

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SANDRA REGINA YAGINUMA

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INULINA A
PARTIR DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) POR
ADSORÇÃO EM RESINAS DE TROCA IÔNICA**

FLORIANÓPOLIS – SC

MAIO DE 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

SANDRA REGINA YAGINUMA

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INULINA A
PARTIR DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) POR
ADSORÇÃO EM RESINAS DE TROCA IÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri

FLORIANÓPOLIS, MAIO DE 2007.

Extração e Purificação Parcial de Inulina a partir de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Por Adsorção em Resinas de Troca Iônica

Sandra Regina Yaginuma

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, na área de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri
Orientadora

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri

Prof^a. Dr^a. Regina de Fátima P. Muniz Moreira

Prof. Marinho Bastos Quadri

Prof. Dr. Ricardo Antonio Fco. Machado

**Dedico às manifestações
divinas de Amor, Papai, Mamãe, Edson
pelo apoio incondicional.**

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada Deus por essa realização que fizemos em conjunto, por me guiar e por me dar Vida e Força infinitas.

Muito Obrigada Pai e Mãe, por todo Amor, carinho, apoio. Por não terem desistido. Por fazerem de mim o que sou hoje, por me ensinarem tudo o que sei. Palavras não são suficientes para expressar tudo o que fizeram por mim, todo o amor. Eu só posso agradecer. Muito Obrigada!

Muito obrigada Profa. Mara Gabriela Novy Quadri, pela orientação, pelo incentivo, pelo carinho e amizade.

Muito obrigada Prof. Ricardo A. F. Machado, por confiar a mim um projeto tão belo.

Muito obrigada os colegas de trabalho, pela companhia, apoio, pela ajuda dentro do laboratório e especialmente ao Toni que muito me ensinou.

Muito obrigada Fernanda, Solange e Raquel, que me proporcionaram o mais importante nessa jornada: a amizade.

Muito obrigada Edson, por me acolher com tanto Amor em seu lar, pela paciência, incentivo e amizade. Muito obrigada Milene, por me aceitar de coração aberto e por toda ajuda dentro do laboratório.

Muito obrigada minha família, pela torcida, pelo carinho, apoio.

Muito obrigada os amigos, pela companhia e apoio. Principalmente à Thais, que mesmo de longe me ajudou muito e torceu por mim.

Muito obrigada à LNF – Latino Americana e Clariant do Brasil.

Se sou o que sou e estou onde estou, devo isso a todos vocês. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. OBJETIVOS	18
1.2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. YACON	19
2.1.1. <i>Histórico</i>	20
2.1.2. <i>Descrição da planta</i>	21
2.1.3. <i>Cultivo do yacon</i>	22
2.1.4. <i>Produção do yacon</i>	22
2.1.5. <i>Composição química e nutricional</i>	23
2.2. FRUTANOS	25
2.2.1. <i>Levanos</i>	26
2.2.2. <i>Gramíneos</i>	26
2.3. INULINA	26
2.3.1. <i>Ocorrência</i>	28
2.3.2. <i>Propriedades físicas e físico-químicas</i>	28
2.3.3. <i>Propriedades funcionais da inulina e FOS</i>	29
2.3.4. <i>Efeitos da inulina</i>	30
2.3.5. <i>Utilização da inulina</i>	31
2.3.6. <i>Pode adoçante</i>	32
2.4. OBTENÇÃO DA INULINA	32
2.5. PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO POR ADSORÇÃO	33
2.5.1. <i>Matriz</i>	34
2.5.2. <i>Parâmetros que afetam na cromatografia de troca iônica</i>	35
2.5.2.1. <i>Resolução (Rs)</i>	35
2.5.2.2. <i>Fator de capacidade (k)</i>	36
2.5.2.3. <i>Eficiência (H)</i>	36

2.5.2.4. Seletividade (α).....	36
2.6. RESINAS DE TROCA IÔNICA.....	37
2.6.1. Tipos de resina	37
2.7. ADSORÇÃO.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. MATÉRIA-PRIMA.....	41
3.2. PROCESSAMENTO DE YACON E EXTRAÇÃO DE INULINA.....	41
3.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS DE YACON.....	43
3.3.1. Sólidos Totais.....	43
3.3.2. Açúcares Totais.....	44
3.3.3. Açúcares redutores.....	44
3.3.4. Açúcares não redutores.....	44
3.3.5. Teor de sólidos solúveis.....	45
3.3.6. Cinzas.....	45
3.3.7. Proteínas.....	45
3.3.8. Glicose.....	46
3.3.9. Frutose.....	46
3.3.10. Sacarose.....	46
3.3.11. Inulina.....	46
3.3.12. Cor.....	46
3.4. RESINAS UTILIZADAS NA PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DE YACON	47
3.4.1. Resina C150.....	47
3.4.2. Resina A860S.....	47
3.4.3. Resina PCR 462Ca	48
3.5. PREPARAÇÃO DAS COLUNAS PARA A PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DE YACON POR ADSORÇÃO DE TROCA IÔNICA	49
3.6. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DE YACON	50
3.6.1. Planejamento experimental.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	54
4.2. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DE YACON OBTIDO PELO PROCESSO QUENTE.....	55
4.2.1. Purificação do extrato para eliminação de minerais e proteínas	55
4.2.2. Purificação do extrato para eliminação de pigmentos.....	57
4.3. SEPARAÇÃO DOS AÇÚCARES DO EXTRATO DE YACON	58
4.3.1. Planejamento Experimental.....	58
4.3.2. Tempo de retenção.....	64

4.3.3. Pureza da Inulina.....	64
5. CONCLUSÕES	67
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - TUBÉRCULOS DE YACON.	19
FIGURA 2.2 - ESTRUTURA DA INULINA.	27
FIGURA 2.3 - ESQUEMA DO MECANISMO DE TROCA IÔNICA.	33
FIGURA 2.4 - MATRIZ COM TROCADORES ANIÔNICO E CATIÔNICO	34
FIGURA 2.5 - CROMATOGRAMA OBTIDO ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO DE DOIS COMPONENTES.	35
FIGURA 2.6 - EFEITO DA SELETIVIDADE E EFICIÊNCIA DA RESOLUÇÃO	37
FIGURA 2.7 - CURVA DE RUPTURA E PONTOS DE RUPTURA E EXAUSTÃO	40
FIGURA 3.1 - FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO QUENTE DE INULINA	42
FIGURA 3.2 - FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO FRIA DE INULINA.	43
FIGURA 3.3 - COLUNA RECHEADA COM: A - RESINA C150; B - RESINA A860S; C - RESINA PCR 642CA	49
FIGURA 3.4 - EQUIPAMENTO COMPLETO	49
FIGURA 4.1 - CURVA DE RUPTURANO PROCESSO DE ADSORÇÃO DE CINZAS DO EXTRATO DE YACON, UTILIZANDO A RESINA C150.	56
FIGURA 4.2 - COLORAÇÃO: A - EXTRATO BRUTO; B - EXTRATO APÓS PROCESSO COM RESINA A860S.	57
FIGURA 4.3 - GRÁFICO DA SEPARAÇÃO DOS AÇÚCARES DO EXTRATO DE YACON	63
FIGURA 4.4 - EVOLUÇÃO DA PUREZA DA INULINA	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - MÁXIMA PRODUTIVIDADE DE YACON EM DIFERENTES AMBIENTES.....	22
TABELA 2.2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA RAIZ DE YACON.....	23
TABELA 2.3 - CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM RAIZES TUBEROSAS DE YACON, 96 DIAS DA COLHEITA, MANTIDA EM CONDIÇÕES DE BAIXA TEMPERATURA... ..	24
TABELA 2.4 - TEOR DE FRUTANOS EM CHICÓRIA, ALCACHOFRA DE JERUSALÉM E YACON	25
TABELA 2.5 - CONTEÚDO DE FRUTANOS E OUTROS CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA, EM DIFERENTES PARTES DE YACON	25
TABELA 2.6 - QUANTIDADE DE INULINA EM PLANTAS COMUMENTE CONSUMIDAS NA NUTRIÇÃO HUMANA	28
TABELA 2.7 - PODER ADOÇANTE DOS AÇÚCARES DO YACON	32
TABELA 3.1 - CARACTERÍSTICAS DA RESINA C150	47
TABELA 3.2 - CARACTERÍSTICAS DA RESINA A860S	48
TABELA 3.3 - CARACTERÍSTICAS DA RESINA PCR 642CA	48
TABELA 3.4 - CARACTERIZAÇÃO DOS LEITOS PARA PURIFICAÇÃO DO YACON	50
TABELA 3.5 - FATORES E NÍVEIS DE VARIAÇÃO ESTUDADOS DURANTE A TRIAGEM DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	52
TABELA 4.1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS DOIS EXTRATOS DE YACON	54
TABELA 4.2 - CARACTERIZAÇÃO DA COR PELO SISTEMA CIELAB	58
TABELA 4.3 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2_{III}^{5-2} PARA SEPARAÇÃO DA INULINA DOS DEMAIS AÇÚCARES	58
TABELA 4.4 - MATRIZ COMPLEMENTAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2_{III}^{5-2} PARA SEPARAÇÃO DA INULINA DOS DEMAIS AÇÚCARES	59
TABELA 4.5 - VALORES DOS EFEITOS DOS PLANEJAMENTOS FATORIAL E COMPLEMENTAR	60
TABELA 4.6 - EFEITOS PRINCIPAIS	60
TABELA 4.7 - FATORES E NÍVEIS DE VARIAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^2	61
TABELA 4.8 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2^2 PARA SEPARAÇÃO DA INULINA DOS DEMAIS AÇÚCARES	61

TABELA 4.9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA PARA O VOLUME INJETADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2	61
TABELA 4.10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA PARA A CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2	62
TABELA 4.11 - CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO PARA A SEPARAÇÃO DOS AÇÚCARES DO EXTRATO DE YACON	62
TABELA 4.12 - FATORES QUE AFETAM A SEPARAÇÃO	63
TABELA 4.13 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS AÇÚCARES NO PROCESSO DE SEPARAÇÃO	64
TABELA 4.14 - TEMPOS RETENÇÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA	65

RESUMO

A inulina é um carboidrato com propriedades bifidogênicas, imunológicas e bioquímicas que promovem a saúde, encontrada em diversas plantas como a chicória e alcachofra de Jerusalém, yacon, alho, etc.

Devido a grande quantidade de inulina encontrada, o yacon tem propriedades como o combate à diabetes. A crescente produção no Brasil se concentra principalmente em São Paulo e Santa Catarina.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação das condições de operação para a extração e purificação de inulina a partir de yacon. Foram testados dois métodos de extração com água: fria e quente. A extração a frio foi feita pela trituração dos tubérculos de yacon limpos e descascados, seguida de pasteurização a 95°C por 15 minutos, resfriamento até 60°C, filtração e congelamento. A extração a quente teve adição de água num volume de cinco vezes o peso do yacon. A mistura foi triturada e aquecida em banho-maria a 75°C por 1 hora e o extrato foi filtrado e congelado. A caracterização do extrato foi feita através da quantificação dos teores de sólidos totais e solúveis, açúcares totais e redutores, proteínas, cinzas, frutose, glicose, sacarose e inulina.

A purificação do extrato obtido pela extração a quente foi feita em três etapas utilizando adsorção em resinas de troca iônica. A primeira e segunda etapas utilizaram as resinas C150 e A860S, grau alimentício, Purolite e tiveram o objetivo de eliminar os minerais, pigmentos e proteínas do extrato de yacon. As condições de operação utilizadas foram as recomendadas pelo fabricante.

Para determinar as condições de operação adequadas para a terceira etapa, a separação dos açúcares, foi utilizada uma solução modelo constituída de 5,5% de inulina, 3,1% de açúcares redutores em dois planejamentos experimentais 2^{5-2}_{III} . Foram consideradas como variáveis o tipo de eluente (água e NaOH 0,5M), volume do pulso (0,5 e 0,9 mL), concentração de açúcares no extrato (10 e 20% p/v), vazão (0,5 e 0,7 mL.min⁻¹) e força iônica (presença ou não de acetato de sódio 0,5M). A resposta do sistema foi a resolução Rs obtida, calculada a partir das curvas de eluição. As variáveis

significativas, encontradas através da magnitude dos efeitos principais foram usadas em um segundo planejamento 2^2 com ponto central. O extrato de yacon foi submetido, então à purificação utilizando as melhores condições de operação.

As extrações a quente e a frio mostraram ser significativamente diferentes entre si, sendo a extração a quente o melhor procedimento, com um teor de inulina extraída (5,28 g/100mL) cerca de cinco vezes maior que a extração fria (0,93 g/100 mL).

Com relação à purificação, a primeira resina (C150) produziu extrato de yacon livre de minerais até cerca de 430 volumes escoados, o que corresponde a 0,312 mL/ g de resina em 17 horas de operação à vazão de 1,2 mL.min⁻¹. A resina C150 também diminuiu em 51% o teor de proteínas em intervalo de tempo semelhante. O processo com a segunda resina (A860S) resultou, a partir do extrato original ($L^*=64,22$, $a^*=-0,75$, $b^*=37,97$), em extrato de yacon de aspecto transparente ($L^*=96,99$, $a^*=-1,75$, $b^*=2,11$), com uma variação de cor ΔE^* de 48,59 e teor de proteína de 8,94 mg/100mL de extrato para cada grama de resina.

Para a separação dos açúcares, os resultados do primeiro planejamento experimental mostraram que o melhor eluente é a água, sem qualquer adição de sal e a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹. No segundo planejamento, concluiu-se que a concentração de açúcares de 20% p/v e um pulso de 1,5mL conduzem a melhor separação de açúcares.

A separação dos açúcares presentes no extrato de yacon, inulina livre de açúcares foi obtida até 0,4 V/V₀, a uma concentração média de 2,5 mg/mL. A resolução foi de 0,436; com eficiência de 1,512; fator de capacidade de 1,892 e seletividade de 0,215. Os tempos de retenção da inulina, frutose, glicose e sacarose foram de 7,1; 13,94; 18,45 e 20,67 minutos, respectivamente.

ABSTRACT

Nowadays, people are even more concerned about healthy foods and substances like inulin has shown up due to its functional characteristics. Chicory and Jerusalem artichoke have been used as inulin sources, but many vegetables such as yacon stock a great quantity of energy as inulin form.

This work aims to evaluate the operating conditions for the partial purification of inulin from yacon using ion exchange resin, a non expensive separation method. It was tested two kinds of extraction with water, hot and cold. The cold extraction was done by grinding yacon cubes that were washed and peeled. The extract was pasteurized at 95°C for 15 minutes then cooled to 60°C to be filtered and frozen. The hot extraction was processed with washed, peeled yacon cubes. To the yacon, five times its weight of water was added, this moisture was taken to water bath at 75°C for 1 hour, and then it was filtered and frozen.

The yacon extract characterization was made by the quantification of the total and soluble solids, total and reducing sugar, proteins, ashes, fructose, glucose, sucrose and inulin amounts.

The extract purification was made by adsorption in ion exchange resins in three stages. The hot extract was utilized because of its inulin content. The first and second stages aimed to eliminate ashes, color bodies and proteins contents. The operation conditions were those indicated by the manufacturer.

To determinate the best operation conditions for the third stage, an aqueous model solution was prepared with inulin, glucose and fructose, simulating the juice extracted from yacon. The solution was passed through a column of 30 cm in height x 0.5 cm in diameter, filled with ion exchange resin, PCR 642Ca (Purolite do Brasil LTD).

Two initial experimental designs 2^{5-2}_{III} , the principal fraction and the complementary one, were performed, considering the variables: eluent type (water and NaOH 0,5M), pulse volume (0.5 e 0.9mL), sugar concentration (10 e 20% w/v), flow (0.5 e 0.7 mL.min⁻¹) and ionic force. The response of the system was the resolution, Rs, calculated from the elution curves. The significant

variables, found by the magnitude of the principal effects, were used in another experimental planning 2^2 with central point. Yacon extract was then passed through the column with PCR 642Ca resin using the best conditions.

Hot and cold extraction had a significant statistical difference, being the hot extraction the best processing because it showed an inulin extraction (5.28 g/100mL) five times greater than the cold extraction (0.93 g/100 mL).

