDE, W. VAN DEN.; CONINCK, B. DE, CLERENS, S.; VERGAUWEN, R.; LAERE, A. VAN. 2003. Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall

invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris*. L.). *Plant J.* **36** (5):697-710.

ENDE, W. VAN DEN.; CONINCK, B. DE; LAERE, A. 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends Plant Sci.* **9** (11): 523-528.

ETTALIBI, M & BARATTI, J .C. 2001. Hydrolysis by thermo stable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **28**: 596-601.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. 1987. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 13–20.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T. T. 1986. Reserve carbohydrate in underground organs of native Brazilian plants, *Rev. Brasil. Bot.* **9**: 159–166.

GERN, R.M.M.; JONAS, M.E.C.; FURLAN, S.A.; NINOW, J.L. 2000. Utilização de extrato de chicória na produção de endo-inulinase por *Paenibacillus sp.* *Rev. Saúde e Ambiente* **1** (1): 73-76.

GODFREY, T ; WEST, S. 1996. "Industrial enzymology". Stokton Press, New York.

GROOT-WASSINK, J.W.D.; FLEMING, S.E. 1980. Non-especific betafructofuranosidases (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and industrial properties. *Enzyme Microbiol. Technol.* **2**: 45.

GUPTA, A.K.; GILL, A.; KAUR, N.; SINGH, R. 1994. High termal stability from *Aspergillus species*. *Biotech Letters* **16** (7): 733-734.

HALLFRISCH J. 1991. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J.* **4**(9): 2652-60.

HEINZE, T., LIEBERT. T. 2001. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Prog. Polym. Sci* **26**: 1689-1762.

HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In "Science and Technology of Fructans". M. Suzuki, N.J. Chatterton (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp. 119–139.

HEWITT, L. 1994. Fight the good fat. *Food Manufacture.* **69** (10): 20.

HOEHN, E.; McKAY, C.J.; MURRAY, E. D. 1983. Production of high fructose syrup from inulin involving ultrafiltration. USA Patent number 4421852.

HUMERES, E., SEQUINEL, L. F., NUNES, M., OLIVEIRA, C. M. S., BARRIE, P. J. 1998. *Canadian J. Chem.* **76**: 960-965.

HUMERES, E.; OLIVEIRA, C. M.; OSELLAME, V. T.; SOUZA, I. 1991. Protein immobilization by aminolysis of cellulose xanthate esters. *J. Physical Organic Chem.* **4 (9)**: 573- 578.

IBRAHIM, M.; ALAAM, M; EL-HAES, H.; JALBOUT,A.F.; LEON, A. 2006. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclética Química* **31 (3)**: 15-21.

ISOGAI, A., ATALL R H. 1998. Dissolution of cellulose in aqueous NaOH solutions. *Cellulose* **5**: 309-19.

JARVIS, M. 2003. Cellulose stacks up. *Science* **426**: 611-2.

JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A. 2003. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. *Process Biochem.* **39**: 5-11.

KATO, K.; ARAKI, T.; MORITA, N.; MOORI, M.; SUZUKI, Y. 1999. Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-fructan-fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch* **51**: 253-258.

KENNEDY, J. ZAMIR, A. 1975. The use cellulose xanthate for the immobilization of biological molecules, *Carbohydrate Res.* **41**: 227-2233.

KOCHHAR, A.; GUPTA, A.K.; KAUR, N. 1999. Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *J. Sci. Food. Agric.* **79**: 549-554.

KOK, N.; ROBERFROID, M.; DELZENNE, N. 1996. Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br. J. Nutr.* **76**: 881-890.

KOOPS, A.J.; JONKER, H.H. 1994. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* 'Colombia': I fructan: fructan fructosyltransferase, *J. Exp. Bot.* **45**: 1623-1631.

KORKOUTAS, Y.; BEKOTOROU, A.; BANAT, L.M.; MARCHANT, R. KOUTINAS, A. A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* **21 (4)**: 377-397.

