

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
ÁCIDO LACTOBIÔNICO E DE DIFERENTES LACTOBIONATOS
PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis* VISANDO À UTILIZAÇÃO
NA ÁREA FARMACÊUTICA

MARIA GABRIELE DELAGUSTIN

CAXIAS DO SUL

2017

MARIA GABRIELE DELAGUSTIN

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
ÁCIDO LACTOBIÔNICO E DE DIFERENTES LACTOBIONATOS
PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis* VISANDO À UTILIZAÇÃO
NA ÁREA FARMACÊUTICA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção de grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Co-orientadores: Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

CAXIAS DO SUL

2017

D333c Delagustin, Maria Gabriele
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
ÁCIDO LACTOBÍÔNICO E DE DIFERENTES LACTOBIONATOS
PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis* VISANDO À UTILIZAÇÃO
NA ÁREA FARMACÊUTICA / Maria Gabriele Delagustin. – 2017.
185 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Eloane Malvessi.

Coorientação: Mauricio Moura da Silveira, Valquíria Linck Bassani.

1. Biotecnologia. 2. Ácido lactobiônico. 3. *Zymomonas mobilis*. I.
Malvessi, Eloane, orient. II. Silveira, Mauricio Moura da, coorient. III.
Bassani, Valquíria Linck, coorient. IV. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

MARIA GABRIELE DELAGUSTIN

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO LACTOBÍÔNICO E DE DIFERENTES LACTOBIONATOS PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis* VISANDO À UTILIZAÇÃO NA ÁREA FARMACÊUTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Co-orientadores: Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira e Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 DE DEZEMBRO DE 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Dra. Fernanda Bettin

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Eloane Malvessi pela orientação, paciência, incentivo e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira pela orientação, colaboração e ensinamentos.

A Msc. Sabrina Carra pelos ensinamentos, dedicação, paciência, companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Thiago Barcellos e a equipe do laboratório de Óleos essenciais pelos ensinamentos, todas as contribuições significativas e pela disponibilidade dos equipamentos.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a Profa. Dra. Valquíria Bassani pela oportunidade, ensinamentos e pela disponibilidade dos equipamentos.

Aos membros da banca de acompanhamento Dr. Leandro Tasso e Dra. Fernanda Betin pelas contribuições e sugestões ao trabalho.

Aos professores do curso de farmácia, em especial a Dra. Elizete Facco pelo apoio nos estágios de docência.

Aos professores e ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelo conhecimento compartilhado, apoio financeiro e estrutura física.

Aos mestrandos e doutorandos do laboratório de bioprocessos, em especial a Analia Folle e Lenara Meneghel pelo companheirismo, amizade, apoio, incentivo e troca de conhecimentos.

Agradecimento aos bolsistas do laboratório de bioprocessos, em especial Eduarda Gonçalves, Romana Grando e Verônica Oliboni, pela ajuda e disponibilidade.

Aos meus pais, minha família e amigos por sempre me apoiarem, pela paciência, incentivo, amizade e amor. E por sempre me guiarem.

À CAPES, UCS, CNPq e FAPERGS pelo apoio financiamento do projeto.

3.3.1	Purificação dos produtos da bioconversão	36
3.3.2	Conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico	38
3.4	Testes de estabilidade	39
3.4.1	Testes de estabilidade acelerada	39
3.4.2	Testes de estabilidade de longa duração	40
3.4.3	Testes de degradação forçada	40
3.4.3.1	Ação da temperatura	41
3.4.3.2	Degradação ácida ou básica	41
3.4.3.3	Degradação oxidativa	41
3.4.3.4	Fotoestabilidade	42
3.4.3.5	Cinética de degradação	43
3.5	Métodos analíticos	43
3.5.1	Determinação da concentração celular	43
3.5.2	Determinação de açúcares redutores (AR).....	44
3.5.3	Estimativa da concentração de substratos e produtos em ensaios de bioconversão.....	44
3.5.4	Parâmetros de avaliação do processo de bioconversão.....	48
3.5.4.1	Conversão de substrato em produto.....	48
3.5.4.2	Produtividade molar.....	48
3.5.4.3	Produtividade específica	48
3.5.4.4	Velocidade específica de formação de produtos.....	49
3.6	Caracterização físico-química do ácido lactobiônico e dos sais de lactobionato	50
3.6.1	Quantificação e identificação do lactobionato, sorbitol, lactose e frutose	50
3.6.2	Análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C	50
3.6.3	Análise de espectrometria de massas de alta resolução	51
3.6.4	Determinação do pH	51
3.6.5	Determinação do poder rotatório específico	51
3.6.6	Determinação da umidade.....	52

3.6.7	Determinação de solubilidade.....	52
3.7	Análise estatística.....	52
4.	RESULTADOS.....	53
4.1	Capítulo 1: Bioprodução, purificação e identificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio.	54
4.1.1	Cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i> para obtenção de células e do complexo enzimático	54
4.1.2	Bioprodução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio	55
4.1.3	Bioprodução de lactobionato de potássio e lactobionato de cálcio em bateladas repetidas.....	60
4.1.4	Purificação dos sais de lactobionato da mistura final de bioconversão	67
4.1.5	Identificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio	70
4.2	Capítulo 2: Estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial.....	82
4.2.1	Bioprodução e purificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio	82
4.2.2	Estabilidade acelerada.....	88
4.2.3	Estabilidade de longa duração.....	119
4.3	Capítulo 3: Estudo de degradação forçada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico	138
4.3.1	Estabilidade frente ao pH.....	138
4.3.2	Degradação frente à temperatura	155
4.3.3	Degradação oxidativa.....	160
4.3.4	Degradação frente à luz ultravioleta	168
5.	CONCLUSÕES.....	170
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do alfa hidroxiácido ácido glicólico e do poli-hidroxiácido gliconolactona. 5
- Figura 2:** Estrutura do ácido lactobiônico. 6
- Figura 3:** Conversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glicônico, respectivamente, pela ação das enzimas glicose frutose-oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*. 11
- Figura 4:** Reações de obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol pelo sistema glicose frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*. 12
- Figura 5:** Sistema utilizado para a imobilização de *Zymomonas mobilis* em alginato de sódio. 32
- Figura 6:** Sistema utilizado nos ensaios de bioconversão utilizando solução de NaOH ou KOH 7,0 mol/L para o controle do pH da reação. 33
- Figura 7:** Sistema de bioconversão utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para o controle do pH. 33
- Figura 8:** Fluxograma da bioprodução dos lactobionatos de potássio e cálcio, em bateladas repetidas, utilizando células/enzimas de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. 35
- Figura 9:** Purificação dos sais de lactobionato por precipitação em etanol. 36
- Figura 10:** Sistema empregado na conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico. 39
- Figura 11:** Câmera espelhada com lâmpada de irradiação UVA/UVB e lâmpada branca fluorescente, utilizada na execução dos ensaios de fotoestabilidade dos lactobionatos de sódio, potássio, cálcio e do ácido lactobiônico. 43
- Figura 12:** Cinética do cultivo de *Zymomonas mobilis* realizado em biorreator de agitação mecânica (450 rpm, 5,0 L, pH 5,5, 30°C), relacionando a densidade ótica (D.O.) e o consumo de glicose em função do tempo. 55
- Figura 13:** Perfil de produção dos lactobionatos de sódio, potássio ou cálcio e do consumo de lactose em função do tempo, em ensaios de bioconversão 58

com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*.

- Figura 14:** Velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função da concentração de lactose e do tempo em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. 60
- Figura 15:** Variação da concentração de lactobionato de cálcio ou lactobionato de potássio em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em bateladas consecutivas. 63
- Figura 16:** Velocidade específica de formação de lactobionatos de cálcio (μ_P) e potássio em função do tempo e velocidade específica de formação de lactobionato de cálcio e potássio em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em bateladas consecutivas. 65
- Figura 17:** Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de sódio. 72
- Figura 18:** Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de potássio. 74
- Figura 19:** Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de cálcio. 76
- Figura 20:** Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de sódio. 80
- Figura 21:** Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de potássio. 80
- Figura 22:** Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de cálcio. 81
- Figura 23:** Cromatogramas relativos às amostras da mistura final de cada bioconversão e após a etapa de purificação dos produtos. 87
- Figura 24:** Amostras do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. 95
- Figura 25:** Cromatogramas obtidos dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, no tempo inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. 99
- Figura 26:** Reação de interconversão do ácido lactobiônico em lactobionolactona. 100
- Figura 27:** Espectrometria de massas, por injeção direta, do lactobionato de 101

sódio incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.

- Figura 28:** Estrutura química do lactobionato de sódio. 103
- Figura 29:** Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de potássio previamente incubado a 40°C e 75% de umidade relativa. 105
- Figura 30:** Estrutura química do lactobionato de potássio. 107
- Figura 31:** Espectro de massas, por injeção direta, de amostra de lactobionato de cálcio, incubada a 40°C e 75% de umidade relativa. 108
- Figura 32:** Estrutura química do lactobionato de cálcio. 110
- Figura 33:** Espectro de massas, por injeção direta, ácido lactobiônico previamente incubado a 40°C e 75% de umidade relativa. 112
- Figura 34:** Espectro de massas, por injeção direta, ácido lactobiônico comercial previamente incubado a 40°C e 75% de umidade relativa. 115
- Figura 35:** Reação de quebra da ligação glicosídica do ácido lactobiônico. 116
- Figura 36:** Espectro de massas, por injeção direta, ácido lactobiônico comercial após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. 117
- Figura 37:** Amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial após seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade relativa. 123
- Figura 38:** Cromatogramas obtidos dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, das amostras inicial, após três e seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade relativa 124
- Figura 39:** Cromatogramas relativos às amostras de ácido lactobiônico no tempo inicial, em 24 h e 240 h de exposição à solução de NaOH 0,01 mol/L (1:1). 141
- Figura 40:** Cromatogramas relativos às amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico no tempo inicial e em 240 h de exposição à solução de HCl 0,01 mol/L (1:1). 147
- Figura 41:** Cromatogramas relativos às amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico no tempo inicial e em 24 0h de exposição à solução HCl 0,1 mol/L (1:1). 149
- Figura 42:** Cromatogramas relativos às amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico no tempo inicial e em 240 h de 152

exposição à solução HCl 1,0 mol/L (1:1).

- Figura 43:** Doseamento das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico em função do tempo de exposição a 60°C. 155
- Figura 44:** Cromatogramas relativos às amostras de ácido lactobiônico no tempo inicial e ao final de quinze dias de exposição a 60°C. 156
- Figura 45:** Amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico após quinze dias de exposição a 60°C. 157
- Figura 46:** Doseamento das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico em função do tempo de exposição a 80°C por quinze dias. 158
- Figura 47:** Cromatogramas relativos às amostras de ácido lactobiônico no tempo inicial e ao final de quinze dias de exposição a 80°C. 159
- Figura 48:** Amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico após quinze dias de exposição a 80°C. 160
- Figura 49:** Cromatogramas relativos às amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico no tempo inicial e ao final de sete dias de exposição à solução de H₂O₂ 3% (m/v). 163
- Figura 50:** Gráficos da concentração x tempo, log da concentração x tempo e 1/concentração x tempo do lactobionato de sódio submetidas à solução 3% (m/v) de H₂O₂ por sete dias, em temperatura ambiente. 164
- Figura 51:** Concentração x tempo, log da concentração x tempo e 1/concentração x tempo, do lactobionato de potássio submetido à solução 3% (m/v) de H₂O₂ por sete dias em temperatura ambiente. 165
- Figura 52:** Concentração x tempo, log da concentração x tempo, e 1/concentração x tempo do lactobionato de cálcio submetido à solução 3% (m/v) de H₂O₂ por sete dias em temperatura ambiente. 166
- Figura 53:** Gráficos da concentração x tempo, log da concentração x tempo e 1/concentração x tempo do ácido lactobiônico submetidos à solução 3% (m/v) de H₂O₂ por sete dias, em temperatura ambiente. 167
- Figura 54:** Percentual recuperado dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à ação da luz ultravioleta por 90 dias em comparação com os controles, sob proteção da luz ultravioleta. 168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de estresse definidas pelo Informe Técnico 01/2008 para estudo de degradação forçada.	27
Tabela 2: Composição do meio de cultivo utilizado para a ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e na produção de biomassa/enzimas de <i>Zymomonas mobilis</i> .	29
Tabela 3: Resultados gerais de produção, em 24 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio por células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> .	57
Tabela 4: Resultados gerais de produção de lactobionatos de cálcio e potássio por células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> em 24 h de reação.	62
Tabela 5: Resultados referentes à purificação do caldo final da bioconversão por precipitação com etanol.	69
Tabela 6: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de sódio purificado.	71
Tabela 7: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de potássio purificado.	75
Tabela 8: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de cálcio purificado.	77
Tabela 9: Deslocamentos químicos dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio identificados por ressonância magnética nuclear de ^{13}C .	79
Tabela 10: Determinação da concentração, por cromatografia líquida, dos substratos residuais lactose e frutose e dos produtos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e sorbitol obtidos via bioconversão por células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> .	84
Tabela 11: Quantificação, por cromatografia líquida, dos produtos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico, sorbitol e substratos lactose e frutose após a etapa de purificação por precipitação com etanol.	85
Tabela 12: Leituras de pH das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em concentração de 10 g/L, no tempo inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.	88

Tabela 13: Análise do poder rotatório dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em concentração 10% (m/v) inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.	90
Tabela 14: Análise da solubilidade de 1 g dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em água Milli-Q, no tempo inicial e após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.	92
Tabela 15: Análise da umidade dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, no tempo inicial e após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.	94
Tabela 16: Concentração, obtida por cromatografia líquida, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.	96
Tabela 17: Fórmulas moleculares identificadas a partir da relação m/z obtidas por espectrometria de massas das amostras de lactobionato de sódio incubadas a 40°C e 75% de umidade relativa.	101
Tabela 18: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas por espectrometria de massas do lactobionato de potássio incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.	106
Tabela 19: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas por espectrometria de massas do lactobionato de cálcio incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.	108
Tabela 20: Fórmulas moleculares identificadas em relação m/z obtidas por espectrometria de massas do ácido lactobiônico incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.	113
Tabela 21: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas por espectrometria de massas do ácido lactobiônico comercial incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.	116
Tabela 22: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do ácido lactobiônico comercial nas amostras após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.	1178

Tabela 23: Leituras de pH das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em concentração 10 g/L nos tempos inicial, após três e seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade.	120
Tabela 24: Análise do poder rotatório dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial em concentração 10% (m/v) inicial, após três e seis meses em 30°C e 75% umidade relativa.	121
Tabela 25: Concentração, obtida por cromatografia líquida, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, das amostras inicial, após três e seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade relativa.	126
Tabela 26: Fórmulas moleculares identificadas a partir das <i>m/z</i> obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de sódio incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.	127
Tabela 27: Fórmulas moleculares identificadas a partir das <i>m/z</i> obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de potássio incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.	129
Tabela 28: Fórmulas moleculares identificadas a partir das <i>m/z</i> obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de cálcio incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.	131
Tabela 29: Fórmulas moleculares identificadas a partir das <i>m/z</i> obtidas pelo espectro de massas do ácido lactobiônico incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.	133
Tabela 30: Fórmulas moleculares identificadas a partir das <i>m/z</i> obtidas pelo espectro de massas do ácido lactobiônico comercial incubado a 30°C e 75% umidade relativa.	135
Tabela 31: Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 0,01 mol/L a 23°±2°C.	139
Tabela 32: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 0,01 mol/L por dez dias, a 23°±2°C	140

- Tabela 33:** Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 0,1 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 142
- Tabela 34:** Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à solução de NaOH 0,1 mol/L a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 143
- Tabela 35:** Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 1,0 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 144
- Tabela 36:** Valores de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas a solução de NaOH 1,0 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 145
- Tabela 37:** Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 0,01 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 146
- Tabela 38:** Leituras de pH inicial, após 120h e 240h das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas a solução de HCl 0,01 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 148
- Tabela 39:** Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 0,1 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 150
- Tabela 40:** Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 0,1 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 151
- Tabela 41:** Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 1,0 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 153
- Tabela 42:** Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 1,0 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 154
- Tabela 43:** Doseamento, por cromatografia líquida, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à solução de 3% (m/v) de H_2O_2 por sete dias a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. 161

RESUMO

O ácido lactobiônico e seus sais (lactobionatos), compostos que apresentam aplicações na área farmacêutica, foram obtidos via ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR)/gliconolactonase (GL) - presente no periplasma de células da bactéria *Zymomonas mobilis* - imobilizado em alginato de cálcio. Nas reações catalisadas por este sistema enzimático, o pH do meio deve ser controlado em valores ligeiramente ácidos. Para este fim, foram empregados NaOH, KOH ou Ca(OH)₂ e, como consequência, os respectivos sais foram formados. O estudo da cinética de formação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do próprio ácido lactobiônico foi seguido das etapas de purificação, caracterização e avaliação da estabilidade físico-química, visando à potencial utilização destes compostos na área farmacêutica. Em ensaios de bioprodução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, foram obtidos rendimentos de 74, 77 e 84%, respectivamente. Em bateladas sucessivas de bioconversão, totalizando 96 h de uso do biocatalisador, rendimentos de 80 e 56 % em lactobionatos de cálcio e de potássio foram atingidos. Na etapa de purificação dos sais, foram alcançados teores de pureza de aproximadamente 95%, sendo então procedida a caracterização dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas e RMN de ¹³C. Nos estudos de estabilidade acelerada, de longa duração e degradação forçada, os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio obtidos nos ensaios de bioconversão conduzidos em maior volume reacional, foram inicialmente purificados e, então, comparados frente ao ácido lactobiônico, obtido por troca iônica a partir do lactobionato de sódio, e com o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich). Nos testes de estabilidade acelerada e de longa duração, foi constatada a estabilidade de todos os compostos por até seis meses quando expostos a 30 e 40°C e 75% de umidade relativa. Por outro lado, a presença da lactobionolactona foi identificada nas amostras dos compostos na forma ácida. Com relação aos testes de degradação forçada, os lactobionatos de sódio, potássio, e cálcio e o ácido lactobiônico se mostraram estáveis frente à exposição a soluções ácidas e alcalinas e às temperaturas avaliadas. Contudo, observou-se degradação no tratamento com solução oxidativa, com cinética de degradação de ordem zero para os sais e de segunda ordem para o ácido lactobiônico. Elevadas concentrações de produtos - lactobionatos de sódio, potássio e cálcio - foram atingidas com a utilização do sistema GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio. Considerando o conjunto de informações obtido, quanto à caracterização

físico-química dos compostos produzidos, foi demonstrada a estabilidade frente aos diferentes parâmetros avaliados atendendo aos requisitos mínimos legais para sua aplicação na área farmacêutica.

ABSTRACT

Lactobionic acid and its salts (lactobionate) are substances that have several applications in pharmaceutical area. These products were obtained by enzymatic complex glucose-fructose-oxidoreductase (GFOR)/gluconolactonase (GL) present in the periplasm of *Zymomonas mobilis* cells that were immobilized in calcium alginate. In the reactions catalyzed by this enzyme system, the medium pH must be controlled at slightly acid values. For this purpose, NaOH, KOH, or Ca(OH)₂ were used and as a result the respective salts were formed. The kinetic study on the formation of sodium, potassium and calcium lactobionate and lactobionic acid itself was followed by the steps of purification, characterization and evaluation of the physicochemical stability, aiming the potential use of these compounds in the pharmaceutical area. In the assays for the bioproduction of sodium, potassium or calcium lactobionates, yields of 74, 77 and 84% were obtained, respectively. In repeated bioconversion batches, totalizing 96 hours of use of the biocatalyst, yields of 80 and 56% were attained for calcium and potassium lactobionate. In the salts purification step, purity levels of approximately 95% were achieved, and subsequently these compounds were characterized by high performance liquid chromatography, mass spectrometry, and C¹³ NMR. In the studies of accelerated, long term and forced degradation stability, the production of sodium, potassium and calcium lactobionate was carried out at higher reaction volume. The products were purified and then evaluated together with lactobionic acid that was obtained by ion-exchange from sodium lactobionate, and with a commercial lactobionic acid (Sigma-Aldrich). In the accelerated and long term stability tests, it was demonstrated the stability of all compounds when exposed to 30 and 40°C and of 75% of relative humidity for up to six months. On the other hand, the presence of lactobionolactone was identified in samples of compounds in the acid form. With respect to the forced degradation tests, sodium, potassium and calcium lactobionates and lactobionic acid have shown to be stable after exposing to both acidic and alkaline solutions and the temperatures evaluated. However, degradation was observed in the treatment with oxidative solution, with a zero-order degradation kinetics for the salts forms and second-order for lactobionic acid. High concentrations of products - sodium, potassium and calcium lactobionate - were achieved by using the Ca-alginate immobilized GFOR/GL complex. Considering the set of information obtained in regarding to physicochemical characterization, it was demonstrated the high stability of

these compounds in front of different parameters evaluated, endorsing the legal minimum requirements for their application in the pharmaceutical area.

1. INTRODUÇÃO

O ácido lactobiônico é classificado como um ácido biônico, sendo composto por um poli-hidroxiácido, o ácido glicônico, ligado a um açúcar, a galactose. Este insumo é empregado na área farmacêutica, com ação hidratante, anti-idade e capacidade quelante de íons ferro. Além disso, é relatada a sua utilização em soluções de preservação de órgãos a serem transplantados e na vetorização de fármacos. Na área de alimentos, têm funções como acidulante e estabilizante. O ácido lactobiônico pode, também, ser encontrado na forma de sal, como, por exemplo, os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio.

A produção do ácido lactobiônico é realizada por síntese química ou rota biotecnológica. A bioprodução por microrganismos e enzimas destaca-se, em relação à síntese química, por serem técnicas com condições mais brandas, onde não são utilizados solventes e não são empregadas elevadas temperaturas e pressões. Para a síntese enzimática do ácido lactobiônico, é relatada a ação do complexo glicose-frutose oxidoredutase (GFOR)/glicono-lactonase (GL), presente no periplasma de células da bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis*. Estas enzimas operam em mecanismo *ping-pong*, onde a lactose é oxidada a lactobiono- δ -lactona e a frutose reduzida a sorbitol. Posteriormente, pela ação da GL, a lactobiono- δ -lactona é hidrolisada a ácido lactobiônico. Nesta reação de formação do ácido lactobiônico e sorbitol, conforme o ácido é produzido, o pH da solução tende a diminuir e, para a manutenção da atividade enzimática, uma base como NaOH, KOH ou Ca(OH)₂ é adicionada, formando os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, respectivamente. Ainda, o lactobionato pode ser novamente convertido à forma ácida por cromatografia de troca iônica.

Para a purificação do ácido lactobiônico e dos sais, relata-se a utilização da técnica de precipitação em etanol, visto que estes compostos são insolúveis neste solvente. Por sua vez, o sorbitol, a lactose e a frutose são solúveis em etanol, porém, em diferentes proporções. Dependendo da pureza requerida, a precipitação pode ser realizada mais de uma vez, assim obtendo-se substâncias mais puras. O etanol é o solvente de escolha visto que é um produto resultante do metabolismo de *Z. mobilis* e, após a utilização na purificação, pode ser recuperado por destilação.

A caracterização e o estudo de estabilidade de um insumo são fundamentais no desenvolvimento de um produto farmacêutico. Tendo conhecimento da estrutura do princípio ativo, é possível prever os possíveis produtos de degradação que podem ser gerados quando o mesmo é exposto às condições de estresse. A presença de produtos de degradação pode levar à alteração de características físico-químicas da formulação a qual o insumo foi incorporado e até à ocorrência de efeitos tóxicos ao paciente.

Tendo em vista a constante busca por produtos inovadores no mercado, aliada à potencialidade de uso do ácido lactobiônico e dos lactobionatos na área farmacêutica, a devida caracterização dos insumos se torna imprescindível. Visto a escassez de informações relativas à caracterização físico-química e estabilidade do ácido lactobiônico e dos sais, a elucidação destes parâmetros são fundamentais para trazer segurança no emprego destes insumos.

O presente trabalho teve como objetivo geral produzir ácido lactobiônico, na forma de diferentes sais – utilizando o sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado –, purificar os produtos obtidos e avaliar os sais e o próprio ácido, conforme critérios estabelecidos pela legislação pertinente, visando à sua aplicação nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

Para que o objetivo geral fosse alcançado, foram desenvolvidas atividades que focalizaram os objetivos específicos listados a seguir:

- conduzir ensaios de bioconversão com células/enzimas imobilizadas de *Z. mobilis*, utilizando NaOH, KOH e Ca(OH)₂ no controle do pH da reação para a consequente formação dos sais - lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, respectivamente;

- avaliar a reutilização das células/enzimas imobilizadas de *Z. mobilis* em ensaios de bioconversão para a produção dos lactobionatos de potássio e cálcio;

- avaliar os processos de purificação dos sais produzidos e a sua posterior conversão para a forma ácida;

- realizar a identificação e a caracterização físico-química dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio;

- avaliar a estabilidade de longa duração e acelerada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial;

- conduzir ensaios de degradação forçada frente ao pH (ácido/básico), temperatura, oxidação e luz ultravioleta para verificar a estabilidade físico-química dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido lactobiônico e sais de lactobionato: características e aplicações

Nos anos 70, Van Scott & Yu (1974) identificaram uma classe de substâncias ativas que proporcionavam efeitos benéficos quando aplicadas topicamente, nomeada de hidroxiácidos (HA). Estes compostos são ácidos orgânicos que apresentam um grupamento hidroxil (-OH) na posição α , em relação ao grupamento carboxil (COOH), denominados de α -hidroxiácidos (AHA) ou na posição β , os β -hidroxiácidos (BHA), sendo os AHA utilizados na cosmetologia (Green *et al.*, 2009).

Os AHA são utilizados no tratamento de peles ressecadas, acne, além de apresentarem efeito anti-idade e esfoliante. O primeiro AHA a ser utilizado em produtos cosméticos foi o ácido glicólico, sendo este composto o que apresenta a menor estrutura molecular da classe. Outros exemplos são o ácido lático e o ácido salicílico (Grimes *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2009; Kornhauser *et al.*, 2010).

Apesar dos efeitos benéficos, estas moléculas são estruturas de baixa massa molecular, assim, penetrando rapidamente na pele e causando sensação de ardência e irritação, motivo que é geralmente considerado limitante no tratamento com AHA (Van Scott *et al.*, 1996; Grimes *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2009). Com efeitos farmacológicos similares aos AHA, a classe dos poli-hidroxiácidos (PHA) foi reconhecida, porém, sem causar irritação na pele. Os PHA são ácidos carboxílicos com dois ou mais grupos hidroxilas ligadas aos átomos de carbono de uma cadeia alifática ou alicíclica, sendo essencial a presença de pelo menos uma hidroxila na posição α . Entre os PHA mais utilizados, destaca-se a gliconolactona (Green, 2005; Green *et al.*, 2009). Na Figura 1, são representadas as estruturas de um alfa e de um poli-hidroxiácido.

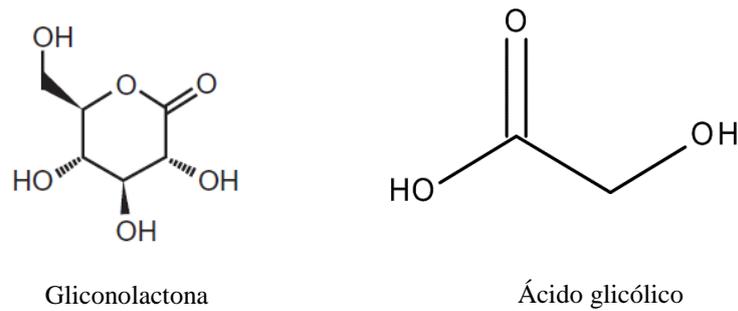


Figura 1: Estrutura do alfa hidroxilado ácido glicólico e do poli-hidroxilado gliconolactona.

Fonte: Green (2005); Green *et al.*, (2009).

Os PHA apresentam uma estrutura molecular maior que os AHA, por isso, penetram na pele de forma lenta e gradual, causando menor sensação de irritabilidade e ardência (Grimes *et al.*, 2004). Por este motivo, os PHA podem ser utilizados em peles sensíveis e também nos casos de peles com rosácea e dermatite atópica (Bergfeld *et al.*, 1998).