At the purification process, the first resin (C150) produced an yacon extract free of minerals until 430 drain volumes, which is 0.312 mL/g resin in about 17 operation hours at flow of $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Resin C150 also reduced about 51% of protein amount during this process. The second resin (A860S) produced from the original extract ($L^*=64.22$, $a^*=-0.75$, $b^*=37.97$) to a transparent extract ($L^*=96.99$, $a^*=-1.75$, $b^*=2.11$) with a color variation of 48.59 and a protein amount of 8.94 mg/100mL of extract for gram of resin.

For the sugar separation, the experimental design determined that the best eluent is water with no addition of salt and flow of $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The second experimental design shows that a sugar concentration of 20mL and a pulse volume of 0.5 mL lead to a better separation.

The sugar separation of yacon extract was satisfactory, it was got pure inulin until $0.4 V/V_0$ and average concentration of 2.5 mg/mL. Resolution was of 0.413; efficiency of 1.512, capacity factor of 1.892 and selectivity of 0.215. The retention times of inulin, fructose, glucose and sucrose were 7.1; 13.94; 18.45 e 20.67 minutes, respectively

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos vegetais tem o amido como carboidratos de reserva, porém existem plantas que estocam energia em forma de frutanos. Estes são oligo e polissacarídeos, sendo constituídos por uma molécula de sacarose a que se unem resíduos de frutose por ligações β (2 \rightarrow 1) e β (2 \rightarrow 6), (Quinteros, 2000), podendo ser lineares ou ramificadas. Smith (1993) divide os frutanos em três grupos: inulinas, levanos e graminanos.

Levanos e graminanos são frutanos de bactérias; já a inulina pode ser obtida de bactérias ou encontrada em plantas. O que as diferencia é o grau de polimerização; nas inulinas das plantas, o grau de polimerização (DP) é menor que 200 e varia de acordo com as espécies. Já as produzidas por bactérias têm DP alto, variando de 10.000 a 100.000, e possui mais ramificações.

Inulina é um carboidrato contendo, principalmente, se não exclusivamente, ligações β (2 \rightarrow 1) de frutose, podendo haver uma molécula inicial de glicose. A nomenclatura usada pode ser GF_n e F_m , onde n e m correspondem ao número de moléculas de frutose presentes na cadeia.

Depois do amido, os frutanos são os polissacarídeos mais abundantemente encontrados na natureza. A inulina pode ser encontrada em plantas comuns da dieta humana: cebola, alcachofra de Jerusalém, chicória, alho, banana, centeio, cevada, yacon, etc.

Atualmente, devido ao dia-a-dia que torna cada vez mais difícil manter uma alimentação adequada e saudável, as indústrias de alimentos voltam suas atenções para a produção de alimentos que tragam maiores benefícios à saúde além da função de alimentar e nutrir, ou seja, alimentos funcionais.

O aumento no consumo de gorduras e açúcares conduz um maior número de pessoas à obesidade, infartos cardíacos, diabetes, etc. HEASMAN e MELENTIN (1998) mostram que a mortalidade devido às doenças cardiovasculares é cerca de 40% na Europa.

A inulina é um alimento prebiótico, uma vez que passa pelo estômago e intestino delgado sem ser digerida. Não havendo contribuição calórica e sendo fermentada por bactérias do gênero *Bifidus bacterium* e *Lactobacillus*, auxiliam

no aumento desta microflora, que está relacionada com a melhoria da saúde do cólon e influenciam o bem estar geral do corpo. Além disso, afeta os parâmetros fisiológicos do sistema digestivo, como esvaziamento gástrico, tempo de trânsito, pH e massa fecal, de forma similar às fibras dietéticas (ROBERFROID *et al.*, 1993).

Apesar de ser considerada como um alimento, a inulina não é consumida diretamente, mas sim é utilizada como aditivo em produtos lácteos, suplementos alimentares e adoçantes. É bastante utilizada também, como substituta da gordura (GORDON, 1996), como fibra alimentar ou agente espessante. Além disso, há uma grande especulação sobre o uso de inulina por pessoas diabéticas, uma vez que esta tem capacidade de reduzir os níveis de glicose no sangue (TAPER e ROBERFROID, 1999).

A inulina é extraída, comercialmente, a partir de alcachofra de Jerusalém e chicória, sendo utilizada na forma nativa, ou seja, contendo pequenas quantidades de sacarose, frutose e glicose. Comercialmente, é encontrada na forma de pó para uso como aditivo alimentar, levando o nome de Beneo® GR (inulina com grau de polimerização acima de 10) e Beneo® P95 (inulina com grau de polimerização abaixo de 10), fabricados pela Orafiti. No Brasil, a inulina é acrescentada a produtos como leite em pó da marca Nestlé, ou ainda em barras de frutas, como é o caso das barras Supino.

Dentre as plantas ricas em inulina e que ainda são pouco estudadas, encontra-se o yacon, um tubérculo de origem andina (ASAMI *et al.*, 1991), com aparência semelhante à de uma batata doce (FUKAI *et al.*, 1995) e sabor próximo ao de uma pêra (OHYAMA *et al.*, 1990; PARAJARA, 1999). Sua comercialização no Brasil ainda é pequena por ser pouco conhecido pelos consumidores, porém seu cultivo e produção são bastante crescentes na economia do país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, com destaque para São Paulo e Santa Catarina.

No que diz respeito às metodologias de purificação de inulina, encontra-se na literatura processos de filtração por membrana. A utilização de cromatografia de troca iônica se destina apenas à análise de inulinas.

Os estudos sobre as propriedades físico-químicas e funcionais, extração e purificação de inulina vêm crescendo a cada dia, porém ainda são necessárias pesquisas e informações sobre o assunto para o aumento e

melhoria de sua produção, uma vez que a inulina pode agregar valor aos produtos alimentícios, devido a sua funcionalidade.

1.1. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral a extração e purificação da inulina a partir de yacon. Como objetivos específicos, avaliou-se a) o efeito da temperatura sobre a extração, b) as características físico-químicas dos extratos de yacon, c) a viabilidade de aplicação de um processo de purificação por adsorção em resinas de troca iônica, em relação à retirada de minerais, pigmentos, proteínas e d) a separação dos demais açúcares (sacarose, glicose e frutose) contidos no extrato de yacon. Avaliou-se ainda o grau de pureza do extrato contendo inulina de yacon ao final do processo.

1.2. Estrutura da dissertação

A dissertação encontra-se dividida em 7 capítulos.

- Capítulo 1 – Introdução, objetivos e justificativa.
- Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica incluindo informações sobre: o yacon, seu histórico, produção, características físico-químicas; inulinas, definição, propriedades funcionais, utilização e obtenção; e o processo de purificação da inulina por adsorção.
- Capítulos 3 – Materiais e Métodos.
- Capítulo 4 – Resultados e Discussão.
- Capítulo 5 – Conclusões.
- Capítulo 6 – Sugestões para trabalhos futuros.
- Capítulo 7 - Referências Bibliográficas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Yacon

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta perene, herbácea, pertencente à Família Asteraceae. Originária da região andina da América do Sul é encontrada desde o Equador até o noroeste da Argentina (ROBINSON, 1997).



Figura 2.1 – Tubérculos de yacon (Wikipédia)

Esta espécie também é conhecida por nomes tipicamente andinos. Na Bolívia, recebe o nome de aricoma; no Equador pode ser encontrada como: jicama, chicama, shicama, jiquima ou jiquimilla (TITTEL, 1986). Outros nomes, de origem Quéchuá, também são comuns: llaqon, llacum, llacuma e yacumpi. Neste idioma, yacu significa água. Além de nomes andinos, o yacon também recebe diferentes nomes em idiomas europeus: poire de terre, em francês e yacon strawberry, em inglês (ZARDINI, 1991)

Originalmente, o yacon foi classificado como *Polymnia*, gênero descoberto por Linnaeus em 1751. De CANDOLLE (1836), BLAKE (1917,

1930) e WELLS (1967) (citados por ROBINSON, 1997) mantiveram a planta dentro deste gênero. Porém, em 1978, ROBINSON adotou uma perspectiva diferente e restabeleceu o yacon no gênero *Smallanthus*, proposto por Mackenzie em 1933, pois se acredita que *Smallanthus macroscyphus* é possivelmente seu progenitor (OLIVEIRA E NISHIMOTO, 2004)

Nos mercados locais dos Andes é classificado como fruta e vendido junto com maçãs, abacates, abacaxis, etc. e não com as batatas, como é esperado pelos visitantes. Em áreas que se estendem do Peru a Argentina, o yacon é consumido principalmente em feriados como “Corpus Cristi”; no Equador consome-se os tubérculos no “Dia de Finados” e “Dia de Todos os Santos” (ROBINSON, 1997).

2.1.1. Histórico

Camponeses andinos encontraram yacon em propriedades de terra e acreditavam ser uma erva daninha. Depois, mudaram seu status para planta controlada e mais tarde para planta cultivada. Este fato aconteceu nas áreas úmidas e inclinadas dos Andes, em regiões do nordeste da Bolívia e centro do Peru, onde se encontra a maior diversidade de variedades de yacon. No Equador, acredita-se que a planta foi introduzida pelos Incas apenas algumas décadas antes da invasão espanhola.

O primeiro registro do yacon foi feito por Felipe Guaman Poma de Ayala (1615), que listou 55 safras de cultivares nativos dos Andes. O padre Bernabé Cobo (1653) (citado por ROBINSON, 1997) fez uma descrição mais detalhada, indicando o uso do yacon como fruta e sua capacidade de resistir vários dias de transporte pelo mar (ROBINSON, 1997).

De acordo com Perez Arbeláez (1956), o yacon foi exibido pela primeira vez na Europa no começo do século XX, na França. Porém, o interesse europeu não foi muito significativo.

Com as mudanças culturais, o cultivo do yacon diminuiu nos países não andinos durante a maior parte do século. Mas durante os anos 80, houve um crescimento do interesse pela safra de yacon fora dos Andes, o que estimulou novas pesquisas sobre a planta nos países andinos.

Nas últimas três décadas, o cultivo de yacon tem se estendido a outros continentes, sendo encontrado nos EUA, mas com pouco atrativo comercial.

Na Nova Zelândia, existem pesquisas sobre o produto, que também é comercializado em supermercados como vegetal especial. Da Nova Zelândia, o yacon foi introduzido no Japão e, então, trazido para o Brasil, onde é produzido nas regiões Sul e Sudeste, com destaque para os estados de São Paulo e Santa Catarina.

2.1.2. Descrição da planta

O yacon é dotado de um sistema radicular que origina caules aéreos pilosos esverdeados (QUNITEROS, 2000), de altura entre 1,5 a 3 m. O sistema de raiz é composto de 4 a 20 tubérculos de armazenagem com peso entre 200 a 500g, podendo atingir 25 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro e um extenso sistema de raízes finas e fibrosas.

As raízes tuberosas são, na sua maioria, fusiformes, mas frequentemente adquirem formatos irregulares devido ao contato com pedras do solo e a pressão de outras raízes (ROBINSON, 1997). As cores dos tubérculos variam consideravelmente, podendo ser branca, creme, branca com estrias roxas, roxas, rosas e amarelas. A casca é marrom, rosa, roxa, creme ou branca.

Quando recém colhidas, as raízes são insípidas e adquirem sabor doce e refrescante após 3-5 dias de exposição ao sol devido à hidrólise parcial dos oligofrutanos que se reduzem a moléculas de glicose, frutose e sacarose. O National Research Council descreve o sabor do yacon como semelhante à maçã fresca picada e que lembra melancia (CNR, 1989; citado por ESTRELLA & LaAZARTE, 1994). OHYAMA *et al.* (1990) e PARAJARA (1999) dizem que o gosto do tubérculo é parecido com ao da pêra.

2.1.3. Cultivo do yacon

Muitas espécies selvagens do gênero *Smallanthus* (*S. glabratus*, *S. riparius*, *S. siegesbeckius*, *S. macroscyphus* e *S. conntus*) mostram uma preferência por habitats perturbados, como: bancos de rios, desabamento de

terra e beira de estradas. Plantações em curva de nível e agricultura de corte-e-queima praticadas pela população andina desde os tempos pré-históricos promovem um nicho ideal para essas espécies, que deram origem ao yacon, tornando-o adaptável a uma diversidade de solos. Tais plantas também invadem campos abandonados e espaço entre terras cultivadas (ROBINSON, 1997). Além disso, a evolução de adaptação desses tubérculos se deve ao fato de que existem épocas, que duram de 2 a 4 meses, de seca e baixas temperaturas nas regiões andinas, que normalmente são chuvosas e quentes.

O cultivo do yacon é feito em regiões próximas a florestas úmidas e a maioria dos cultivares completa seu ciclo produtivo em sete meses (REA, 1995). A temperatura ideal para seu plantio encontra-se na faixa de 18 a 25°C e altitude entre 900 – 3500m. Devido a uma alta taxa de transpiração, o plantio do yacon requer uma irrigação regular.

A colheita é feita manualmente nos períodos de Julho a Janeiro nos países andinos e mecanicamente no Brasil, onde a safra vai de Março a Setembro (PARAJARA, 1999 e QUINTEROS, 2000).

2.1.4. Produção do yacon

A produção agrícola do yacon é encontrada na região dos Andes, principalmente na Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela; norte da Argentina e sul e sudeste do Brasil. A Tabela 2.1 apresenta a máxima produtividade do yacon em diferentes ambientes.

Tabela 2.1 – Máxima produtividade de yacon em diferentes ambientes.

Local	Produção (t/ha)	Fonte
Ahuabamba, Peru	28	Lizárraga et al., 1997
Santa Catalina, Equador	74	Castillo et al., 1988
Cajamarca, Peru	95	Seminário, 1995
Capão Bonito, Brasil	100	Kakihara et al., 1996

Todas as fontes foram citadas por ROBINSON, 1997

Nos Estados Unidos, Europa, Japão e Nova Zelândia existem apenas algumas plantações, onde são desenvolvidas pesquisas sobre o potencial do tubérculo em relação às suas propriedades dietéticas.

2.1.5. Composição química e nutricional

As folhas e caule do yacon são ricos em proteínas. Já as raízes tuberosas apresentam teores significativos de potássio, fósforo e ferro (NIETO, 1991). Ao contrário da maioria das espécies vegetais, não estocam carboidratos em forma de amido, mas sim frutanos. O suco de yacon é rico em aminoácidos essenciais livres (KAPULER & GURUSIDIAH, 1994), sendo a asparagina, glutamina, prolina e arginina os encontrados em maior concentração (ASAMI *et al.*, 1989). A composição química da raiz de yacon é mostrada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Composição química da raiz do yacon

Componentes (mg por 100g de raiz de yacon)	Lizárraga et al. (1997) * (base úmida)	Nieto (1991)
Água (g)	70 – 93	84,8**
Proteínas (g)	0,4 – 2,0	3,7
Lipídios (g)	0,1 – 0,3	1,5
Carboidratos (g)	-	-
Fibras (g)	0,3 – 1,7	3,4
Cinzas (g)	0,3 – 2,0	3,5
Cálcio (mg)	23	80
Cobre (mg)	-	0,009
Ferro (mg)	0,3	0,096
Zinco (mg)	-	0,390
Fósforo (mg)	21	120
Potássio (mg)	-	2.200
Sódio (mg)	-	10
Carotenos (mg)	0,08	-
Retinol (mg)	10	-
Tiamina (mg)	0,01	-
Riboflavina (mg)	0,10	-
Niacina (mg)	0,33	-
Ácido ascórbico (mg)	13	-

* - Lizárraga *et al.* (1997), citado por ROBINSON, 1997 ** - raiz tuberosa fresca

Vários carboidratos são estocados nas raízes de yacon: frutose, glicose, sacarose, oligossacarídeos de baixo grau de polimerização (DP de 3 a 10), também conhecidos por frutooligossacarídeos (FOS) e traços de amido e frutanos, que são oligossacarídeos com DP maior que 10 (ASAMI *et al.*, 1989; OHYAMA *et al.*, 1990).

ASAMI *et al.* (1991) constataram que os oligofrutos de baixo DP (média de 4,3) correspondem a 67% em base seca dos carboidratos do yacon logo após a colheita, sendo que os FOS entre GF₂ e GF₅ representam 70% dos açúcares totais, os frutanos 0,23% e o amido 0,04%.

