

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INULINA A PARTIR DAS RAIZES DA CHICÓRIA (*Chicorium indivia*)

Sheron Honorato de Godoy¹

Ricardo Wagner²

RESUMO

A inulina é um polissacarídeo largamente encontrado na natureza em mais de 30.000 vegetais, sendo utilizada como carboidrato de reserva destes. Sua estrutura é formada por uma mistura de polímeros e oligômeros superiores lineares de frutose que variam de duas a sessenta unidades. As unidades de β -D-frutofuranosil são mantidas entre si, por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1), possuindo uma molécula de glicose na porção final, a qual é unida por ligação do tipo (α 1 \rightarrow β 2). O presente trabalho tem por objetivo extrair e caracterizar a inulina a partir da raiz da chicória (*Chicorium indivia*). A inulina foi extraída em autoclave, em seguida dialisada em membrana *cut-off* 12.000 Da e liofilizada. Com esse material foram realizadas as dosagem de açúcar total pelo método Fenol-Ácido Sulfúrico (48,06%), dosagem de açúcar redutor seguindo o método de Somogy-Nelson (4%), dosagem de proteínas totais (1,6%). Através da análise de ressonância magnética nuclear de ¹³C pode-se observar os deslocamentos químicos para as unidades de frutofuranose unidas por ligações β (2 \rightarrow 1) e a presença de outro polissacarídeo no extrato obtido.

Palavras-chave: Polissacarídeo, Inulina, *Chicorium indivia*.

¹ Acadêmica de Farmácia da Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL, Curitiba (PR) E-mail: sheron_159@hotmail.com

² Farmacêutico Bioquímico. Doutor em Bioquímica. Professor do Curso de Farmácia Faculdade Integradas do Brasil – UNIBRASIL

ABSTRACT

Inulin is a polysaccharide widely found in nature in more than 30,000 plants, being used as reserve carbohydrates in them. Its structure is composed of a mixture of higher linear polymers and oligomers of fructose ranging from two to sixty units. The units of β -D-fructofuranosyl are held together by β -(2 \rightarrow 1) type bonds, possessing a glucose molecule in the final portion, which is united by (α 1 \rightarrow β 2) type bond. This work aims in extracting and characterizing inulin from chicory root (*Cichorium indivia*). Inulin was extracted in an autoclave machine, using a method proposed by Nogueira (2002), then dialyzed in a 12,000 Da lyophilized cut-off membrane. With this material were performed the dosage of total sugar using Phenol-Sulfuric Acid method (48.06%); levels of reducing sugars, following the Somogy-Nelson method (4%), determination of total proteins (1.6%), using BREDFORD method (1976). By the analysis of ^{13}C nuclear magnetic resonance we could observe chemical shifts for fructofuranose units linked by β (2 \rightarrow 1) bonds and the presence of another polysaccharide in the extract obtained.

Keywords: polysaccharide, inulin, *Cichorium indivia*.

INTRODUÇÃO

A inulina é polímero de D-frutose, encontrado em diversas plantas, constituída de uma mistura de polímeros e oligômeros superiores lineares de frutose que variam de duas a sessenta. Esta foi identificada pela primeira vez na planta *Inula helenium*, na qual se observou uma grande concentração de um frutooligossacarídeo em suas raízes e risomas, denominado de inulina ^{(1) (2)}.

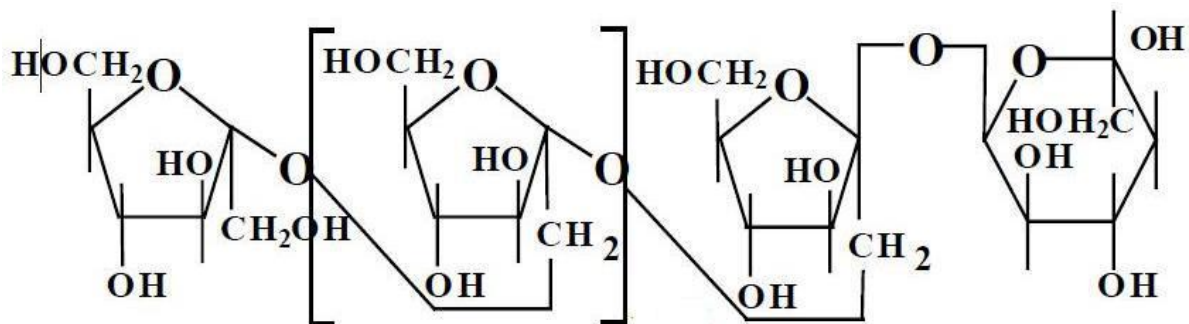


Figura 1. Estrutura geral da inulina.