Juntamente com os PHA, os ácidos biônicos (AB) estão entre a nova geração de PHA. Os BA apresentam a estrutura de um PHA ligado a uma molécula de açúcar. Clinicamente, os BA e os PHA promovem efeitos semelhantes, como ação anti-idade, hidratante, umectante e atividade antioxidante. Dentre os BA, podem-se citar o ácido lactobiônico e o ácido maltobiônico (Yu & Van Scott, 2004; Green *et al.*, 2009; Kornhauser *et al.*, 2010).

O ácido lactobiônico (ácido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glicônico) é composto por uma unidade de galactose ligada por uma ligação éter a uma molécula de ácido glicônico (Figura 2). Consiste de um pó branco, cristalino, com ponto de fusão de 125°C, pKa 3,8 e desvio óptico de +23 para +29°. É solúvel em água, ligeiramente

solúvel em ácido acético glacial, em etanol anidro e em metanol (European Pharmacopoeia, 2008; British Pharmacopoeia, 2009).

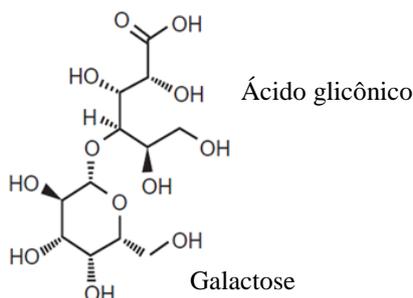


Figura 2: Estrutura do ácido lactobiônico.

Fonte: Kornhauser *et al.* (2010).

Devido ao grande número de hidroxilas presentes na estrutura, o ácido lactobiônico apresenta ação umectante, com maior capacidade de adsorção de água que os umidificantes tradicionais, como o sorbitol e o glicerol. O ácido lactobiônico tem alta capacidade de retenção de água (cerca de 14%), formando uma matriz de gel transparente (película geleificante), que proporciona efeito hidratante, proteção de peles inflamadas e em peles com queimaduras (Grimes *et al.*, 2004; Yu & Van Scott, 2004).

Outra característica do ácido lactobiônico é a capacidade de quelar íons Fe^{2+} , impedindo que a reação de Fenton ocorra e, conseqüentemente, impedindo a formação de radicais hidroxilas. A reação de Fenton é a reação de oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} na presença de água oxigenada (H_2O_2), gerando espécies reativas como o radical hidroxila. Devido a esta característica, atua diminuindo os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Walling, 1975; Goldstein *et al.*, 1993; Charloux *et al.*, 1995). Ainda, é componente majoritário da solução de Wisconsin (UW), utilizada para a preservação de órgãos a serem transplantados (Sumimoto & Kamada, 1990; Southard & Belzer, 1995; Alonso *et al.*, 2013).

Green *et al.* (2006) demonstraram que o ácido lactobiônico, na concentração de 8% (m/v) em uma emulsão, foi capaz de melhorar a textura da pele, suavizando manchas e linhas de expressão. Além disso, identificou-se a melhora na firmeza e na elasticidade da pele, não apresentado sinais de irritação.

Brouda *et al.* (2010) constataram que o ácido lactobiônico é um potente inibidor da matriz metaloproteinase (MMP), demonstrando a capacidade de bloquear a degradação do colágeno e de reduzir a hiperpigmentação em peles expostas ao sol. Por fim, também foi constatada a atividade antioxidante, em função da capacidade de inibição da peroxidação lipídica *in vitro* induzida pela luz ultravioleta (UV).

Tasic-Kostov *et al.* (2010) avaliaram a eficácia e o potencial de irritação do ácido lactobiônico e o ácido glicólico, em concentração de 6% (m/v). Foi identificado melhor desempenho do ácido lactobiônico em relação ao ácido glicólico, proporcionando a esfoliação da pele, melhora na hidratação e diminuição de manchas. Em relação à irritabilidade, nenhuma das formulações causou sensação de queimação e/ou ardência.

Além do uso em cosméticos, o ácido lactobiônico pode ser utilizado na área médica, como por exemplo, para aumentar a solubilidade de antibióticos como eritromicina e claritromicina e como veículo para a suplementação de cálcio (Gutierrez *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013). Zakeri-Milani *et al.* (2012) avaliaram nove ácidos orgânicos diferentes com o objetivo de aumentar a solubilidade da claritromicina, sendo que o ácido lactobiônico se mostrou mais efetivo. Além disso, a estabilidade acelerada e de longa duração (em temperatura ambiente e em -20°C) foram avaliadas, determinando que a formulação de ácido lactobiônico e claritromicina se mostrou estável ao final dos 24 meses tanto em temperatura ambiente quanto em -20°C.

O ácido lactobiônico pode ser utilizado como agente de vetorização de drogas, devido à sua capacidade de ligação aos receptores asialoglicoproteína (ASGPR) presentes em células hepáticas (Gutierrez *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013). As ASGPR são consideradas promissoras marcadoras de células hepáticas tumorais, pois estes receptores estão presentes na superfície destas células e, além disso, apresentam facilidade de ligação com conjugados de galactose. Devido a esta afinidade com a galactose, o ácido lactobiônico pode ser utilizado como um vetor de fármacos. Um exemplo é a utilização na vetorização do fármaco antitumoral doxorubicina (Villa *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015).

Mukherjee & Yun (2015) demonstraram que a administração oral e intraperitoneal (250 e 500 $\mu\text{mol/L}$) de ácido lactobiônico resultou em redução significativa, dose dependente, do ganho de peso corporal em ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras, melhorando, também, os parâmetros metabólicos. Assim, os autores sugeriram a possibilidade de utilização do ácido lactobiônico como composto anti-obesidade.

Na área alimentar, foi aprovado como aditivo pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo utilizado como acidulante, agente de firmeza e estabilizante (Gutierrez *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013). Também é utilizado em alimentos, devido à capacidade prebiótica e, além disso, é responsável pelo aumento do rendimento da produção de queijos (Nielsen & Hoeier, 2009; Adebola *et al.*, 2014). Ainda, pode ser utilizado como acidulante na produção de queijos, substituindo a glicono- δ -lactona, com a vantagem de apresentar propriedades funcionais (Ribeiro *et al.*, 2016).

O lactobionato de cálcio é um sal solúvel em água, propriedade esta desejável, visto que sais de cálcio geralmente apresentam baixa solubilidade. O lactobionato de

cálcio se dissolve em água, aproximadamente 62 g/100 mL, apresentando solubilidade superior ao carbonato de cálcio e ao lactato de cálcio (Murakami *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2013; Vavrusova *et al.*, 2014).

A baixa solubilidade em água de alguns sais de cálcio, em pH neutro, pode levar à precipitação durante a estocagem de alimentos e bebidas suplementadas com cálcio, resultando, assim na redução da biodisponibilidade do cálcio (Pak & Avioli, 1988, Gutierrez *et al.*, 2012, Alonso *et al.*, 2013). A adição de lactobionato de cálcio, tanto em bebidas não lácteas quanto à base de leite, além de queijos, tem sido empregada para proporcionar a suplementação de cálcio. Isso se deve ao fato de que a incorporação do lactobionato de cálcio em alimentos pode estimular a absorção intestinal do cálcio (Alonso *et al.*, 2013).

2.2 Produção do ácido lactobiônico

A síntese química do ácido lactobiônico foi realizada pela primeira vez por Fischer & Meyer (1889). Nesta reação, catalisada por bromo, ocorre a oxidação da lactose formando o ácido lactobiônico (Nordkvist *et al.*, 2007). Posteriormente, diversas metodologias de síntese química foram definidas, como a via eletroquímica e a catálise heterogênea (Gutierrez *et al.*, 2012).

Além da síntese química, há relatos da produção do ácido lactobiônico por microrganismos e síntese enzimática. Alguns exemplos são os microrganismos *Pseudomonas graveolens* (Nishizuka & Hayaishi, 1962), *Burkholderia cepacia* (N 216) (Murakami *et al.*, 2002) e *Pseudomonas taetrolens* (Alonso *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2012; Goderska *et al.*, 2014). Outro microrganismo relatado na literatura é *Zymomonas mobilis*, cujas células/enzimas são empregadas tanto na forma de suspensão (livres)

quanto imobilizadas em suportes (Bertasso *et al.*, 1996; Satory *et al.*, 1997; Malvessi, 2008; Malvessi *et al.*, 2013; Zagonel, 2013).

2.3 Bioprodução por *Zymomonas mobilis*

As bactérias do gênero *Zymomonas* são microrganismos encontrados no meio ambiente, geralmente associadas com plantas que apresentam altos teores de açúcares nas seivas (Swings & De Ley, 1977, Viikari, 1986). Dentre o gênero *Zymomonas*, *Z. mobilis* foi descoberta em 1928, por Lindner apud Swings & De Ley (1977), isolada no México a partir da seiva fermentada de *Agave atrovirens*.

Z. mobilis é uma bactéria Gram-negativa, se apresenta na forma de bacilos e é obrigatoriamente fermentativa. Este microrganismo utiliza somente glicose, frutose e sacarose como fontes de carbono, empregando a via de Entner-Doudoroff para metabolizar estes açúcares. Esta via metabólica é geralmente utilizada por microrganismos aeróbios, sendo que *Z. mobilis* é o único microrganismo anaeróbio a utilizar esta via (Gibbs & De Moss, 1954; Swings & De Ley, 1977; Doelle, 1993; Sprenger, 1996).

No periplasma das células de *Z. mobilis*, estão presentes as enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL). O mecanismo catalítico da enzima GFOR opera em “ping-pong”, onde duas meia-reações são realizadas. A glicose é oxidada a glicono- δ -lactona pela redução do NADP⁺ a NADPH, após esta coenzima é reoxidada pela redução da frutose a sorbitol (Figura 3). A enzima apresenta somente um sítio ativo para os dois substratos (glicose/frutose), portanto à medida que um substrato se liga na enzima, o outro é liberado. Seguindo a reação, a glicono- δ -lactona é convertida a ácido glicônico (gliconato) pela enzima glicono- δ -lactonase (GL), conforme mostrado na Figura 3. Em condições normais de metabolismo celular, o

gliconato (ácido glicônico) entra na via de Entner-Doudoroff e segue para a produção de etanol (Zachariou & Scopes, 1986, Hardman *et al.*, 1988).

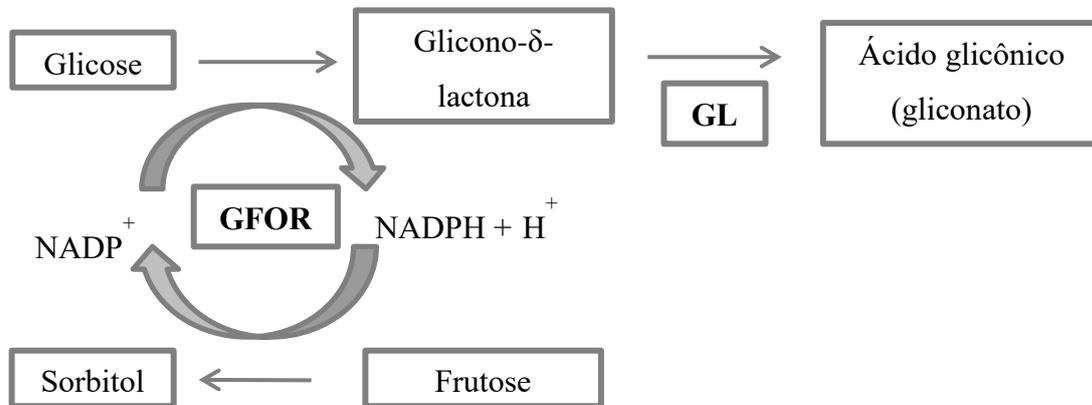


Figura 3: Conversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glicônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidorredutase (GFOR) e glicono-δ lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*.

Fonte: Adaptado de Zachariou & Scopes (1986).

Visando à formação de ácido glicônico e sorbitol, ou seja, para que o ácido glicônico seja direcionado para a via de Entner-Doudoroff, o metabolismo fermentativo deve ser inativado. Para isso, Chun & Rogers (1988), relatam a utilização de células de *Z. mobilis* tratadas com agentes permeabilizantes, que inativam o metabolismo fermentativo, impedindo a formação de etanol e o crescimento celular (Rehr *et al.*, 1991).

Além da produção do ácido glicônico pelo sistema enzimático de GFOR/GL, há relatos da oxidação de outros monossacarídeos e dissacarídeos. Satory *et al.* (1997), utilizando enzimas purificadas de *Z. mobilis*, demonstraram que GFOR/GL tem a capacidade de oxidar outros carboidratos, como maltose, xilose, arabinose, manose,

celobiose, galactose e lactose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos e sorbitol.

Malvessi (2008), em estudos com células de *Z. mobilis* livres e imobilizadas em alginato de cálcio, demonstra a capacidade da enzima GFOR em catalisar a oxidação de diversas aldoses aos seus respectivos ácidos aldônicos, bem como a redução de cetose ao respectivo poliol. Como exemplos, destaca-se a formação de ácido lactobiônico e maltobiônico a partir de lactose e maltose, respectivamente, e sorbitol.

Na produção de ácido lactobiônico, Zagonel (2013) ressalta que a formação de produto e o tempo do processo são influenciados pela concentração dos substratos lactose e frutose e da concentração de células/enzimas empregadas no início do processo.

Na Figura 4, está representada a reação catalisada pelo sistema enzimático GFOR/GL, utilizando como substratos frutose e lactose.

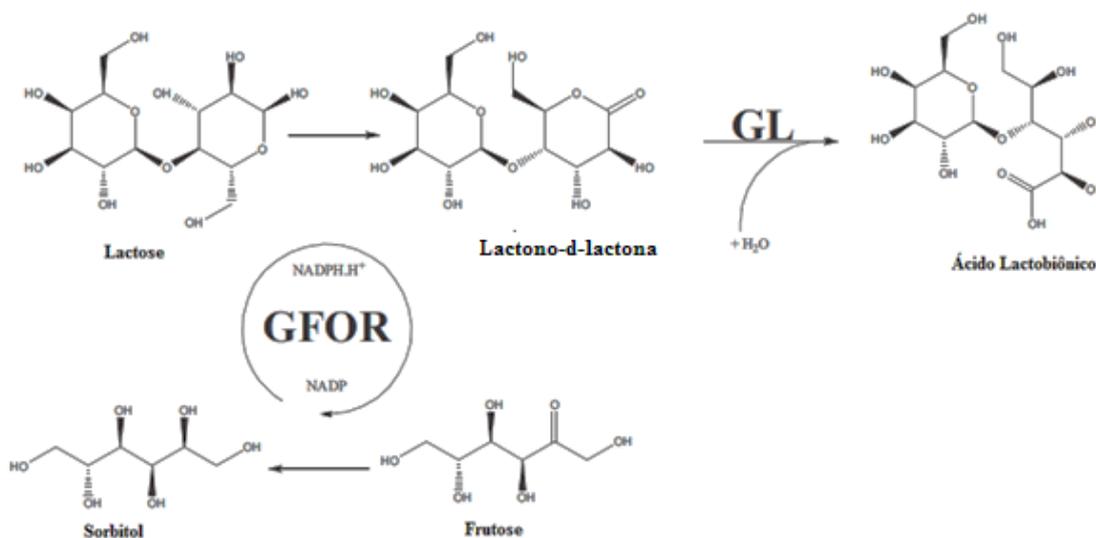


Figura 4: Reações de obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol pelo sistema glicose frutose oxidorredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*.

Fonte: Pedruzzi *et al.* (2011).

Como alternativa à utilização de células/enzimas em solução (células livres), tem sido relatada a utilização da técnica de imobilização celular. A imobilização consiste no confinamento físico das células cataliticamente ativas, impedindo que se misturem com o meio onde estão contidos os substratos e os produtos. Como vantagens da utilização de células/enzimas imobilizadas, citam-se o aumento da produtividade e a estabilidade das células. Além disso, possibilita a reutilização do catalisador e a separação dos produtos do meio reacional é facilitada (Kourkoutas *et al.*, 2004; Covizzi *et al.*, 2007). Ressaltam-se, também, algumas dificuldades que podem ocorrer com o uso das células imobilizadas, como, por exemplo, a perda ou a diminuição de atividade enzimática durante a etapa de imobilização e as questões relacionadas à difusão de substratos e produtos através do suporte (Kourkoutas *et al.*, 2004).

O processo de imobilização das células de *Z. mobilis*, juntamente com o complexo enzimático GFOR/GL, é descrito na literatura com o uso de diferentes suportes, como alginato de cálcio (Malvessi, 2008; Pedruzzi *et al.*, 2011), κ -carragena (Rehr *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1996) e, ainda, diferentes polímeros (Ferraz *et al.*, 2000; Vignoli *et al.*, 2006).

Alguns exemplos, em particular da utilização de alginato de cálcio serão descritos a seguir. Bertasso *et al.* (1996) avaliaram a atividade de GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, sendo relatada a preservação de cerca de 80% da atividade inicial após aproximadamente 350 h de processo de bioconversão em batelada. Malvessi (2008) demonstrou o emprego do sistema imobilizado GFOR/GL na produção de ácido lactobiônico e sorbitol a partir de frutose e lactose, sendo atingido rendimento médio de 75% em 24 h de processo.

Pedruzzi *et al.* (2011) avaliaram a cinética de produção de ácido lactobiônico, utilizando os substratos lactose e frutose e o sistema enzimático GFOR/GL de *Z.*

mobilis em duas formas, com células/enzimas livres e imobilizadas em alginato de cálcio. Foi relatado que a utilização de altas concentrações iniciais (700 mmol/L) de frutose, com células/enzimas livres, não afetou a formação do ácido biônico. Entretanto, para a lactose, constatou-se que a concentração é um parâmetro crítico, sendo que maiores concentrações iniciais (700 mmol/L) levaram à maior atividade do complexo enzimático. Para células imobilizadas em alginato de cálcio, foi avaliada a produção de ácido lactobiônico utilizando esferas de 1,2 mm e 1,7 mm de diâmetro. Como resultados, foi obtida uma produção de 41,6 mol/h de ácido lactobiônico utilizando esferas de 1,2 mm, no qual a resistência à transferência de massa parece não ser significativa e 33,6 mol/h utilizando esferas de 1,7 mm.

Carra (2012) relata o uso de células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio em testes de bateladas repetidas, utilizando hidróxido de sódio para controle do pH. Cerca de 85% da atividade enzimática inicial foi preservada após oito ciclos sucessivos de bioconversão, totalizando 193 h de processo. A produção do ácido lactobiônico tanto com células/enzimas livres (170 g/L) quanto imobilizadas em alginato de cálcio (168 g/L) também foi avaliada e resultou em valores praticamente idênticos ao final de 24 h de processo, obtendo-se, assim, a mesma produtividade (7,1 e 7,0 g/L/h).

Na bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol, utilizando o sistema de GFOR/GL de *Z. mobilis*, o pH do meio reacional deve ser controlado a fim de manter a atividade catalítica da enzima. Conforme o ácido lactobiônico vai sendo formado, há uma tendência de queda do pH. Para a manutenção da atividade catalítica, o pH deve ser mantido em 6,4 com adição de solução alcalina, como por exemplo o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de cálcio. Utilizando-se uma base para o controle do pH tem-se a conversão do ácido em sal de lactobionato. Como por exemplo,

os lactobionatos de sódio (Carra, 2012; Malvessi *et al.*, 2013), potássio (Zagonel, 2013; Gonçalves *et al.*, 2016) ou cálcio (Murakami *et al.*, 2008; Delagustin *et al.*, 2016).

2.4 Purificação dos sais de lactobionato e conversão para ácido lactobiônico

Em função da menor afinidade do complexo GFOR/GL por lactose, em relação à glicose, quantidades residuais de lactose e frutose são identificadas ao final da reação. As concentrações residuais são determinadas a partir do cálculo para a determinação da concentração dos produtos obtidos (Malvessi *et al.*, 2013). A separação dos sais de lactobionato, do sorbitol e dos resíduos de substratos da bioconversão, a frutose e a lactose, pode ser realizada por precipitação. Esta técnica é baseada na diferença de solubilidade dos compostos da mistura reacional na presença de solventes orgânicos (Silveira *et al.*, 2007; Carra, 2012).

Visando à recuperação do lactobionato, Silveira *et al.* (2007) descreveram o uso de sucessivas precipitações com solução hidroalcoólica 75% (v/v) ou outros solventes orgânicos. Devido à produção de etanol pelo processo fermentativo de *Z. mobilis*, é preferível a utilização deste solvente. O ácido lactobiônico é praticamente insolúvel em etanol, o sorbitol e a lactose são levemente solúveis em etanol e a frutose é solúvel em etanol (95% v/v), sendo assim, a precipitação é aplicável como forma de separação do sorbitol, lactose e frutose do sal de lactobionato (Rowe *et al.*, 2009; Carra, 2012).

Carra (2012) destacou a utilização de sucessivas precipitações do lactobionato de sódio com etanol 75% (v/v) para a recuperação da mistura reacional de bioconversão. Ao final destas etapas, o precipitado foi seco em estufa 30°C e o etanol foi recuperado por destilação fracionada. Com a finalidade de aperfeiçoar a etapa de purificação e recuperação do lactobionato de sódio, Carra *et al.* (2016) avaliou os parâmetros como a

temperatura, teor do solvente na mistura e vazão específica de adição (mL de solvente/mL de caldo/min). Como parâmetros ideais para a precipitação de lactobionato de sódio com etanol, foram definidos a vazão específica de 0,5 mL/mL/min, 45°C e teor do solvente em água de 65% (v/v). Em relação à pureza do lactobionato de sódio, 75, 88 e 100% foram alcançados na primeira, segunda e terceira precipitações, respectivamente. Os resultados foram avaliados com a utilização da ferramenta estatística Box-Behnken *design*.

Em relação à conversão do lactobionato para a forma ácida, Jones & Ho (2001) desenvolveram um processo de conversão do lactobionato de cálcio em ácido lactobiônico com a utilização de resinas de troca iônica. Carra (2012) relata a utilização de cromatografia de troca iônica para a conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico, com recuperação aproximada de 80%. Após a liofilização, o autor destaca a recuperação média de 98% em produto.

2.5 Caracterização do ácido lactobiônico e dos sais de lactobionato

Como as matérias-primas que foram empregadas neste trabalho – ácido lactobiônico e sais de lactobionato – são obtidas por bioconversão, a caracterização físico-química é fundamental (Brasil, 2003). Alguns testes recomendados para a caracterização da molécula consistem em solubilidade, ponto de fusão, estabilidade, morfologia, identidade e pureza (Ansel *et al.*, 2000; Aulton, 2005).

Carra (2012) determinou o ponto de fusão, pH, desvio óptico, umidade e açúcares redutores para o lactobionato de sódio e o ácido lactobiônico obtidos pelo sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*. Neste trabalho foram reportados os seguintes valores: ponto de fusão de 172°C e 125°C, pH de 6,38 e 2,96 (solução 10g/L), desvio óptico de +22,5 e +23,0°(solução 10%), umidade de 3,0 e 2,6%,

respectivamente, para lactobionato de sódio e ácido lactobiônico e açúcares redutores < 0,2% (m/v) para ambos os compostos.

O lactobionato de cálcio, D-ácido glicônico, 4-*O*- β -D-galactopiranosil, sal de cálcio (2:1), pode se apresentar na forma de di-hidrato ($C_{24}H_{42}O_{24}Ca \cdot 2H_2O$, massa molar 790,68 g/mol, apresenta desvio óptico entre +22,0 e +26,5°, pH entre 5,4 e 7,4 (solução 1:20) (USP, 2015).

No desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia em fase líquida para a identificação e quantificação do ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol, Pedruzzi (2010) relata a ocorrência da lactobionolactona, uma estrutura intermediária formada durante a oxidação da lactose a ácido lactobiônico. As condições para o aparecimento da lactona têm sido associadas com o pH ácido.

Utilizando uma coluna IC Sep ICE-ION-300, 75°C, 0,5 mL/min e variando-se o pH da fase móvel H_2SO_4 (4,33, 4,01, 3,71, 3,44 e 3,04), Pedruzzi (2010) demonstrou que a resolução do pico cromatográfico do ácido lactobiônico melhora quando o eluente torna-se mais ácido. Em pH < 3,1 ocorre sobreposição dos picos do ácido lactobiônico e em pH 3,1, a simetria do pico é afetada, provavelmente, devido ao surgimento da lactobionolactona. A lactobionolactona foi identificada na solução de referência após a dissolução dos cristais de ácido lactobiônico no eluente (pH ácido). A recomendação para prevenir a formação da lactobionolactona seria a solubilização em solução alcalina.

Simms *et al.* (1994) desenvolveram um método cromatográfico para a identificação e quantificação do ácido lactobiônico, lactose e a lactobionolactona. Utilizando a coluna Bio-Rad HPX-87C, 85°C, 1 mL/min e fase móvel 1,2 mmol/L de $CaSO_4$ e detector por índice de refração, a lactose e lactobionolactona co-eluíram e, posteriormente, foi identificado o pico isolado de ácido lactobiônico.

2.6 Estudos de pré-formulação e estabilidade do ácido lactobiônico e dos sais de lactobionato

Os estudos de pré-formulação tem como objetivo identificar as características físico-químicas do fármaco, o insumo ativo, antes de sua utilização em um produto farmacêutico. O conhecimento destas características auxilia na seleção adequada da formulação a qual este insumo será incorporado, na embalagem em que deverá ser mantido, bem como na verificação das melhores condições de armazenagem (ICH, 2003b; Blessy *et al.*, 2014).

Segundo a RDC nº 45 de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um insumo farmacêutico ativo (IFA) é: *“qualquer substância introduzida na formulação de uma forma farmacêutica que, quando administrada a um paciente, atua como ingrediente ativo, podendo exercer atividade farmacológica ou no efeito direto no diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de uma doença, podendo ainda afetar a estrutura e funcionamento do organismo humano”*.

Outra propriedade a ser analisada é a estabilidade físico-química. Este parâmetro é um assunto de grande preocupação, pois a perda da estabilidade pode gerar produtos de degradação, alterando o seu efeito farmacológico e, ainda, podendo levar a efeitos tóxicos. Deste modo, o insumo deve manter as características físico-químicas e a qualidade, ou seja, ser estável durante os processos de produção, transporte e armazenamento até o término do seu prazo de validade (Yoshioka & Stella, 2012; Blessy *et al.*, 2014).

A estabilidade de um produto farmacêutico também pode ser definida como a capacidade de uma formulação/insumo manter - dentro dos limites especificados, por todo o período de armazenamento e utilização - as mesmas propriedades e características iniciais (Bajaj *et al.*, 2012; Blessy *et al.*, 2014). Por isso, são necessários

estudos de estabilidade antes da comercialização de um produto. Estes estudos devem expor o insumo a condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrerem durante o prazo de validade. Entretanto, tais condições não devem ser tão extremas que, ao invés de acelerarem o envelhecimento, provoquem alterações que não ocorreriam normalmente (ICH, 2003b; Brasil, 2005; Bajaj *et al.*, 2012).

Os dados obtidos durante os ensaios são requisitos para aprovação, pelos órgãos reguladores, de qualquer insumo ativo ou formulação. No Brasil, o estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos deve ser realizado conforme a resolução RE nº 1/2005 (ANVISA), que dispõe o guia para a realização de estudos de estabilidade e pela RDC nº 45/2012 (ANVISA), que dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos e ativos. Para a realização dos testes, a ANVISA também dispõe do guia de estabilidade de produtos cosméticos (2014).

A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) disponibiliza alguns guias para estudos de estabilidade, com destaque para o Q1A (R2) *Stability Testing of New Drug Substances and Products* (2003b), Q1B *Photostability Testing of New Drug Substances and Products* (1996), Q1C *Stability Testing for New Dosage Forms* (1996) e Q3B (R2) *Impurities in New Drug Products* (2006).

Outra literatura que auxilia na avaliação de um insumo são as Farmacopeias, como um código oficial farmacêutico que estabelece os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. Entre as farmacopeias, as utilizadas neste trabalho são a brasileira, a americana (US Pharmacopoeia), a britânica (British Pharmacopoeia) e a Europeia (European Pharmacopoeia).

2.7 Fatores que afetam a estabilidade do insumo farmacêutico

Todos os fármacos podem sofrer decomposição química ou física e, dependendo da sua estrutura química, a degradação pode ser de maior ou menor intensidade. Os fatores ambientais (fatores extrínsecos) estão envolvidos diretamente na degradação de uma molécula, sendo que os principais são luz, ar e umidade. Os fatores intrínsecos também podem afetar a estabilidade do produto e são acarretados por fatores inerentes à formulação (Brasil, 2004; Aulton, 2005; Gil, 2007).