A proporção de oligofrutos e monossacarídeos variam significativamente durante o ciclo de crescimento da planta e depois da colheita (ASAMI *et al.*, 1991; FUKAI *et al.*, 1995). OHYAMA *et al.* (1990) indicam que apenas 20% dos carboidratos são frutanos. Isso se deve ao fato de que o material usado ficou armazenado durante 96 dias antes do experimento, sendo caracterizada a degradação enzimática que ocorre durante o processo de armazenagem, mesmo em condições de baixas temperaturas.

Tabela 2.3 – Conteúdo de carboidratos solúveis em raízes tuberosas de yacon, 96 dias após da colheita, mantidas sob refrigeração (OHAYAMA *et al.*, 1990).

Carboidrato	Conteúdo (mg/g peso seco)
Frutose	350
Glicose	158
Sacarose	74
GF ₂	60
GF ₃	47
GF ₄	34
GF ₅	21
GF ₆	16
GF ₇	13
GF ₈	10
GF ₉	7
Total GF ₂₋₉	201

GF_n = glicose/frutose; n = grau de polimerização (DP)

Para ZARDINI (1991), o sabor doce do yacon só começa a aparecer depois de 3-5 dias de exposição ao sol após a colheita, o que deixa claro que a degradação enzimática dos oligossacarídeos é responsável pelo acréscimo de doçura no tubérculo, uma vez que os produtos da hidrólise são glicose e frutose, cujo poder adoçante é maior do que o do FOS e dos frutanos.

Outras fontes de frutanos também são conhecidas: chicória e alcachofra de Jerusalém. Porém, cada vegetal apresenta diferentes graus de polimerização dos frutanos. Por exemplo, 60% dos oligossacarídeos da chicória têm DP menor que 20. (VAN LOO *et al.*, 1995).

A partir da tabela 2.5., pode-se dizer que os rizomas e as raízes tuberosas são as partes do yacon que mais contêm frutanos.

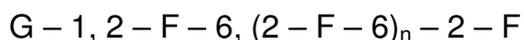
Os frutanos são oligo e polissacarídeos, constituídos por uma molécula de sacarose a que se unem resíduos de frutose por ligações β (2→1) e β (2→6), (QUNITEROS, 2000), podendo ser lineares ou ramificadas. Para FRANCK e LEENHEER (2005), frutanos são, de modo geral, qualquer composto cujas ligações fructosil-frutose são a maioria.

SMITH (1993) divide os frutanos em três grupos: inulinas, levanos e graminanos.

2.2.1. Levanos

São os frutanos de bactérias e são encontrados entre as *Pseudomonaceae*, *Enterobacteraceae*, *Streptococcaceae*, *Actinomycetes* e *Bacillaceae*. Estes frutanos são produtos da excreção das bactérias durante seu crescimento (FRANCK e LEENHEER, 2005).

De acordo com POLLOCK (1986), a estrutura dos levanos tem como base a 6-kestose, onde os resíduos de frutose se unem a de sacarose por ligações β (2→6), apresentando a fórmula geral:



2.2.2. Graminanos

Nestes frutanos, o resíduo de glicose se une diretamente aos resíduos de frutose, nas posições 1 e 6. Portanto, os graminanos são moléculas com ligações β (2→1) e β (2→6) (MARX *et al.*, 1997; De ROOVER *et al.*, 1999).

A fórmula geral, sugerida por POLLOCK (1986), é:



2.3. Inulina

Inulina é definida como um carboidrato que contém, principalmente, se não exclusivamente, ligações β (2→1) de frutose (WATERHOUSE e

CHATTERTON, 1993, citados por FRANCK e LEENHEER, 2005), podendo haver uma molécula inicial de glicose.

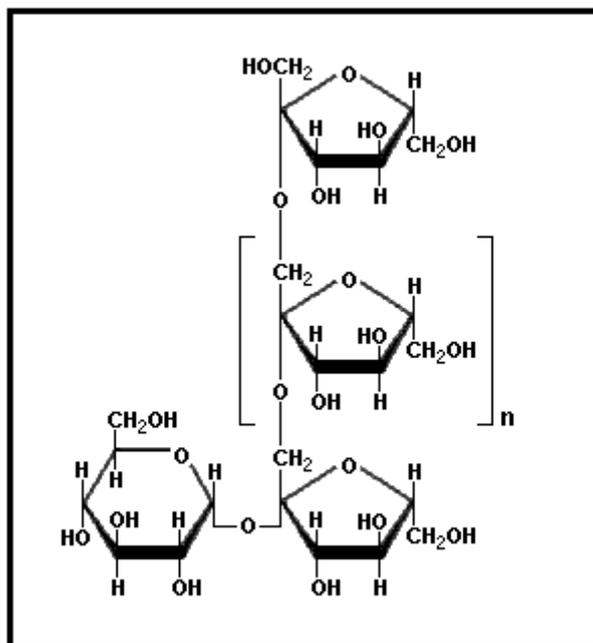


Figura 2.2 – Estrutura da inulina

A nomenclatura usada pode ser GF_n e F_m , onde n e m correspondem ao número de moléculas de frutose presentes na cadeia.

O grau de polimerização (DP) da inulina, assim como as ramificações do polímero são importantes propriedades que influenciam a funcionalidade do carboidrato.

A inulina pode ser originária das plantas ou bactérias. O que as diferencia é o grau de polimerização; nas inulinas das plantas, o DP é menor que 200 e varia de acordo com as espécies, geralmente está o DP das inulinas das plantas varia de 2 a 60 (IZZO e FRANCK, 1998). Já as inulinas produzidas por bactérias tem DP alto, variando de 10.000 a 100.000, e possui mais ramificações.

FRANCK e LEENHEER (2005) dizem que a inulina nativa sempre contém glicose, frutose, sacarose e pequenos oligossacarídeos. O termo “nativa” se refere à inulina que é extraída de raízes frescas e que antes de sua análise, passa por processo de inativação da atividade enzimática da própria planta. A inulina comercial, proveniente da alcachofra de Jerusalém e chicória,

não é considerada nativa, uma vez que esse produto raramente representa a inulina típica da planta da qual é extraída.

2.3.1. Ocorrência

Depois do amido, os frutanos são os polissacarídeos mais abundantemente encontrados na natureza, estando presente numa grande variedade de plantas e algumas bactérias.

A tabela abaixo mostra o conteúdo de inulina nas plantas consumidas na dieta humana.

Tabela 2.6 – Quantidade de inulina em plantas comumente consumidas na nutrição humana (FRANCK e LEENHEER, 2005).

Fonte	% inulina
Cebola	2-6
Alcachofra de Jerusalém	14-19
Chicória	15-20
Alho poro	3-10
Alho	9-16
Alcachofra	3-10
Banana	0,3-0,7
Centeio	0,5-1
Cevada	0,5-1,5
Yacon	3-19

2.3.2. Propriedades físicas e físico-químicas

Por serem carboidratos não redutores, os frutanos não sofrem reação de Maillard (DREVON e BORNET, 1992) e são apenas hidrolisados pela invertase microbiana (ARCHBOLD, citado por POLLOCK, 1986).

A enzima hidrolítica presente nas plantas que contém inulina é a inulinase, que é capaz de clivar as ligações $\beta(2\rightarrow1)$ dos frutanos, gerando frutose e glicose. A inulinase é classificada em endo- e exo-inulinase (QUINTEROS, 2000).

A exo-inulinase separa os resíduos de frutose terminal, enquanto que a endo-inulinase age nas ligações $\beta(2\rightarrow1)$ não terminais (VAN DEN ENDE et al., 1996).

Os frutanos são bastante solúveis em etanol 80% a 0°C e pH 2 e em água (VAN LOO et al., 1998).

Os frutooligossacarídeos (FOS), frutanos com DP entre 2 e 10, são bastante estáveis a pH maiores que 3 e temperaturas superiores a 140°C (BORNET, 1994). As soluções aquosas de FOS são estáveis por meses chegando mesmo a mais de um ano, quando mantidas sob refrigeração (YUN, 1996).

2.3.3. Propriedades funcionais da inulina e FOS

Alimento funcional é aquele que contém um ou mais componentes que afetam as funções no corpo e produzem efeitos celulares e fisiológicos positivos (ROBERFROID, 1998). Dentre os alimentos funcionais estão em destaque os probióticos, prebióticos e simbióticos, que são uma combinação dos dois primeiros (QUNITEROS, 2000).

Simbióticos são os alimentos que possuem as características tanto de probióticos quanto de prébióticos. Os alimentos probióticos contêm suplementos microbianos vivos e promovem a saúde, melhorando o balanço microbiano do ser humano. Os microrganismos probióticos são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GOLDIN, 1998).

ROBERFROID (1998) diz que um prebiótico é um alimento não digerível, que estimula o crescimento e a atividade da microbiota benéfica ao trato gastro-intestinal.

Para ser classificado como prebiótico, o alimento deve:

- ter resistência a digestão, hidrólise e fermentação no estômago;
- ser seletivamente fermentada por um ou um número limitado de bactérias potencialmente benéficas ao cólon;
- alterar a composição da colônia microbiana do intestino, levando a uma mais saudável.

A inulina não é digerida pelo estômago e intestino delgado, pois é resistente às enzimas da saliva e aparelho digestivo (ROBERFROID, 1993).

Portanto, não há contribuição calórica neste processo. No cólon acontece a fermentação da inulina por bactérias, e seus produtos são ácidos graxos de cadeia curta (short chain fatty acids, SCFA), como por exemplo o ácido acético, propiônico e o butírico; além de dióxido de carbono, metano e hidrogênio (Wang e Gibson, 1993).

Os SCFA são absorvidos pelo organismo, gerando energia e conseqüentemente, uma contribuição calórica, que pode variar de 1 a 2,2 kcal/g (ROBERFROID *et al.*, 1993b e MOLIS *et al.*, 1996).

Por ser fermentada por bactérias do gênero *Bifidus bacterium* e *Lactobacillus*, a inulina auxilia no aumento dessa microflora, que está relacionada com a melhoria da saúde do cólon, influenciando o bem estar geral do corpo. Além disso, as bactérias benéficas, ao proliferarem no cólon, diminuem significativamente o número de bactérias patogênicas como *E. coli* e *Clostridia*. Por esses motivos, a inulina pode ser considerada um prebiótico.

A inulina também afeta os parâmetros fisiológicos do sistema digestivo, como esvaziamento gástrico, tempo de trânsito, pH e massa fecal, de forma similar às fibras dietéticas (ROBERFROID *et al.*, 1993).

2.3.4. Efeitos da inulina

Existem evidências de que a inulina auxilia na absorção de minerais, principalmente o cálcio. Através de estudos *in vitro* com jovens que receberam 15 g/dia de inulina, VAN DEN HEUVEL *et al.* (1998, 1999) observaram que houve aumento na absorção de cálcio pelos jovens.

VAN LOO *et al.* (1998) dizem que a maior parte dos estudos indica que o consumo dos frutanos tipo inulina aumenta a absorção de cálcio e possivelmente de Mg⁺⁺ e Fe⁺⁺.

A redução dos triglicerídeos plasmáticos, fosfolipídios e colesterol é resultado do metabolismo dos lipídios modificados pelas fibras e FOS (FIORDALISO *et al.*, 1995). Os autores chegam a essa conclusão a partir de estudos feitos em ratos que tiveram uma dieta contendo 10% de FOS e demonstraram uma diminuição das lipoproteínas de muito baixa densidade. A redução acontece pela absorção dos SCFA pelas membranas intestinais e

posterior migração até o fígado, onde atuariam como reguladores das vias metabólicas.

A inulina também está relacionada com a inibição da carcinogênese do cólon. Em um estudo desenvolvido por REDDY *et al.* (1998) foram induzidas lesões pré-cancerosas em ratos, usando azoximetano. Foi administrada uma dieta de 10% de FOS ou inulina e após certo período foi observada uma redução significativa das lesões.

Os frutanos têm ação redutora da glicose e da insulina. Dessa forma, as células tumorais não se desenvolvem por aproveitarem pouco a glicose, além da mudança à sensibilidade à insulina, que faz parte do mecanismo de inibição do crescimento dos tumores (TAPER e ROBERFROID, 1999).

A inibição dos estágios iniciais do câncer de cólon é atribuída à formação dos ácidos de cadeia curta, mais especificamente, o ácido butírico, que promove um acréscimo da apoptose (morte das células malignas) no cólon (QUINTEROS 2000). Para REDDY (1999), o efeito inibidor do câncer de cólon, deve-se à remoção dos carcinógenos pelas bificobactérias, via fezes.

2.3.5. Utilização da inulina

A inulina, apesar de ser considerada como um alimento é utilizada como aditivo no meio de produtos lácteos, suplementos alimentares e adoçantes.

É bastante utilizada também, como substituta da gordura, pois age da mesma maneira em relação à textura, (GORDON, 1996), como fibra alimentar ou agente espessante.

Além disso, há uma grande especulação sobre o uso de inulina por pessoas diabéticas, considerando a capacidade da inulina em reduzir os níveis de glicose no sangue (TAPER e ROBERFROID, 1999).

A inulina é extraída de alcachofra de Jerusalém e chicória e utilizada na forma nativa, ou seja, contendo pequenas quantidades de sacarose, frutose e glicose. Comercialmente, é encontrada na forma de pó para uso como aditivo alimentar, levando o nome de Beneo® GR (inulina com grau de polimerização acima de 10) e Beneo® P95 (inulina com grau de polimerização abaixo de 10), fabricados pela Orafiti. No Brasil, a inulina é acrescentada a produtos como

leite em pó da marca Nestlé e em barras de frutas Supino da marca Banana Brasil.

2.3.6. Poder adoçante

O sabor global da inulina é menos intenso que o da sacarose, Os frutanos com DP maior que 10 não são doces.

O poder adoçante dos carboidratos do yacon está apresentado abaixo.

Tabela 2.7 – Poder adoçante dos açúcares do yacon

Açúcar	Valor (%)
Sacarose	100
Glicose	70
Frutose	170
1-kestose (GF ₂)	31
Nistose (GF ₃)	22
Frutofuranosilnistose (GF ₄)	16

Fonte: YUN (1996)

2.4. Obtenção de inulina

A extração da inulina para análise é, normalmente, feita através da imersão da matéria-prima em água em ebulição. Glicose, frutose e sacarose são determinados por método enzimático e a inulina é calculada pela diferença de concentração (PROSKY e HOEBREGS, 1999).

A separação e a purificação da inulina têm sido, por tempos, um processo demorado e incompleto (PRAZNIK *et al.*, 1984). O métodos mais utilizados para a purificação de frutanos é a filtração por membranas (GOULAS, *et al.*, 2002 e LI, *et al.*, 2004). A utilização de cromatografia gasosa, líquida e de troca iônica detém-se apenas à análise de inulinas e o processo de adsorção é descrito apenas para a desmineralização de produtos da indústria de açúcar.

2.5. Processos de purificação por adsorção

A troca iônica é um método de separação que envolve uma fase estacionária e uma móvel. Uma mistura de solutos é introduzida na fase móvel que carrega a solução através da fase estacionária carregada de íons.

O mecanismo de separação acontece de acordo com a figura abaixo.