KRAJEWSKÁ, B. 2004. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enz. Microbiol. Technol.* **35 (2-3)**: 126-139.

LABROU, N. E.; CLONIS, Y.D. 1995. Biomimetic dye affinity chromatography for the purification of bovine heart lactate dehydrogenase, *Journal of chromatography A* **718**: 35-44.

LAURENZO, K. S.; NAVIA, J. L.; NEIDITCH, D. S. 1999. Preparation of inulin products. USA Patent nº 5986.

LEHNINGER, A. L. 2002. Princípios de Bioquímica 3ª. ed. Editora Sarvier. São Paulo p.147-178.

LICKLIDER, L.; KUHR, W. G.; LACEY, M. P.; KEOUGH, T.; PURDON, M.P.; TAKIGIKU, R. 1995. On-line microreactor/capillary electrophoresis/mass spectrometry for the analysis of proteins and peptides, *Analytical Chemistry*, **67(22)**: 4170-4177.

LOBO, A. R. 2004. Efeitos dos frutanos (Frutooligossacarídeos) na biodisponibilidade do cálcio e magnésio em ratos. Dissertação de Mestrado . USP. São Paulo.

LUSCHER, M.; HOCHSTRASSER, U.; VOGEL, G.; AESCHBACHER, R.; GALATI, V.; NELSON, C.J.; BOLLER, T.; WIEMKEM, A. 2000. Cloning and functional analysis of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from tall fescue. *Plant Physiol.* **124**: 1217-1227.

MARCONCINI, J. M. 2000. Utilização da fosfatase alcalina como enzima modelo no processo de imobilização de enzimas em éster xântico derivado de celulose. Dissertação de Mestrado. UFMS. Campo Grande.

MARUYAMÁ, Y; ONODERA, K. 1979. Production and some properties of invertase isozymes of *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**: 361.

MEIER, H.; REID, J.S.G. 1983. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In "Encyclopedia of Plant Physiology". F.A. Loewus, W. Tanner (Eds.). New Series, vol. 13A. Plant Carbohydrates, Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 418-471.

MISRA, B. N.; MEHTA, I. K.; RATHORE, M.P.S.; LAKHANPAL, S. 2003. Effect of L(-)threonine, 5-hydroxytryptophane, and 5-hydroxytryptamine on the ceric-ion-initiated grafting of methyl acrylate onto cellulose. *J. App. Polymer Sci.* **49 (11)**: 1979-1984.

MORVAN, A.; CHALLE, G.; PRUD'HOMME, M.P.; SAOS, J. LE BOUCAUD, J. 1997. Rise of fructan exohydrolase activity in stubble

of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. *New Phytol.* **136**: 81–88.

MÜLLER, J.M.; JONAS, R.; CARVALHO-JONAS, M.F.; FURLAN, S.A. 2006. Caracterização de oligofruktoses produzidas por endo-inulinases de *Paenibacillus sp. B. Ceppa* **24 (2)**: 363-374.

NAKAMURA, T.; NAGATOMO, Y.; HAMADA, S.; NISHINO, Y.; OHTA, K. 1995. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Fermentation Bioeng* **78**: 134-139 .

NAKAMURA, T.; NAKATSU, S. 1977. General properties of extracellular inulinase from *Aspergillus sp.* *J. Agr. Chem.* **51**: 23.

NEGORO, H.; KITO, E. 1973. Betafructofuranosidases from *Candida kefyr*. *J. Ferm. Technol.* **51**: 96.

NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZA, H. 2002. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I^β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **124 (31)**: 9074 - 9082.

NOGUEIRA, R. I. 2002. Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó. Tese de doutorado. UNICAMP. Campinas.

OLIVEIRA, C. M. S. 1983. Imobilização de enzimas em matriz de celulose, Dissertação de Mestrado. UFSC. Florianópolis.

OLIVEIRA, C. M. S. 1995. Mecanismos de aminólise de éster xântico de celulose e análogos. Tese de Doutorado. UFMG. Belo Horizonte.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, N. FONTANA, J.D. 1999. Recent developments in microbial inulinases. *Appl. Biochem Biotechnol.* **81**: 35-52.