Dentre os fatores extrínsecos estão tempo, temperatura, umidade, luz, oxigênio, além do material de acondicionamento. Em relação aos fatores intrínsecos estão as incompatibilidades físicas e químicas, como pH, reações de oxidorredução, reações de hidrólise, interações entre componentes da própria formulação e com o material de acondicionamento (Brasil, 2004).

A temperatura é o mais importante dentre os fatores ambientais envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, sendo que, na maioria dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura (Kommanaboyina & Rhodes, 1999). O efeito da temperatura na velocidade da reação geralmente segue a relação de Arrhenius, em que o aumento da temperatura acelera as reações químicas, podendo facilitar a geração de produtos de degradação (Aulton, 2005).

A energia de ativação é definida como a energia mínima para que uma reação ocorra espontaneamente. Com o aumento da temperatura, a energia de ativação necessária é menor, facilitando a ocorrência da reação (Kommanaboyina & Rhodes, 1999, Yoshioka & Stella, 2000). A temperatura baixa, por sua vez, pode afetar o sistema devido à diminuição da solubilidade, podendo levar à ocorrência de precipitações (Brasil, 2004).

A luz, em determinado comprimento de onda, pode fornecer energia de ativação necessária para que ocorra uma reação de oxidorredução, ruptura de ligações e isomerizações. Juntamente com o oxigênio, pode originar a formação de radicais livres e desencadear reações de oxidorredução (Brasil, 2004; Leite, 2005).

Kim *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade térmica de uma solução de β -lachapona (100 $\mu\text{g/mL}$ em 50% acetonitrila). As soluções foram armazenadas em 4, 25, 40 e 60°C. Amostras foram retiradas nos tempos de 0, 2, 6, 24, 48, 72 h e imediatamente analisadas por cromatografia em fase líquida (CLAE) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). O estudo mostrou que a degradação ocorreu em maior velocidade na presença de temperaturas mais elevadas.

A degradação ocasionada pela umidade ocorre devido à presença de água no produto, podendo reagir, por exemplo, a partir de reações de hidrólise, hidratação e isomerização. Além disso, a água pode ser adsorvida na superfície da molécula, formando uma película e resultando na degradação do produto (Yoshioka & Stella 2000). Também podem ocorrer alterações físicas no produto, tornando-o amolecido ou pegajoso e modificando o peso e o volume (Brasil, 2004; Leite, 2005).

A hidrólise está entre os fatores intrínsecos de degradação. Quanto maior o teor de água da formulação, mais provável a ocorrência desse tipo de reação (Brasil, 2004). Essa reação ocorre quando o fármaco reage com moléculas de água, sendo que a água ataca nucleofílicamente o fármaco que for suscetível (Ansel *et al.*, 2000; Yoshioka & Stella, 2000; Aulton, 2005). Esta reação pode ser catalisada pelo pH, pela presença de cátions divalentes e pela temperatura. Por isso é necessário estudar qual a faixa de pH em que o fármaco tem menor porcentagem de hidrólise, assim definindo qual o melhor produto para a sua incorporação (Brasil, 2012a).

Chilukuri *et al.* (2014) avaliaram a degradação forçada do fármaco fosamprenavir (1 mg/mL) utilizando solução ácida (2,0 mol/L de HCl, 80°C, 12 h), básica (2,0 mol/L de NaOH, 80°C, 12 h), oxidativa (6% de H₂O₂, 80°C, 8 h), degradação térmica (105°C, sete dias) e umidade (25°C, 90% de umidade relativa, sete dias). As hidrólises básica e oxidativa resultaram na formação de uma impureza e a hidrólise ácida resultou na formação de duas impurezas. Nos demais ensaios, o fármaco se mostrou estável.

O pH é um fator capaz de acelerar ou diminuir a velocidade das reações, pois as principais reações envolvidas na degradação de fármacos são a hidrólise e a oxidação, sendo que ambas podem ser catalisadas por ácidos ou bases (Yoshioka & Stella 2000).

Carini *et al.* (2013) submeteram o extrato purificado de um biflavonoide extraído da planta *Achyrocline satureioides* às diversas condições de estresse, como temperatura (100°C, 120 min), soluções ácida (HCl 1,0 mol/L, 120 min), básica (NaOH 0,1 mol/L, 120 min) e oxidativa (14,5% de H₂O₂, 120 min) e a fotoestabilidade (radiação ultravioleta C, 254 nm, 120 min). Segundo os autores, somente a condição alcalina foi capaz de degradar a molécula.

Yatsu *et al.* (2014) desenvolveram um método quantitativo para avaliar a estabilidade de isoflavonas em diferentes matrizes complexas. A solução padrão foi submetida às condições de estresse ácida (HCl 1,0 mol/L), básica (NaOH 1,0 mol/L) e oxidativa (H₂O₂ 30%). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 60°C ou em câmara de fotoestabilidade (luz ultravioleta C, 254 nm) por sete dias. Na análise em cromatografia em fase líquida-detector UV e CLAE- EM/EM (cromatografia em fase líquida, detector de massas), foram observados produtos de degradação quando as amostras foram submetidas à solução básica com temperatura (NaOH 1,0 mol/L 60°C) e em condição básica com luz ultravioleta C (NaOH 1 mol/L UV).

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, podendo estar relacionada a fatores como a luz, traços de metais, oxigênio e agentes oxidantes. A oxidação é a perda de elétrons ou de um átomo eletropositivo ou ainda, a adição de um átomo eletronegativo. É uma reação em cadeia com a influência do oxigênio molecular (Ansel *et al.*, 2000; Aulton, 2005).

A maioria das reações de oxidação em produtos farmacêuticos está relacionada com auto-oxidação, que ocorre espontaneamente pela presença do oxigênio atmosférico. Primeiramente, ocorre a reação entre uma molécula de oxigênio com o fármaco, propagando-se por meio de um radical livre, que após reagirá com outras moléculas do fármaco (Yoshioka & Stella, 2000; Leite, 2005).

Patel *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade da citicolina sódica de acordo com ICH (2003b) e desenvolveram um método para análise. As amostras (1 mg/mL) foram submetidas à solução ácida (HCl 0,1 mol/L, 100°C por 2 h), básica (NaOH 0,1 mol/L, 100°C por 2 h), oxidativa (H₂O₂ 20%, 80°C por 2 h), fotodegradação (pó sob luz UV por sete dias) e temperatura (pó 100°C, dois dias). Após, as amostras foram analisadas por cromatografia em fase líquida. A amostra de citicolina sódica apresentou picos de degradação quando exposta às soluções ácida, básica e oxidativa.

Kakde *et al.* (2013) desenvolveram e validaram um método qualitativo para a avaliação da estabilidade do oxalato de escitalopram e do clonazepam. As amostras de escitalopram (25 mg/mL) e de colanzepam (2,5 mg/mL) foram submetidas às soluções ácida (HCl 0,1 mol/L, 50°C, 24 h), básica (NaOH 0,1 mol/L, 50°C, 24 h) e oxidativa (H₂O₂, 24 h). Para a fotoestabilidade, estas foram armazenadas em câmara de ultravioleta por 24 h. E para a temperatura, as amostras foram expostas a 60°C, por 24 h. Os autores descrevem que escitalopram e clonazepam se mostraram estáveis frente à

oxidação, temperatura e luz UV. Entretanto, foi observada uma significativa degradação quando ácido e base foram utilizados.

A fotodecomposição ou fotólise pode ocorrer devido às reações oxidativas e hidrolíticas. Quando as moléculas são atingidas pela radiação eletromagnética, estas absorvem a luz, resultando em um aumento na energia da molécula. Esse aumento de energia pode resultar em decomposição, conversão em calor, emissão de luz em outro comprimento de onda (fluorescência ou fosforescência) ou, ainda, reter ou transferir a energia (Gil, 2007).

Kim *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade do β -lactopona frente a condições de estresse. O estudo de fotodegradação foi realizado com a amostra em solução (100 $\mu\text{g/mL}$ em 50% de acetonitrila) e em estado sólido (umidade 75% e 0%). Como controle, as amostras foram protegidas da luz com papel alumínio. Utilizou-se luz de xenon (UV-vis, 320–800 nm) a 45°C e, após, foram analisadas por CLAE e CL-EM. O estudo mostrou a presença de três produtos de degradação na amostra em solução, observando-se também, mudança de coloração do produto. Na amostra sólida, também houve mudança de coloração da amostra em relação ao controle. Também, foi constatada uma queda significativa na concentração da amostra em relação ao controle. Os autores destacam que, na presença de umidade (75%), ocorreu uma maior queda na concentração da β -lactopona em relação às amostras expostas a 0% de umidade.

A cinética química estuda a velocidade na qual os processos de degradação ocorrem. A determinação da estabilidade e do prazo de validade de fármacos e medicamentos baseia-se na cinética de reação, isto é, no estudo da velocidade de degradação e do modo como essa velocidade é influenciada pelos excipientes e outras substâncias que possam estar presentes, assim como por fatores extrínsecos (Prista *et al.*, 1990; Auton, 2005).

O método de Arrhenius apresenta a relação entre a velocidade de reação e a temperatura. Este método consiste em expor o fármaco a diferentes condições de temperatura - superiores à normal - e acompanhar, em tempos determinados, o decréscimo da concentração da substância ativa (Auton, 2005; Leite, 2005).

As reações de degradação de primeira ordem ocorrem quando a degradação do fármaco é diretamente proporcional à concentração em relação ao tempo, ou seja, a degradação depende linearmente da concentração do insumo. Nas reações de segunda ordem, a velocidade de reação é proporcional a dois reagentes. Nas reações de ordem zero, a velocidade de reação é independente da concentração da droga e é constante em relação ao tempo (Aulton, 2005; Waterman & Adami, 2005).

No estudo de estabilidade, Kim *et al.* (2016) determinaram a cinética de degradação da β -lachapona em diferentes testes de estresse. Quando a amostra é submetida à luz UV, a concentração da amostra depende do tempo de exposição. Quando plotado o gráfico correlacionando o tempo e a concentração, o coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9980, sugerindo que esta reação de degradação ocorra segundo a cinética de ordem zero. Neste mesmo estudo, também foram determinadas as cinéticas de degradação ácida, neutra e básica. Plotando gráfico semi-logarítmico da concentração remanescente de β -lachapona *versus* o tempo, o coeficiente de determinação (r^2) foi de aproximadamente 0,99 para os três casos, sugerindo que a reação de degradação ocorra seguindo a cinética de primeira ordem.

2.8 Testes de estabilidade e prazo de validade

A estabilidade de um produto químico geralmente se refere à habilidade do composto em resistir à decomposição. Em termos farmacêuticos, estabilidade refere-se

ao tempo de armazenamento onde nenhum produto de degradação esteja em concentração suficiente para representar um risco ao paciente (ICH, 2003a).

O estudo da estabilidade abrange um conjunto de métodos qualitativos e quantitativos realizados em produtos ou fármacos que são submetidos a diferentes condições de armazenagem. O principal objetivo é verificar a formação de produtos de degradação e estabelecer o prazo de validade (ICH, 2003b; Gil, 2007).

O Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade (RE n° 1, 2005) da ANVISA estabelece os testes a serem realizados a fim de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade de um produto farmacêutico. Este guia determina a realização dos testes de estabilidade acelerada, de acompanhamento e de longa duração (Brasil, 2005). Na resolução da ANVISA que dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFA) (RDC n° 45, 2012), é estabelecido que, além dos testes citados acima, sejam realizados testes de degradação forçada e de fotoestabilidade (Brasil, 2012).

O estudo de estabilidade acelerada é projetado para acelerar a possível degradação física ou química de insumos ou produtos farmacêuticos. Neste estudo, o produto é submetido às condições forçadas de envelhecimento durante o armazenamento (Brasil, 2012). Este tipo de estudo demonstra o que ocorreria no produto farmacêutico quando este fosse submetido às condições normais de armazenamento por longo período de tempo. Na grande maioria das vezes, o estudo de longa duração confirma o prognóstico dado pelo estudo acelerado (Brasil, 2012).

Por sua vez, o estudo de estabilidade de longa duração é realizado com condições climáticas normais para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do insumo após um período de tempo pré-estabelecido. Os

resultados são utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade do produto (Brasil, 2012).

Os testes de degradação forçada auxiliam na identificação de prováveis produtos de degradação e, também, nesta etapa, são desenvolvidos os procedimentos analíticos que serão utilizados no estudo de estabilidade. Nestes testes, devem ser incluídos os efeitos da temperatura, umidade, oxidação, luz e a susceptibilidade à hidrólise em ampla faixa de pH. O ensaio de fotoestabilidade é realizado para verificar se exposição à luz resultaria em alterações no IFA (Brasil, 2012). Diversos autores relatam a realização de testes de estresse a fim de desenvolver e validar metodologias para a análise do insumo e possíveis produtos de degradação (Carini *et al.*, 2013; Kakde *et al.*, 2013; Yatsu *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016).

A ANVISA, em 2008, lançou o Informe Técnico (IT) nº 1, contendo diretrizes e especificações para conduzir os estudos de degradação forçada. Este informe técnico preconiza as condições que as amostras do produto farmacêutico devem ser submetidas, descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de estresse definidas pelo Informe Técnico 01/2008 para estudo de degradação forçada.

Teste	Metodologia
Solução ácida	0,1 mol/L de HCl
Solução básica	0,1 mol/L de NaOH
Solução oxidativa	3% de H ₂ O ₂ (v/v)
Fotólise	UV-B fluorescente
Aquecimento	60°C
Umidade	75% UR ou superior
Íons metálicos (opcional)	0,05 M Fe ²⁺ ou Cu ²⁺

Fonte: (Brasil, 2008).

Além do que determina a legislação, alguns autores realizam os testes de estresse com pequenos ajustes de metodologia. Por exemplo, Patel *et al.* (2011) e Kakde *et al.* (2013) utilizaram soluções ácida e básica concomitantemente com temperatura elevada. Kim *et al.* (2016) avaliaram a fotoestabilidade com umidade e sem umidade. Yatsu *et al.* (2014) utilizou solução oxidativa a 30% e Carini *et al.* (2013) relata o emprego de solução oxidativa de 14,5%.

Assim, este trabalho visa ao aprimoramento dos conhecimentos acerca da produção, purificação e controle de qualidade dos sais de lactobionato e do ácido lactobiônico, sendo estas informações essenciais para a potencial utilização destes insumos como matérias primas na área farmacêutica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bioprodução de células/enzimas

3.1.1 Microrganismo e meios de cultivo

A bactéria utilizada neste estudo foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirida do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (RFA). As culturas foram mantidas em meio líquido e estocadas a 4°C (Malvessi *et al.*, 2006).

O meio de cultivo utilizado para a ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e na produção de biomassa/enzimas está descrito na Tabela 2 (Malvessi *et al.*, 2006). A solução de glicose foi preparada separadamente e, após, foi adicionada ao meio de cultivo. A esterilização de todos os meios e da solução de glicose foi realizada em autoclave, a 1 atm, por 15 min.

Tabela 2: Composição do meio de cultivo utilizado para a ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e na produção de biomassa/enzimas.

Componente	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
KH ₂ PO ₄	3,5
Extrato de levedura bruto (Prodex Lac®, Prodesa S.A., Brasil)	7,5
Glicose	
ativação e conservação das culturas	20
obtenção de inóculo	100
cultivo em biorreator	150

3.1.2 Produção de células/enzimas de *Zymomonas mobilis*

A produção de células e enzimas foi realizada em três etapas, iniciando com a ativação da cultura, seguida do preparo do inóculo e, por fim, a realização do cultivo em biorreator.

A ativação celular foi realizada a partir da cultura de *Z. mobilis* em estoque, a 4°C. Para isso, foram inoculados 4 mL da suspensão bacteriana em 36 mL de meio de ativação, sendo mantidos em estufa, a 30°C por 12 h.

Posteriormente, o inóculo foi preparado em frascos contendo 450 mL de meio, inoculado com 45 mL da cultura previamente ativada e pH controlado em 5,5 com adição de 5 g/L de CaCO₃ (Malvessi *et al.*, 2006). Os meios foram incubados a 30°C, sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U/H – B. Braun Biotech, RFA), sob anaerobiose, por 10 h. Nos frascos, foram acoplados filtros para permitir a injeção inicial de N₂, assim obtendo-se a anaerobiose e, posteriormente, para a liberação de CO₂ decorrente do metabolismo microbiano.

Na produção de biomassa e enzimas em biorreator, adicionou-se ao meio de cultivo, um volume de inóculo necessário para a obtenção de uma concentração celular correspondente a vinte unidades de densidade óptica (D.O.). O cultivo foi realizado em regime descontínuo, em fermentador de bancada de 7,0 litros de volume total e 5,5 litros de volume útil, em anaerobiose. A temperatura foi mantida a 30°C, agitação de 450 rpm e controle de pH em 5,5 pela adição automática de NaOH 5 mol/L (Malvessi *et al.*, 2006). Ao término do cultivo, o meio fermentado foi centrifugado (Centrífuga Sigma 4K-15), a 6000 rpm, por dez minutos. A biomassa foi ressuspensa em água destilada para posterior utilização.

Para a obtenção de um maior volume de células/enzimas de *Z. mobilis* necessários para a realização, em particular, dos testes de estabilidade, foram realizados

quatro cultivos seguidos, em bateladas por cortes (pé de cuba), sendo mantidos os mesmos parâmetros de processo citados anteriormente.

3.1.3 Permeabilização e imobilização de células/enzimas de *Zymomonas mobilis*

A permeabilização celular foi realizada com o intuito de inativar o metabolismo fermentativo bacteriano e evitar que, nos ensaios de bioconversão, ocorresse o crescimento celular e conversão do substrato em etanol. Para isso, a suspensão celular foi concentrada a 25 g/L e, então, adicionado 0,2% (m/v) de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB). A mistura foi mantida em agitação magnética, a 4°C, por 10 min. Ao final, a mistura foi novamente centrifugada a 6000 rpm (Centrífuga Sigma 4K-15) por 10 min. Em seguida, procedeu-se a etapa de tratamento com glutaraldeído 0,5% (m/v). Para isso, as células foram diluídas a 50 g/L e, então, adicionou-se um volume de glutaraldeído 25% (m/v) necessário para a obtenção de uma concentração de 0,5% (m/v). A mistura foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente, por 10 min e, ao final, a suspensão foi centrifugada a 6000 rpm (Centrífuga Sigma 4K-15) por 10 min e ressuspensa a 70 g/L em água (Carra, 2012).

Para a etapa de imobilização, inicialmente, alginato de sódio Algogel 5540 (Degussa Flavors & Fruit Systems do Brasil Ltda.) foi dissolvido em água (4% m/v) e, após a completa dissolução, foi adicionado igual volume da suspensão de células (70 g/L), previamente tratadas com glutaraldeído.

Para a obtenção de esferas de alginato de cálcio, todo o volume da mistura foi lentamente gotejado em solução de CaCl₂ 0,3 mol/L, com auxílio de um sistema composto por agulhas hipodérmicas e uma bomba peristáltica (Figura 5). Após esta etapa, as esferas foram reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v), sob agitação

magnética, em temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$). Para o armazenamento, as esferas foram mantidas em água pH 7,0, a 4°C (Carra, 2012).

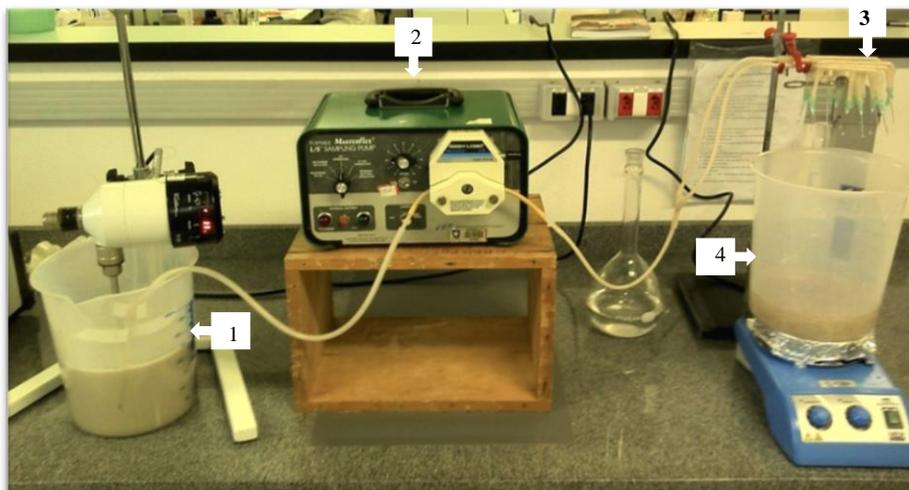


Figura 5: Sistema utilizado para a imobilização de *Zymomonas mobilis* em alginato de sódio. [1] solução de alginato de sódio + suspensão celular de *Z. mobilis*; [2] bomba peristáltica; [3] agulhas hipodérmicas; [4] esferas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

3.2 Ensaios de bioconversão

3.2.1 Ensaios de bioconversão em menor escala

Os ensaios de bioprodução de sorbitol e lactobionato foram realizados em reator encamisado contendo 0,35 L de solução de frutose (600 mmol/L) e lactose (700 mmol/L), 20 g/L de biocatalisador imobilizado, pH controlado em 6,4 a 39°C . A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, com pH controlado pela adição automática de solução 7,0 mol/L de NaOH ou de KOH (Figura 6), sendo, desta forma, obtidos lactobionatos de sódio ou de potássio, respectivamente.

Quando o hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) foi utilizado para controlar o pH da reação enzimática, formando o lactobionato de cálcio, este foi adicionado na forma de pó devido a sua baixa solubilidade em água. O consumo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ durante a reação

foi avaliado pela alteração de massa em balança semi-analítica (Figura 7). Os ensaios de bioconversão foram realizados em triplicata.

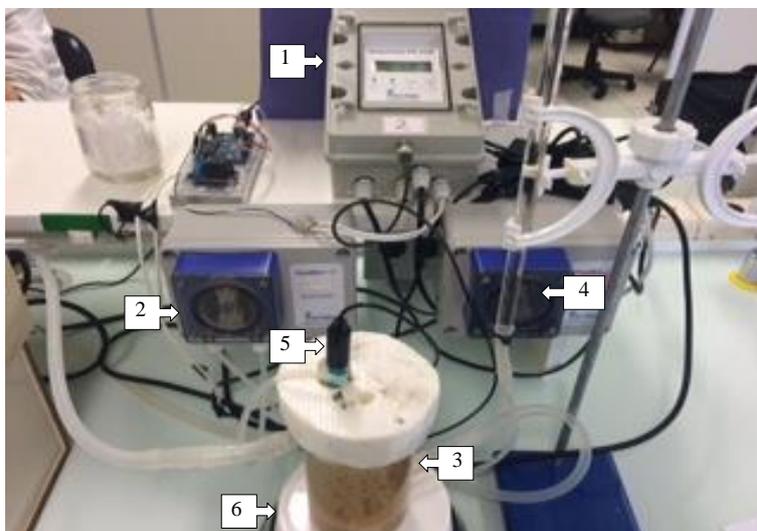


Figura 6: Sistema utilizado nos ensaios de bioconversão utilizando solução de NaOH ou KOH 7,0 mol/L para o controle do pH da reação. [1] controlador de pH; [2] bomba peristáltica; [3] reator enzimático encamisado; [4] bureta; [5] sonda de pH; [6] agitador magnético.



Figura 7: Sistema de bioconversão utilizando Ca(OH)_2 para o controle do pH. [1] controlador de pH; [2] biorreator encamisado; [3] balança; [4] sistema para adição do Ca(OH)_2 ; [5] sonda de pH; [6] agitador magnético.

3.2.2 Ensaios de bioconversão em maior escala

Para a obtenção dos compostos em quantidade suficiente para a realização dos testes de estabilidade, os ensaios de bioconversão foram realizados em maior volume de reação.

Para a produção de lactobionato de sódio, utilizou-se biorreator encamisado contendo 2,5 L de solução de frutose (600 mmol/L) e lactose (700 mmol/L), 20 g/L de biocatalisador imobilizado, pH controlado em 6,4 pela adição automática de solução 7,0 mol/L de NaOH, a 39°C. A mistura reacional foi mantida sob agitação mecânica, a 150 rpm, usando a unidade operacional de controle do biorreator Biostat B (B. Braun Biotech, Sartorius). As duas turbinas, distribuídas no eixo central do biorreator, tiveram suas pás recobertas com uma capa de silicone com o intuito de reduzir o cisalhamento sobre as esferas. A bioprodução foi conduzida por um período de tempo necessário para que fosse atingida conversão média de 80% em produto.

Para a obtenção de lactobionato de potássio, utilizou-se biorreator encamisado contendo 1,3 L de solução de frutose (600 mol/L) e lactose (700 mol/L), 20 g/L de biocatalisador imobilizado, pH controlado em 6,4 pela adição automática de solução alcalina 7,0 mol/L de KOH, a 39°C. A mistura reacional também foi mantida sob agitação mecânica, com uma turbina envolta com borracha (a 150 rpm) e foi conduzida até a obtenção de 80% de conversão.

Para a etapa de bioprodução do lactobionato de cálcio foi utilizado biorreator encamisado contendo 0,65 L de solução de frutose (600 mmol/L) e lactose (700 mol/L), 20 g/L de biocatalisador imobilizado, a 39°C e pH controlado em 6,4 pela adição automática de Ca(OH)_2 , formando o lactobionato de cálcio. A mistura reacional foi mantida sob agitação mecânica, a 150 rpm. Foram realizadas duas bioconversões sendo, conduzidas até a obtenção de 80% de conversão.

3.2.3 Bateladas repetidas de bioconversão

Uma das vantagens da utilização de células/enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização do biocatalisador, avaliado em bateladas repetidas de bioconversão. Estes testes foram realizados para a obtenção dos lactobionatos de potássio e de cálcio. Foram conduzidos quatro ciclos de bioconversão de 24 h de duração. Ao término do primeiro ciclo, as esferas foram removidas do meio reacional, lavadas com água pH 7,0. Posteriormente, as esferas utilizadas na bioprodução do lactobionato de potássio, foram tratadas com CaCl_2 0,3 mol/L por 10 min. Em seguida, nova solução de frutose (600 mmol/L) e de lactose (700 mmol/L) foram preparadas para dar início a um novo ciclo de bioconversão.

Na Figura 8 é apresentado o fluxograma com as etapas dos quatro ciclos de bioconversão. Os ensaios de bioconversão em batelada foram realizados em triplicata.

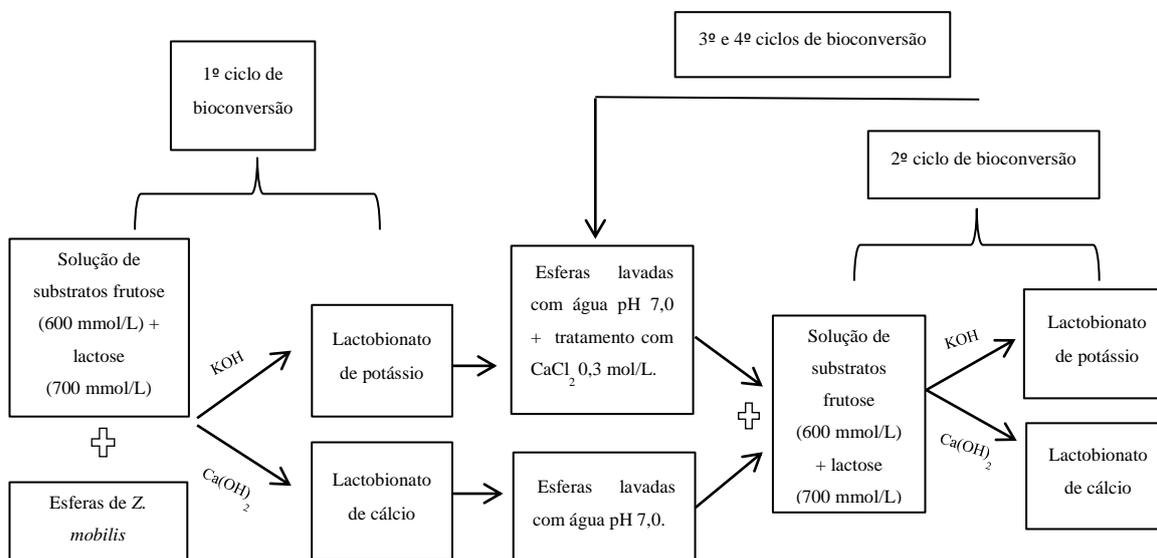


Figura 8: Fluxograma da bioprodução dos lactobionatos de potássio e cálcio, em bateladas repetidas, utilizando células/enzimas de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

3.3 Purificação dos produtos da bioconversão e conversão para a forma ácida

3.3.1 Purificação dos produtos da bioconversão

A separação dos produtos lactobionato (sódio, potássio e cálcio), sorbitol e dos substratos residuais lactose e frutose presentes no meio reacional, ao final do processo de bioconversão, foi realizada pela técnica de precipitação com solventes orgânicos. Para isso, foi adicionado um volume de solução hidroalcoólica 96% (v/v) a 30 mL da mistura final do processo de bioconversão até a obtenção de uma concentração hidroalcoólica final de 75% (v/v). O solvente foi adicionado à solução em vazão de 9 mL/min, controlada por meio de uma bomba peristáltica, a 25°C, sob agitação magnética (Figura 9).