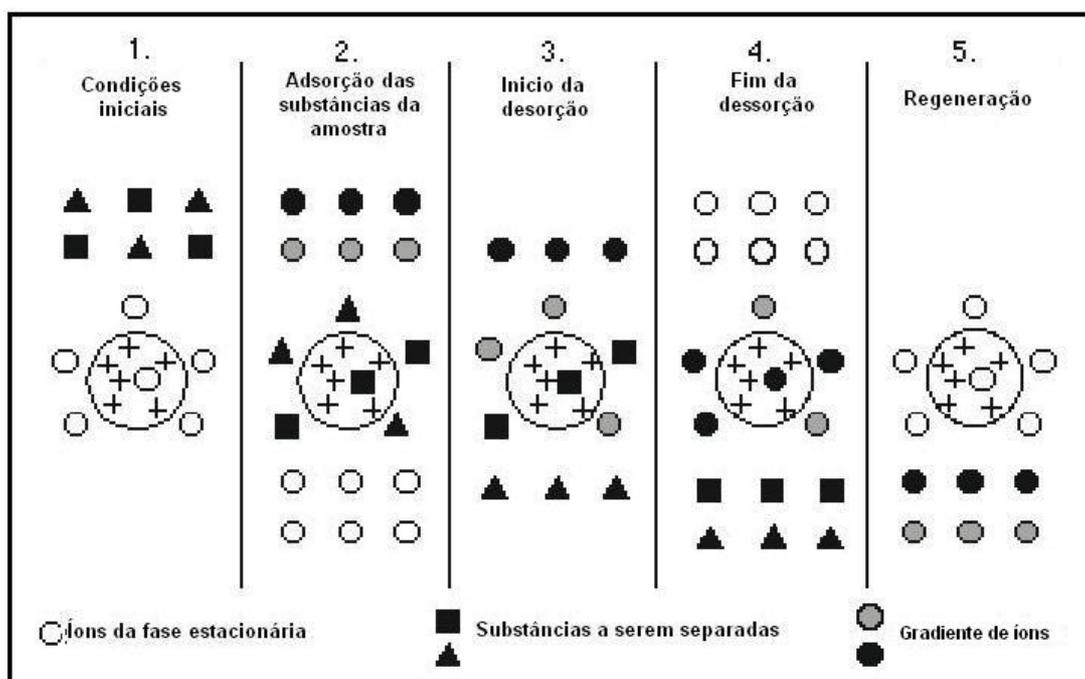


Figura 2.3 – Esquema do mecanismo de troca iônica

No esquema apresentado na Figura 2.2., há no primeiro estágio um equilíbrio entre os trocadores iônicos, normalmente são utilizados ânions e cátions simples como cloro e sódio como contra-íons, ou seja, os íons presentes na matriz.

O segundo estágio é a aplicação e adsorção da amostra, liberando íons da fase estacionária em quantidade equivalente à adsorvida. A diferença é a posição e origem do sítio de troca. Os sítios são um grupo iônico capaz de formar uma ponte eletrostática com um íon de carga oposta. A facilidade da troca depende da força da ponte, que varia de maneira similar à dissociação de eletrólitos fortes e fracos (KUNIN e MYERS, 1952).

As substâncias que ficaram na coluna são removidas pela troca de eluente no terceiro estágio. A dessorção pode ser acelerada com a introdução de um gradiente crescente de concentração de um sal, força iônica.

As quarta e quinta etapas são referentes à retirada de substâncias não eluídas anteriormente sob as condições iniciais de operação e o re-equilíbrio dos trocadores, ou seja, a regeneração da coluna.

A separação das substâncias acontece devido à diferença de graus de interação das mesmas com o trocador iônico. Tais interações podem ser controladas pela força iônica, eluente, pH, etc.

2.5.1. Matriz

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos que podem ser classificados em aniônico ou catiônico.

Os trocadores aniônicos trocam ânions e apresentam grupos iônicos positivos ligados a matriz. Inversamente, os trocadores catiônicos trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos como mostra a Figura 2.4.

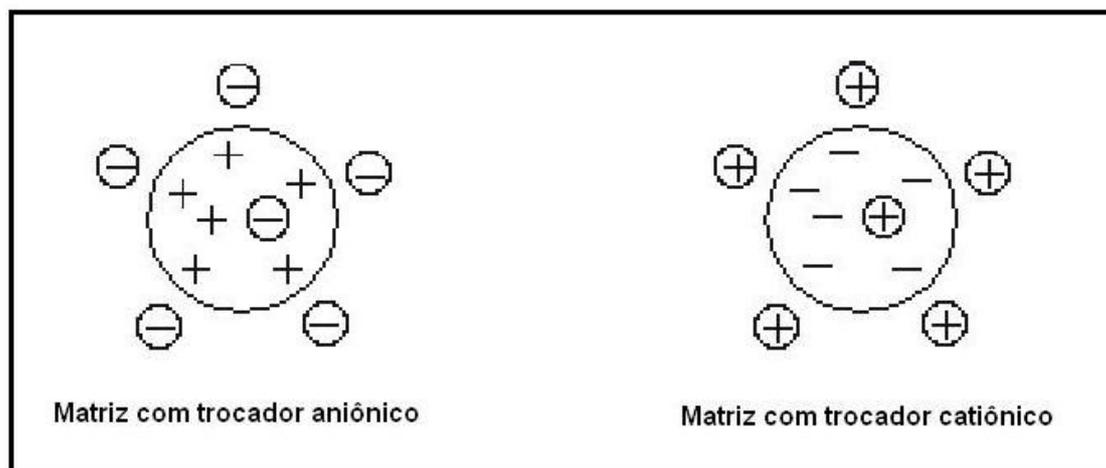


Figura 2.4 – Matriz com trocadores aniônico e catiônico.

2.5.2. Parâmetros que afetam a separação na adsorção de troca iônica

O resultado de um procedimento de troca iônica é, geralmente, expresso pela resolução entre os picos de interesse. Os parâmetros que afetam a resposta do processo são a resolução, eficiência, fator de capacidade e seletividade.

2.5.2.1. Resolução (Rs)

A resolução é definida pela distância entre os picos máximos obtidos na separação e pode ser usada para determinar a otimização do procedimento, quanto mais seu valor se aproxima de 1, melhor é a separação.

A Figura 2.5 apresenta o esquema de resultados obtidos por cromatografia de troca iônica na separação de dois componentes.

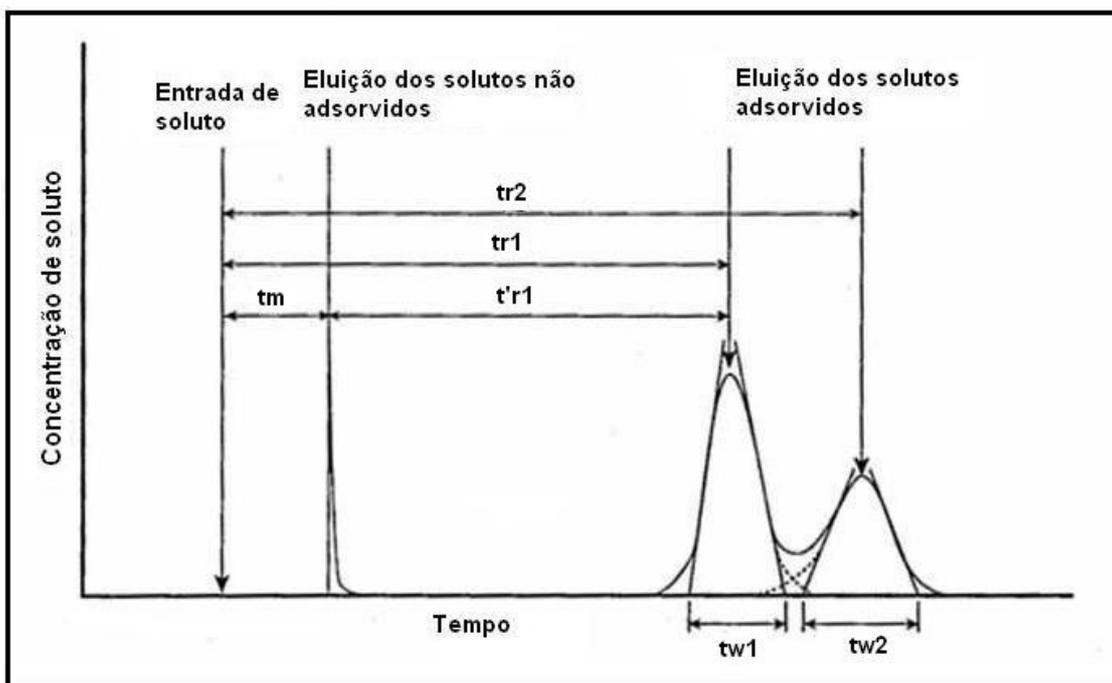


Figura 2.5 – Cromatograma obtido através da cromatografia de separação de dois componentes,

A partir dos dados obtidos em gráficos como o da Figura 2.5, pode-se obter o valor de Rs de acordo com a equação:

$$R_s = \frac{tr_2 - tr_1}{\frac{1}{2}(tw_1 + tw_2)} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Onde, tr_1 e tr_2 são os tempos de retenção dos dois componentes; tw_1 e tw_2 são a larguras das bandas medidas; t_m é o tempo de retenção na coluna de um soluto não adsorvido até sua saída.

2.5.2.2. Fator de capacidade (k)

É a medida da retenção de cada componente e é calculada por cada pico individual:

$$k = \frac{1}{R-1} \quad (\text{Eq. 2.2.})$$

Onde R é a razão de tempo entre o tempo de retenção na coluna (t_m) e o tempo de retenção do soluto (tr).

A capacidade será alta se os grupos iônicos ativos localizados no interior dos poros também contribuírem com a troca iônica.

2.5.2.3. Eficiência (H)

Também expressada por HETP (altura equivalente de pratos teóricos), a eficiência é o número de pratos teóricos por metro de coluna.

$$H = \frac{N}{L} \quad (\text{Eq. 2.3.})$$

Onde N é o número de pratos teóricos e L o comprimento da coluna.

Este parâmetro indica as condições da coluna, como por exemplo o empacotamento da mesma.

2.5.2.4. Seletividade (α)

Define a capacidade do sistema em separar os picos (distância entre eles):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Eq. 2.4.})$$

K_1 e k_2 são os fatores de capacidade do primeiro e segundo picos, respectivamente.

A seletividade é o fator mais importante para determinar a resolução e depende da natureza e do número de grupos trocadores na matriz e das condições de operação.

Os efeitos da seletividade e a eficiência da resolução são apresentados na Figura 2.6.

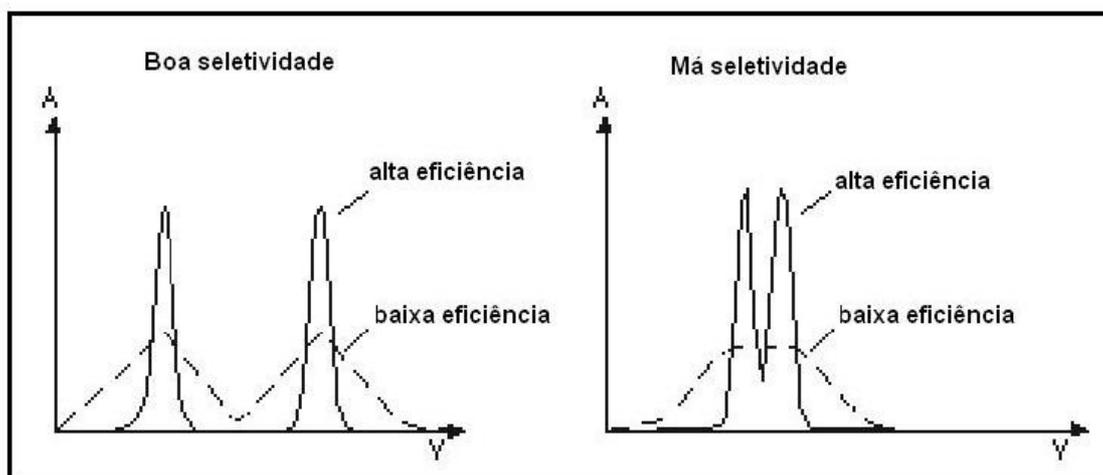


Figura 2.6 – Efeito da seletividade e eficiência da resolução.

2.6. Resinas de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, as matrizes podem ser resinas poliméricas de alto peso molecular, contendo grupos iônicos como parte da estrutura do polímero (KUNIN e MYERS, 1952).

O fato de a troca iônica ser um processo reversível torna o método bastante vantajoso. Segundo HIESTER *et al.* (1963), as resinas podem ser regeneradas com uma solução contendo o íon inicialmente presente no polímero, que irá reverter a reação de equilíbrio, restaurando a resina à sua condição original.

2.6.1. Tipos de resina

As primeiras resinas estudadas para troca iônica eram formadas por materiais inorgânicos naturais e sintéticos, que foram substituídas por resinas orgânicas e sintéticas. Porém, com a alta demanda de trocadores iônicos na

indústria alimentícia, desenvolveram-se materiais para a fabricação de resinas específicas para seu uso e com propriedades especiais (DOFNER, 1991).

Os trocadores orgânicos sintéticos podem ser classificados segundo os grupos iônicos funcionais fixados a matriz, sendo eles:

- resinas aniônicas, forte e fraca;
- resinas catiônicas, forte e fraca;

A terminação forte e fraca para a classificação das resinas é uma referência à força que o grupo iônico afixado em de se dissociar completamente ou não.

O grupo ativo das resinas catiônicas fortes são, geralmente, grupos de ácidos sulfônicos; já as resinas catiônicas fracas contêm grupos carboxílicos e fosfóricos ligados a matriz. As resinas aniônicas fortes possuem grupos amino-quaternários e as fracas contêm outros amino-grupos acoplados à matriz (KUNIN e MYERS, 1952; HELFFERICH, 1962; HIESTER *et al.*, 1963).

Além dos grupos iônicos funcionais, a estrutura da matriz também diferencia cada resina e pode ser:

- Gel: durante a polimerização, a rede obtida tem forma de gel;
- Macroporosa: produção a partir de monômeros, realizada na presença de solventes, gera uma estrutura porosa formada ao longo da polimerização;
- Isoporosa: tem estrutura com poros uniformes;
- Peliculares: formas alternativas, não são granulares, mas têm forma de filme, fibra, placa, etc.

As resinas são utilizadas nas indústrias para a purificação e desmineralização de água. Na indústria alimentícia são usadas em processos de adsorção como no caso do açúcar refinado, no qual a resina é utilizada na inversão da sacarose, descalcificação, desmineralização e descoloração do açúcar, além da separação cromatográfica de frutose e glicose (MIERS, 1995; UTSUNOMIYA, 1995). As separações cromatográficas por resina também estão sendo estudadas para a purificação e recuperação de açúcares (MAEDA, *et. at.*, 2003; VIARD e LAMELOISE, 2003; GIACOBELLO, *et al.*, 2000). Em geral, as resinas são utilizadas no refino e descoloração do açúcar

(CREN, 2002), porém não foram encontrados registros da utilização das resinas para purificação de inulina.

2.7. Adsorção

A adsorção é a transferência de um ou mais constituintes de uma fase fluida para a superfície de uma fase sólida. Este processo pode ser classificado como adsorção física, quando envolve forças de Van der Waals e interação eletrostática; ou adsorção química, onde se formam ligações químicas entre adsorvente e adsorbato. A utilização de uma fase sólida do tipo estrutura iônica envolve tanto o processo de adsorção física quanto o processo de troca iônica em si, que também é considerado um processo de adsorção de forma genérica (CREN, 2002).

Uma técnica muito utilizada na indústria é a adsorção em leito fixo, que consiste na percolação de um leito empacotado em coluna vertical, por um fluido contendo o soluto que se deseja adsorver. No início da operação, todo o soluto é adsorvido e a sua concentração na saída é nula. Com o tempo, inicia-se a saturação da resina, que começa na extremidade da alimentação e migra em direção à saída do fluido. Devido à saturação, a resina aproxima-se da sua capacidade máxima de adsorção e a concentração de soluto na saída da coluna começa a aumentar até se tornar igual à concentração de entrada.

Para a análise do desempenho de uma coluna de adsorção com resina de troca iônica, utilizam-se curvas de ruptura. O ponto de ruptura da coluna acontece quando a concentração de saída atinge 10% da concentração inicial; ao alcançar 90% da concentração inicial, tem-se o ponto de exaustão (BELTER, *et al.*, 1988). A Figura 2.7 mostra a curva de ruptura e os pontos de ruptura e exaustão.

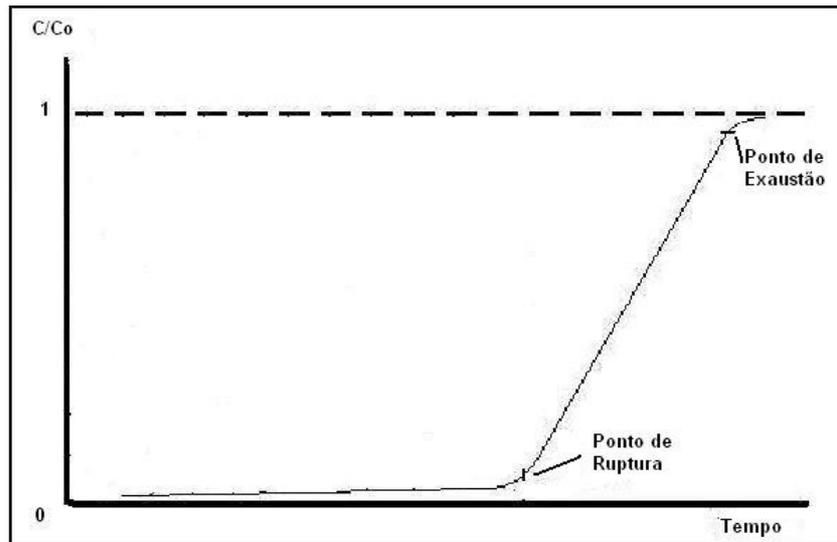


Figura 2.7 – Curva de ruptura e pontos de ruptura e exaustão.