Muitas plantas que contém inulina fazem parte da dieta básica humana, como a alcachofra, aspargo, trigo, cebola, alho e chicória. Nesta última altos teores foram encontrados nas suas raízes ^{(3) (4)}.

A concentração de inulina em cada planta depende da variedade, do tempo decorrido desde a colheita até a utilização e das condições de estocagem. Na

chicória, dependendo desses fatores, a concentração de inulina pode chegar a 17% nas raízes úmidas e até 50% da matéria seca ^{(5) (6)}.

A chicória é também conhecida como escarola ou almeirão, sendo produzido em grandes quantidades no Canadá, Europa, Estados Unidos. Nestes locais utiliza-se raízes torradas e picadas como um substituinte do café, ou até mesmo adicionado a ele devido ao seu sabor amargo. É uma planta que se adapta em diversas regiões temperadas e frias, e esta possui uma raiz tuberosa com característica amarga devido a inulina ^{(1) (5)}.

A inulina após extração e secagem possui como características organolépticas um pó branco, amorfo e higroscópico, com odor neutro e sabor amargo, tendo peso molecular de 1600g/mol e densidade de aproximadamente 1,35g/ml. Sua solubilidade é aproximadamente de 6% à 10°C e 35% à 90°C, variando de acordo com a temperatura, a sua capacidade de ligação de água é de 2:1, e em solução esta reduz o ponto de congelamento da água e aumenta o ponto de fusão ^{(7) (8)}.

Este polissacarídeo possui diversas aplicabilidades. Uma dela como padrão ideal para avaliação da filtração glomerular, por ela não ser absorvida e ser excretada na forma inalterada. Entretanto esta aplicação não é viável, pelo fato do paciente permanecer hospitalizado para que ocorra o teste devido sua forma de administração endovenosa ^{(9) (10)}.

A inulina passou a ser alvo da indústria farmacêutica, pois sua fermentação no intestino contribui para a absorção de cálcio, magnésio e ferro. Sendo que uma

administração de inulina e oligossacarídeo em doses de 8g/dia contribuem para um aumento de 20% na absorção de cálcio. Alguns estudos sugerem que a inulina promove uma diminuição significativa dos lipídios séricos, entretanto seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado ⁽¹³⁾.

É um grande alvo da indústria alimentícia para fabricação de produtos light, diets, muito utilizada como substituinte do açúcar e gorduras por seu baixo valor calórico, pois quando ingerida ela não é hidrolisada totalmente no estômago, devido à estabilidade de suas ligações β -(2→1), não resultando assim em ganho calórico. É utilizada também como alimento funcional, devido sua similaridade com as fibras, pois além da resistência à hidrólise ela não é absorvida no intestino. No intestino pode ocorrer a fermentação da inulina com produção de gases e formação de ácidos graxos de cadeias curtas, diminuindo o pH do colón, estimulando o crescimento das bactérias da flora normal, conseqüentemente, inibindo o crescimento dos organismos patogênicos, sendo de grande importância para a prevenção do câncer de colón ^{(1) (11)}.

Já na indústria alimentícia devida a sua propriedade geleificante é muito utilizada na panificação, produção de assados, biscoitos, tortas, recheios, sobremesas, temperos, cereais, iogurtes, produtos lácteos, sorvetes, balas, cereais, entre outros ⁽¹²⁾.

Também possui propriedades emulsificantes, sendo muito utilizado na indústria cosmética para fabricação de cremes e géis ⁽¹²⁾.

Este trabalho tem como objetivo extrair e identificar a inulina em raízes de chicória (*Chicorium indivia*).

METODOLOGIA

Determinação da umidade nas raízes:

Para determinação de umidade utilizou-se 108,311g de amostra da raiz de *Chicoria indivia*, pesadas e acondicionadas em estufa a 50°C por 24 horas e 48 horas, após as 48 horas as raízes permaneceram mais 1 hora no dessecador antes da pesagem final ⁽¹⁴⁾.

Extração:

Para o processo de extração da inulina utilizou-se uma amostra de 11,047g com aproximadamente 250ml de água a qual foram adicionada em um erlenmeyer, e em seguida acondicionada em autoclave a 120°C por 20 minutos ⁽¹⁵⁾.