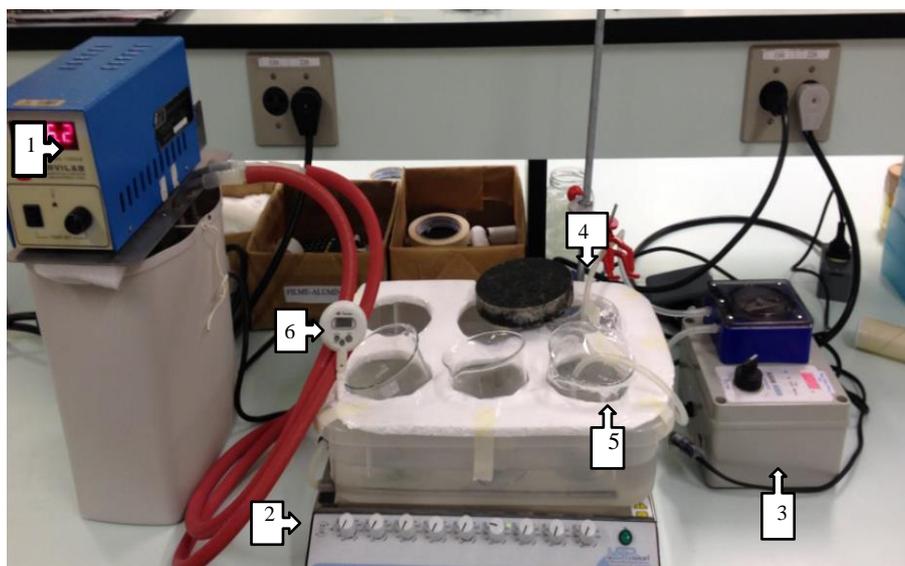


Figura 9: Purificação dos sais de lactobionato por precipitação em etanol.

- [1] Banho termostático; [2] agitador magnético; [3] bomba peristáltica;
[4] recipiente para adição de etanol; [5] recipiente para o caldo da bioconversão;
[6] termômetro.

Posteriormente, as soluções foram armazenadas em temperatura inferior a 0°C por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi solubilizado em água destilada até a obtenção do volume de caldo utilizado inicialmente.

Para a obtenção de elevado grau de pureza do lactobionato, os procedimentos de precipitação e solubilização foram repetidos por mais duas vezes. Ao final das três etapas de purificação, o solvente remanescente foi evaporado em capela de exaustão de gases e, em seguida, seco em estufa, a 25°C. Após a secagem, o pó foi triturado, com auxílio de um almofariz e pistilo e armazenado em dessecador. Para a verificação da pureza, tanto o caldo final da bioconversão quanto o produto final foram analisados por cromatografia líquida. A recuperação do etanol resultante das etapas de precipitação foi realizada por destilação fracionada. Os ensaios de precipitação foram realizados em triplicata.

Para a purificação dos compostos a serem utilizados nos ensaios de estabilidade acelerada, longa duração e degradação forçada, esta etapa foi realizada em maior volume reacional. Para a purificação do lactobionato de sódio, o caldo final da bioconversão foi separado em duas partes de 1,0 L. Para a purificação do lactobionato de potássio utilizou-se 1,0 L e, para o lactobionato de cálcio, foi utilizado 0,8 L do caldo. Etanol 96% (v/v) foi adicionado ao caldo final das respectivas bioconversões até que fosse atingida concentração de solvente de 70% (v/v), sendo adicionado à solução em vazão de 500 mL/min, a 45°C, sob agitação mecânica (Oliveira *et al.*, 2015). Posteriormente, seguiram-se as mesmas etapas descritas anteriormente.

3.3.2 Conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico

Para a conversão do lactobionato de sódio à sua forma ácida – ácido lactobiônico – foi utilizado o método de cromatografia por troca iônica, conforme proposto por Carra (2012). Para isso, utilizou-se o lactobionato de sódio purificado na etapa anterior, sendo que todo o pó obtido ao final da purificação foi diluído em água destilada. Inicialmente, a resina catiônica ácida forte Amberlite IRA-120 (Vetec Química Fina) foi mantida por aproximadamente 24 h em água destilada. Posteriormente, cerca de 90 mL de resina foram introduzidos na coluna e, em seguida, foram realizadas duas lavagens com água destilada. Para a ativação da resina, 100 mL de HCl 1,0 mol/L foram introduzidos na coluna e mantidos sob circulação com auxílio de uma bomba peristáltica, por 20 min. A resina foi, então, lavada com água destilada, para a remoção do excesso de HCl, até a obtenção de pH 4,7. O sistema empregado nos testes de conversão de lactobionato em ácido lactobiônico é mostrado na Figura 10.

A solução de lactobionato de sódio foi introduzida na coluna e mantida em circulação, sendo que a remoção da amostra foi realizada somente após a queda do pH para 2,80. Ao final do processo, adicionou-se água destilada para auxiliar na remoção do ácido lactobiônico retido na resina, sendo a coleta cessada quando observado o aumento do pH para 3,4. O procedimento foi repetido até que todo o lactobionato de sódio fosse convertido a ácido lactobiônico.

A posterior cristalização do ácido lactobiônico foi realizada em liofilizador (Liofilizador de bancada FreeZone, 4,5 L) operado com pressão de vácuo abaixo de 500 mmHg e temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 h. Posteriormente, o produto liofilizado foi triturado com auxílio de um almofariz e pistilo e armazenado em dessecador (Carra, 2012). Para a verificação da pureza do produto final, este foi analisado por cromatografia em fase líquida.



Figura 10: Sistema empregado na conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico. [1] sonda de pH; [2] válvula para a saída da amostra; [3] válvula para a entrada da amostra; [4] válvula para a circulação; [5] bomba peristáltica; [6] resina catiônica ácida; [7] entrada da amostra.

3.4 Testes de estabilidade

3.4.1 Testes de estabilidade acelerada

O teste de estabilidade acelerada foi realizado em câmaras climáticas (Nova Ética 420/ CLD) a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ de UR (zona climática IV - quente e úmida), nas dependências da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As amostras de lactobionato de sódio, lactobionato de potássio, lactobionato de cálcio, ácido lactobiônico e ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich) foram distribuídas, em triplicata, em frascos de polietileno de alta densidade com tampa, de 50 mL (FADA Plásticos, Glorinha/RS), para análise em três e seis meses (Brasil, 2012).

Para a análise inicial utilizaram-se aproximadamente 3 g de amostra; para a análise de três meses foram armazenados aproximadamente 3 g de amostra em cada frasco e, para a análise final de seis meses, em torno de 6 g. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.2 Testes de estabilidade de longa duração

O teste de estabilidade de longa duração foi realizado em câmaras climáticas (Nova Ética 420/ CLD) $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\pm 5\%$ UR (zona climática IV - quente e úmida), nas dependências da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As amostras de lactobionato de sódio, lactobiona de potássio, lactobionato de cálcio, ácido lactobiônico e ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich) foram divididas, em triplicata, em frascos de plástico (polietileno de alta densidade de 50 mL com tampa- FADA plásticos) para análise no tempo zero, três, seis, nove, doze, dezoito e 24 meses (Brasil, 2012). Para a análise de zero, três, seis, nove, doze, dezoito meses foram armazenados aproximadamente 3 g em cada frasco e para a análise final de 24 meses, 6 g. Ressalta-se que as amostras foram analisadas, neste trabalho até o período de seis meses de testes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.3 Testes de degradação forçada

Os testes de degradação forçada foram realizados com o lactobionato de sódio, lactobionato de potássio, lactobionato de cálcio e ácido lactobiônico, este obtido via ação do sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.3.1 Ação da temperatura

As amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico foram submetidas às temperaturas de 60 e 80°C por quinze dias (Brasil, 2008). Para cada composto, 1,5 g de amostra foi adicionado em uma placa de Petri, em triplicata, e mantido em estufa a 60 e 80°C. Nos dias 2, 6, 10, 12 e 15, foram coletadas amostras e, posteriormente, foram diluídas em água Milli-Q, em concentração de 10 g/L e analisadas por cromatografia em fase líquida. Os ensaios de precipitação foram realizados em triplicata.

3.4.3.2 Degradação ácida ou básica

Para os testes de degradação em pH ácido, foram utilizadas soluções de HCl 0,01, 0,1 e 1 mol/L, por um tempo de exposição de dez dias (Brasil, 2008). Para cada amostra, foi preparada uma solução inicial de 20 g/L. A esta solução adicionou-se o mesmo volume da solução de HCl (0,01, 0,1 e 1 mol/L).

Em relação à degradação em pH alcalino, foram utilizadas soluções de NaOH 0,01, 0,1 e 1,0 mol/L, por um período de dez dias (Brasil, 2008). Para cada amostra, foi preparada uma solução inicial de 20 g/L e, após, adicionou-se o mesmo volume da solução de NaOH (0,01, 0,1 e 1,0 mol/L). Para ambos os testes, as amostras foram coletadas nos tempos de exposição de 0, 3, 5, 10, 17, 24, 48, 120 e 240 h e, posteriormente, analisadas por cromatografia em fase líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.3.3 Degradação oxidativa

Para os testes de degradação oxidativa foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% (v/v), sendo as amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do

ácido lactobiônico expostas a este agente por um período de dez dias (Brasil, 2008). Para cada amostra de concentração inicial de 20 g/L, foi adicionado volume necessário de H₂O₂ 30% (m/v) necessário para a obtenção de uma concentração de 3% (v/v). As amostras foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3, 24, 48, 72 e 240 h, diluídas para 10 g/L e analisadas por cromatografia em fase líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.3.4 Fotoestabilidade

No estudo de fotoestabilidade, as amostras dos lactobionato de sódio, potássio e cálcio e de ácido lactobiônico foram acondicionadas em mini placas de Petri (0,5 g em cada placa), em triplicata, e acondicionadas em uma câmara com lâmpada de irradiação UVA/UVB (Ecolume) e lâmpada branca fluorescente fria (Ecolume) (Figura 11). Os controles foram mantidos na câmara ao abrigo a luz (cobertos por papel alumínio), permitindo avaliar, desta forma, a contribuição das possíveis mudanças ambientais dentro da câmara. Foi realizado controle de temperatura no interior da câmara com o uso de termo-higrômetro e as coletas foram realizadas nos tempos 30, 60 e 90 dias (Brasil, 2008; Brasil, 2012). As amostras foram analisadas por cromatografia em fase líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Figura 11: Câmera espelhada com lâmpada de irradiação UVA/UVB e lâmpada branca fluorescente, utilizada na execução dos ensaios de fotoestabilidade dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico.

3.4.3.5 Cinética de degradação

A partir dos resultados do doseamento dos ensaios de degradação são plotados os gráficos de Concentração (C) x Tempo (t), $\log C \times t$ e $1/C \times t$, que correspondem às reações de ordem zero, primeira e segunda ordem, respectivamente. A representação gráfica que melhor se ajustar a uma reta determinará a ordem de reação, sendo que a inclinação determinará a constante de velocidade (k) da reação de degradação, em cada temperatura (Auton, 2005; Leite, 2005).

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular do inóculo foi estimada, em triplicata, por densidade óptica. As amostras foram diluídas e a leitura de absorbância das suspensões celulares foi feita em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210), a 560 nm (Carra, 2012).

No cultivo em biorreator, a quantificação celular foi realizada, em triplicata, por gravimetria. Amostras de 3 mL do meio de fermentação foram centrifugadas a 6000 rpm, por 10 min (Sigma, modelo 4-15), sendo o sobrenadante descartado e a massa obtida lavada duas vezes com água destilada. A massa de células centrifugada foi ressuspensa em água destilada e então transferida para cadinhos de porcelana, incubados em 90-95°C até a completa secagem.

3.5.2 Determinação de açúcares redutores (AR)

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico – DNS (Miller, 1959). Para esta análise, a 0,25 mL de amostra previamente diluída foi adicionado 0,75 mL de reagente DNS. As amostras foram mantidas em banho a 100°C por 5 min, sendo, posteriormente, colocadas em banho de gelo por 2 min. Ao final desta etapa, foi adicionado 4 mL de água destilada e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210), a 545 nm e convertidas em concentração (g/L) empregando uma curva padrão de glicose (0,1 e 1,0 g/L).

3.5.3 Estimativa da concentração de substratos e produtos em ensaios de bioconversão

A concentração de lactobionato de sódio, lactobionato de potássio e lactobionato de cálcio formados nos ensaios de bioconversão foram definidas de acordo com o volume e a concentração de base utilizada durante a reação para o controle do pH (Malvessi, 2008). Os produtos da reação, ácido lactobiônico (lactobionatos de sódio e de potássio) e sorbitol são formados em base equimolar (1:1). Assim, os substratos lactose e frutose são consumidos na mesma proporção.

No caso do lactobionato de cálcio, a reação de oxidação da lactose é 2:1, ou seja, a cada 2 mol de lactose é formado 1 mol de lactobionato de cálcio, da mesma maneira que é 1:2 em relação ao sorbitol. Neste caso, para a frutose e sorbitol, seria 1:1.

A partir disso, as concentrações de sorbitol e dos substratos foram estimadas indiretamente em função do volume e da concentração das soluções de NaOH ou de KOH e da massa adicionada de Ca(OH)_2 , utilizada para titular o respectivo ácido formado na reação.

Para a determinação das concentrações dos produtos formados e dos substratos consumidos na bioprodução dos lactobionatos de sódio ou potássio, foram utilizadas as Equações 1 e 2. A Equação 1 foi utilizada para calcular as concentrações dos produtos lactobionato de sódio, lactobionato de potássio e sorbitol.

$$C = \frac{(V_{\text{base}} \times M \times MM)}{(V_{\text{total}} + V_{\text{base}})} \quad (1)$$

Onde:

C, concentração de produto formado (g/L);

V_{base} , volume de base (mL);

M, concentração de base (mol/L);

MM, massa molar do produto (lactobionato de sódio, 380,28 g/mol; lactobionato de potássio, 396,39 g/mol; sorbitol, 182,17 g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão (mL).

A Equação 2 foi utilizada para determinar a quantidade dos substratos lactose e frutose restantes.

$$S = S_0 - \left[\frac{(V_{\text{base}} \times M \times MM_{\text{substrato}})}{(V_{\text{total}} + V_{\text{base}})} \right] \quad (2)$$

Onde:

S, concentração de substrato restante (g/L);

S_0 , concentração de substrato inicial (g/L);

V_{base} , volume de base (mL);

M , concentração de base (mol/L);

$MM_{\text{substrato}}$, massa molar do substrato (lactose, 360 g/mol; frutose, 180 g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão (mL).

As Equações 3, 4, 5 e 6 foram utilizadas para calcular as concentrações dos produtos formados e dos substratos consumidos na bioprodução do lactobionato de cálcio.

A Equação 3 foi utilizada para determinar a concentração do lactobionato de cálcio formado na bioconversão.

$$C = \frac{g_{\text{base}} \times MM \times 1000}{V_{\text{total}} \times MM2} \quad (3)$$

Onde:

C , concentração de produto formado (g/L);

g_{base} , massa da base (g);

MM , massa molar do produto (lactobionato de cálcio, 754,65 g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão (mL);

$MM2$, massa molar do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (74,09 g/mol).

A Equação 4 foi utilizada para calcular a concentração do sorbitol formado na bioconversão.

$$C_{\text{produto formado}} = \left[\frac{(g_{\text{base}} \times MM \times 1000)}{(V_{\text{total}} \times MM2)} \right] \times 2 \quad (4)$$

Onde:

C , concentração de produto formado (g/L);

g_{base} , massa da base (g);

MM, massa molar do produto (sorbitol, 180,17 g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão (mL);

MM2, massa molar do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (74,09 g/mol).

Para determinar a quantidade de lactose residual durante o processo de bioprodução do lactobionato de cálcio, foi empregada a Equação 5.

$$S = S_0 - \left[\frac{(C_{L\text{Ca}} \times S_0)}{(C_{\text{max LCa}})} \times \text{MM} \right] \quad (5)$$

Onde:

S, concentração de lactose restante (g/L);

S_0 , concentração de lactose inicial (mol/L);

$C_{L\text{Ca}}$, concentração de lactobionato de cálcio formado (mol/L);

$C_{\text{max LCa}}$, concentração máxima teórica de lactobionato de cálcio (mol/L);

MM, massa molar do substrato (lactose – 360 g/mol).

Em relação à quantidade de frutose residual durante o processo de bioprodução do lactobionato de cálcio, a determinação foi baseada na Equação 6.

$$S = S_0 - \left[\frac{(C_{\text{Sorb}} \times S_0)}{(C_{\text{max Sorb}})} \times \text{MM} \right] \quad (6)$$

Onde:

S, concentração de frutose restante (g/L);

S_0 , concentração de frutose inicial (mol/L);

C_{Sorb} , concentração de sorbitol formado (mol/L);

$C_{\text{max LCa}}$, concentração máxima teórica de sorbitol (mol/L);

MM, massa molar do substrato (frutose, 180 g/mol).

3.5.4 Parâmetros de avaliação do processo de bioconversão

3.5.4.1 Conversão de substrato em produto

A conversão de substrato em produto (Y_{P/S_0}) foi determinada pela relação entre o lactobionato formado e a concentração de lactose inicial, segundo a Equação 7.

$$Y_{P/S_0} = \frac{P_f}{S_0} \quad (7)$$

Y_{P/S_0} , conversão de substrato em produto (mmol/mmol);

P_f , concentração do lactobionato ou ácido lactobiônico formado (mmol);

S_0 , concentração de lactose inicial (mmol).

3.5.4.2 Produtividade molar

A produtividade molar (P_m) foi calculada pela divisão do lactobionato formado pelo tempo de processo, segundo a Equação 8.

$$P_m = \frac{P_f}{t} \quad (8)$$

Onde:

P_m , produtividade molar (mmol/h);

P_f , concentração do lactobionato formado (mmol);

t , tempo de processo (h).

3.5.4.3 Produtividade específica

A produtividade específica (q) foi calculada pela divisão de P_m pela biomassa celular utilizada na bioconversão, baseada na Equação 9.

$$q = \frac{P_m}{M_x} \quad (9)$$

Onde:

q , produtividade específica (mmol/g/h);

P_m , produtividade molar (mmol/h);

M_X , biomassa celular seca (g).

3.5.4.4 Velocidade específica de formação de produtos

A velocidade específica de formação de produto (μ_P) foi determinada pela derivação de curvas relacionando mmol de produto formado em função do tempo (Equação 10) e em função da concentração de lactose (Equação 11), sendo os valores de velocidade obtidos divididos pela massa celular utilizada nos ensaios.

$$\mu_P = \frac{1}{M_X} \times \frac{dM_P}{dt} \quad (10)$$

Onde:

μ_P , velocidade específica de formação de produto (mmol/g/h);

M_X , massa de células (g);

dM_P/dt , derivada do produto em função do tempo (mmol/h).

$$P = \frac{1}{M_X} \times \frac{dM_P}{dC_{\text{lactose}}} \quad (11)$$

Onde:

μ_P , velocidade específica de formação de produto (mmol/g/h);

M_X , massa de células (g);

dM_P/dC_{lactose} , derivada do produto em função da concentração de lactose (mmol/mmol).

3.6 Caracterização físico-química do ácido lactobiônico e dos sais de lactobionato

3.6.1 Quantificação e identificação do lactobionato, sorbitol, lactose e frutose

A determinação das concentrações de ácido lactobiônico (lactobionato), sorbitol, lactose e frutose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa (Agilent Technology 9100), utilizando a coluna Aminex HPX-87H (BioRad), fase móvel H₂SO₄ 0,05 mmol/L, fluxo de 0,4 mL/min, a 60°C, com detector índice de refração e volume de injeção de 10 µL (Demoliner *et al.*, 2015). As amostras foram quantificadas através da curva padrão com solução de referência em concentração de 1,0 a 14,0 g/L. A metodologia analítica foi desenvolvida e validada anteriormente (dados não publicados).

As amostras foram preparadas em água Milli-Q e filtradas em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro, sendo diluídas, quando necessário, para serem quantificadas dentro da faixa da curva padrão.

3.6.2 Análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C

Os espectros de RMN- de ¹³C dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico foram obtidos em um espectrômetro modelo Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ¹H e 75 MHz para o núcleo de ¹³C. Os espectros foram obtidos em D₂O (água deuterada). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

3.6.3. Análise de espectrometria de massas de alta resolução

A análise por espectrometria de massas foi realizada com as amostras de lactobionato de sódio, de potássio, de cálcio e ácido lactobiônico. As amostras foram diluídas em água Milli-Q e analisadas por infusão direta em um espectrômetro modelo Bruker micrOTOF-Q II, empregando uma fonte ESI (*electrospray ionization*). A análise das m/z foi realizada com auxílio do software Bruker Daltonics – Compass DataAnalysis e IsotopePattern.

3.6.4 Determinação do pH

Para a determinação do pH, as amostras em concentração de 10 g/L foram solubilizadas em água Milli-Q, a 25°C, e utilizou-se pHmetro (Provitec MV 1200), previamente calibrado com soluções pH 4,0 e 7,0. O resultado correspondeu à média de três determinações (Farmacopeia Brasileira, 2012).

3.6.5 Determinação do poder rotatório específico

Em relação à determinação do poder rotatório, foi preparada uma solução na concentração de 10% (m/v) em água Milli-Q. Após 24 h, as soluções foram filtradas (filtro de poliamida, 0,45 μm) e o desvio óptico foi medido, a 20°C, utilizando polarímetro (Polax 2L, Atago) (Farmacopeia Brasileira, 2012). As leituras foram realizadas em triplicata. O poder rotatório foi calculado segundo a Equação 12.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = (100 \cdot \alpha) / (C \times c) \quad (12)$$

Onde:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$, poder rotatório específico;

α , ângulo de rotação;

C, concentração da substância (g/100 mL);

c, comprimento da cela do polarímetro (1dm).

3.6.6 Determinação da umidade

A umidade foi determinada em balança de umidade por infravermelho (HB43-Halogen Moisture Analyzer), a 100°C. As análises foram realizadas em triplicata.

3.6.7 Determinação de solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado em triplicata, a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). À 1 g de amostra foi adicionada água destilada até completa solubilização, iniciando a adição com 1 mL de água Milli-Q (Farmacopeia Brasileira, 2012). As análises foram realizadas em triplicata.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de análise de variância (ANOVA), em nível de 5% de probabilidade e pós teste de Tukey, utilizando o programa computacional GraphPad Prism 5.01[®].

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados e discutidos em três subitens, distribuídos conforme apresentado a seguir.

4.1 Capítulo 1: Bioprodução, purificação e identificação dos lactobionato de sódio, potássio e cálcio.

4.2 Capítulo 2: Estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial.

4.3 Capítulo 3: Estudo de degradação forçada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico.

4.1 Capítulo 1: Bioprodução, purificação e identificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio.

Este capítulo tem por finalidade apresentar os resultados referentes ao cultivo de *Z. mobilis* para a obtenção de células e enzimas GFOR/GL. Posteriormente, são descritos os perfis cinéticos da bioprodução de lactobionatos de sódio, potássio e cálcio com a utilização do complexo enzimático imobilizado em alginato de cálcio, assim como os resultados da bioprodução em bateladas repetidas, visando à reutilização do biocatalisador. Finalmente, são apresentados os dados referentes à purificação e identificação dos produtos de bioconversão.

4.1.1 Cultivo de *Zymomonas mobilis* para obtenção de células e do complexo enzimático

Para a realização dos ensaios de bioconversão, primeiramente foi realizado um cultivo de *Z. mobilis*, em regime descontínuo, em biorreator de agitação mecânica, para a obtenção de células e do complexo enzimático GFOR/GL.

Os parâmetros operacionais do cultivo não foram alterados durante a realização dos ensaios, portanto, os resultados em termos de crescimento e do consumo de substrato foram semelhantes entre diferentes ensaios.

Na Figura 12, são apresentados, de forma representativa, os perfis cinéticos de crescimento celular e de consumo de substrato durante o cultivo de *Z. mobilis* em regime descontínuo. Ao final do cultivo, a concentração celular foi determinada por gravimetria e, em seguida, as células/enzimas foram centrifugadas e tratadas para a posterior imobilização em alginato de cálcio e utilização das esferas nos ensaios de bioconversão.

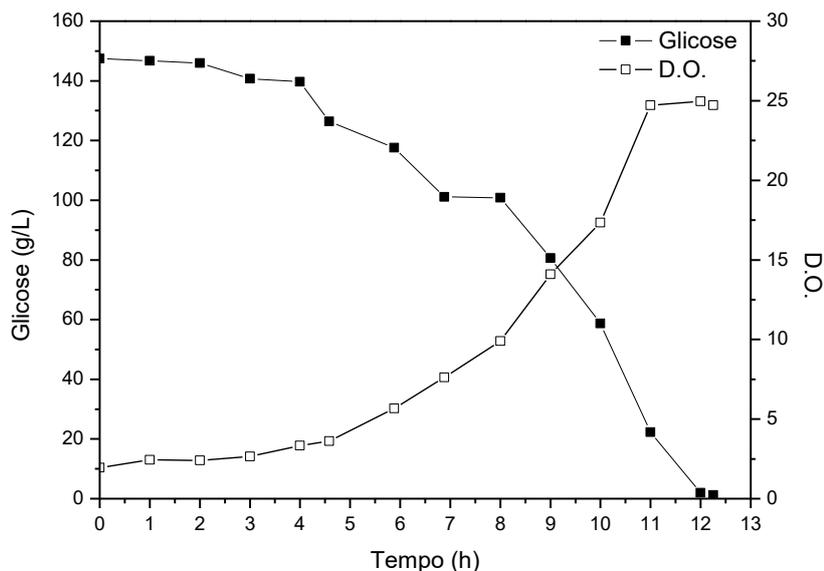


Figura 12: Cinética do cultivo de *Zymomonas mobilis* realizado em biorreator de agitação mecânica (450 rpm, 5,0 L, pH 5,5, 30°C), relacionando a densidade ótica (D.O.) e o consumo de glicose em função do tempo.

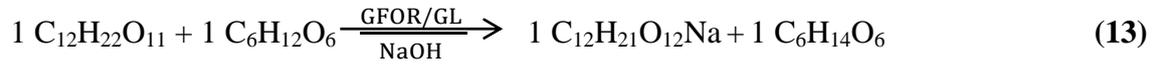
4.1.2 Bioprodução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio

Como o objetivo de avaliar a cinética de bioprodução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, pelo sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio, foram conduzidos três ensaios de bioconversão. Os ensaios foram conduzidos em paralelo, em triplicata, e com células/enzimas provenientes do mesmo cultivo.

Os ensaios de bioconversão foram realizados utilizando um reator de 0,80 L contendo 0,35 L de solução de substratos (lactose/frutose) e biocatalisador imobilizado. A temperatura de 39°C e o pH 6,4 foram mantidos constantes ao longo dos ensaios, sendo a reação monitorada pela medida do volume (ou massa) e concentração do álcali utilizado para neutralizar o ácido orgânico formado. Sendo assim, na reação foram utilizadas soluções de NaOH ou KOH ou Ca(OH)₂, com a formação do respectivo sal, ou seja, lactobionato de sódio (Carra, 2012; Malvessi *et al.*, 2013), lactobionato de

potássio (Pedruzzi *et al.*, 2011; Zagonel, 2013; Gonçalves *et al.*, 2016) ou lactobionato de cálcio (Murakami *et al.*, 2008, Delagustin *et al.*, 2016), respectivamente.