Todas essas informações são importantes para entender o comportamento do soluto na coluna de adsorção e da resina utilizada, podendo-se identificar o início da saturação da resina até sua saturação total, além do tempo de operação da coluna e quantidade de soluto adsorvido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

Os tubérculos de yacon da variedade amarela com 7 dias de colheita, produzidos em São Paulo, da safra de Setembro de 2005, foram obtidos no estabelecimento “Direto do Campo” em Florianópolis - SC.

3.2. Processamento do yacon e extração de inulina

Dois métodos foram utilizados para a obtenção do extrato de inulina a partir de yacon: a quente e a frio.

Para a obtenção do extrato com aquecimento foi utilizado yacon lavado, descascado e cortado em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta. Ao yacon picado foram adicionados 5 vezes a quantidade de água e triturados com mixer, marca Walita, modelo RI3123. A suspensão foi colocada em banho-maria a 75°C por 1 hora e então, o produto foi filtrado com papel filtro comum e embalado em saco de polietileno e congelado a -18°C para posterior análise. Este processamento segue a metodologia descrita por VAN LOO *et al.* (1995).

A obtenção do extrato a frio foi conduzida com yacon lavado, descascado e cortado em cubos com aproximadamente 4 cm de aresta. Os pedaços de yacon foram processados em centrífuga de uso doméstico marca Walita, modelo RI 6728. Em seguida o extrato foi pasteurizado a 95°C por 15 minutos e filtrado com papel filtro. O extrato foi embalado em sacos de polietileno e congelado a -18° para posterior análise.

Os processamentos seguem os fluxogramas das Figuras 3.1 e 3.2.

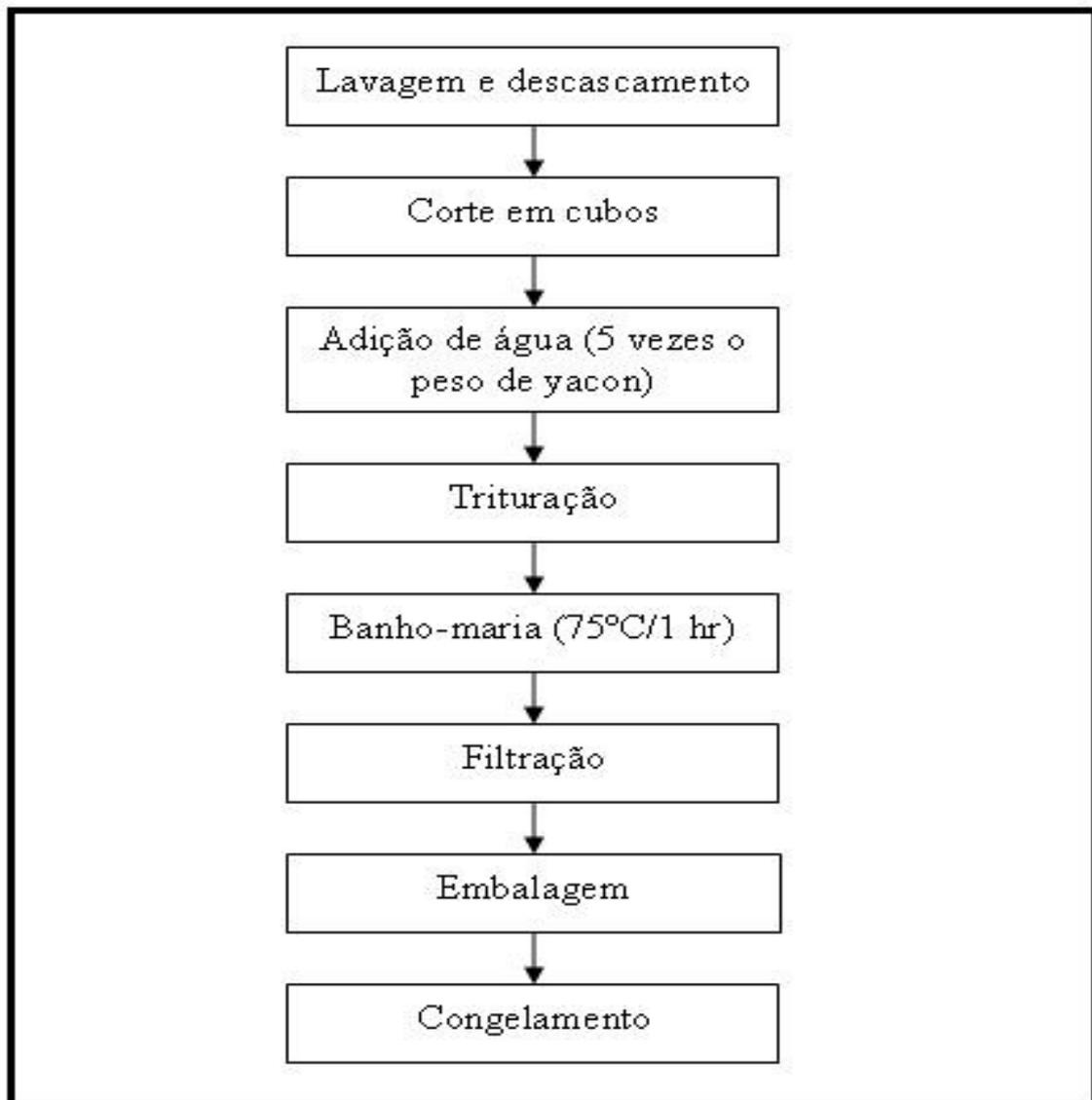


Figura 3.1 – Fluxograma da extração quente de inulina (VAN LOO *et al.*, 1995)

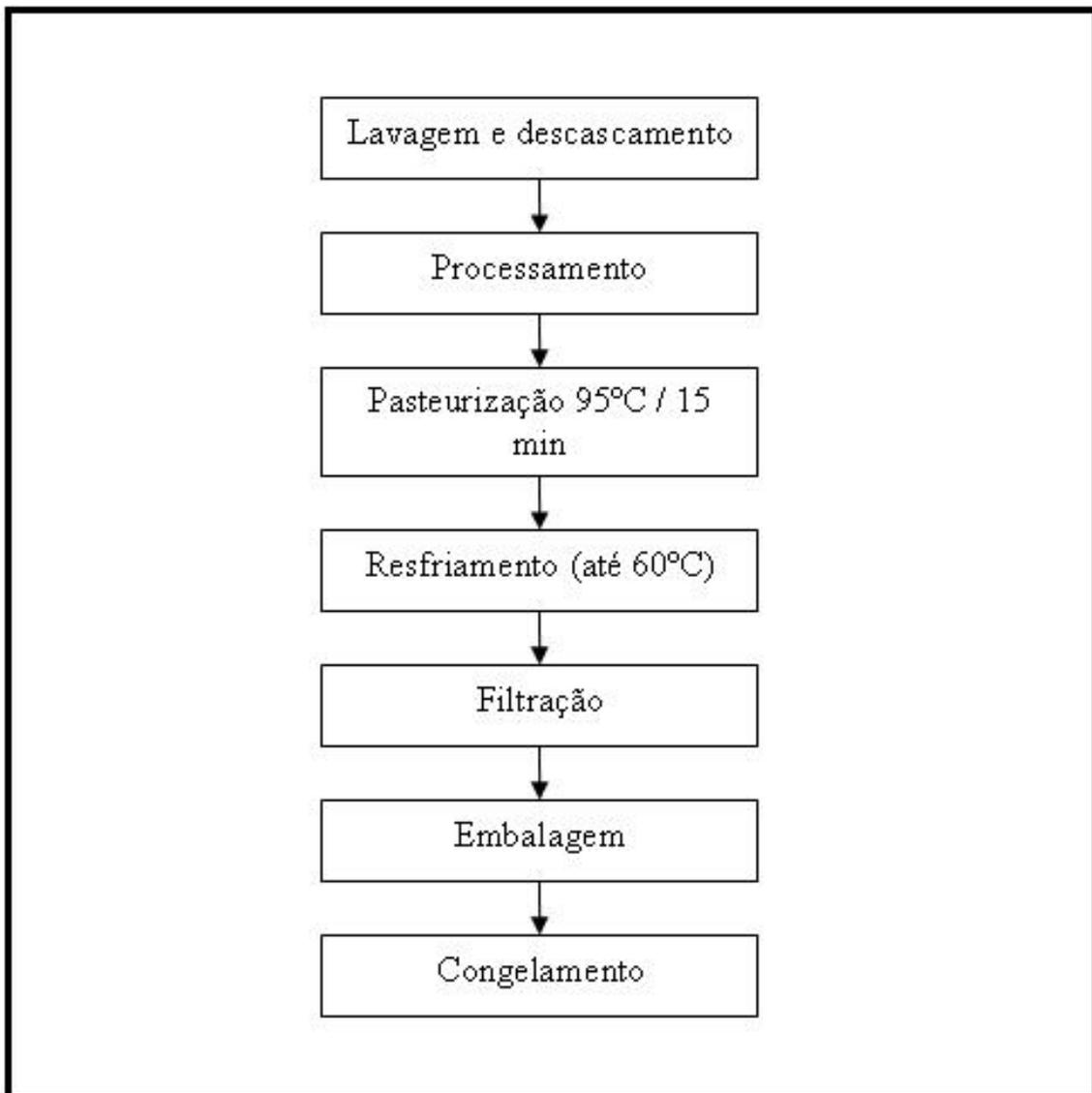


Figura 3.2 – Fluxograma da extração fria de inulina.

3.3. Caracterização físico-química dos extratos de yacon

O extrato de yacon foi caracterizado físico-quimicamente de acordo com os seguintes métodos:

3.3.1. Sólidos Totais

Obtido por método gravimétrico. Cerca de 5 gramas de amostras foram pesadas e estocadas em uma estufa à 55°C por 5 horas sob vácuo de 40mm de Hg, até peso constante. Os recipientes contendo as amostras, placas de

Petri, foram inseridos em um dessecador para esfriar por 30 minutos e posteriormente pesados em uma balança semi-analítica, com precisão de 0,001g (AOAC 934.01, 1997).

3.3.2. Açúcares Totais

Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µL de amostra, 500 µL de solução de fenol 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Em seguida o tubo foi agitado, incubado a temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância lida em espectrofotômetro a 490 nm. Esta leitura é comparada a uma curva padrão de glicose 0,1 g·L⁻¹ 0,01 % p/v com concentrações de 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 g·L⁻¹ (DUBOIS et al., 1956).

3.3.3. Açúcares Redutores

Utilizou-se o método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (3,5 – DNS). Este método baseia-se na reação de oxidação do grupo aldeído presente nos açúcares redutores, mediante redução do ácido 3,5 – dinitrosalicílico em condições alcalinas. Em um tubo de ensaio contendo 200 µL da amostra previamente diluída, foi adicionado 200 µL do reativo DNS. A mistura foi incubada em banho-maria a 100 °C por 15 minutos, sendo em seguida resfriada em banho de gelo até a temperatura ambiente. Foi adicionado um volume de 2 mL de água destilada e, após 15 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e comparada a uma curva padrão de glicose em concentrações na faixa de 0 a 3,0 g·L⁻¹ (MILLER, G.L., 1959).

3.3.4. Açúcares não- redutores

Obtidos por diferença entre carboidratos totais e redutores.

3.3.5. Teor de sólidos solúveis

A determinação do teor de sólidos solúveis foi realizada através de um refratômetro óptico manual transferindo-se de 1 a 2 gotas da amostra homogeneizada e filtrada para o prisma do refratômetro, calibrado previamente com água destilada, que fornece medidas diretas em graus Brix, com resolução de 0,2, sem a necessidade de correção em função da temperatura (AOAC, método 37.1.15, 1997).

3.3.6. Cinzas

Pesou-se 5 gramas de amostra em cápsula de porcelana previamente aquecida em mufla a 550 , resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Secou-se em estufa, carbonizou-se em temperatura baixa e incinerou-se em mufla a 550 . Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente e pesou-se. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Para se achar o conteúdo de cinzas utilizou-se a seguinte fórmula (AOAC, método 31.1.04, 1997):

$$(100 * N) / P = \text{Cinzas por cento p/p}$$

Onde:

N = peso de cinzas em gramas

P = peso da amostra em gramas

3.3.7. Proteínas

Primeiramente, prepara-se o reagente para o ensaio, utilizando 1 volume de reagente Dye stock e 4 volumes de água destilada.

Em um tubo de ensaio colocam-se 40µL de amostra e 2mL de reagente para ensaio. O tubo é coberto com para-filme e suavemente invertido várias vezes para misturar. A seguir se faz a medida de absorbância a um comprimento de onda 595 nm. A leitura é comparada a uma curva padrão de

BSA com concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BRADFORD, 1976).

3.3.8. Glicose

Teste enzimático colorimétrico Bioliquid, Laborclin.

3.3.9. Frutose

Obtida pela diferença de concentração de açúcares redutores e glicose.

3.3.10. Sacarose

A hidrólise da sacarose presente no extrato de yacon é feita utilizando solução de invertase (LNF – Latino Americana) 2% e solução de extrato de yacon em uma solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 na proporção 1:2 a 55°C por 120 horas. Após a hidrólise, repetiu-se a análise de açúcares redutores e por diferença entre a segunda e a primeira determinação, obteve-se a concentração de sacarose. A metodologia adotada foi adaptada de CRUZ *et al.* (1998)

3.3.11. Inulina

Foi determinada pela diferença de açúcares totais e demais açúcares (PROSKY e HOEBREGS, 1999).

3.3.12. Cor

Foi utilizado método tristimulus com leitura em espectrofotômetro Spectronic Unicam, modelo Genesys 10Vis, em comprimento de onda de 414 a 663nm (RAND *et al.*, 1976).

Os valores de transmitância medidos foram transformados para o sistema CIELab pelo programa CIE Color Calculator (www.brucelindbloom.com), obtendo-se as dimensões L* (luminosidade), a* (verde a vermelho) e b* (amarelo a azul).

3.4. Resinas utilizadas na purificação do extrato de yacon

As resinas utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Purolite do Brasil LTDA. São elas:

3.4.1. Resina C150

Segundo informações do fabricante (Purolite do Brasil LTDA), a C150 é uma resina macroporosa de troca catiônica de poli(estireno sulfonato) resistente a choque térmico e osmótico. Sua estrutura se assemelha a uma esponja e permite a alta taxa de difusão da maioria dos cátions, incluindo aqueles de metais pesados, amins e materiais orgânicos de alto peso molecular. Os cátions são facilmente removidos e a resina regenerada. Ela apresenta ainda robustez física, boa regenerabilidade e boa cinética de troca no tratamento de açúcares e desmineralização de soluções orgânicas

A Tabela 3.1 apresenta as características da resina apresentadas pelo fabricante.

Tabela 3.1 – Características da resina C150

Resina C150	
Estrutura do polímero	Poliestireno macroporoso interligado com divinilbenzeno
Aparência	Pérolas esféricas
Grupo Funcional	Ácido sulfônico
Forma iônica	Sódio Na ⁺
Temperatura limite de operação	140°C
pH limite de operação	nenhum

3.4.2. Resina A860S

É uma resina macroporosa tipo I de troca aniônica, grau alimentício, com boa capacidade na remoção de pigmentos e compostos orgânicos em melado de açúcar. A adsorção é altamente reversível e sua eficiência é maior em ciclos de adsorção com mais de 24 horas (Purolite do Brasil LTDA).