Determinação do teor de açúcar total:

A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método Fenol-Ácido Sulfúrico, com leitura da absorbância a 490nm. Está leitura foi comparada com a uma curva padrão de glicose (1mg/ml em diferentes concentrações) ⁽¹⁶⁾.

Determinação de açúcar redutor:

Para determinar a dosagem de açúcar redutor, foi utilizado o método de Somogy-Nelson, e efetuada a leitura no espectrofotômetro a 540nm. Esta leitura foi comparada com a uma curva de concentração padrão de glicose (1mg/ml em diferentes concentrações) ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾.

Determinação de proteína:

A dosagem de proteína total foi realizada segundo o método proposto por BRADFORD (1976). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 595nm. Esta leitura foi comparada com a uma curva padrão de albumina (1mg/ml em diferentes concentrações) ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁹⁾.

Análise de ressonância magnética nuclear de carbono-13:

Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos pelo uso de espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400 do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, incorporados a transformador de Fourier. As amostras foram solubilizadas em óxido de deutério (D₂O), e colocadas em tubos de 15 cm de comprimento e com 5 mm de diâmetro. As análises foram realizadas a 50-70°C, e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, utilizando como padrão externo a acetona PA (δ 30,2) ⁽¹⁶⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o teste de umidade uma amostra inicial de 108,311g foi acondicionada em estufa a 50°C por 24 horas, após 24 horas observou-se umidade na amostra a qual permaneceu por mais 24 horas acondicionada em estufa e 1 hora em dessecador, na pesagem final obteve-se uma amostra de 11,047g, que corresponde um teor de umidade de 89,80%.

A extração do polissacarídeo foi realizada pelo método da autoclave a 120°C por 20 minutos, utilizando-se 11,047g da amostra seca. O extrato obtido foi filtrado,

posteriormente concentrado em evaporador rotatório a 70°C e dialisado em membrana de diálise com *cut-off* de 12.000 Da contra água corrente por 48 horas. Depois de dialisado o extrato foi liofilizado para a obtenção do polissacarídeo, fornecendo um rendimento de 0,386g (3,5%) em relação ao peso seco.

Para dosagem de açúcar total utilizou-se o método Fenol-Ácido Sulfúrico, que fundamenta-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol, a mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. O teor de açúcares total na amostra foi de 48,06%.

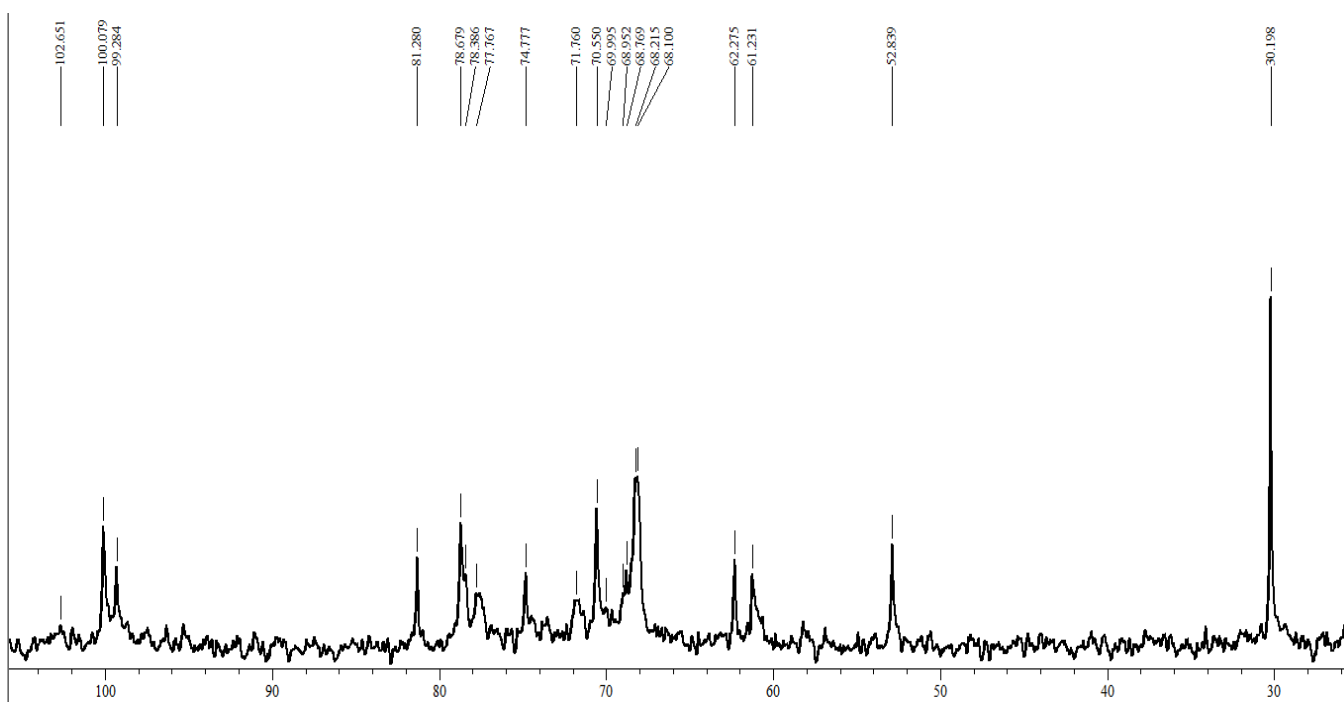
O teor de açúcar redutor encontrado foi de 4%, a dosagem realizada utilizou a metodologia de Somogy e Nelson, em que ocorre a reação dos glicídeos redutores aquecidos em meio alcalino, transformando-se em enodíóis que reduzem o íon cúprico presente a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz a reação arsênio-molibídico a óxido de molibdênio de coloração azul, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de açúcares redutores existentes na amostra.