As Equações 13, 14 e 15 descrevem a formação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e sorbitol, respectivamente, a partir de lactose e frutose.



Na Tabela 3 são apresentados os resultados gerais dos ensaios de bioconversão e na Figura 13, os perfis de formação dos respectivos sais de lactobionato e do consumo de lactose em função do tempo de reação.

Tabela 3: Resultados gerais de produção, em 24 h, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C).

	Lactobionato de sódio	Lactobionato de potássio	Lactobionato de cálcio
P_{max} (mmol/L)	493,03 ± 22,49 ^a	500,11 ± 35,16 ^a	294,11 ± 14,99 ^b
Y_{P/S_0} (mmol/mmol)	0,748 ± 0,042 ^a	0,776 ± 0,071 ^a	0,410 ± 0,027 ^b
P_m (mmol/h)	7,38 ± 0,16 ^a	7,13 ± 1,24 ^a	4,29 ± 0,22 ^b
q (mmol/g/h)	1,02 ± 0,01 ^a	1,08 ± 0,18 ^a	0,613 ± 0,031 ^b
ρ (%)	74,83 ± 4,17 ^a	77,52 ± 7,3 ^a	84,03 ± 4,28 ^a
$\mu_{P,max}$ (mmol/g/h)	1,72 ± 0,15 ^a	1,61 ± 0,07 ^a	1,158 ± 0,21 ^b
S_f (mmol/L)	168,61 ± 23,36 ^a	141,58 ± 33,13 ^a	111,73 ± 19,98 ^a

P_{max} , concentração máxima de lactobionato formado; Y_{P/S_0} , conversão em relação ao substrato inicial; P_m , produtividade molar; q , produtividade específica; ρ , conversão em produto em relação ao máximo teórico; $\mu_{P,max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , lactose residual. Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Conforme apresentado na Tabela 3, não foi verificada diferença significativa em termos de produção dos lactobionatos de sódio e potássio. Em 24h de reação foi atingido em torno de 500 mmol/L de produto, com conversão de 75% e concentração residual de 150 mmol/L de lactose. Com relação à Y_{P/S_0} , foram atingidos valores de 0,748 e 0,776 mmol/mmol, ou seja, para cada mmol de substrato consumido (lactose), 0,748 mmol de lactobionato de sódio ou 0,776 de lactobionato de potássio foram formados, respectivamente. Em relação a P_m , foram produzidos 7,38 e 7,13 mmol dos lactobionatos de sódio ou potássio, respectivamente, por hora de reação.

Aproximadamente 1 mmol dos lactobionatos de sódio e potássio foram obtidos por grama de célula por hora (produtividade específica).

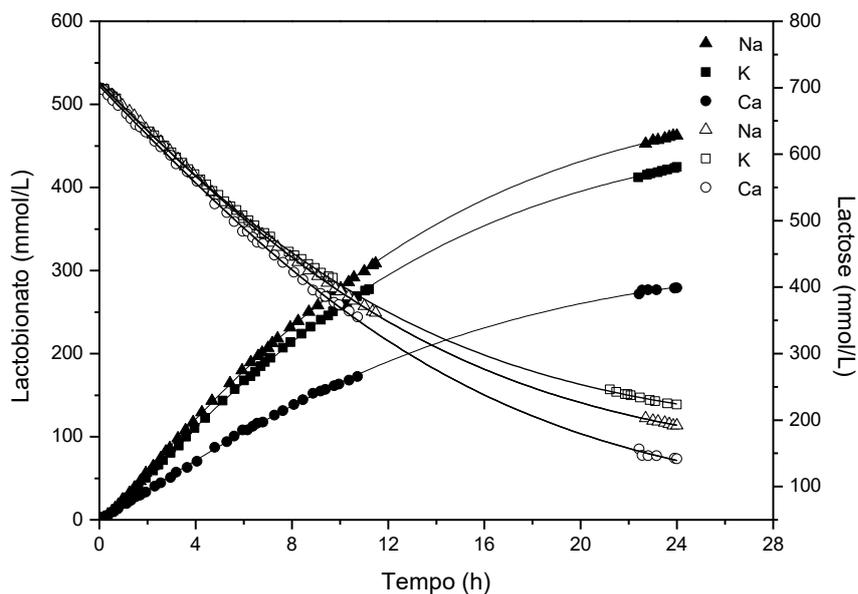


Figura 13: Perfil de produção dos lactobionatos de sódio, potássio ou cálcio e do consumo de lactose em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C, volume reacional, 0,35 L). Símbolos abertos representam o consumo de lactose e símbolos fechados representam a produção do lactobionato.

Quando comparadas com a obtenção de lactobionato de cálcio, observa-se que há diferença significativa nos parâmetros P_{max} , Y_{P/S_0} , P_m , q e μ_{Pmax} , não sendo observada diferença significativa em termos de conversão e S_f (Tabela 3). Os parâmetros que levam em consideração a quantidade em mol de produto formado (P_{max} , Y_{P/S_0} , P_m , q e μ_{Pmax}), apresentaram diferença significativa. Como descrito nas Equações 13, 14 e 15, a reação de formação do lactobionato de cálcio é de 2:1, ou seja, para cada 2 mol de lactose consumidos, 1 mol de lactobionato de cálcio é produzido. A estequiometria é diferente para os lactobionatos de sódio e potássio, onde a reação é 1:1. Portanto, é

justificável que os valores de P_{\max} , $Y_{P/SO}$, P_m , q e $\mu_{P\max}$ sejam inferiores quando comparados com a produção dos lactobionatos de sódio e potássio.

Os resultados em relação ao rendimento corroboram os estudos realizados por Carra (2012) que, em ensaio de bioprodução de ácido lactobiônico por células imobilizadas de *Z. mobilis*, nas mesmas condições operacionais, relata a obtenção de rendimento de 72% em 24 h de reação e concentração de lactose residual de 200 mmol/L.

No caso do rendimento e de S_f , para os quais não foram observadas diferenças significativas entre os três testes de bioconversão, salienta-se que o rendimento leva em consideração a produção máxima teórica em relação à massa produzida e, neste caso, o número de mols não interferiria na comparação. Quanto ao valor de S_f , como os rendimentos foram também semelhantes, a concentração de lactose residual foi proporcional, como pode ser observado na Figura 13.

Outro parâmetro a ser analisado é a velocidade de formação de produto (μ_P). Na Figura 14, estão exibidos os perfis cinéticos de velocidade específica de formação de produto em função da concentração de lactose (Figura 14A) e também em função do tempo (Figura 14B). Analisando os perfis cinéticos de velocidade descritos na Figura 14, verifica-se que a velocidade da reação é comandada pela concentração do substrato lactose que, conforme é consumida, a velocidade tende a diminuir. Neste caso, como a velocidade é calculada em mols, o perfil de formação de lactobionato de cálcio, embora em menor velocidade, segue o mesmo perfil em relação aos lactobionatos de sódio e potássio. Esta queda na velocidade pode ter sido devido à menor afinidade da enzima GFOR pela lactose, conforme descrito por Malvessi (2008), que relata a menor afinidade do complexo GFOR/GL pela lactose, quando comparada aos substratos glicose, maltose e galactose.

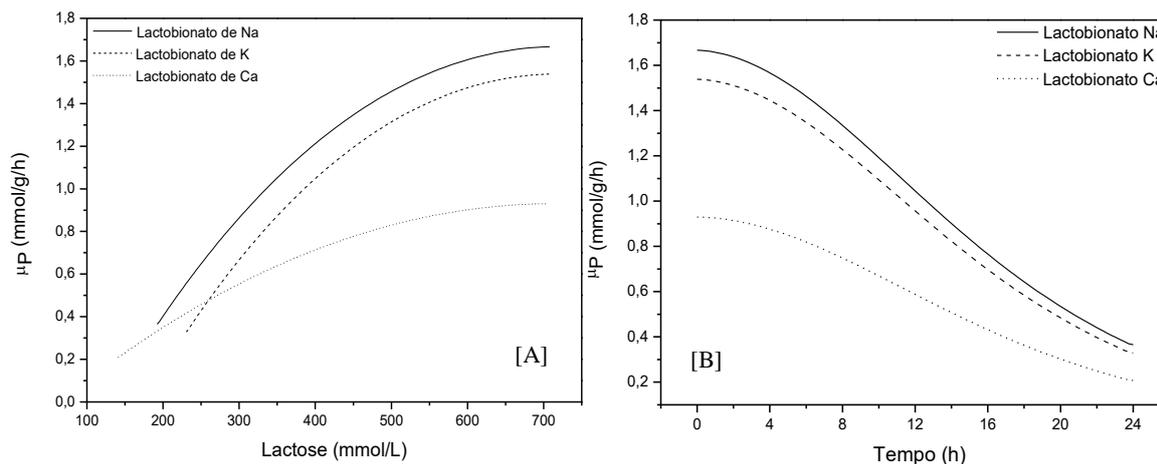


Figura 14: Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função da concentração de lactose [A] e em função do tempo [B] a partir de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ($S_0= 700$ mmol/L de lactose e 600 de mmol/L frutose, $X= 20$ g/L, pH 6,4, 39°C, volume reacional 0,35L).

4.1.3 Bioprodução de lactobionato de potássio e lactobionato de cálcio em bateladas repetidas

Com a finalidade de avaliar a reutilização das células/enzimas na bioprodução dos lactobionatos de potássio e cálcio, foram realizados quatro ciclos sucessivos de bioprodução. Ao final de cada batelada de 24 h, o biocatalisador imobilizado foi removido do meio de cultivo e lavado com água para a eliminação dos produtos e substratos que poderiam ter ficado retidos nas esferas.

Posteriormente, as esferas utilizadas na bioprodução do lactobionato de potássio foram tratadas com CaCl_2 0,3 mol/L, pois foi observada perda da rigidez. Com este tratamento, os íons Ca^{2+} ligam-se novamente com o alginato por meio de ligações iônicas, enrijecendo-as (Lee & Mooney, 2012).

Os resultados gerais das bateladas repetidas de bioprodução dos lactobionatos de cálcio e potássio são apresentados na Tabela 4. Nas Figuras 15 e 16, são apresentados os

perfis de bioprodução em função do tempo e de velocidade específica de formação de produtos, respectivamente.

Em relação à bioprodução do lactobionato de cálcio, conforme demonstrado na Tabela 4, ainda que observada uma leve diminuição nos valores dos parâmetros analisados no decorrer das bateladas, não foi constatada diferença significativa entre as quatro bateladas. Em relação ao $Y_{P/S0}$, valores em torno de 0,400 mmol/mmol foram alcançados nas quatro bateladas, ou seja, para cada mmol de lactose consumido, aproximadamente 0,400 mmol de lactobionato de cálcio foi produzido. Os valores de P_{max} variaram entre 280 e 290 mmol/L, com rendimento (ρ) aproximado de 80% e substrato (lactose) residual de cerca de 120 mmol/L.

Estes resultados podem ser identificados na Figura 15A, onde são observados padrões similares de bioprodução de lactobionato de cálcio. Inicialmente, até aproximadamente 6 h de reação, perfis praticamente iguais foram observados nas quatro bateladas, porém, ao longo do processo, a redução em termos de concentração de produto formado foi menos acentuada nas bateladas 3 e 4. Este perfil inicial corrobora também os valores de μ_{Pmax} , onde foi determinado valor médio de 1,1 mmol/g/h em lactobionato de cálcio nas quatro bateladas (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados gerais de produção de lactobionatos de cálcio e potássio por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em 24 h de reação ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C).

Batelada	P_{max}	Y_{P/S0}	P_m	q	ρ	μ_{Pmax}	S_f	
	mmol/L	mmol/mmol	mmol/h	mmol/g/h	% (m/v)	mmol/g/h	mmol/L	
	1	294,11 ± 14,99 ^a	0,42 ± 0,03 ^a	4,28 ± 0,22 ^a	0,61 ± 0,03 ^a	84,03 ± 4,28 ^a	1,16 ± 0,21 ^a	111,74 ± 19,98 ^a
	2	293,32 ± 14,30 ^a	0,42 ± 0,02 ^a	4,25 ± 0,23 ^a	0,61 ± 0,03 ^a	83,72 ± 4,26 ^a	1,12 ± 0,18 ^a	110,81 ± 29,02 ^a
Lactobionato	3	280,00 ± 25,74 ^a	0,40 ± 0,04 ^a	4,07 ± 0,40 ^a	0,58 ± 0,05 ^a	80,04 ± 7,30 ^a	1,16 ± 0,17 ^a	141,97 ± 20,12 ^a
de cálcio	4	279,64 ± 20,55 ^a	0,39 ± 0,03 ^a	4,01 ± 0,31 ^a	0,58 ± 0,04 ^a	78,56 ± 4,90 ^a	1,11 ± 0,24 ^a	139,94 ± 20,10 ^a
	1	500,11 ± 35,16 ^a	0,81 ± 0,03 ^a	7,56 ± 0,89 ^a	1,08 ± 0,13 ^a	78,86 ± 5,15 ^a	1,62 ± 0,061 ^a	141,58 ± 33,13 ^a
Lactobionato	2	393,90 ± 25,47 ^b	0,63 ± 0,07 ^b	6,52 ± 0,64 ^{ab}	0,93 ± 0,09 ^{ab}	65,10 ± 7,91 ^b	1,17 ± 0,151 ^b	221,91 ± 23,16 ^b
de potássio	3	391,12 ± 23,87 ^b	0,63 ± 0,07 ^b	5,86 ± 0,41 ^b	0,84 ± 0,06 ^b	64,27 ± 8,55 ^b	1,16 ± 0,170 ^b	231,57 ± 27,11 ^b
	4	365,09 ± 35,21 ^b	0,56 ± 0,08 ^b	5,62 ± 0,53 ^b	0,80 ± 0,08 ^b	56,37 ± 7,81 ^b	0,99 ± 0,242 ^b	278,16 ± 32,34 ^b

P_{max}, concentração máxima de ácido lactobiônico; Y_{P/S0}, conversão em relação ao substrato inicial; P_m, produtividade molar; q, produtividade específica; ρ, rendimento; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f, lactose residual. Colunas, de cada amostra, com letras iguais não apresentam diferença significativa (p<0,05).

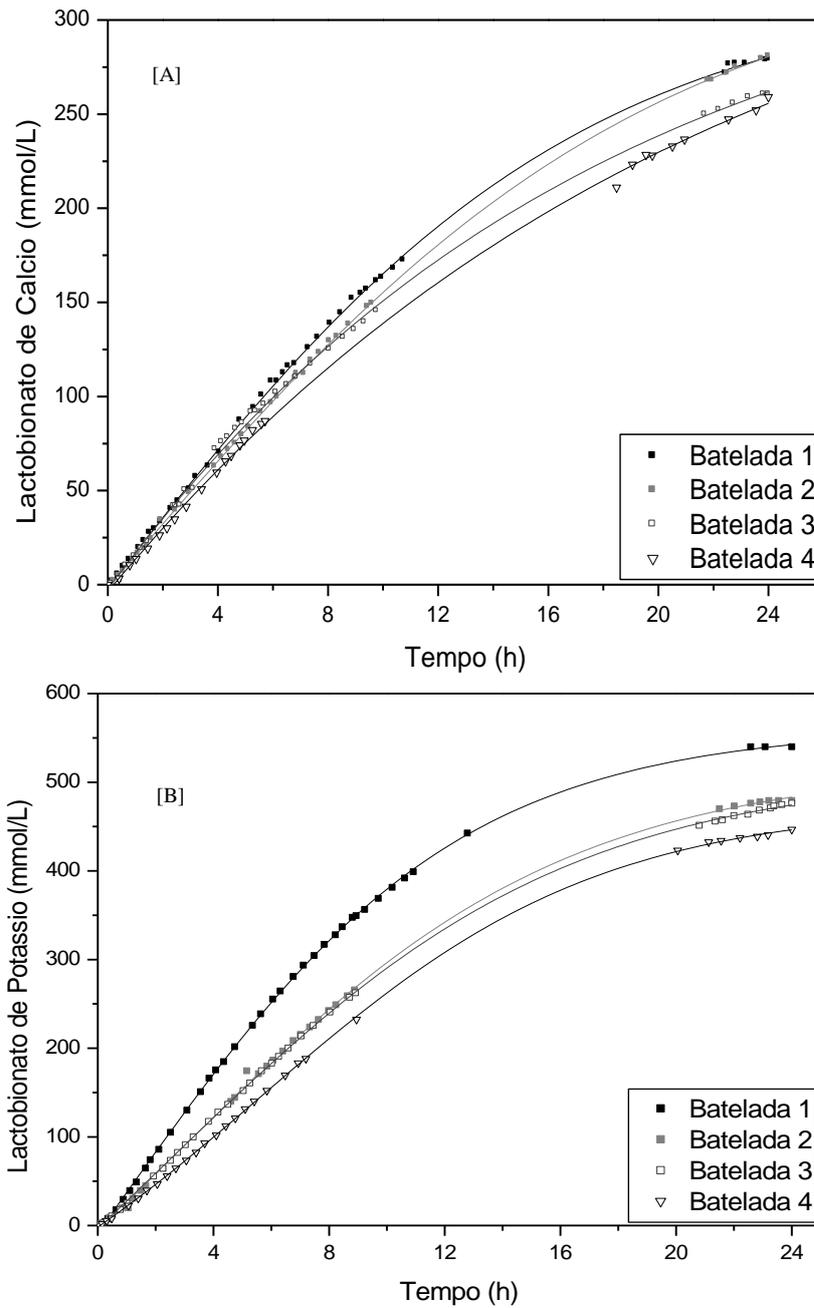


Figura 15: Variação da concentração de lactobionato de cálcio [A] ou lactobionato de potássio [B] em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em bateladas consecutivas ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C, volume reacional 0,35 L).

Analisando a bioprodução em batelada de lactobionato de potássio (Figura 15B), observam-se diferenças em relação à obtida em lactobionato de cálcio (Figura 15A). Primeiramente, analisando os dados na Tabela 4 e a Figura 15B, há uma queda significativa em relação ao P_{\max} da primeira batelada para as demais, de 500 mmol/L para em torno de 390 mmol/L, influenciando, assim, o rendimento em produto (de 78 para cerca de 60%). Considerando a conversão em relação ao substrato inicial, diferenças significativas também foram observadas, sendo atingido 0,8 mmol/mmol na batelada 1 e nas demais, aproximadamente 0,6 mmol/mmol (Tabela 4).

Na Figura 16, são comparados os perfis de velocidade específica de formação de lactobionatos de cálcio ou potássio em função do tempo (Figuras 16A e 16B) e em função da concentração de lactose (Figuras 16C e 16D). Observa-se, nas bateladas de bioconversão 1 e 2, a manutenção inicial da velocidade de formação de lactobionato de cálcio e, contrariamente, nas bateladas 3 e 4, a queda mais acentuada, a qual foi mantida ao longo de 24 h de reação (Figuras 16A e 16C). Este perfil também pode ser observado analisando os valores de P_m e q , apresentados na Tabela 4. Mesmo não apresentando diferença significativa, nas bateladas 1 e 2 foram determinados P_m em lactobionato de cálcio de cerca de 4,2 mmol/h e q de 0,6 mmol/g/h, valores pouco superiores às bateladas 3 e 4 ($P_m \approx 4,0$ mmol/h e $q \approx 0,58$ mmol/g/h).

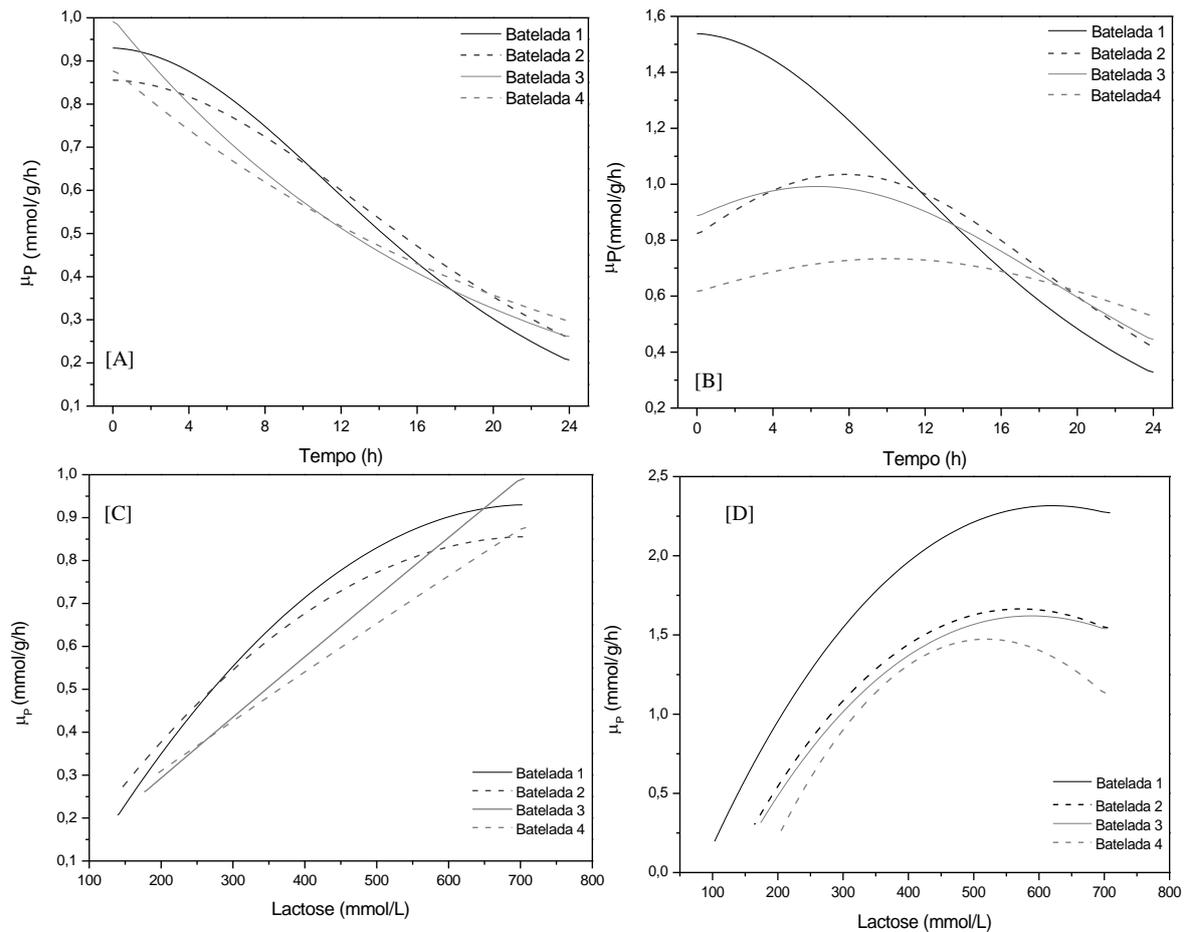


Figura 16: Velocidade específica de formação de lactobionatos de cálcio (μ_P) [A] e potássio [B] em função do tempo e velocidade específica de formação de lactobionato de cálcio [C] e potássio [D] em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em bateladas consecutivas ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 de mmol/L frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C, volume reacional 0,35 L).

Com base nos perfis da velocidade específica de formação de lactobionato de potássio em função do tempo e em função da concentração de lactose, apresentados nas Figuras 16B e 16D (também compilados na Tabela 4), verifica-se maior velocidade de bioprodução na batelada 1. Neste caso, foi atingido μ_{Pmax} de 1,6 mmol/g/h, sendo evidenciada velocidade superior por até aproximadamente 11 h de reação, com consumo

médio de 400 mmol/L de lactose. Ainda analisando a batelada 1, foram obtidos valores de P_m de 7,5 mmol/h e q de 1 mmol/g/h, não apresentando diferenças significativas quando comparados com os dados alcançados no segundo ciclo ($P_m = 6,5$ mmol/h e $q = 0,93$ mmol/g/h). Porém, foi identificada diferença significativa em relação aos ciclos de bioconversão 3 e 4 (valores médios de P_m de 5,7 mmol/h e q de 0,8 mmol/g/h). A manutenção da velocidade foi observada durante a maior parte da reação nas bateladas 2, 3 e 4. Entretanto, foram identificados valores diferentes de μ_p , entre 0,9 e 1,0 mmol/g/h nas bateladas 2 e 3 e em valor inferior, porém mais constante na batelada 4, aproximado de 0,6 mmol/g/h.

Quanto ao aspecto geral das esferas empregadas nos ensaios de bioprodução dos lactobionatos de cálcio e potássio, verifica-se que, no primeiro caso, as esferas não perderam a rigidez no decorrer das bateladas, sendo utilizada somente água para a lavagem das esferas entre os ciclos. Isso pode ser decorrente da reação de obtenção das esferas, onde o alginato de sódio ao reagir com o Ca^{2+} do $CaCl_2$, forma um hidrogel de alginato de cálcio (Lee & Mooney, 2012). Na bioprodução do lactobionato de cálcio utiliza-se $Ca(OH)_2$ no controle do pH, sendo que o Ca^{2+} desta base poderia, de certa forma, ter reagido com o alginato e, assim, ajudado na preservação da rigidez das esferas durante o processo de bioconversão.

Em contrapartida, analisando os resultados da bioprodução do lactobionato de potássio, no decorrer do processo, foi verificada a perda da rigidez das esferas. Após a lavagem das esferas com água, estas foram tratadas com $CaCl_2$ para a devida retomada do enrijecimento. Contrariamente do ocorrido na bioprodução do lactobionato de cálcio, queda em termos de rendimento foi observada nas bateladas 2, 3 e 4 em relação à primeira batelada. Estes resultados corroboram os apontamentos de Carra (2012), na avaliação da bioprodução de ácido lactobiônico durante oito bateladas repetidas a partir

de células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. A queda na produção de ácido lactobiônico foi identificada sempre quando realizado o tratamento das esferas com CaCl_2 , justificado em função de problemas de transferência de massa acarretados pela maior rigidez das esferas.

4.1.4 Purificação dos sais de lactobionato da mistura final de bioconversão

Ao final dos respectivos processos de bioconversão, as esferas foram removidas do meio e o caldo foi destinado à avaliação, por cromatografia em fase líquida. A cromatografia líquida foi realizada com o intuito de corroborar os resultados obtidos pelo volume/massa de base utilizada para neutralizar o ácido formado.

A precipitação com etanol, usada para a purificação e recuperação dos sais de lactobionato, se baseia na diferença de solubilidade entre os componentes do caldo final da bioconversão. Na precipitação do lactobionato com etanol, foram utilizados 30 mL do caldo de bioconversão e etanol em concentração equivalente a 75% (v/v). Foram realizadas três etapas sucessivas de precipitação e, ao final, após a obtenção do produto seco e triturado, foi preparada uma solução 10 g/L, a qual também foi analisada por cromatografia em fase líquida.

Os resultados em termos de concentração de substratos e proporções do caldo final da bioconversão e do produto final são apresentados na Tabela 5. Analisando os resultados relativos ao caldo final da bioprodução dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio, ressalta-se a obtenção média de 60% (m/v) de lactobionato, 11% (m/v) de lactose, 2,0% (m/v) de frutose e 27% (m/v) de sorbitol. Estes resultados eram esperados, visto que os valores de rendimento e S_f nas três condições de bioprodução foram semelhantes, como observado na Tabela 3.

Contudo, analisando os resultados dos produtos finais, foram detectadas diferentes proporções dos componentes. Para os lactobionatos de sódio e cálcio, foi constatada a proporção de 94,40 e 95,82% (m/v) em lactobionato, 1,8 e 1,31% (m/v) de lactose e 3,80 e 2,86% (m/v) de sorbitol, respectivamente. Para o caldo do lactobionato de potássio, o perfil observado, em termos de purificação, foi diferente, onde o lactobionato também foi quantificado em 95% (m/v), entretanto, maior percentual de lactose foi observado, de 4,0% (m/v) e cerca de 1,3% (m/v) de sorbitol.

Por serem praticamente insolúveis em etanol, os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, têm-se como consequência a precipitação em maiores quantidades (Carra, 2012). Quanto aos outros compostos, o sorbitol, por sua vez, é classificado como pouco solúvel e a lactose muito pouco solúvel em etanol 75% (European Pharmacopeia, 2008). Levando em consideração estas características, é esperada a precipitação de lactose em maior quantidade, correlacionando com o sorbitol.