As características apresentadas pelo fabricante são mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Características da resina A860S

Resina A860S	
Estrutura do polímero	Poliacrílico macroporoso
Aparência	Pérolas esféricas
Grupo Funcional	Amônio quaternário
Forma iônica	Cloreto Cl ⁻
Temperatura limite de operação	80°C
pH limite de operação	1 – 14

A resina A860S foi utilizada para a retirada de proteínas e pigmentos do extrato de yacon já livre de minerais.

3.4.3. Resina PCR 642Ca

Resina gel de troca iônica forte com matriz de poliestireno que oferece a separação de compostos polares e apolares. Tem alta eficiência na velocidade de separação para compostos de alto peso molecular. A resina é especialmente pré-condicionada para sua aplicação em alimentos de acordo com os regulamentos da Food and Drugs Association (FDA). É utilizada na separação de açúcares, aminoácidos, ácidos inorgânicos e sais.

No presente trabalho, a resina foi utilizada na separação dos açúcares do extrato de yacon e as características fornecidas pelo fabricante são:

Tabela 3.3 – Características da resina PCR 642Ca

PCR 642Ca	
Estrutura do polímero	Gel poliestireno interligado com divinilbenzeno
Aparência	Pérolas esféricas
Grupo Funcional	Ácido sulfônico
Forma iônica	Cálcio Ca ⁺⁺
Temperatura limite de operação	130°C
pH limite de operação	0 – 14

As colunas e as resinas utilizadas são mostradas na Figura 3.3.



Figura 3.3 – Coluna recheada com: A – resina C150; B – resina A860S; C – resina PCR 642Ca.

3.5. Preparação das colunas para a purificação do extrato de yacon por adsorção de troca iônica

O sistema usado no processo de adsorção consiste em um reservatório para eluente⁽¹⁾, um bomba peristáltica⁽²⁾, uma coluna de vidro⁽³⁾ e coletor e amostra⁽⁴⁾. O equipamento é mostrado na Figura 3.4.

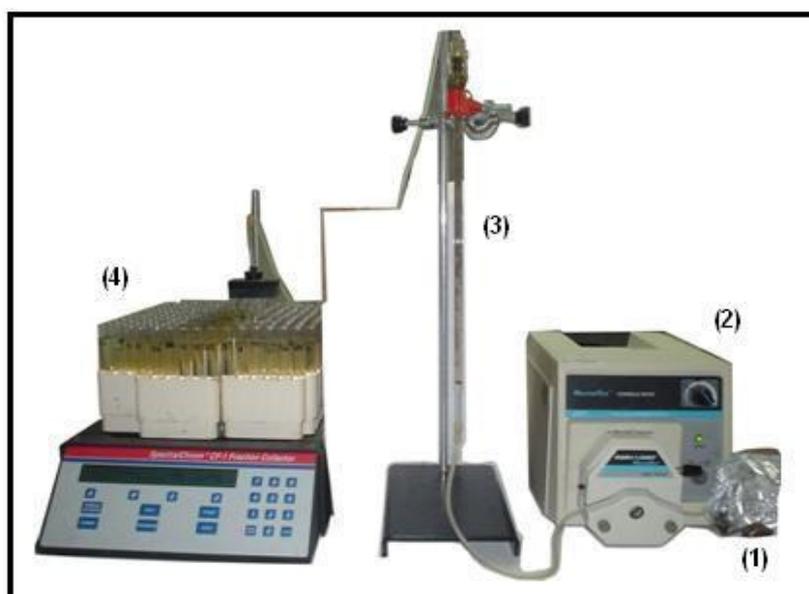


Figura 3.4 – Equipamento completo.

As colunas de 0,5 cm de diâmetro e 30 cm de altura foram recheadas com as resinas C150, A860S e PCR 642Ca. No fundo e no topo de cada uma delas foram colocadas esferas e lã de vidro para melhorar a uniformidade do fluxo e evitar a expansão do leito. A coluna presa a um suporte vertical foi saturada por capilaridade com água destilada, usando um frasco de Mariotte. Este foi substituído pela bomba peristáltica após a saturação da coluna. O condicionamento das colunas contendo resinas C150 e PCR 642Ca foi feito com HCl 5%, enquanto que a coluna contendo a resina A860S foi condicionada com NaOH 4%, por 1 hora em ambos os casos.

Os leitos foram caracterizados de acordo com a Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Caracterização dos leitos para purificação do extrato de yacon.

	C150	A860S	PCR 642Ca
Massa (g)	3,9176	3,7398	3,0789
V_T (ml)	5,67	5,75	5,71
V_0 (mL)	2,09	2,14	2,35
Porosidade	0,3559	0,3637	0,3997

Onde V_T e V_0 são os volumes total e de líquido dentro das colunas.

As colunas C150 e PCR 642 Ca foram regeneradas com HCl 5%, e a A 860S com NaOH 4%, todas por 1 hora.

3.6. Purificação do Extrato de Yacon

O extrato de yacon obtido por extração quente foi filtrado em papel filtro comum para a retirada de sólidos em suspensão e, então, bombeado para a primeira coluna de adsorção, contendo a resina C150, para a retirada de sais. Somente o extrato livre de cinzas foi utilizado para a segunda etapa da purificação.

O mesmo procedimento foi aplicado ao extrato eluído da coluna recheada com a resina A860S, sendo analisado o teor de proteínas e determinados os parâmetros de cor do extrato antes e após a passagem deste estágio. Procedeu-se às análises até o início da curva de eluição. O extrato

limpo foi injetado na coluna recheada com PCR 642Ca para a separação dos açúcares em solução.

3.6.1. Planejamento Experimental

Para determinar as condições de operação mais adequadas para a separação dos açúcares do extrato de yacon por adsorção, uma simulação foi realizada com solução aquosa de açúcar contendo 5,5% de inulina (Clariant do Brasil), 3,1% de açúcares redutores, concentrações estas similares ao do extrato bruto obtido em um planejamento experimental.

O planejamento experimental é um conjunto de técnicas frequentemente utilizadas em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, servindo como ferramenta para avaliar os efeitos e relações de variáveis de entrada, ou fatores, sobre variáveis de saída, respostas.

No processo de separação de açúcares do extrato de yacon, foi avaliada a influência de cinco fatores e suas possíveis interações para determinar as condições ótimas de operação da coluna contendo a resina PCR 642Ca. As variáveis estudadas foram:

- (A) – Tipo de eluente;
- (B) - Volume Injetado de amostra;
- (C) - Concentração de carboidratos da amostra;
- (D) - Vazão;
- (E) - Força iônica.

Com cinco fatores, um planejamento completo exigiria 32 ensaios (2^5). Porém, optou-se por uma triagem de variáveis, utilizando um planejamento saturado 2_{III}^{5-2} , que corresponde a $\frac{1}{4}$ do planejamento 2^5 e produz um número mínimo de ensaios (2^3) que podem ser realizados em relação ao número de cinco variáveis. O planejamento completo fornece um modelo entre média e efeitos, com $2^5 = 32$ parâmetros. O uso de oito observações para a estimativa destes parâmetros produzirá a associação em cada efeito, de $32/8 = 4$ efeitos.

Cada efeito principal estará associado a três outros efeitos (BARROS NETO *et al.*, 1995).

Esta escolha torna-se possível, pois quando o número de variáveis aumenta, cresce consideravelmente o número de efeitos de interações de ordem elevada, assim como as chances de uma ou mais variáveis não afetarem a resposta de forma significativa (BARROS NETO *et al.*, 1996).

Definido o planejamento a ser realizado, determinou-se o nível de variação -1 e +1 para cada um dos cinco fatores em estudo. Na Tabela 3.5. são mostradas as variáveis e seus respectivos níveis.

Tabela 3.5 – Fatores e níveis de variação estudados durante a triagem do Planejamento Experimental.

Fatores	Níveis de variação dos fatores	
	-1	+1
Eluente	Água	NaOH
Volume Injetado	0,5 mL	0,9 mL
Concentração de carboidratos	10%	20%
Vazão	0,5 mL.min ⁻¹	0,7 mL.min ⁻¹
Força iônica	Sem acréscimo	Acetato de sódio 0,5M

Após a triagem das variáveis, realizou-se a análise dos valores dos efeitos de cada fator sobre a variável resposta, neste caso, a resolução das curvas obtidas. Para a obtenção de respostas mais precisas dos efeitos principais, um planejamento experimental espelho foi desenvolvido de modo a separar os efeitos das interações. As geratrizes utilizadas para o primeiro planejamento experimental foram I = 124 e I = 135 e para o complementar foram I = -124 e I = -135.

Com os valores dos efeitos de cada fator principal, analisou-se a significância de cada fator em relação a variável resposta desejada (Rs). Os fatores não significativos foram fixados nos valores mais convenientes e um novo planejamento experimental 2² completo foi realizado com os fatores significativos. Novamente uma análise dos valores dos efeitos foi feita para a determinação da importância de cada fator no experimento.

Determinadas as condições de operação da coluna, procedeu-se o experimento utilizando o extrato de yacon parcialmente purificado com as duas

resinas anteriores. O extrato foi injetado, eluido e recolhido no coletor de frações; a curva de eluição foi obtida pela análise dos açúcares.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação dos processos de extração

A Tabela 4.1. mostra resultados da caracterização físico-química dos dois extratos de yacon obtidos pelos processamentos quente e frio.

Tabela 4.1 – Caracterização físico-química dos dois extratos de yacon.

g/100mL	Extração a quente	Extração a frio
Sólidos Totais (%)	11,39 ± 0,18 ^A	7,43 ± 0,21 ^B
°Brix	7,16 ± 0,28 ^A	6,40 ± 0,17 ^B
Proteínas	0,042 ± 0,003 ^A	0,092 ± 0,007 ^B
Cinzas	0,372 ± 0,034 ^A	0,206 ± 0,003 ^B
Açúcares Totais	9,04 ± 0,52 ^A	7,28 ± 0,71 ^B
Açúcares Redutores	3,14 ± 0,05 ^A	3,92 ± 0,11 ^B
Glicose	0,49 ± 0,02 ^A	0,13 ± 0,01 ^B
Frutose	2,66 ± 0,07 ^A	3,79 ± 0,06 ^B
Sacarose	0,62 ± 0,02 ^A	0,67 ± 0,08 ^A
Inulina / FOS	5,28 ± 0,11 ^A	0,93 ± 0,28 ^B

Letras diferentes indicam que há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos resultados obtidos da caracterização físico-química dos dois extratos de yacon, com nível de significância de 5%.

De acordo com a Tabela 4.1, pode-se observar que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as extrações, em relação a todos os componentes analisados, exceto pela sacarose. Os teores dos sólidos totais e solúveis, cinzas, açúcares totais, glicose e inulina foram maiores na extração quente.

Os teores de sólidos totais em ambas as extrações estão dentro da faixa de 7 a 30% encontrados por Lizárraga et al. (1997), citado por ROBINSON (1997). Os teores de cinzas das extrações a quente e a frio são da mesma ordem de grandeza dos valores (0,1 a 0,3 g/100g) também encontrados por Lizárraga et al. (1997), citado por ROBINSON (1997).

Os valores de inulina e FOS encontrados no extrato obtido a quente estão dentro da faixa esperada de 3 a 19% (FRANCK E LEENHEER, 2005).

Em relação aos açúcares, individualmente analisados, tem-se que a quantidade de inulina extraída a quente é maior do e a encontrada por OHAYAMA *et al.* (1990), enquanto que a quantidade de frutose do extrato de yacon é menor. Isso se deve ao fato de que quanto maior é o tempo de armazenagem, menor o teor de inulina e maior o de frutose. As amostras do autor acima citado foram analisadas 96 dias após sua colheita, já as amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas após 7 dias de colheita, tempo relativamente pequeno para a formação da inulina em frutose.

A diferença entre os teores de inulina extraída a frio e a quente se deve ao fato de que a inulina tem maior solubilidade em água a temperaturas elevadas (FONTANA *et al.*, 1994).

4.2. Purificação do extrato de yacon obtido pelo processo quente

A purificação do extrato de yacon foi realizada apenas no extrato obtido com aquecimento, devido à maior quantidade de inulina extraída.

4.2.1. Purificação do extrato para a eliminação de minerais e proteínas

Nesta primeira etapa de purificação, o extrato passou pelo processo de adsorção utilizando as resinas C150 para a retirada de minerais. Segundo RUTHVEN (1984), o processo de purificação envolve adsorção física, pois as forças de Van der Waals estão presentes. Além disso, as forças eletrostáticas são significativas, pois se trata de um processo com resinas que possuem estrutura iônica.

A Figura 4.1 mostra que as cinzas, inicialmente à concentração de 0,372 g/100mL de extrato, foram completamente retidas nas 17 primeiras horas de processo (430 V/V₀). Isso corresponde a 1,2 L para 3,9176 g de resina, ou seja, foram obtidos 0,312 L de extrato livre de cinzas por grama de resina. Foram retidas cerca de 1,7641 g de cinzas/g de resina no período do experimento (1300 V/V₀). 1,1851 g de cinzas/g de resina foram retidas até 595 volumes escoados, onde se tem extrato livre de minerais. A vazão de escoamento utilizada foi de 1,2 mL.min⁻¹.

É importante observar que a composição de cinzas corresponde à quantidade de minerais presentes nos alimentos (CHAVES *et al.*, 2004).

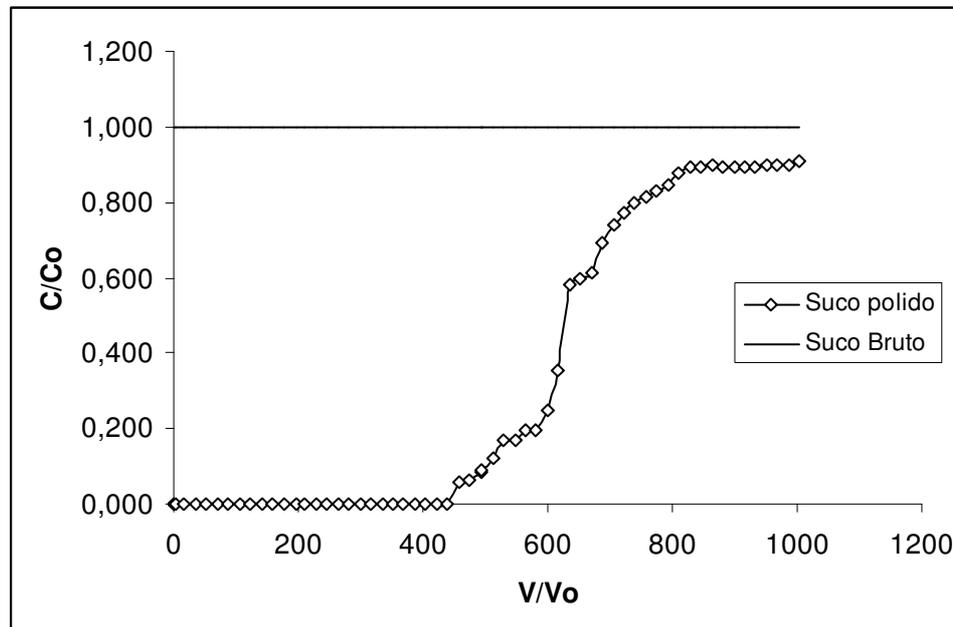


Figura 4.1 – Curva de ruptura no processo de adsorção de cinzas do extrato de yacon, utilizando a resina C150.

As resinas C150 e A860S são utilizadas para retirar minerais e pigmentos, respectivamente, de produtos alimentícios, porém mostram capacidade de retirar proteínas.

A resina C150 afetou o teor protéico. Foram retidas cerca de 51% do teor de proteínas, inicialmente de 0,042 g/100mL de extrato, nas 16 primeiras horas de processo ou 440 volume de poro, resultando em um extrato com concentração de 20,8 mg/100mL de proteínas. A vazão de escoamento utilizada foi de 1,2 mL.min⁻¹.

Após a adsorção pela resina C150, obteve-se um extrato, então, livre de cinzas e com o teor de proteínas de 20,8 mg/100mL. Não foram detectadas modificações no teor de açúcares totais.

A segunda etapa do processo, utilizando a resina A860S, reteve cerca de 43% de proteínas em relação à quantidade de proteínas do extrato previamente purificado com a resina C150, o que corresponde a um produto

com 0,327 L de extrato contendo 8,94 mg/100mL de proteínas por grama de resina. A vazão de escoamento foi de 1,2 mL.min⁻¹.