Através do método de BRADFORD (1976), foi efetuada a dosagem de proteínas totais em que obteve-se um teor de 1,6%. Este método é baseado na interação entre o corante Coomassie brilliant blue (BG-250) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-

250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

A presença da inulina no extrato foi determinada por análise de RMN- C^{13} , a análise do espectro apresentou sinais correspondentes aos carbonos da unidade de frutose. O C1 da frutose é visto em 61,2ppm, o C2 que se encontra-se ligado possui um deslocamento químico de 102,6ppm, o C3 é visto em 77,5ppm, o C4 em 74,7ppm, C5 em 81,2ppm e finalmente C6 aparece em 62,2ppm (FIGURA 2).

Figura 2: Espectro de RMN – ^{13}C do polissacarídeo inulina. Análise realizada com



probe de 5 mm, 50° C, em D₂O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Estes dados estão de acordo com o trabalho de OLIVEIRA et al (2011) e CÉRANTOLA (2004), que determinam os deslocamentos químicos pra um frutooligossacarídeo de folhas de raízes de *Stevia rebaudiana*. Os sinais para as

unidades de glicose não puderam ser determinados devido à proporção entre as unidades de frutose e glicose.

Na figura 2, ainda observa-se dois sinais na região de carbono anomérico em 100ppm e 99,2ppm, sugerindo que mais de uma molécula pode estar presente no extrato, não só a inulina, sendo necessário um processo de purificação para separar esse outro polissacarídeo da inulina^{(20) (21)}.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os teores de proteína, açúcar total e açúcar redutor estão de acordo com os dados obtidos por NOGUEIRA (2002), que utilizou a mesma metodologia de extração com autoclave. Apesar do rendimento baixo de 3,5%, uma diferença deve ser levada em consideração devido o uso de uma espécie diferente de chicória, onde nos trabalhos publicados a espécie mais utilizada é a *Chicorium intybus*, a qual possui uma raiz mais tuberosa que a *Chicorium indivia*, proporcionando um maior acúmulo de inulina nessa raiz.

O método de extração utilizado mostrou-se eficaz, porém não extraiu somente inulina. É um método rápido e prático para se fazer um extrato, mas para a obtenção da inulina pura seria necessário outros processos.

A diálise em membrana *cut-off* de 12-14.000Da utilizada nesse trabalho depois da extração em autoclave reteve apenas os polissacarídeos que tinham peso molecular superior ao *cut-off* da membrana, não sendo possível reter oligossacarídeos e polissacarídeos menores.

De acordo com MARCHETTI (1993) a extração da inulina de raízes de chicória permite extrair oligômeros com diferentes graus de polimerização, sendo compostos de dissacarídeos e inulina com 3 a 60 unidades de frutose ⁽²²⁾.

A metodologia empregada por FIGUEIRA (2000) faz um congelamento prévio do extrato para em seguida, depois de descongelada a amostra, realizar uma centrifugação e o material centrifugado é a inulina. Este processo está baseado na solubilidade da inulina em uma temperatura mais baixa.