A frutose não foi detectada no produto final dos três ensaios, o que é justificável, visto que esta substância apresenta elevada solubilidade em etanol (European Pharmacopeia, 2008). Ainda, corroborando nesta questão, Carra (2012), define que 1 g de frutose é solubilizada em 14 mL de etanol 75% (v/v).

Tabela 5: Resultados referentes à purificação do caldo final da bioconversão por precipitação com etanol (volume de etanol até obtenção de 75% (v/v), vazão de adição de etanol de 9 mL/min, a 25°C).

Caldo final da bioconversão						
	Lactobionato de sódio		Lactobionato de potássio		Lactobionato de cálcio	
	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)
Lactobionato	242,69 ± 2,37	58,05	245,56 ± 2,84	60,85	244,04 ± 3,61	58,80
Lactose	44,48 ± 2,93	10,64	45,4 ± 2,47	11,24	50,23 ± 2,39	12,10
Frutose	8,95 ± 0,97	2,14	9,43 ± 0,98	2,34	9,73 ± 0,41	2,35
Sorbitol	121,96 ± 3,35	29,17	103,2 ± 4,21	25,57	111,02 ± 4,11	26,75
Solução final						
	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)
Lactobionato	9,08 ± 0,13	94,40	9,78 ± 0,07	94,52	9,57 ± 0,06	95,82
Lactose	0,18 ± 0,02	1,80	0,43 ± 0,02	4,10	0,14 ± 0,02	1,31
Frutose	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sorbitol	0,36 ± 0,01	3,80	0,14 ± 0,01	1,38	0,28 ± 0,03	2,86

nd: não detectado

4.1.5 Identificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio

A estrutura química dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio foram confirmadas por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS – ESI-TOF) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C .

Na Figura 17, é apresentado o espectro de massas do lactobionato de sódio e na Tabela 6, descritos os valores de m/z detectados no espectro e identificadas as possíveis fórmulas moleculares correspondentes. As fórmulas moleculares foram analisadas na biblioteca do software Isotopepattern[®]. Em seguida, estão apresentadas as m/z dos isótopos desta molécula e a respectiva abundância.

Na Figura 17A, é apresentado o espectro de massas, no modo positivo, obtido por injeção direta da amostra diluída em água Milli-Q. Neste caso, a molécula deve estar ionizada positivamente para que ocorra a sua detecção e, em função disto, a molécula se liga com um cátion. Nas Figuras 17B, 17C, 17D e 17E, estão representados os espectros expandidos para a melhor visualização da distribuição isotópica, que auxiliam na identificação dos valores de m/z . No caso do lactobionato de sódio, são formados os adutos $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z de 381,1086, e o aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com m/z de 403,0921. São observados outros adutos do lactobionato como o íon de m/z 783,1855 $[(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12})_2\text{Na} + \text{Na}]^+$, como descritos na Tabela 6. Além dos íons moleculares referentes ao lactobionato de sódio, foi, ainda, identificada o íon molecular relacionado ao sorbitol através do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com valor de m/z de 205,0733. Isto destaca a pureza do lactobionato de 94% e cerca de 3,8% de sorbitol (Tabela 5). Analisando a Figura 17F, observa-se a molécula com carga negativa. Neste caso, a molécula perde um íon, em particular, o lactobionato de sódio perde Na^+ , o que leva à formação dos compostos descritos na Tabela 6, sendo identificadas $[\text{M}-\text{Na}]^-$ com m/z de 357,1151 e o conjugado entre dois lactobionatos $[2\text{M}-\text{Na}]^-$ com m/z de 715,2371.

Tabela 6: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de sódio purificado.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
381,1086	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{Na} + \text{H}]^+$	+1	381,0990	100,000
			382,1129	13,689
			383,1106	3,333
205,0733	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{Na}]^+$	+1	205,0733	100,000
			206,0755	6,879
783,1855	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12})_2]^+$	+1	783,1855	100,000
			784,1855	27,355
			785,1928	8,533
403,0921	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{Na} + \text{Na}]^+$	+1	403,0921	100,000
			404,0937	13,678
			405,0972	3,331
357,1151	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NaO}_{12}\text{-Na}]^-$	-1	357,1151	100,000
			358,1168	13,678
			359,1173	3,331
715,2371	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12})_2\text{-H}]^-$	-1	715,2371	100,000
			716,2383	27,367
			717,2414	8,536

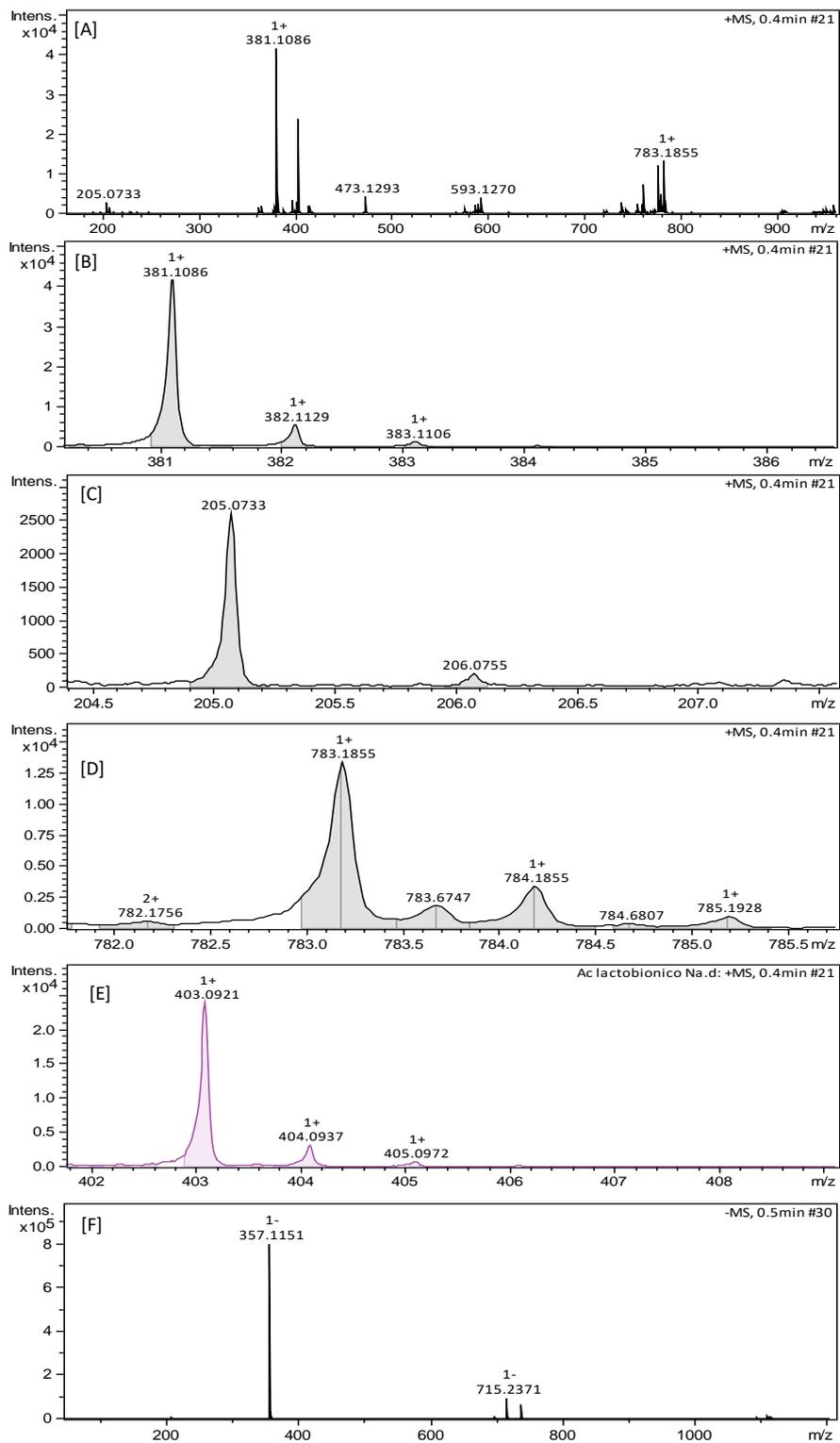


Figura 17: Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de sódio.

[A] espectro de massas do lactobionato de sódio; [B] espectros expandidos de m/z

381,1086, [C] de m/z 205,0733, [D] de m/z 783,1855 e [E] de m/z 403,0921;

[F] espectro no modo negativo do lactobionato de sódio.

Na Figura 18, estão representados os espectros de massas obtidos pela amostra do lactobionato de potássio e, na Tabela 7, estão demonstrados as m/z identificadas com as possíveis estruturas e os respectivos isótopos. Os espectros de massa do lactobionato de potássio foram obtidos por injeção direta após a diluição em água Milli-Q. Na Figura 18A, está representado o espectro geral da amostra do lactobionato de potássio no modo positivo e, nas Figuras 18B, 18C, 18D e 18E, estão representados os espectros expandidos para a melhor visualização da distribuição isotópica, que auxiliam na identificação dos valores de m/z .

A partir da Figura 18A, foram detectados cinco sinais *de* m/z (Tabela 7), identificando o lactobionato de potássio na forma do aduto $[M+H]^+$ com m/z de 397,0676. Ainda, o lactobionato de potássio formando aduto de Na^+ ($[M+Na]^+$) com m/z de 419,0568 e como aduto de K^+ ($[M+K]^+$) com m/z de 435,0314. A presença do aduto lactobionato ligada ao Na^+ ($[M+Na]^+$), possivelmente, foi devida à utilização de Na^+ nas etapas anteriores de produção ou à presença do íon no equipamento. Nesta análise, também foi identificada m/z correspondente ao sorbitol ligado ao K^+ ($[M+K]^+$) com m/z de 221,0422, uma vez que foi determinada a pureza, por cromatografia líquida, do lactobionato de potássio de 95% e 1,38% de sorbitol (Tabela 5).

Na Figura 18F, o espectro do modo negativo demonstrou sinais de m/z correspondente ao íon lactobionato (m/z 357,1175).

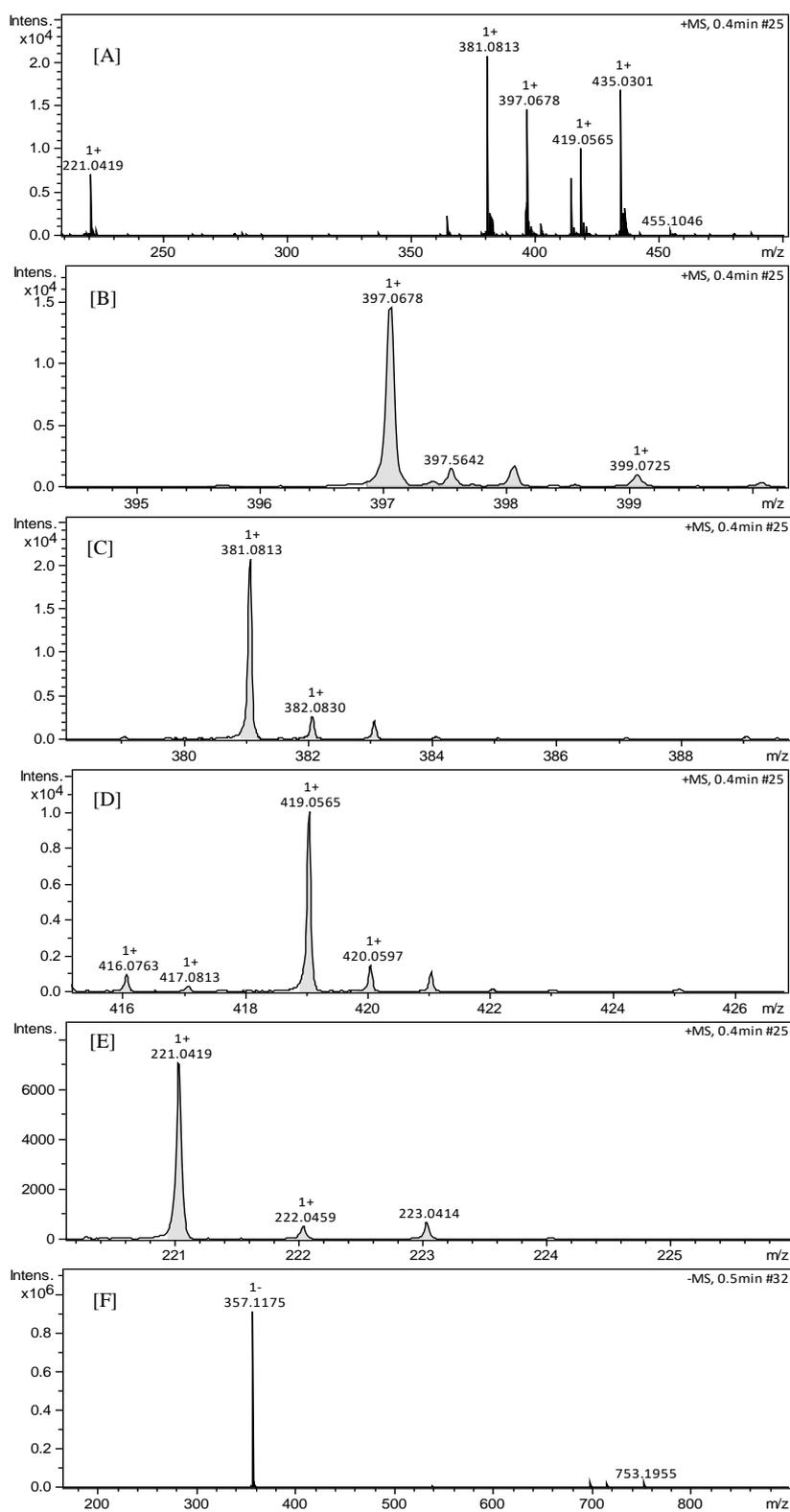


Figura 18: Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de potássio.

[A] espectro de massas do lactobionato de potássio; [B] espectro expandido de m/z

397,0676, [C] de m/z 381,0813, [D] de m/z 419,0568 e [E] de m/z 221,0422;

[F] espectro no modo negativo do lactobionato de potássio m/z 357,1175.

Tabela 7: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de potássio purificado.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
397,0676	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{K} + \text{H}]^+$	+1	397,0676	100,000
			398,0712	13,702
			399,0725	10,551
419,0568	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{KO}_{12} + \text{Na}]^+$	+1	419,0568	100,000
			420,0595	13,690
			421,0519	10,550
435,0314	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{KO}_{12} + \text{K}]^+$	+1	435,0314	100,000
			436,0347	13,703
			437,0293	17,768
221,0422	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{K}]^+$	+1	221,0422	100,000
			222,0463	6,892
			223,0402	8,652
381,0813	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{Na}]^+$	+1	381,0813	100,000
			382,0830	13,689
			383,0808	3,333
357,1175	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{KO}_{12} - \text{K}]^-$	-1	357,1175	100,000
			358,1189	13,678
			359,1194	3,331

Na Figura 19 é evidenciado o espectro de massas obtido do lactobionato de cálcio tanto no modo positivo (Figura 19A) quanto no negativo (Figura 19H) e, na Tabela 8, descritos os sinais m/z identificados.

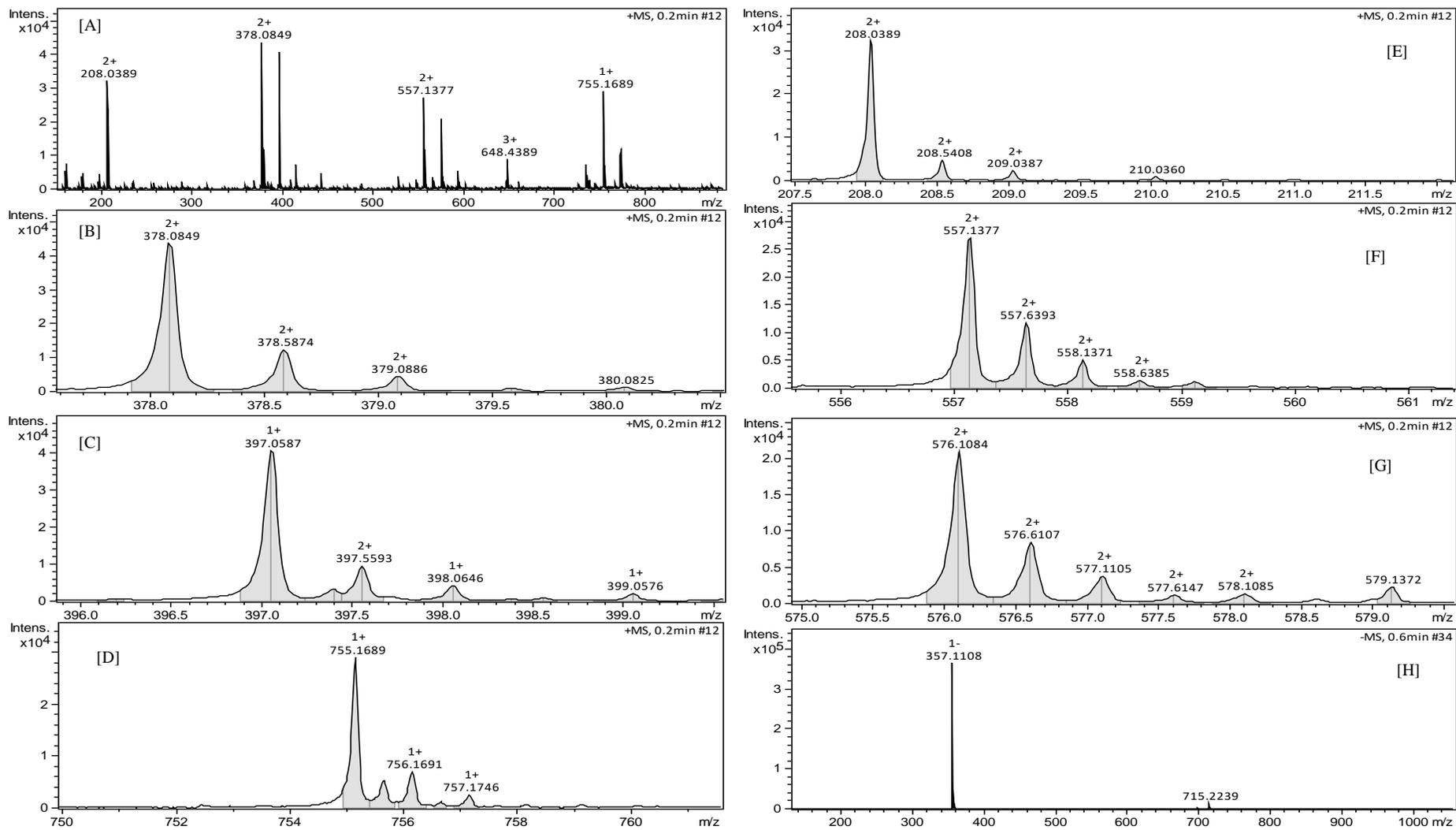


Figura 19: Espectro de massas, por injeção direta, do lactobionato de cálcio. [A] espectro de massas do lactobionato de cálcio;

[B] espectro expandido de m/z 378,0849, [C] de m/z 397,0587, [D] de m/z 755,1689, [E] de m/z 208,0389, [F] de m/z 557,1377 e

[G] de m/z 576,108; [H] espectro no modo negativo do lactobionato de cálcio.

Tabela 8: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de cálcio purificado.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
378,0849	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_2 Ca + H]^+$	+2	378,0849	100,000
			378,5874	27,378
			379,0886	9,207
			379,5893	1,975
397,0587	$[C_{12}H_{21}O_{12}Ca]^+$	+1	397,0587	100,000
			398,0646	13,678
			399,0576	3,998
755,1689	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_2 Ca + H]^+$	+1	755,1689	100,000
			756,1691	27,367
			757,1746	9,203
208,0389	$[C_{12}H_{22}O_{12} Ca + H_2O]^+$	+2	208,0389	100,000
			208,5408	13,750
			209,0387	4,214
557,1377	$[(C_{12}H_{22}O_{12})_3 Ca]^+$	+2	557,1377	100,000
			557,6393	41,067
			558,1371	16,287
			558,6385	4,518
			559,1225	3,288
576,1084	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_3 Ca + (H_2O)_2 + H]^+$	+2	576,1084	100,000
			576,6107	41,212
			577,1105	16,758
			577,6147	4,711
			578,1085	3,362
357,1108	$[C_{12}H_{21}O_{12}Ca - Ca]^-$	-1	357,1108	100,000
			358,1123	13,678
			359,1129	3,331
715,22	$[C_{12}H_{21}O_{12})_2Ca - Ca]^-$	-1	715,2239	100,000
			716,2274	27,367
			717,2296	8,536

No modo positivo, representado pelas Figuras 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F e 19G, foram identificadas a formação de carga positiva com a formação de adutos de lactobionato de cálcio na forma de $[M+H]^+$ com m/z de 378,0849. Foi detectada, também, a m/z de 397,0587, correspondente a um lactobionato ligado ao Ca^{+2} ($[M+Ca^2]^+$). Adutos de dois e três lactobionatos também foram detectados com m/z de 557,1377 e 755,1689, respectivamente, além de conjugados com água (m/z 208,0389 e 576,1084). Salienta-se, neste espectro, a presença de dois íons de lactobionato ligados com um íon de Ca^{2+} (Equação 15). No modo negativo, Figura 19H, foram identificados adutos de lactobionato na forma de $[M-Ca^2]^-$ com m/z de 357,1108 e $[M+M-Ca^2]$ com m/z de 715,2239.

A confirmação estrutural dos sais de lactobionato também foi realizada pela atribuição dos sinais de carbono-13 obtidos pelas análises de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio são apresentados na Tabela 9, bem como os respectivos espectros nas Figuras 20, 21 e 22.

Tabela 9: Deslocamentos químicos dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio identificados por ressonância magnética nuclear de ^{13}C .

	Deslocamento químico (δ)		
	Lactobionato de sódio	Lactobionato de potássio	Lactobionato de cálcio
C1	178,5 ppm	178,5 ppm	178,5 ppm
C1'	103,4 ppm	103,4 ppm	103,3 ppm
C2	72,5 ppm	72,5 ppm	73,4 ppm
C2'	72,7 ppm	72,7 ppm	72,3 ppm
C3	71,0 ppm	71,0 ppm	70,9 ppm
C3'	81,5 ppm	81,5 ppm	81,5 ppm
C4	71,6 ppm	71,6 ppm	71,4 ppm
C4'	68,6 ppm	68,6 ppm	68,5 ppm
C5	71,4 ppm	71,4 ppm	71,4 ppm
C5'	75,3 ppm	75,3 ppm	75,3 ppm
C6	61,9 ppm	61,9 ppm	61,7 ppm
C6'	61,0 ppm	61,0 ppm	60,9 ppm

Pode ser observada na Tabela 9 bem como nos espectros das Figuras 20, 21 e 22, uma relação consistente entre os sinais para ambos os sais de lactobionato, sendo identificados todos os doze sinais esperados. O sinal observado em 178 ppm é atribuído ao carbono carbonílico. O sinal apresentado em 103 ppm foi atribuído ao carbono anomérico da porção galactosídica. Os demais sinais estão compreendidos entre 61 e 81 ppm.

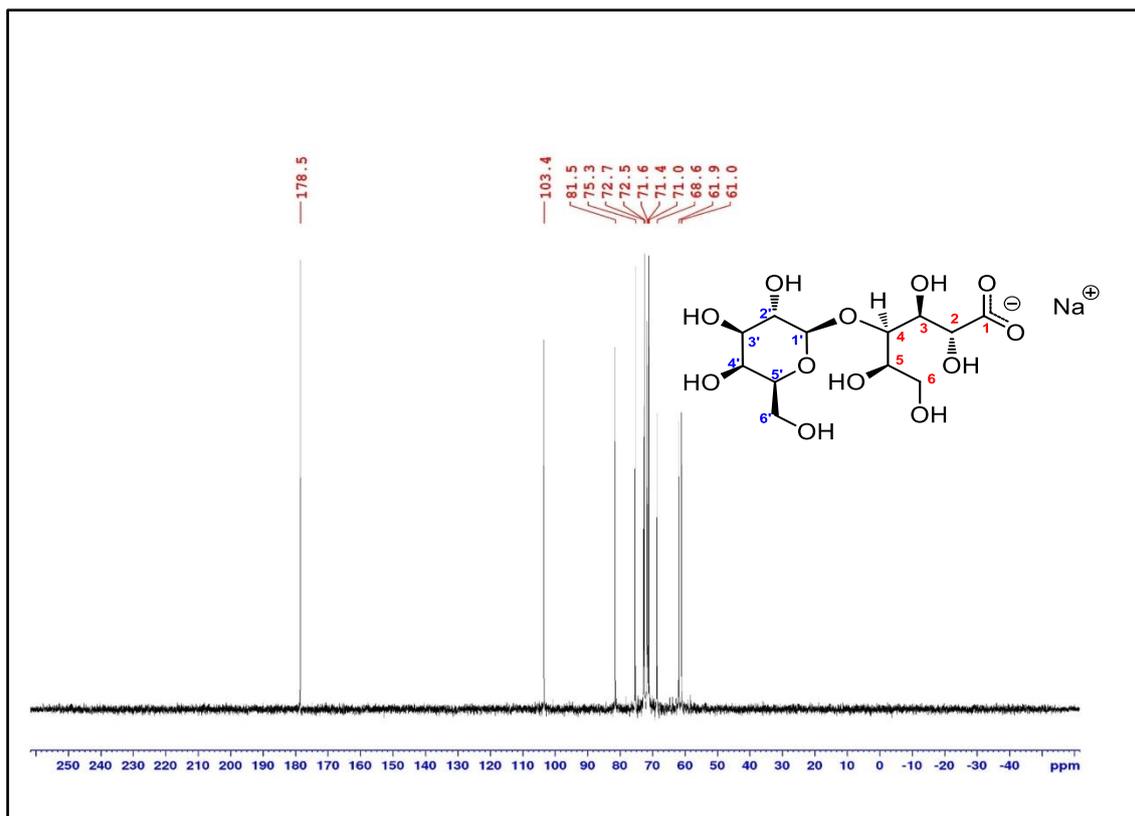


Figura 20: Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de sódio.

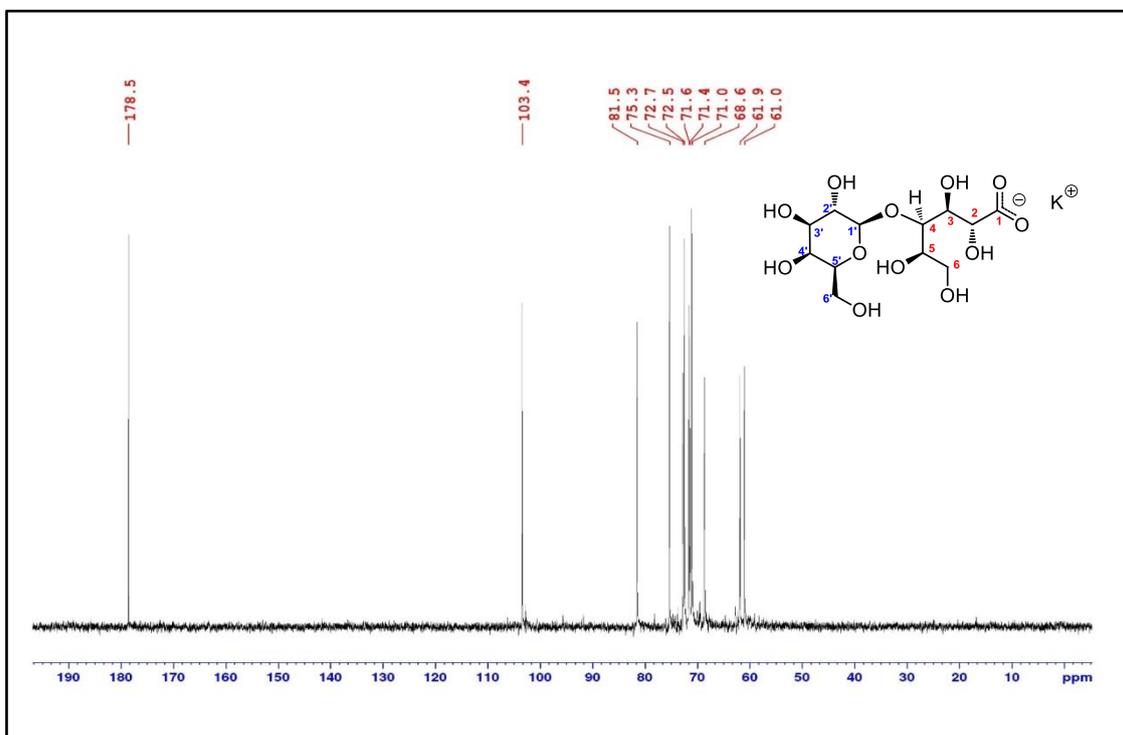


Figura 21: Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de potássio.