4.2.2. Purificação do extrato para a eliminação de pigmentos

Para a retirada de pigmentos da solução de yacon, analisou-se apenas a coloração inicial e final.

A cor é o resultado da interação entre fonte de iluminação, objeto e observador, não é uma característica absoluta do objeto, mas sim uma percepção humana, uma sensação, como ilustrada na Figura 4.2.



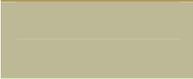
Figura 4.2 – A: extrato bruto; B: extrato após processo com resina A860S

Para que se possa definir a cor e atribuir-lhe um valor numérico, fatores como iluminação e características do objeto podem ser combinados através de dados espectrais do objeto, caracterizando assim o sistema visual humano ao identificar uma determinada cor (BILLMEYER & SALTZMAN, 1981).

A caracterização da cor pode ser feita de acordo com diversos sistemas, que reproduzem o espaço espectral da cor para um sistema de coordenadas

de dimensões finitas (GOMES & VELHO, 1994). O sistema utilizado neste trabalho foi o CIELab.

Tabela 4.2 – Caracterização da cor pelo sistema CIELab.

Extrato	L*	a*	b*	ΔE^*	Cor
Bruto	64,22	-0,75	37,97	---	
Pós resina C150	74,57	-0,40	30,14	12,98	
Pós resina A860S	96,99	-1,75	2,11	48,59	

Sendo assim, a Tabela 4.2 mostra a caracterização das soluções de yacon antes e depois do processo de adsorção pelas resinas C150 e A860S. Além do aspecto da cor visível na Figura 4.4, os índices de cor mostram que a retirada de pigmentos foi efetiva. Os índices encontrados para o extrato parcialmente purificado, pelas resinas C150 e A860S correspondem a uma cor próxima à transparência.

4.3. Separação dos açúcares do extrato de yacon

A solução a ser tratada nesta etapa é o extrato de yacon obtido pela extração quente e parcialmente purificado, ou seja, isenta de minerais e com concentração de proteínas de 8,94 mg/100mL. O extrato é, então, basicamente, constituído pelos açúcares: frutose, glicose, sacarose e inulina.

Como visto no capítulo anterior, as condições de operação da adsorção de troca iônica foram definidas a partir de planejamento experimental.

4.3.1. Planejamento Experimental

Na Tabela 4.3 está apresentada a matriz de planejamento fatorial parcial 2^{5-2}_{III} e as respostas obtidas para cada ensaio.

Tabela 4.3 – Matriz do Planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} para separação da inulina dos demais açúcares.

Ensaio	Fatores					Resposta
	(A) Eluente	(B) Volume injetado (mL)	(C) Concentração de carboidratos (%)	(D) Vazão (mL.min ⁻¹)	(E) Força iônica	Resolução (Rs)
1	-1	-1	-1	+1	+1	0,122
2	+1	-1	-1	-1	-1	0,138
3	-1	+1	-1	-1	+1	0,234
4	+1	+1	-1	+1	-1	0,105
5	-1	-1	+1	+1	-1	0,253
6	+1	-1	+1	-1	+1	0,300
7	-1	+1	+1	-1	-1	0,449
8	+1	+1	+1	+1	+1	0,104

-1 e +1 são os níveis de variação dos fatores descritos na tabela 4.1

O complementar da matriz de planejamento para obtenção dos efeitos principais livres dos efeitos de segunda ordem é mostrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Matriz complementar do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} para separação da inulina dos demais açúcares.

Ensaio	Fatores					Resposta
	(A) Eluente	(B) Volume injetado (mL)	(C) Concentração de carboidratos (%)	(D) Vazão (mL.min ⁻¹)	(E) Força iônica	Resolução (Rs)
1	-1	-1	-1	-1	-1	0,373
2	+1	-1	-1	+1	+1	0,042
3	-1	+1	-1	+1	-1	0,127
4	+1	+1	-1	-1	+1	0,212
5	-1	-1	+1	-1	+1	0,075
6	+1	-1	+1	+1	-1	0,229
7	-1	+1	+1	+1	+1	0,403
8	+1	+1	+1	-1	-1	0,081

Através dos resultados obtidos nas Tabelas 4.3 e 4.4, realizou-se uma análise dos efeitos dos cinco fatores estudados em relação à resposta do experimento (resolução Rs).

Tabela 4.5 – Valores dos efeitos dos planejamentos fatorial e complementar.

Planejamento fatorial			Planejamento espelho		
Efeito	Interações	Efeito puro	Efeito	Interações	Efeito puro
L _A	A+BD+CE	-0,103	L' _A	A-BD-CE	-0,103
L _B	B+AD	0,020	L' _B	B-AD	0,026
L _C	C+AE	0,127	L' _C	C-AE	0,008
L _D	D+AB	-0,134	L' _D	D-AB	0,015
L _E	E+AC	-0,046	L' _E	E-AC	-0,019

Os efeitos encontrados referem-se aos fatores principais e às interações indicadas, porém desejam-se os efeitos dos fatores principais não associados. Os efeitos principais podem ser obtidos a partir da média aritmética dos efeitos de cada fator nos ensaios do planejamento principal e complementar $((L + L')/2)$. Os resultados são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Efeitos principais para separação da inulina dos demais açúcares.

Fatores	Valor do efeito
(A) Eluente	-0,103
(B) Volume injetado	0,023
(C) Concentração de carboidratos	0,067
(D) Vazão	-0,060
(E) Força iônica	-0,033

De acordo com a Tabela 4.6, pode-se observar que a mudança do eluente, água para hidróxido de sódio diminui em 0,1030 a resolução do sistema. Os aumentos da vazão e da força iônica também diminuem a resolução. Por outro lado, os aumentos do volume injetado e da concentração de carboidratos na solução melhoram a resolução Rs.

Dessa forma, os fatores selecionados de modo a aumentar a resolução foram água como eluente e vazão de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Não será utilizado acetato de sódio. Na próxima etapa estudar-se-á os efeitos dos fatores volume injetado e concentração de carboidratos como fatores significativos.

Para a determinação, então, das melhores condições de operação, realizou-se um novo planejamento experimental 2^2 completo e com pontos centrais. Os fatores e níveis de variação são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Fatores e níveis de variação do planejamento experimental 2².

Fatores	Níveis de variação		
	-1	0	+1
Volume injetado (mL)	0,9	1,2	1,5
Concentração de carboidratos (%)	20	30	40

As respostas deste novo planejamento estão apresentadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Matriz do planejamento 2² e respostas separação da inulina dos demais açúcares.

Ensaio	Fatores		Resposta
	Volume injetado	Conc. carboidratos	Resolução (Rs)
1	-1	-1	0,373
2	+1	-1	0,150
3	-1	+1	0,009
4	+1	+1	0,491
5	0	0	0,084
6	0	0	0,096
7	0	0	0,048

As Tabelas 4.9 e 4.10 mostram a análise de variância ANOVA referentes ao volume injetado e concentração de carboidratos. Pelos resultados obtidos, nenhuma das duas variáveis é significativa, e qualquer valor, na faixa estudada, pode ser usado para o processo de separação.

Tabela 4.9 – Análise de variância ANOVA para o volume injetado do planejamento experimental 2.

Efeitos	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F	P
Média	0,2585	1	0,2585	8,2248	0,0456
Volume injetado	0,0719	2	0,0359	1,1437	0,4047
Erro	0,1257	4	0,0314		

Tabela 4.10 – Análise de variância ANOVA para a concentração de carboidratos do planejamento experimental 2.

Efeitos	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F	P
Média	0,2585	1	0,2585	7,2686	0,0543
Concentração de carboidratos	0,0554	2	0,0277	0,7782	0,5182
Erro	0,1422	4	0,0356		

Assim as condições de operação selecionadas para o processo de cromatografia de troca iônica, utilizando a resina PCR 642Ca, na separação dos açúcares do extrato de yacon foram:

Tabela 4.11 – Condições de operação para a separação dos açúcares do extrato de yacon.

Fatores	Condições
Eluente	Água
Volume injetado	1,5 mL
Concentração de carboidratos	20%
Vazão	0,5 mL.min ⁻¹
Força iônica	Nula

Foi utilizada a concentração de 20% de carboidratos, pois é uma concentração fácil de ser obtida a partir do extrato bruto. Concentrações mais altas exigiriam a adição de uma etapa (concentração do extrato) ao processo.

Com as condições de operação determinadas, foram realizadas duas corridas com o extrato de yacon e os resultados obtidos são ilustrados na Figura 4.3.

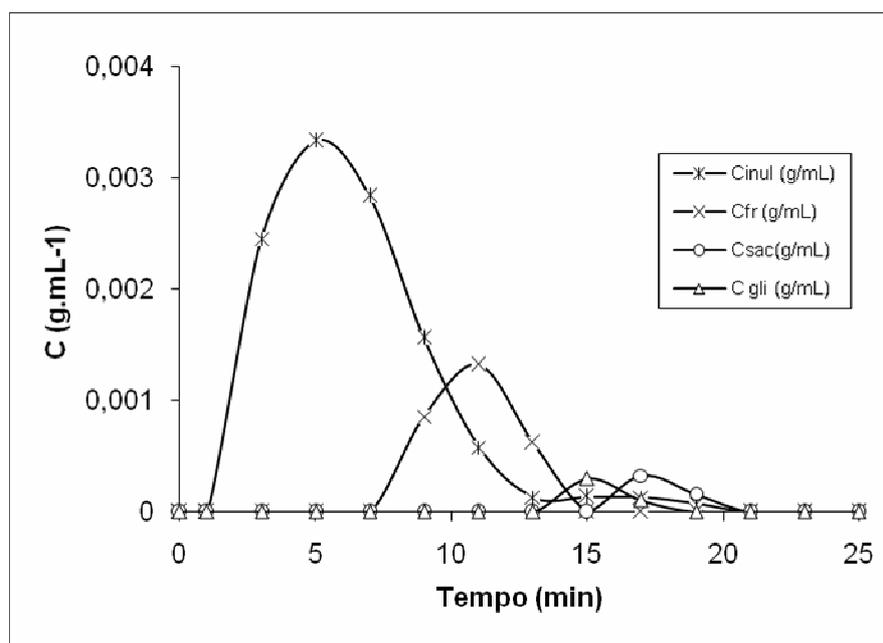


Figura 4.3 – Gráfico de separação dos açúcares do extrato de yacon.

Para uma melhor análise da separação dos açúcares do extrato de yacon, é necessário verificar os parâmetros que afetam o processo (Tabela 4.12).

Tabela 4.12 – Fatores que afetam a separação.

Fatores	Respostas
Resolução (Rs)	0,463 ± 0,017
Fator de capacidade (k)	1,892 ± 0,297
Eficiência (H)	1,512 ± 0,018
Seletividade (α)	0,215 ± 0,094

Observando-se a Tabela 4.12, pode-se dizer que resolução (Rs) mostra uma separação parcial dos açúcares. Isto pode ser observado na Figuras 4.3, onde mais da metade do pico de eluição da frutose coincide com a parte descendente final da curva de eluição da inulina. Esta mistura se inicia a cerca de 7 minutos. Os demais açúcares pouco influem na separação, uma vez que a glicose começa a surgir quando a concentração de inulina já é muito pequena ($5,0 \cdot 10^{-5}$ g/100mL a 17 minutos) e a sacarose, por sua vez, praticamente não se sobrepõe à inulina. Uma separação completa resultaria em resolução igual a 1. Este fato também pode ser notado pelos valores da seletividade, pois

quanto mais a seletividade de aproxima de 1, menor é a resolução e neste caso têm-se seletividades de valores baixos (Purolite).

O valor de eficiência ou pratos teóricos indica a condição de empacotamento da coluna e para ser boa deve ser de 2 a 3 vezes o diâmetro da coluna (Amersham, 2003). A coluna em questão apresenta-se com 0,5cm de diâmetro e sua eficiência, que é 3 vezes maior, indica que ocorreu um bom empacotamento da coluna.

O fator de capacidade mede o poder de retenção de soluto pela resina, seu valor deve variar de 1 a 5 (Purolite). A resina PCR 642Ca mostrou-se com boa capacidade de reter os açúcares da solução de yacon, pois k tem valor dentro da faixa esperada.

Nenhum resultado semelhante foi encontrado na literatura para comparação.

4.3.2. Tempo de retenção

A Tabela 4.13 apresenta os tempos de retenção de cada açúcar no processo de separação por cromatografia de troca iônica.

Tabela 4.13 – Tempo de retenção dos açúcares no processo de separação.

Açúcar	Tempo de retenção (min)
Inulina	$7,10 \pm 1,20$
Frutose	$13,94 \pm 1,57$
Glicose	$18,45 \pm 1,35$
Sacarose	$20,67 \pm 1,44$

Na literatura são encontrados alguns dados sobre o tempo de retenção em separação para análise de açúcares, porém tais informações diferem quanto à ordem de saída e aos tempos de retenção. A Tabela 4.14 mostra os dados de cada trabalho.

Tabela 4.14 – Tempos de retenção encontrados na literatura.

Autor	Açúcar	Tempo de retenção (min)	Forma de separação	Tipo de coluna
QUINTEROS, 2000	Frutose	7,29	HPLC	Carbopac PA1 (4 x 250 mm, P/N 35391, S/N 3963)
	Sacarose	9,82		
	Glicose	12,47		
	Inulinas	14,45		
BRUGGINK, <i>et al.</i> 2005 (a, b)	Glicose	3,00	Cromatografia de troca ânionica	Carbopac PA 200 (3 x 250 mm) e Carbopac PA 200 (250 x 0,381 mm)
	Fructose	3,50		
	Sacarose	4,20		
	Inulinas	6,50		
CHATTERTON <i>ET AL.</i> , 1993	Glicose	3,00	Cromatografia de troca ânionica	Fractogel (5 x 120 cm)
	Fructose	3,50		
	Sacarose	5,00		
	Inulinas	7,50		
SMOUTER e SIMPSON, 1993	Sacarose	2,00	HPLC	Dextro-Pak C18 (100 x 25 mm)
	Inulinas	2,50		

A diferença nos tempos de retenção e na ordem de saída devem-se ao fato de que cada autor utilizou uma metodologia diferente e no caso da troca iônica, o tipo de resina e as condições de operação também variam de acordo com cada estudo e, conseqüentemente, os resultados se diferem. Neste trabalho, utilizou-se a resina PCR 642Ca, forma iônica Ca^{++} e não foram encontrados dados na literatura para comparação.

4.3.3. Pureza da inulina

Nota-se que foi possível obter inulina 100% pura, ou seja, sem a presença de qualquer outro açúcar, nos primeiros 7 minutos de processo, ou 0,33 volumes de poro, o que corresponde a 57% da inulina injetada. Com o desenvolvimento da separação, a pureza da inulina decresce e aos 15 minutos, toda inulina foi desorvida. A evolução da pureza da inulina obtida é apresentada na figura 4.4. A frutose, por sua vez, não é obtida pura em nenhum momento do processo, pois se mistura aos demais açúcares.

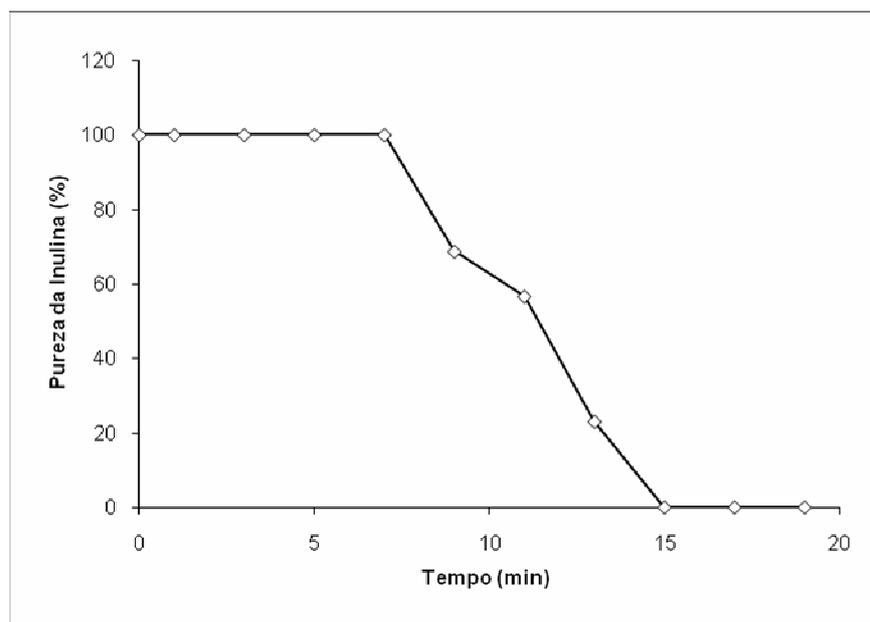


Figura 4.4 – Evolução da pureza da inulina

Atualmente, a inulina comercial é encontrada na forma nativa, ou seja, como mistura dos açúcares: frutose, glicose, sacarose e inulina. As inulinas consideradas frutooligossacarídeos (FOS), que contém DP menor que 10 são vendidas separadamente, como mistura de FOS e os demais açúcares. De acordo com a fabricante dos produtos Beneo® GR (inulina) e Beneo® P95 (FOS) a pureza dos produtos é de 95 e 98%, respectivamente. Porém as purezas encontradas, através de análises realizadas neste trabalho, foram de 96,7% para Beneo® GR e de 95,62% para Beneo® P95.