PESSOA-JR., A.; VITOLO, M. 1999. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. *Braz. J. Chem. Eng.* **16**: 237-245.

PESSONI, R. A.; OLMEDO, P.M.O.; CLEMENTE FILHA, A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2004. Produção de concentrados de frutose por inulinases de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **24(3)**: 373-377.

POLLARD, C.J.; AMUTI, K.S. 1981. Fructose oligossacarídeos, possíveis marcadores de relações filogenéticas entre famílias de plantas dicotiledôneas. *Biochem. Syst. Ecol.* **9**: 69–78.

- ROBERFROID, M . B. 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br.J. Nutr.* **93(1)**:S13-25.
- ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZIME, N.1993. The biochemistry of oligofructose a nondigestible fiber, an approach to calculate its column value. *Nutrition Reviews* **51(5)**: 137.
- ROBERFROID, M.B.; DELZENNE, N.M. 1998. Dietary fructans. *Ann. Rev. Nutr.* **18**: 117-123.
- ROBINSON, R. K. The potential of inulin as a functional ingredient. *British Food J.* **97 (4)**: 30-32.
- ROSEVEAR A.; KENNEDY J.; CABRAL J.M.S. 1987. "Immobilized enzymes and cells". IOP Publishing Ltd. Bristol.
- ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. 1998. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **54 (5)**: 1131-1137.
- RYDHOLM, S.A. 1985. "Pulping Process". John and Sons, USA.
- SELIWANOFF, T .1887. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, , 20(1)*, 181-182.
- SHARP, A. K.; KAY, G.; LTLLY, M. D. 1996. Biotechnology. *Bioengineering* **11**: 363.
- SHIOMI, N. 1993. Structure of fructo-polysaccharide (asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phitol.* **123**: 263-270.
- SILVA, R. F. 1996. Use of inulin as a natural textura modifier. *Cereal Foods World* **41(10)**: 792-795.
- SINGH, P.; GILL P.K. 2006. Production of Inulinases, *Food Technol. Biotechnol.* **44 (2)**: 151-162.
- SJOSTRÖN, E. 1981. "Wood Chemistry: fundamentals and applications". 1st edition, Academic Press, USA.
- SOMOGYI, M. A. 1945. New reagent for the determination of sugar. *J Biol Chem* **160**: 61-68.
- TAYLOR, K. A. C. C. 1995. A colorimetric Fructose Assay Applied *Biochem Biotechnol.* **53**: 215-227 .

TERTULIANO, M.F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytol.* **123**: 741-749.

TOMOTANI, E. J. 2002. Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo Dowex) seu uso na modificação da sacarose, Dissertação de Mestrado. USP. São Paulo.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L. de HOEBREGS, H., SMITS, G.1995. The presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **35(6)**: 525-552.

VANDAMME, E. J.;DERYCKE, D.G. 1983. Fermentation Process, Proprieties and Applications In "Advances in Applied Microbiology". v.29, p.139-176.

WADA, M.; CHANZY, H.; NISHIYAMA, Y; LAMGAN, P. 2004. Cellulose crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Macromoleculas* **37**: 8548-8555.

WAGNER, W.; WIEMKEN, A. 1986. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel), *J. Plant Physiol.* **123**: 419-428.

WANG, Y. M.; VAN EYS J.1981. Nutritional Significante of fructose and sugar alcohols. *Ann Rev. Nutri* **1**:437-475.

WISEMMAN, A.1985. "Handbook of enzyme technology". 2nd edition, John Wiley & Sons, USA.

YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M.; 1986. "Cellulose - Structure, modification and hydrolysis". 1st edition. John Wiley & Sons. USA,.

ZABORSKY, O. R. 1973. "Imobilized enzymes". Chemical Rubler. Cleveland.

ZITTAN, L. B. 1981. Enzimatic Hydrolysis of Inulin Analternate way to fructose production. *Starch* **33 (11)**: 373-377.