Apesar de não se obter uma inulina pura com a metodologia da diálise, foi possível identificar a presença da inulina no extrato, por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C, metodologia esta que mostrou seis sinais referentes aos seis carbonos da frutose gerando um espectro característico para esse polímero. Desta maneira o passo de congelamento e centrifugação é mais eficiente para separar a inulina que a membrana de diálise.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR pelas análises de RMN ¹³C.

REFERÊNCIAS

- 1-Figueira GM. Desenvolvimento agrotecnológico da espécie *Cichorium intybus* L. Campinas, 2000. 68p. Tese [Doutorado em Engenharia Agrícola]. Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas; 2000.
- 2-Leite CTJ, Parck JKIL, Ramalho PRJ, Furlan MD. Caracterização reológica das diferentes fases de extrato de inulina de raízes de chicória, obtidas por abaixamento de temperatura. *Ciência e Tecnologia da Pós-colheita* 2004; 24(1): 1-14.

- 3- Silveira CK. Bebidas à base de flocos de abóbora com inulina: características pré-bióticas e aceitabilidade. Tese [Mestrado em Ciências do Alimento]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
- 4- Lago CC. Estudo suco concentrado e da polpa de yancon (*smallanthus sanchifolius*). Tese [Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- 5- Oliveira AR. Efeito da secagem de raízes de Chicória na obtenção de inulina. Tese [Mestrado em Engenharia Agrícola]. Campinas (SP): Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- 6-Grzybowski A. Hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para obtenção de fruto-oligossacarídeos. Tese [Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Curitiba (PR): Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná; 2008.
- 7- Galante MR. Extração de Inulina do alho (*Allium sativum* L. var. Chonan) e simulação dos processos em batelada e em leite fixo. Florianópolis (SC): Tese [Mestrado em Engenharia Química] Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.
- 8- Haully COM, Moscatto AJ. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. Semina: Ciências Exatas e Tecnológica 2002; 23(1): 105-118.
- 9- Maliska C, Pinho RW, Lima TE, Almeida DJ, Pellegrini MP, Schimit ST. Taxa de filtração glomerular pelo EDTA marcado com ⁵¹Cr e com ^{113m}In em equinos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2009; 61(3): 1-11.

- 10- Kirsztajan, MG. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2007; 43(4): 1-14.
- 11-Toneli LCTJ, Park JK, Murr XEF, Negreiros AA. Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2008;28(1):1-14.
- 12- Gonçalves AA, Rohr M. Desenvolvimento de balas mastigáveis adicionadas de inulina. *Alim. Nutr* 2008; 20(3):171-178.
- 13- Fortes RC; Muniz LB. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. Tese [Pós-graduação em Nutrição Humana]. Distrito Federal (DF): Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- 14-Oliveira AO, Parck JK, Chiorato M, Parck BJK, Nogueira IR. Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 2004; 6(2): 131-140.
- 15- Nogueira RI. Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó. Tese [Doutorado em Engenharia Agrícola]. Campinas (SP): Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campina, Campinas; 2002.
- 16- Santos WD, Wagner R. Caracterização química parcial de polissacarídeos da parede celular de *Fusarium Subglutinans*. [tese livre docência]. Curitiba (PR): Caderno da Escola de Saúde, Faculdades Integradas do Brasil; 2010.
- 17- Pavim CR, Ribas DJ. Bioquímica: aulas práticas. Curitiba (PR): UFPR; 2002.
- 18-Demiate MI, Wosiack G, Cezalusniak C, Nogueira A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre o método colorimétrico e

titulométrico. Ciências exatas e da Terra, C. Agrárias e Engenharia. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2002.

19- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Micrograms Quantities for Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976 ;72: 248-254.

20-Cérantola S, Kervarec N, Pichon , Magné C, Bessieres AM, Deslandes E. NMR characterisation of inulin-type fructooligosaccharides as the major water-soluble carbohydrates from *Matricaria marítima* (L.). *Carbohydrate Research* 2004; 339: 2445-2449.

21- Oliveira AJB, Gonçalves RAC, Chierrito TPC, Santos MM, Souza LM, Gorin PAJ, Sasaki GL, Iacomini M. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton. *Food Chemistry*, *In press. Accepted Manuscript*, 2011.

22- Marchetti G. Inulina e fruttani. *Industrie Alimentari* 1993; 32(319): 945-949