Portanto, a inulina não é encontrada totalmente pura e seu preço gira em torno de US\$6,90/kg para a inulina (Beneo® GR) e US\$9,80/kg para FOS (Beneo® P95) (preços informados por Siba Ingredientes, distribuidora da Clariant Brasil, revendedora dos produtos Orafti, fabricante de inulina). A pureza dos produtos Beneo® GR e Beneo® P95.

No caso deste trabalho, obteve-se inulina de yacon, que contém em sua maioria, inulinas de baixo grau de polimerização, ou seja, DP menos que 10 (ASAMI *et al.*, 1991), ou seja, FOS e com total pureza, o que aumenta ainda mais seu valor comercial. Estudos com outros métodos de análise mais precisos e de outros componentes não analisados no presente trabalho são, porém necessários para determinar a pureza absoluta da inulina.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que as formas de extração da inulina a partir de yacon são, significativamente, diferentes em relação à quantidade de inulina extraída. O processo de extração a quente produziu mais de cinco vezes a quantidade de inulina obtida a frio.

O processo de purificação por troca iônica aplicadas à purificação de açúcar mostrou-se eficaz na purificação do extrato de inulina, retirando completamente a quantidade de minerais do extrato de yacon e reduzindo 78% do teor de proteínas. O processo de retirada de pigmentos resultou em um extrato translúcido, com uma diferença de cor de 48,59.

A resina PCR 642 Ca, usada para separação cromatográfica de açúcares, apresentou uma resolução próxima a 0,5. Do volume injetado, recuperou-se praticamente 60% do extrato com inulina sem a mistura de outros açúcares, pelos métodos de análise utilizados, fato que aumenta o valor comercial.

Assim, o método de troca iônica é um processo adequado para os fins propostos. A regeneração da resina reduz os custos e torna o processo industrialmente viável.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a pureza absoluta da inulina por métodos de análise mais precisos;
- Fazer a secagem do extrato de yacon para obtenção de inulina em pó;
- Analisar as propriedades físicas como viscosidade, densidade da inulina obtida e comparar com inulina comercial;
- Avaliar as características físico-químicas do bagaço de yacon obtido através da extração a frio e propor novos produtos para aproveitamento do resíduo
- Repetir os experimentos de separação dos açúcares do extrato de yacon em escala piloto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amersham Biosciences. Íon Exchange Chromatography. Principles and Methods, 2003.

ASAMI, T.; KUBOTA, M.; MINAMISAWA, K.; TSUKIHASHI, T. Chemical composition of yacon, a new root crop from the Andean highlands. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.66, n.2, p.122-126, 1989.

ASAMI, T.; MINAMISAWA, K.; TSUKIHASHI, T.; KANO, K.; HORI, I.; OHYAMA, T.; KUBOTA, M.; TSUKIHASHI, T. Fluctuation of oligofructan contents in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.62, n.6, p.621-627, 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). In CUNNIFF, P. (Ed) **Official Methods of AOAC International**, 16th ed., Arlington, VA, 2v., 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). In CUNNIFF, P. (Ed) **Official Methods of AOAC International**, 16th ed., Arlington, VA, 2v., 1995.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento Experimental e Otimização de Experimentos, 2 ed., Campinas, Unicamp, 299p., 1996.

BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W. Bioseparations: downstream processing for biotechnology. John Wiley & Sons, New York, 368p., 1998.

BILLMEYER, J.R.; SALTZMAN, M. Principles of Color Technology. John Wiley, USA, 1981.

BORNET, F.R.J. Undigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.7635-7695, 1994.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRUGGINK, C.; MAUER, R.; HERRMAN, H.; CAVALLI, S.; HOEFLER, F. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1085, p. 104-109, 2005a.

BRUGGINK, C.; WUHRER, M.; KOELEMAN, C.A.M.; BARRETO, V.; LIU, Y.; POHL, C.; INGENDOH, A.; HORKE, C.H.; DEELDER, A.M. Oligosaccharide analysis by capillary-scale high-pH anion exchange chromatography with on-line ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 829, p. 136-143, 2005b.

CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.Q.; THORNLEY, W.R.; BENETT, J.H. Separation and quantification of fructan (inulin) oligomers by anion exchange chromatography. **Inulin and Inulin-containing crops**. Amsterdam, 1993.

CHAVES, M.C.V.; GOUVEIA, J.P.G.; ALMEIDA, F.A.C.; LEITE, J.C.A.; SILVA, F.L.H. Caracterização físico-química do suco de acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n. 2, 2004.

CREN, E.C. Recuperação de ácidos graxos livres em resina de troca iônica. Tese, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

CRUZ, V. D., BELOTE, J.G., BELLINE, M. Z.. Produção e mecanismo de ação de inulinase de *Aspergillus niger*-245: hidrólise de inulinas de diferentes origens. **Rev. Microbiol.**(online), v. 29. 1998.

DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A.; DE WINTER, M.; TIMMERMANS, J.W.; VAN DEN ENDE, W. Purification and properties of second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p.28-34, 1999.

DOFNER, K.; Ion Exchangers. Walter de Gruyter. Berlin, 1495p., 1991.
DREVON, T.; BORNET, F. Les FOS: ACTILIGHT. In: MULTON, J.L. (Ed.) **Le sucre, les sucres, les edulcorants et les glucides de charges dans les IAA**. Paris: Tec & DOC, Lavoisier, 1992, p.313-338.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS P.A., SMITH F. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350-356, issue 3/(289-428), 1956.

ESTRELLA, J.E.; LAZARTE, J.E. In vitro propagation of Jicama (*Polymnia sonchifolia* Poepping and Endlicher): a neglected Andean crop. **Hortscience**, v.29, n.4, p. 331, 1994.

FIORDALISO, M.; KOK, N.; DESAGER, J.P.; GOETHALS, F.; DEBOYSER, D.; POBERFROID, M.; DELZENNE, N. Dietary oligofructose lower triglycerides phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins in rats. **Lipids**, v. 30, n. 2, p. 163-167, 1995.

FONTANA, J.D.; FO, S.A.; ROGELIN, R.; KAISS, J.; HAULY, M.C.; FRANCO, V.C., BARON, M. PCR protocol and inulin catabolism based differentiation of inulinolytic soil bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45/46, p. 269-282, 1994.

FOUST, A.S.; WENZEL, L.A.; CLUMP, C.W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L.B. Princípios das operações unitárias. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 670p., 1982.

FRANCK, A.; LEENHEER, L.D., Inulin. **Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry** (livro). Technology & Industrial Arts. Cap.8, Wiley – VCH, 2005.

FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K. NANJO, F. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v.43, n.1, p. 171-177, 1997.

FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K; HARA, Y. Seasonal growth and fluctuations of sugar content in yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and dormancy. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.66, p.233-237, 1995.

GIACOBELLO, S.; STORTI, G.; TOLA, G. Design of a simulated moving bed unit for sucrose-betaine separation, *Journal of Chromatography A*, v. 872, p. 23-35, 2000.

GOLDIN, B.R., Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, sup.2, p. 5203-5207, 1998.

GOMES J.; VELHO, L. Computação Gráfica: Imagem. IMPA & SBM, rio de Janeiro, 1994.

GORDON, D.T.; BOCALETTI, W; ORELLANA, R. Fat substitutes, fat mimetics and bulking agents. The rest of the story. **Tecnologia de Alimentos (México)**, v.30, n.5, p.22-29, 1996.

GOTO, K.; FUKAI, K.; HIKIDA, J.; NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 12, p. 2346-2347, 1995.

GOULAS, A.K., KAPASAKALIDIS, P.G., SINCLAIR, H.R., RASTALL, R.A., GRANDISON, A.S. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**. 209, p. 321-335, 2002.

HARLAND, C.E. Ion Exchange theory and practice. Royal society of chemistry paperbacks, 2 ed., 285p., 1994.

HEASMAN, M.; MELLENTIN, J. Addressing the health issue. **International Food Ingredients**, v.3, o.22-24, 1998.

HELFFERICH, F. Ion Exchange. McGraw Hill Book Company, Inc. New York, 624p., 1962.

HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: SUZYKI, M.; CHATTERTON, J.N. (Eds.). **Science and technology of fructans**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 119-136.

HIESTER, N.K.; VERMEULEN, T.; KLEIN, G. Adsorption and ion Exchange. In Chemical Engineer's Handbook, ed. Perry, J.H., 4 ed., McGraw Hill, New York, Section 16, p. 1-40, 1963.

IZZO M., FRANCK, A. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. Conference Report. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 255-257, 1998.

KAPULER, A.M.; GURUSIDDIAH, S. The twenty protein aminoacids free in the juices of our common vegetables and herbs. **Journal of Home & Consumer Horticulture**, v.1, n.1, p.3-18, 1994. Apud: **Food Science and Technology Abstracts**, HU105, 1994.

KUNIN, R.; MYERS, R.J.; Íon Exchange Resins. John Qiley & Sons, Inc. New York, 212p., 1952.

LI, W., LI, J., CHEN, T., ZHAO, A., CHEN, C. Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides II. Extended pore model. **Journal of Membrane Science**, 258, p. 8-15, 2004.

MAEDA, A.; ADACHI, S.; MATSUMO, R. Chromatographic separation of 3-ketoglucose and glucose or 3-ketocellobiose and cellobiose using a cation-exchange resin in potassium form. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 15-20, 2003.

MARX, S.P.; NÖSBERGER, J.; FREHNER, M. Seasonal variation of frutan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β (2 \rightarrow 1)- Linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). **New Phytologist**, v.135, p.267-277, 1997.

MIERS, J.A.J. Regulation of ion exchange resins for food, water and beverage industries. **React. Polym**, v. 24, p. 99-107, 1995.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, issue3/(323-468), 1959.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.

MOLIS, C.; FLOURIÉ, B.; OUARNE, F.; GAILING, M.F.; GUIBERT, A.; BORNET, F.; GALMICHE, J.P. Digestion excretion, and energy value of fructooligosaccharides on healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, p. 324-328, 1996.

National Research Council, 1989. Lost Crops of the Incas: Little – known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington, DC.

NIETO, C. Estudios agronômicos y bromatológicos en jicama (*Polymnia sonchifolia* Poep. and Endl.). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 41, p.213-221, 1994.

OHYAMA, T.; ITO, O.; YASUYOSHI, S.; IKARASHI, T.; MINAMISAWA, K.; KUBOTA, M.; TSUKIHASHI, T.; ASAMI, T. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v.36, n.1, p.167-171, 1990.

OLIVERIA, M.A., NISHIMOTO, E.K. Avaliação do desenvolvimento de plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e caracterização dos carboidratos de reserva em HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n. 2, p. 215-220, 2004.

PARAJARA, F. Yacon, o primo da batata que ajuda a controlar o diabete. **Saúde**, São Paulo, n.194, novembro 1999, p.38-42.

POLLOCK, C.J. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist**, v.104, p.1-24, 1986.

PRAZNIK, W.; BECK, R.H.F.; NITSCH, E. Determination of fructan oligomers of degree of polymerization 2-30 by high liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 303, p. 417-421, 1984.

PREISS, J.; LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: PREISS, J. **The biochemistry of plants. Vol 3 Carbohydrates, structure and function**. New York: Academic Press, 1980, p.371-423.

PROSKY, L.; HOEBREGS, H. Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose, **Journal of Nutrition**, V.129, P. 1418S-1423S, 1999.

Purolite, Ion Exchange Resins, Chromatographic Separation of Saccharides, Organic Acids and Amino Acids.

QUINTEROS, E.T.T. Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon. Tese, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

RAND, M.C., GREENBERG, A.E., TARAS, M. S. Standard Methods for the Examination Water and Wastewater. Franson, M.A. Ed. American Public Health Association, Washington, DC. 1976.

REA, J. Conservatóin y manejo in situ de recursos fitogenéticos agrícolas em Bolívia. Taller electrónico sobre conservación in situ. CIP-Lima, p.24, 1995a.

REA, J. Informe de avances em raíces nativas in situ. Proyecto RTA. 1994-95. La Paz.

REDDY, B.S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 1478s-1482s, 1999.

REDDY, B.S. Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies. **British Journal of Nutrition**, v.80, supl.2, p. s219-s223, 1998.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p.103-148, 1993.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate caloric value. **Nutrition Reviews**, v.51, p.137-146, 1993b.

ROBERFROID, M.B. Caloric value of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.14365-14375, 1999.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. **British Journal of Nutrition**, v.80, supl.2, p.5197-5202, 1998.

ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v.128, p.11-19, 1998.

ROBINSON, H. Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endt). In: HERMAN, M.; HELLER, J. **Andean roots and tubers: ahupa, arracacha, mada and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 202-242, 1997.

RUTHVEN, D.M., Principles of adsorption and adsorption processes. John Wiley & Sons, New York, 1984.

SMITH, C.J. Carbohydrate chemistry. In: LEA, P.J.; LEE GOOD, R.C. (Eds.) **Plant biochemistry and molecular biology**, Chichester: J. Wiley & Sons, 1993, Cap.4, p.74-111.

SMOUTER, H.; SIMPSON, R.J. Extraction and purification of preparative amounts of 1-kestose, 6-kestose, neokestose, nystose and inulina-pentasaccharide. **Inulin and Inulin-containing crops**. London, 1993.

SRIDHAR, P.; SATRI, N.V.S.; MODAK, J.M.; MUKHERJEE, A.K. Mathematical simulation of bioseparation in an affinity packed column. **Chemical Engineering and Technology**, v.17, n.6, p. 422-429, 1994.

TAPER, H.S.; ROBERFROID, M.B. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1488s, 1489s, 1999.

UTSUNOMIYA, Y. Government regulations on the use of ion exchange resins for the processing of potable water, food products and pharmaceutical in Japan. **React Polym**, v.24, p. 121-132, 1995.

VAN DEN ENDE, W.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. In vitro synthesis of fructofuranosyl only oligosaccharides from inulin and fructose by purified chicory root fructan fructosyltransferase. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.346-352, 1996a.

VAN DEN ENDE, W.; VAN WONTERGHEM, D.; VERHAERT, P.; DEWIL E.; VAN LAERE, A; Purification and characterization of fructan: fructan fructosyltransferase from chicory (*Cichorium intybus L.*) roots. **Planta**, v.199, p.493-502, 1996b.

VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; MUYS, T.; VAN DOKKUM, W.; SCHAAFSMA, G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.544-548, 1999.

VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; SCHAAFSMA, G.; MUYS, T.; VAN DOKKUM, W. Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme iron absorption in young, health men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p.445-451, 1998.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L.D.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.525-552, 1995.

VAN LOO, J.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A; HOPKINS, M.; KOK, N.; Mc FARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VAN VLIET, T.; VAN DEN HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII – CT94-1094). **British Journal of Nutrition**, v.81, p.121-132, 1998.

VIARD, V.; LAMELOISE, M.L. Modeling glucose-fructose separation by adsorption chromatography on ion exchange resins. **Journal of Food Engineering**, v. 17, p. 29-48, 1992.

VORAGEN, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 328-335, 1998.

WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p. 373-380, 1993.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p. 107-117, 1996.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on yacon, *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Economic Botany**, v. 45, n.1, p.72-85, 1991.