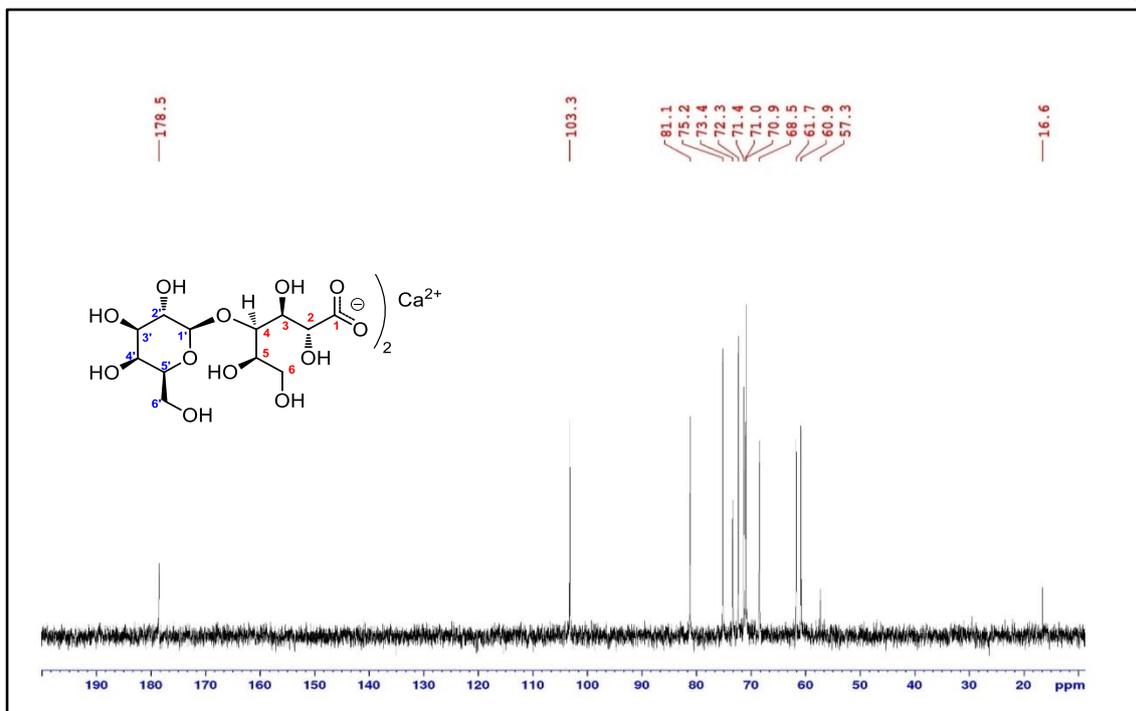


Figura 22: Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de cálcio.

Na contextualização dos dados apresentados e discutidos neste capítulo 1, os resultados são promissores devido a alta conversão (cerca de 75%) na obtenção dos lactobionatos de sódio de potássio e de cálcio, utilizando técnicas sem o uso de solventes, temperaturas elevadas e pressão. A técnica utilizada para a purificação permitiu a obtenção dos lactobionatos com elevada pureza 95% (m/v), apresentando como produtos residuais somente a lactose e o sorbitol. Na caracterização por espectrometria de massas, foram identificadas m/z correspondentes aos sais de lactobionato, formando adutos com íons H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e com H_2O , além da m/z correspondente ao sorbitol. Nas análises por RMN de ^{13}C , foram detectados os picos dos doze carbonos representantes das amostras. A caracterização por espectrometria de massas e RMN de ^{13}C , juntamente com as análises de cromatografia líquida, demonstram a seletividade da reação enzimática de GFOR/GL de *Z. mobilis*, na obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol.

4.2 Capítulo 2: Estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial.

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados referentes à bioprodução, em maior volume reacional, dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio, por células imobilizadas de *Z. mobilis*. Posteriormente, serão apresentados os resultados da etapa de purificação, visando à realização dos testes de estabilidade. Finalmente, são descritos os resultados obtidos nos testes de estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração para os lactobionatos de sódio, de potássio, de cálcio e do ácido lactobiônico (obtido a partir da conversão do lactobionato de sódio por troca iônica) em comparação com o ácido lactobiônico comercial.

4.2.1 Bioprodução e purificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio

As amostras dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio foram obtidas em ensaios de bioconversão utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis* e substratos lactose e frutose. Para o lactobionato de sódio, utilizou-se NaOH 7,0 mol/L para controle do pH e volume de bioconversão de 2,5 L. Para o lactobionato de potássio, KOH 7,0 mol/L foi utilizado e a reação foi realizada em volume de 1,3 L. Para lactobionato de cálcio, Ca(OH)₂ em pó foi utilizado para controlar o pH, em volume reacional de 0,65 L.

Ao final das etapas de bioconversão, os caldos foram analisados por cromatografia em fase líquida, com o intuito de determinar a concentração dos produtos e de substratos residuais, apresentados na Tabela 10.

Analisando a Tabela 10, de uma forma geral, foram determinadas concentrações de substratos e produtos semelhantes aos obtidos nos testes de bioprodução conduzidos em menor volume reacional, descritos no Capítulo 1, cerca de 57% de lactobionato, 12% de lactose, 2% de frutose e 27% de sorbitol (Tabela 5).

A etapa de purificação dos lactobionatos foi realizada por precipitação com etanol. Etanol 96% (v/v) foi adicionado ao caldo final das respectivas bioconversões até que fosse atingida concentração de solvente de 70% (v/v). Esta concentração de etanol foi definida por Oliveira *et al.* (2015), que demonstraram a obtenção de maior taxa de purificação e recuperação do lactobionato de sódio entre as condições avaliadas. Três etapas de precipitação foram realizadas com o intuito de obter um produto com maior grau de pureza. Ao final, os produtos foram secos e macerados, obtendo-se um pó branco e cristalino.

Em seguida, procedeu-se à conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico para a obtenção do produto em forma sólida (cristais), sendo este submetido à liofilização.

Na Tabela 11, são apresentadas as concentrações dos produtos, dos substratos residuais e as devidas proporções após a etapa de purificação.

Tabela 10: Determinação da concentração, por cromatografia líquida, dos substratos residuais lactose e frutose e dos produtos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e sorbitol obtidos via bioconversão por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L de mmol/L de frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C). Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão.

Amostra	Lactobionato		Lactose		Frutose		Sorbitol	
	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)
Lactobionato de sódio	243,89 ± 2,04	59,18	44,19 ± 1,78	10,72	1,64 ± 0,09	0,39	122,47 ± 4,56	29,71
Lactobionato de potássio	211,86 ± 8,21	55,28	59,64 ± 3,21	15,59	9,76 ± 0,42	2,54	106,42 ± 2,88	26,59
Lactobionato de cálcio	240,90 ± 4,69	58,85	48,51 ± 3,52	11,85	8,78 ± 0,57	2,14	111,15 ± 3,99	27,16

Tabela 11: Quantificação, por cromatografia líquida, dos produtos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico, sorbitol e substratos lactose e frutose após a etapa de purificação por precipitação com etanol (etanol 70%, 500 mL/min, 45°C). Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão.

Amostra	Lactobionato/ ácido lactobiônico		Lactose		Frutose		Sorbitol	
	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)
Lactobionato de sódio	9,77 ± 0,15	92,32	0,43 ± 0,09	4,07	nd	nd	0,39 ± 0,01	3,60
Lactobionato de potássio	9,71 ± 0,13	92,27	0,59 ± 0,06	5,63	nd	nd	0,22 ± 0,02	2,09
Lactobionato de cálcio	9,39 ± 0,27	96,75	0,13 ± 0,00	1,30	nd	nd	0,19 ± 0,01	1,94
Ácido lactobiônico	8,43 ± 0,02	93,71	0,29 ± 0,09	3,18	nd	nd	0,28 ± 0,11	3,11

nd: não detectada

Na Figura 23, são apresentados os cromatogramas referentes às amostras da mistura final de cada bioconversão e das amostras após a etapa de purificação dos compostos. Como pode ser observado, a eluição dos picos de lactobionato/ácido lactobiônico, lactose e sorbitol foi detectada nos tempos de retenção de 10,5, 11,5 e 15,5 min, respectivamente.

Analisando os resultados da Tabela 11 e da Figura 23, maior percentual de pureza, de 96,75%, foi atingido para o lactobionato de cálcio e, ainda, apresentando 1,30% de lactose e 1,94% de sorbitol, identificados nos picos apresentados na Figura 23C. Para lactobionato de sódio, potássio e ácido lactobiônico, purezas médias de 92,32, 92,27 e 93,71% foram determinadas, respectivamente. Entre estes, maior teor de lactose foi identificado na bioconversão de lactobionato de potássio, de 5,63% (Figura 23B) e maior percentual de sorbitol, de 3,60%, foi identificado no caldo da bioprodução de lactobionato de sódio (Figura 23A). A frutose não foi detectada no produto final, como argumentado anteriormente, em função da elevada solubilidade em etanol (European Pharmacopeia, 2008).

Na Figura 23D, estão demonstrados os cromatogramas do caldo final da bioprodução do lactobionato de sódio e o produto após a etapa de purificação e conversão para a forma ácida. Assim, sendo detectada a presença de 3,18% de lactose e 3,11% de sorbitol (Tabela 11).

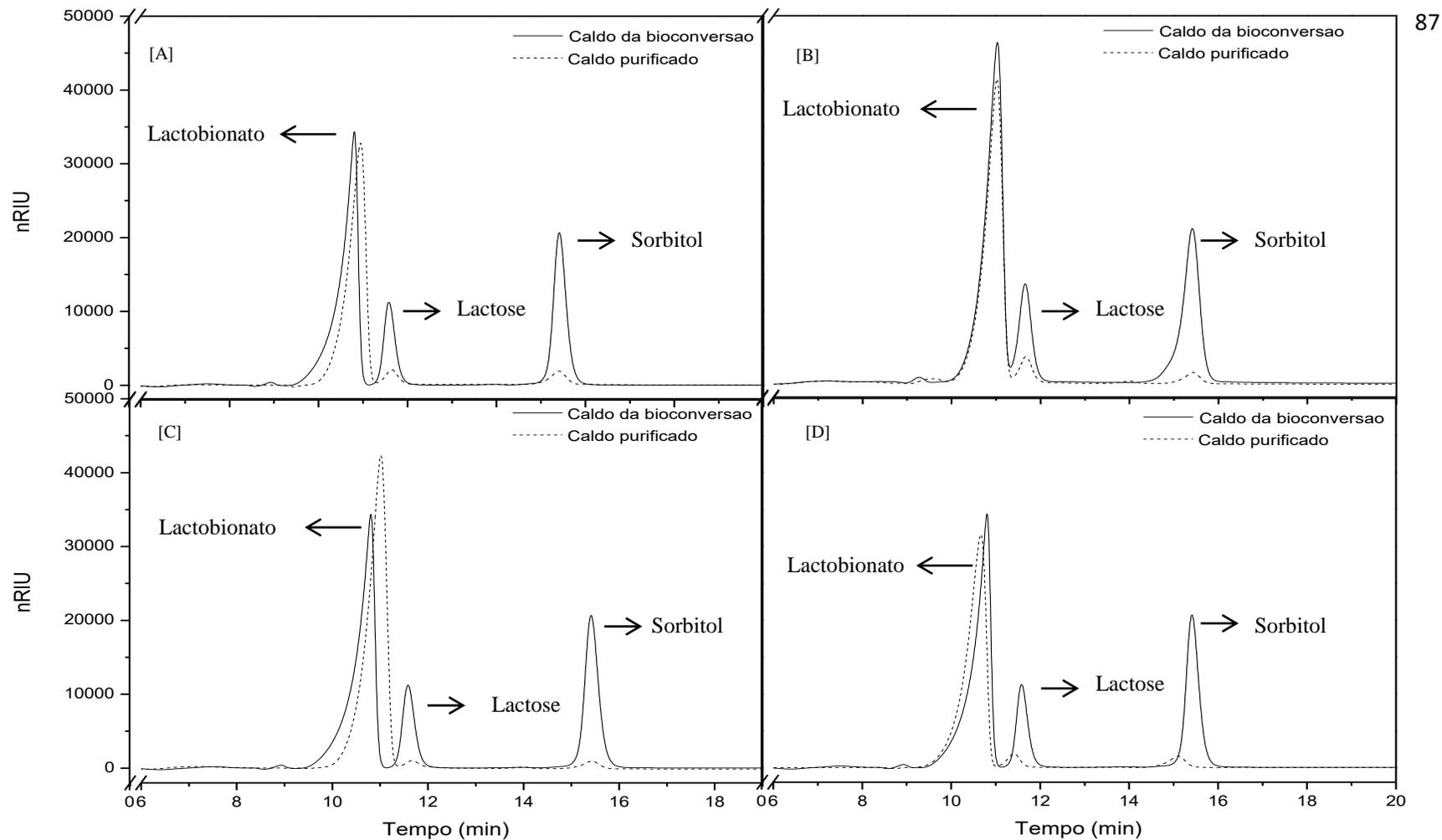


Figura 23: Cromatogramas relativos às amostras da mistura final de cada bioconversão e após a etapa de purificação dos produtos.

Coluna de fase reversa Aminex HPX-87H (BioRad), fase móvel H_2SO_4 0,05 mmol/L, 0,4 mL/min, a 60°C , detector por índice de refração.

[A] lactobionato de sódio; [B] lactobionato de potássio; [C] lactobionato de cálcio; [D] ácido lactobiônico.

4.2.2 Estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade acelerada é projetado com o intuito de acelerar uma possível degradação física ou química de insumos ou produtos farmacêuticos. No ensaio de estabilidade acelerada, utilizaram-se amostras de lactobionato de sódio, de potássio, de cálcio e ácido lactobiônico, obtidos e purificados na etapa anterior, em comparação com o ácido lactobiônico comercial. Para definir a estabilidade das moléculas, foram avaliadas características físico químicas como pH, poder rotatório, solubilidade, umidade, doseamento e análise por espectrometria de massas do produto inicial e após três e seis meses de incubação, nas condições dos testes.

Na Tabela 12, são apresentados os resultados iniciais do pH e depois de três e seis meses de análise das referidas amostras em solução 10 g/L.

Tabela 12: Leituras de pH das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em concentração de 10 g/L, no tempo inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. Os resultados estão descritos em média±desvio padrão.

Amostra	pH inicial	pH 3 meses	pH 6 meses
Lactobionato de sódio	6,44 ± 0,06 ^a	6,57±0,04 ^a	6,24±0,09 ^b
Lactobionato de potássio	6,41 ± 0,03 ^a	6,16±0,10 ^b	6,09±0,05 ^b
Lactobionato de cálcio	7,23 ± 0,05 ^a	6,89±0,13 ^a	6,48±0,09 ^b
Ácido lactobiônico	2,39 ± 0,05 ^a	2,28±0,25 ^a	2,98±0,02 ^b
Ácido lactobiônico comercial	2,74 ± 0,04 ^a	2,63±0,10 ^{ab}	2,54±0,05 ^b

Resultados com letras iguais e apresentados nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Como pode ser observado na Tabela 12, no caso dos lactobionatos de sódio, de potássio, de cálcio e do ácido lactobiônico comercial, houve uma queda significativa do pH da solução inicial em relação à avaliação realizada após seis meses de incubação. Em particular para a amostra de ácido lactobiônico, foi identificado aumento significativo do pH, comparando-se a solução inicial com a avaliada após seis meses, de pH 2,39 para 2,98.

Carra (2012), na avaliação do pH das soluções 1% (m/v) de lactobionato de sódio e do ácido lactobiônico relata valores de 6,38 e 2,96, respectivamente. O valor do pH relativo à solução do lactobionato de sódio foi semelhante à obtida na amostra inicial no presente estudo, de 6,44. O mesmo comportamento foi observado para o caso da solução de ácido lactobiônico, cujo pH determinado após seis meses de incubação foi de 2,98, semelhante ao relatado na literatura.

Segundo a monografia do lactobionato de cálcio, uma solução de concentração 1:20 (1 g/20 mL), deve apresentar pH entre 5,4 e 7,4. Assim as soluções de lactobionato de cálcio analisadas nos tempos zero, três e seis meses, de pH 7,23, 6,89 e 6,48, respectivamente, estão de acordo com os valores especificados (USP, 2015).

De acordo com a monografia da British Pharmacopeia (2009), o ácido lactobiônico é uma mistura, em diferentes proporções, entre sua forma ácida e a forma de δ -lactona. Na forma de δ -lactona, ocorre a formação do anel, onde o grupamento ácido carboxílico participa da reação. Esta reação pode ter ocorrido com o ácido lactobiônico, no qual foi identificado um leve aumento no pH de 2,39 - amostra inicial - para 2,98, amostra relativa a seis meses.

Devido à importância da verificação da pureza enantiomérica na análise de estabilidade e de caracterização de uma estrutura, o poder rotatório foi determinado. Na Tabela 13, estão descritos valores de $[\alpha]_D^{20}$ das amostras iniciais, de três e seis meses.

Tabela 13: Análise do poder rotatório dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em concentração 10% (m/v) inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. Os resultados estão descritos em média±desvio padrão.

Amostra	$[\alpha]_D^{20}$ inicial	$[\alpha]_D^{20}$ 3 meses	$[\alpha]_D^{20}$ 6 meses
Lactobionato de sódio	+21,00° ± 0,99 ^a	+20,29°±0,66 ^a	+18,29°±0,99 ^c
Lactobionato de potássio	+22,72° ± 0,25 ^a	+20,86°±0,88 ^b	+20,24°±0,25 ^b
Lactobionato de cálcio	+22,73° ± 0,25 ^a	+21,28°±0,52 ^b	+20,65°±0,76 ^b
Ácido lactobiônico	+20,62° ± 0,29 ^a	+18,31°±0,80 ^b	+17,93°±0,53 ^b
Ácido lactobiônico-comercial	+22,83° ± 0,29 ^a	na	+17,44°±0,00 ^b

Resultados com letras iguais e apresentados nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si (p<0,05); na: não avaliado.

Observa-se, primeiramente, o desvio do plano da luz polarizada para a direita (+ ou D) em todas as estruturas analisadas. Tanto o ácido lactobiônico (4-*O*-b-D-galactopiranosil-D-acido glicônico) quanto a sua forma de δ -lactona (4-*O*-b-D-galactopiranosil-D-glicono-1,5-lactona) são dextrógiros (British Pharmacopeia, 2009). Evidenciou-se uma diferença significativa do poder rotatório para as cinco amostras iniciais comparadas com as amostras submetidas a seis meses de incubação (a 40°C e 75% UR).

Segundo a monografia do ácido lactobiônico, o poder rotatório da substância anidra em concentração de 1% (m/v) deve apresentar valores entre +23,0° e + 29,0° (British Pharmacopeia, 2009). O $[\alpha]_D^{20}$ tanto das amostras de ácido lactobiônico (+20,62°) quanto do ácido lactobiônico comercial (+22,83°), descritos na Tabela 13, foram inferiores ao determinado na referida monografia. Entretanto, cabe salientar que o

número de graus de rotação medido no polarímetro depende não somente da natureza da amostra, mas também da concentração da solução e do comprimento do tubo em que a amostra se encontra (Barbosa, 2011).

Como a concentração utilizada no presente estudo (10% m/v) é diferente da determinada pela British Pharmacopeia (2009) (1% m/v), seria aceitável a diferença nos valores determinados. Ainda, a determinação do poder rotatório é uma análise manual, sendo que o resultado pode ser interferido por pequenas diferenças das concentrações das amostras, pela temperatura ambiente e, também, pelo operador.

Segundo Carra (2012), na determinação do poder rotatório do lactobionato de sódio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial em concentração de 10% (m/v), foram obtidos os valores de + 22,5°, + 23,4° e +25,2°, respectivamente. Estes valores são superiores aos encontrados no presente estudo, onde os valores de $[\alpha]_D^{20}$ das amostras iniciais do lactobionato de sódio, ácido lactobiônico e ácido lactobiônico comercial foram de +21,00°, +20,62° e +22,83°, respectivamente, os quais podem estar associados aos argumentos referenciados anteriormente.

Valle (2009) analisou o poder rotatório do lactobionato de sódio produzido pelo sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* em comparação com o ácido lactobiônico comercial, ambos em concentração de 0,5 g/10 mL (5% m/v), sendo definidos valores de +22,5° e + 27,7°, respectivamente. Além disso, sugere que, em função dos resultados obtidos, o sal de lactobionato não apresenta nenhuma substância isômera ou racêmica.

A monografia do lactobionato de cálcio determina o poder rotatório entre +22,0° e + 26,5° (USP, 2015), portanto, a amostra inicial de lactobionato avaliada neste trabalho está dentro do preconizado. Entretanto, para as amostras de três e seis meses de incubação, valores inferiores à faixa estipulada foram obtidos.

Para o lactobionato de potássio, até o momento, não foi identificada monografia ou artigos na literatura especializada que informem o respectivo valor do poder rotatório e que possa, então, ser comparado. Neste trabalho, o $[\alpha]_D^{20}$ do lactobionato de potássio foi inicialmente de $+22,72^\circ$, contudo, foi observada a queda após incubação de três e seis meses, estimado em $+20^\circ$.

Com relação à análise de solubilidade dos compostos, esta foi realizada no início e ao final de seis meses de incubação. Para isto, 1 g de cada amostra foi submetida à solubilização com a adição inicial de 1 mL de água Milli-Q. Na Tabela 14, estão descritos os resultados da determinação da solubilidade dos sais de lactobionato, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial.

Tabela 14: Análise da solubilidade de 1 g dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em água Milli-Q, no tempo inicial e após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.

Amostra	Inicial	6 meses
Lactobionato de sódio	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel
Lactobionato de potássio	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel
Lactobionato de cálcio	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel
Acido lactobiônico	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel
Acido lactobiônico comercial	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), quando 1 g de amostra é solubilizada em menos de uma parte (1 mL), esta é classificada como muito solúvel. Quando 1 g de amostra é solubilizada de 1 a 10 partes (1 a 10 mL), é classificada como facilmente

solúvel. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, para todas as amostras, 1g foi solubilizada em 1 a 10 mL, sendo classificadas como facilmente solúvel. Salienta-se a solubilização das amostras dos lactobionatos de potássio, de cálcio, ácido lactobiônico e ácido lactobiônico comercial de 1g em 1 mL. A amostra de lactobionato de sódio também apresentou classificação facilmente solúvel, contudo, foram utilizados 2 mL de água para dissolver a amostra (1g).

Segundo a British Pharmacopeia (2009) o ácido lactobiônico é classificado como livremente solúvel em água, ou seja 1 g é solubilizada de 1 a 10 partes (1 a 10 mL). Ao realizar os testes com o ácido lactobiônico e o ácido lactobiônico comercial, foi possível a solubilização de 1 g em 1 mL de água, sendo classificado, portanto, como facilmente solúvel. A solubilidade elevada do ácido lactobiônico e dos sais em água ocorre devido ao grande número de hidroxilas, que conferem polaridade à molécula e, assim, a tornam facilmente solúvel em água (Barbosa, 2011).

A análise de umidade das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial foi realizada no início e ao final do estudo de estabilidade acelerada. Os resultados gerais são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Análise da umidade dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, no tempo inicial e após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. Os resultados estão descritos em média±desvio padrão.

Amostra	Inicial (%)	6 meses (%)
Lactobionato de sódio	1,55 ± 0,26	3,96 ± 0,18
Lactobionato de potássio	1,81 ± 0,11	3,36 ± 0,25
Lactobionato de cálcio	9,56 ± 1,34	12,01 ± 0,28
Ácido Lactobiônico	2,86 ± 0,05	15,34 ± 0,25
Ácido lactobiônico comercial	1,98 ± 0,10	na

na: não avaliado

Na análise dos resultados de umidade, verifica-se que, em todos os casos, houve aumento do grau de umidade, em especial para o ácido lactobiônico, que apresentou umidade final de 15,34% (Tabela 15). Os resultados obtidos para os lactobionatos de sódio e de potássio foram semelhantes, de 1,55 e 1,81% de umidade inicial e 3,96 e 3,36% ao final, respectivamente. No caso do lactobionato de cálcio, foi identificada umidade elevada no início (9,56%) e ao final (12,01%), sendo observado um aumento de aproximadamente 3%. A partir destes resultados, verifica-se que o ácido lactobiônico tem maior capacidade de retenção de água em relação aos compostos salinos – lactobionatos.

O aspecto do ácido lactobiônico após seis meses de avaliação pode ser observado na Figura 24, com a formação de gel, assim como a alteração da coloração da amostra de ácido lactobiônico e, também, do ácido lactobiônico comercial. A estrutura

do ácido lactobiônico apresenta diversas hidroxilas, que têm a capacidade de interagir com a água, devido às ligações de hidrogênio. Esta capacidade de retenção de água é citada em diversos estudos, onde é relatada a ação umectante com capacidade de retenção de 14% de água, formando uma matriz de gel (Grimes *et al.*, 2004; Yu & Van Scott, 2004).

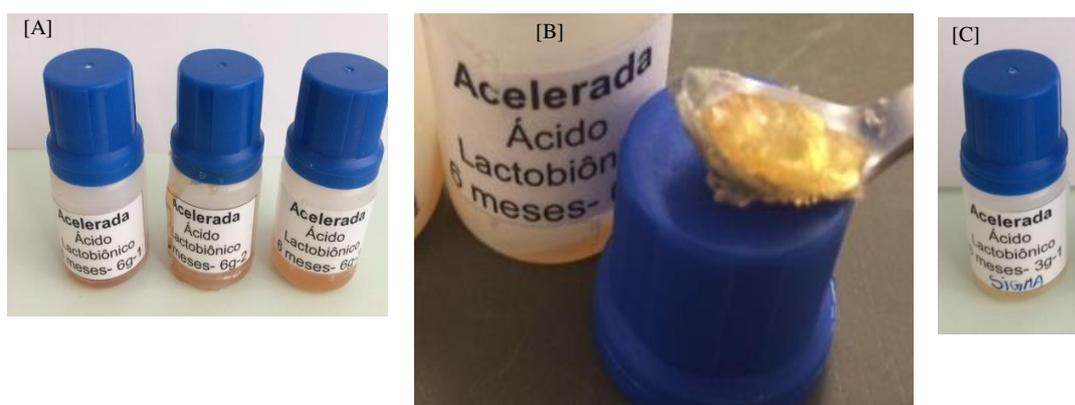


Figura 24: Amostras do ácido lactobiônico [A] e [B] e do ácido lactobiônico comercial [C], após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.

Para verificar a concentração do ácido lactobiônico e dos sais de lactobionato, as amostras foram quantificadas e analisadas por cromatografia em fase líquida. Na Tabela 16, são apresentadas as concentrações teóricas (calculadas a partir do peso e da pureza), a concentração obtida por método cromatográfico (concentração real) e o percentual recuperado (relação entre teórico e real).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 16, não foram observadas diferenças significativas em relação ao percentual recuperado das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio dos tempos inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% UR, sendo o percentual recuperado mantido em torno de 100%. Para o ácido lactobiônico e o ácido lactobiônico comercial, foi identificada diferença significativa do percentual recuperado inicial em relação às amostras de três e

seis meses, iniciando com aproximadamente 90% de recuperação e finalizando em 70% após seis meses de incubação.

Tabela 16: Concentração, obtida por cromatografia líquida, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa. Resultados descritos em média± desvio padrão.

		Lactobionato de	Lactobionato de	Lactobionato de	Ácido lactobiônico	Ácido lactobiônico
		sódio	potássio	cálcio		comercial
Inicial	Teórico (g/L)	9,63 ± 0,33	9,49 ± 0,28	9,33 ± 0,41	9,24 ± 0,23	9,22 ± 0,02
	Real (g/L)	9,77 ± 0,15	9,71 ± 0,26	9,39 ± 0,20	8,43 ± 0,27	8,55 ± 0,30
	Recuperado (%)	101,49 ± 2,33 ^a	102,34 ± 2,26 ^a	100,75 ± 1,78 ^a	91,30 ± 2,29 ^a	92,70 ± 3,05 ^a
3 meses	Teórico (g/L)	9,18 ± 0,07	9,29 ± 0,01	9,55 ± 0,23	9,53 ± 0,17	10,75 ± 0,10
	Real (g/L)	9,49 ± 0,20	9,58 ± 0,07	9,47 ± 0,20	7,32 ± 0,31	7,39 ± 1,07
	Recuperado (%)	103,30 ± 0,50 ^a	103,15 ± 0,25 ^a	99,21 ± 2,50 ^a	79,02 ± 2,85 ^b	69,88 ± 10,15 ^b
6 meses	Teórico (g/L)	9,16 ± 0,13	9,24 ± 0,01	8,53 ± 0,00	9,47 ± 0,10	10,06 ± 0,01
	Real (g/L)	9,14 ± 0,04	9,26 ± 0,06	8,76 ± 0,07	6,94 ± 0,19	7,13 ± 0,21
	Recuperado (%)	99,84 ± 0,71 ^a	100,58 ± 1,24 ^a	102,58 ± 0,53 ^a	73,35 ± 0,85 ^b	70,87 ± 2,11 ^b

Resultados com letras iguais e apresentados nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Na Figura 25, são apresentados os cromatogramas das referidas amostras do tempo inicial, de três e seis meses de incubação. Para os lactobionatos de sódio (Figura 25A), de potássio (Figura 25B) e de cálcio (Figura 25C) são identificados somente três picos correspondentes ao lactobionato (10,5 min), lactose (11,5 min) e sorbitol (15 min), o que era esperado, visto que no doseamento, apresentado na Tabela 16, foi definido o percentual de recuperação em torno de 100%.

Entretanto, ao analisar os cromatogramas do ácido lactobiônico (Figura 25D) e do ácido lactobiônico comercial (Figura 25E), observa-se a eluição de um pico no tempo de retenção de 9 min. Este pico está presente nos três tempos de análise, mas em menor intensidade nas amostras iniciais. Possivelmente, refere-se a um pico de degradação do ácido lactobiônico, uma vez que, na análise de doseamento, o percentual de recuperação inicial e após seis meses foi de 90 e 70%, respectivamente.

Pedruzzi *et al.* (2007), na análise de ácido lactobiônico- comercial por cromatografia em fase líquida, utilizando coluna Cyclobond I 2000 (fase móvel 70:30 acetonitrila:tampão NaH_2PO_4 10 mM, pH 3,0, fluxo de 1 mL/min, a 20°C), identificaram a eluição do pico da lactobionolactona em 6 min e do ácido lactobiônico em 10 min. Com o uso de outra coluna - IC Sep ICE-ION-300 – e condições analíticas (fase móvel ácido sulfúrico 0,450mM, pH 3,1, vazão de 0,5 mL/min, a 75°C), a lactona foi detectada em 5,5 min, enquanto que o pico de eluição do ácido lactobiônico foi observado em 8 min.

Simms *et al.* (1994), com o uso da coluna Bio-Rad HPX-87C e condições analíticas ainda diferentes, relata a eluição da lactona e do ácido lactobiônico em 8 e 10 min, respectivamente. A lactobionolactona é uma estrutura intermediária da obtenção do ácido lactobiônico (Simms *et al.*, 1994) e segundo a British Pharmacopeia (2009), não é considerada uma impureza resultante da degradação do ácido lactobiônico. É relatado,

ainda, que podem ser encontradas diversas proporções entre a forma lactona e a forma ácida. A partir destas informações, sugere-se que o pico identificado em 9 min (Figura 25D e 25E), seja correspondente à lactobionolactona.

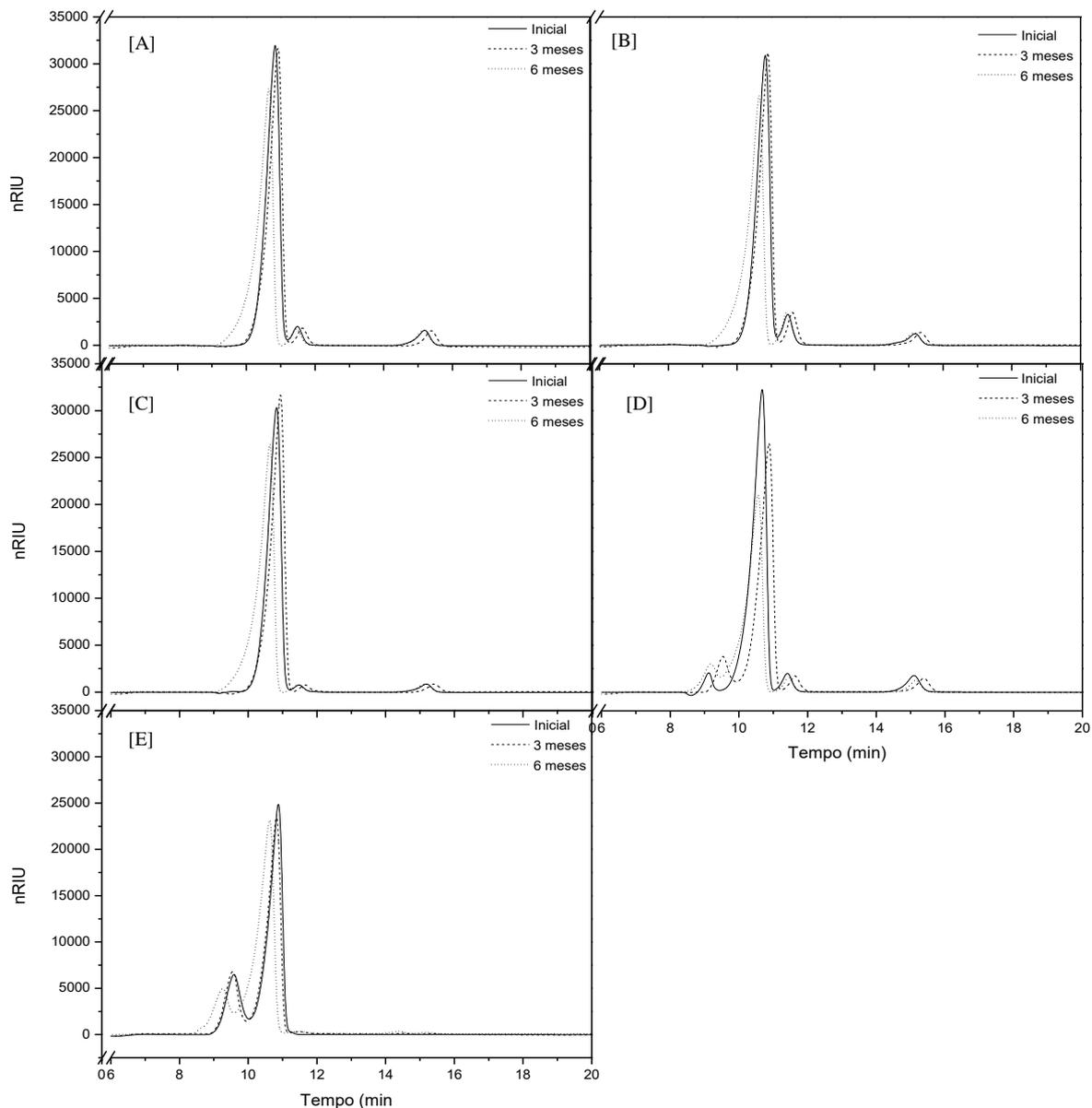


Figura 25: Cromatogramas obtidos dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C], do ácido lactobiônico [D] e do ácido lactobiônico comercial [E], no tempo inicial, após três e seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.

Na formação da lactobionolactona, ocorre uma reação de esterificação intramolecular levando à formação da lactona, conforme demonstrado na Figura 26.

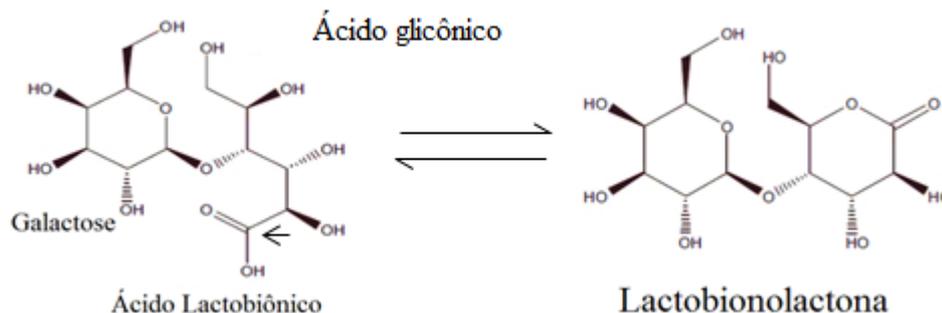


Figura 26: Reação de interconversão do ácido lactobiônico em lactobionolactona.

Fonte: adaptado de Pedruzzi *et al.* (2010).

Na sequência, são apresentados os espectros obtidos por espectrometria de massas, no qual foram analisadas as amostras inicial, recém-obtida (tempo 0 h) dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial e também após três e seis meses de exposição, nas condições dos testes.

Na Figura 27, são apresentados os espectros de massa do lactobionato de sódio e os respectivos espectros expandidos. Os espectros obtidos das amostras de lactobionato de sódio para os três tempos de análise (inicial, três e seis meses) foram semelhantes, portanto, apenas o inicial está mostrado. Na Figura 27A, é apresentado o espectro de massas, no modo positivo, obtido por injeção direta da amostra solubilizada em água Milli-Q. Para que ocorra a detecção, a molécula deve estar ionizada positivamente ou negativamente. Salienta-se que os picos de m/z detectados na Figura 27A foram expandidos para auxiliar na confirmação das m/z identificadas.

Na expansão, podem ser observados os picos de menor intensidade de acordo com a abundância dos respectivos isótopos, sendo uma ferramenta auxiliar para

identificação do íon formado. A expansão dos picos é mostrada nas Figuras 27B, 27C e 27D.

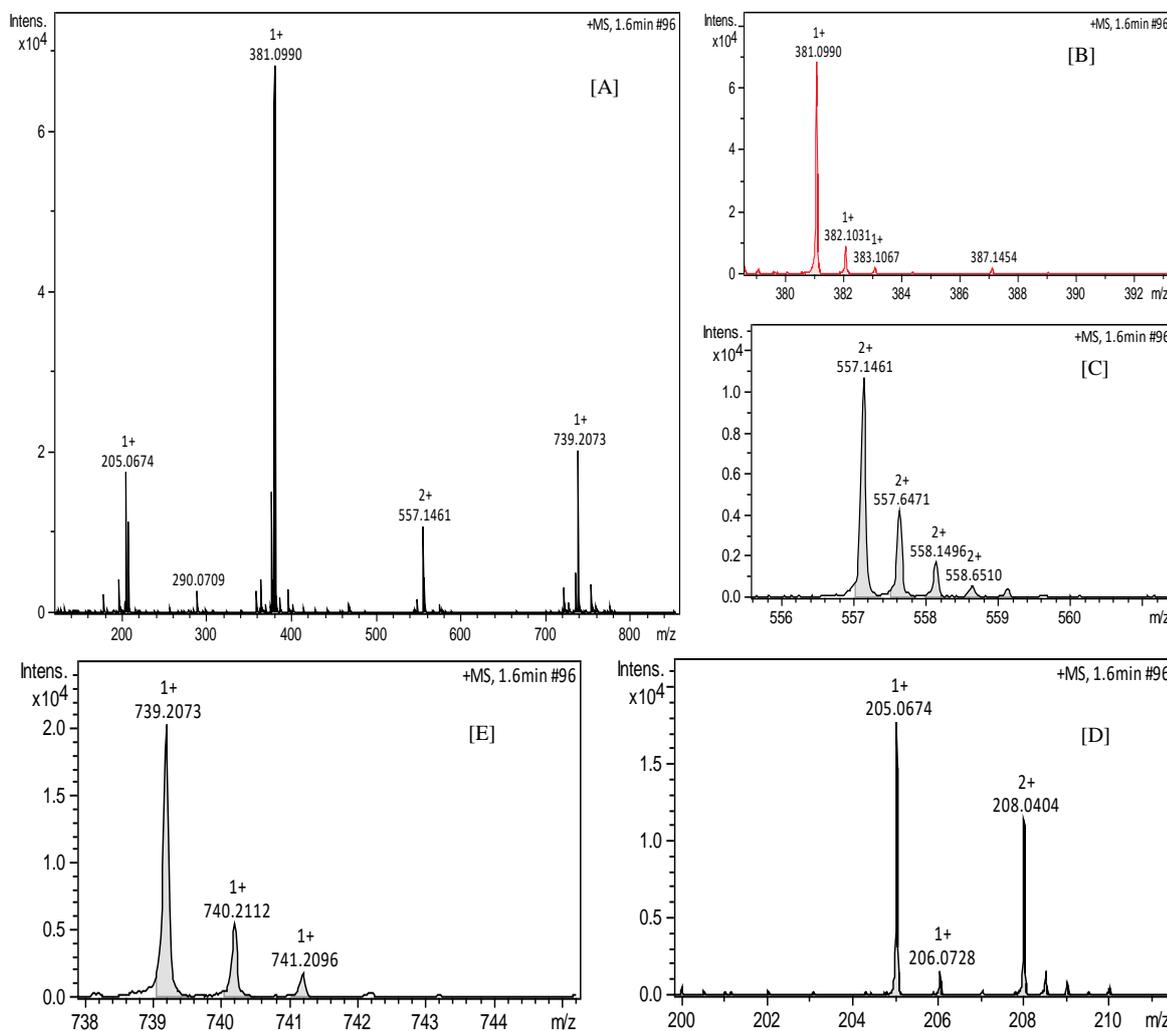


Figura 27: Espectrometria de massas, por injeção direta, da amostra de lactobionato de sódio incubada a 40°C e 75% de umidade relativa. [A] espectro de massas do lactobionato de sódio; [B] espectro expandido da m/z 381,0990, [C] da m/z 557,1416, [D] da m/z 205,0674 e [E] da m/z 739,2073.

Na Tabela 17, estão descritas as m/z detectadas, identificadas com as possíveis fórmulas moleculares correspondentes e, ainda, as m/z dos isótopos desta molécula e a

respectiva abundância. Nesta análise foram identificados os íons moleculares referentes ao lactobionato de sódio protonado $[M+H]^+$ com m/z de 381,0990, o aduto $[C_6H_{14}O_6 + Na]^+$ com m/z de 739,2073 e, além disso, foi constatado o aduto contendo um molécula de água (m/z 557,1461) e de conjugados do lactobionato, ou seja, adutos contendo duas ou três moléculas de lactobionato agrupadas (m/z 739,2073).

Tabela 17: Fórmulas moleculares identificadas a partir da relação m/z obtidas por espectrometria de massas das amostras de lactobionato de sódio incubadas a 40°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
381,0990	$[C_{12}H_{21}O_{12}Na + H]^+$	+1	381,0990	100,000
			382,1031	13,689
			383,1067	3,333
557,1461	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_3 + Na + H_2O + H]^+$	+2	557,1461	100,000
			557,6471	41,117
			558,1496	15,845
			558,6510	4,197
			559,1416	1,009
205,0674	$[C_6H_{14}O_6 + Na]^+$	+1	205,0674	100,000
			206,0728	6,879
739,2073	$[(C_{12}H_{22}O_{12})_2 + Na]^+$	+1	739,2073	100,000
			740,2112	27,378
			741,2096	8,539

Na Figura 28 é representada a estrutura do lactobionato de sódio, onde o íon Na^+ interage com a função ânion carboxilato do ácido carboxílico. Além do lactobionato de sódio, foi ainda identificada a m/z 205,0674 correspondente ao sorbitol, destacando que a pureza determinada por cromatografia líquida do lactobionato é de 94% e apresenta 3,6% de sorbitol (Tabela 11).

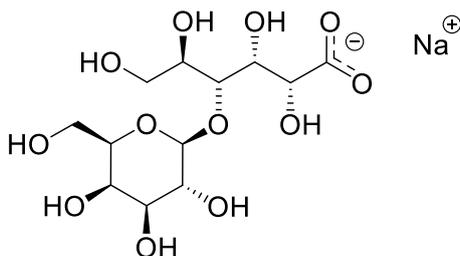


Figura 28: Estrutura química do lactobionato de sódio.

A partir dos resultados relativos ao lactobionato de sódio, descritos neste capítulo, sugere-se que o insumo se manteve estável durante os seis meses de incubação em 40°C e 75% de UR. Avaliados os resultados da cromatografia líquida e da espectrometria de massas, foram identificados o lactobionato, a lactose e o sorbitol, não sendo observados indícios de degradação da molécula. Portanto sugere-se que as diferenças no pH e no poder rotatório da amostra inicial em relação à final não sejam correspondentes a degradação.

Na Figura 29, estão mostrados os espectros de massas do lactobionato de potássio, obtidos da amostra inicial, de três e seis meses de exposição. As análises, por espectrometria de massas, do lactobionato de potássio da amostra inicial, de três e seis meses, apresentaram predominantemente as mesmas m/z , porém, com intensidades diferentes. A análise não é quantitativa e a intensidade do sinal varia de acordo com a estabilidade do íon formado. Na Figura 29A, está mostrado o perfil do espectro de massas do lactobionato de potássio e nas Figuras 29B, 29C, 29D, 29E, 29F e 29G, estão

representados os espectros expandidos para a melhor visualização da distribuição isotópica, que auxiliam na identificação dos valores de m/z .

Na Tabela 18, são apresentadas as m/z detectadas no espectro e identificadas com as possíveis fórmulas moleculares correspondentes, com as m/z dos isótopos desta molécula e a respectiva abundância.

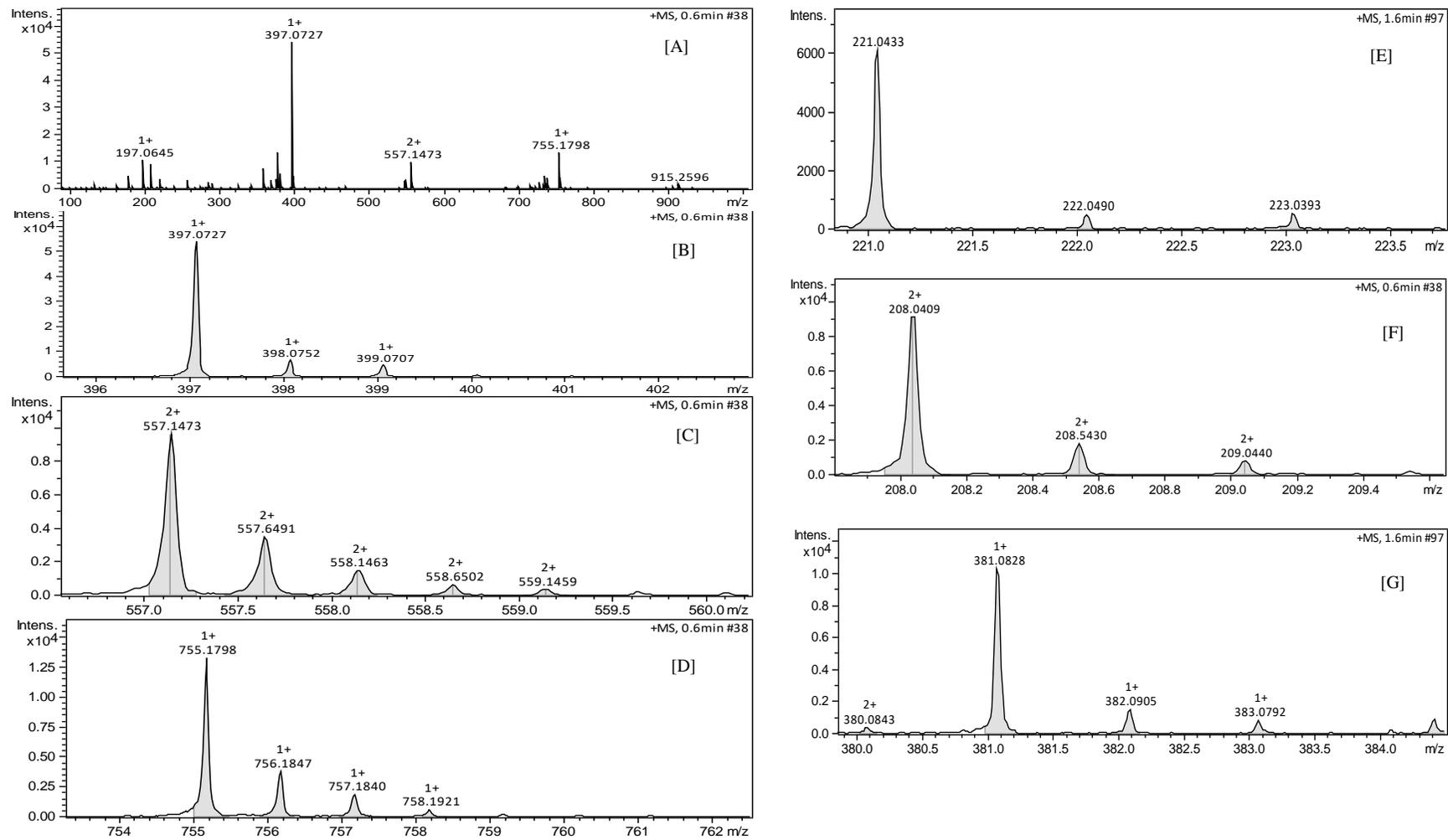


Figura 29: Espectro de massas, por injeção direta, de amostra lactobionato de potássio, incubada a 40°C e 75% de umidade relativa. [A] espectro de massas do lactobionato de potássio; [B] espectro expandido de m/z 397,0727, [C] de m/z 557,1473, [D] de m/z 755,1798, [E] de m/z 221,0415, [F] de m/z 208,0409 e [G] de m/z 381,0828

Tabela 18: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas por espectrometria de massas do lactobionato de potássio incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
397,0727	[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ K + H] ⁺	+1	397,0727	100,000
			398,0777	13,702
			399,0752	10,551
557,1473	[(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂) ₃ + Na + H ₂ O] ⁺	+2	557,1473	100,000
			557,6491	41,117
			558,1463	15,845
			558,6502	4,197
755,1798	[(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂) ₂ K] ⁺	+1	755,1798	100,000
			756,1847	27,391
			757,1840	15,759
			758,1921	3,630
221,0415	[C ₆ H ₁₄ O ₆ + K] ⁺	+1	221,0433	100,000
			222,0490	6,892
			223,0393	8,652
208,0409	[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ + K+ H ₂ O+H] ⁺	+2	208,0409	100,000
			208,5430	13,774
			209,0440	10,767
381,0828	[C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂ + Na] ⁺	+1	381,0828	100,000
			382,0905	13,689
			383,0792	3,333

Analisando a Tabela 18 e a Figura 29, foram identificados o lactobionato de potássio na forma de aduto $[M+H]^+$ com m/z de 397,0727, aduto do lactobionato com Na^+ ($[M+Na]^+$) apresentado m/z de 381,0828 e aduto de dois lactobionatos com K^+ ($[M+M+K]^+$) de m/z de 755,1798. Ainda, foram identificadas interações com H_2O (m/z 557,1473) e $K^+ + H_2O$ (m/z 208,0409). A presença do Na^+ no lactobionato de potássio pode ser justificada pela presença de Na^+ nas etapas de bioprodução, que pode ter permanecido retido na molécula.

Ainda, foi detectada m/z 221,0415 correspondente ao sorbitol ligado ao K^+ . Na Figura 30, é representada a estrutura do lactobionato de potássio, onde se observa a interação do íon K^+ com O^- do ácido carboxílico.

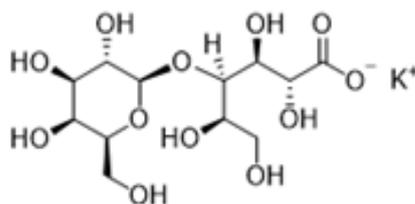


Figura 30: Estrutura química do lactobionato de potássio.

A partir dos resultados da espectrometria de massas da amostra de lactobionato de potássio inicial, após três e seis meses de incubação a $40^{\circ}C$ e 75% UR, juntamente com os resultados obtidos por cromatografia em fase líquida (Tabela 16 e Figura 25B), sugere-se que o lactobionato de potássio se manteve estável até o final do estudo de estabilidade acelerada. Não foram detectados indícios de degradação do insumo.

Na Figura 31, os resultados da espectrometria de massas obtidos das amostras do lactobionato de cálcio incubados em $40^{\circ}C$ e 75% UR são apresentados. Os espectros do lactobionato de cálcio inicial, de três e seis meses de incubação, exibiram perfis de m/z semelhantes.

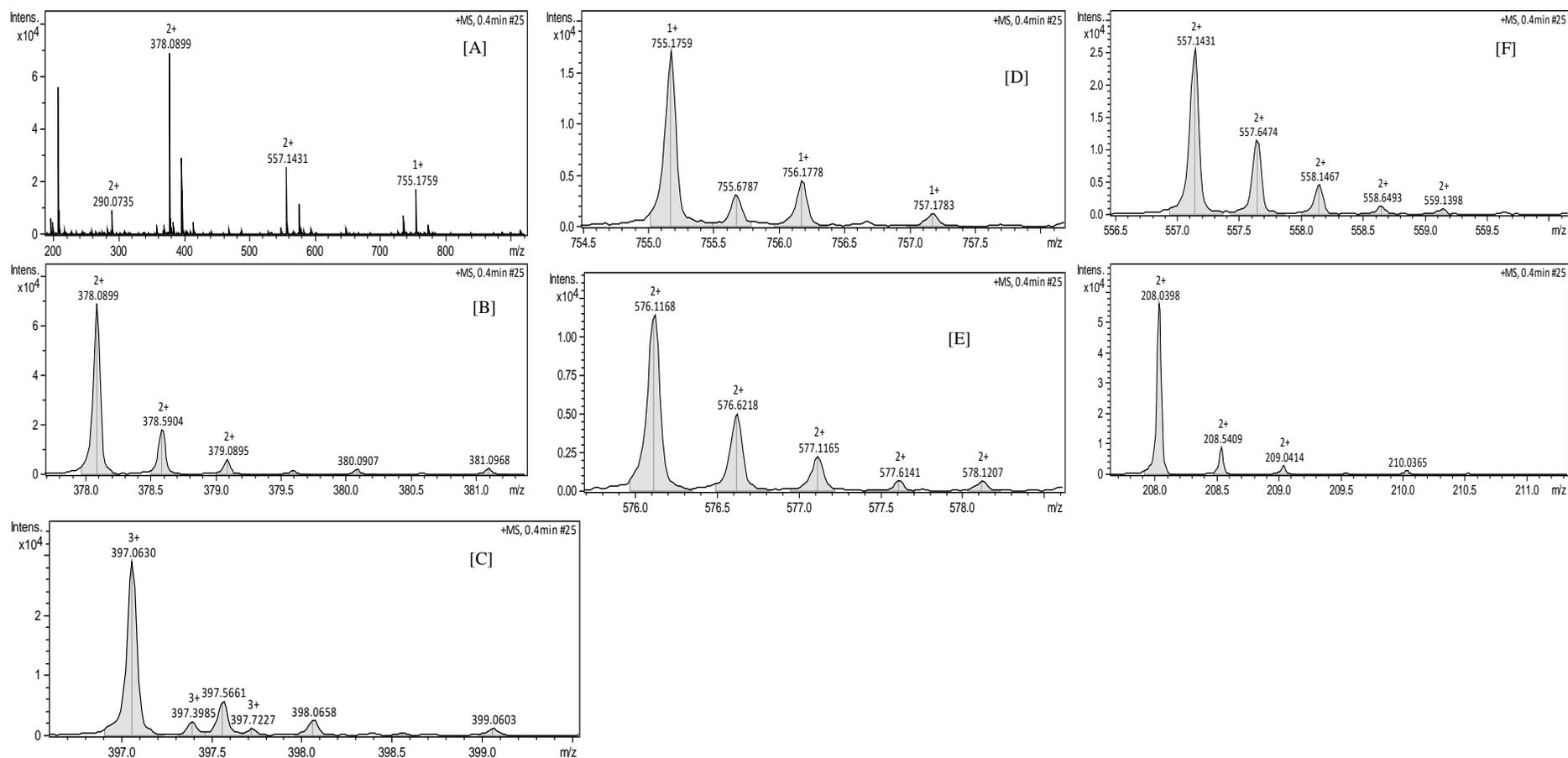


Figura 31: Espectro de massas, por injeção direta, de amostra de lactobionato de cálcio, incubada a 40°C e 75% de umidade relativa. [A] espectro de massas do lactobionato de cálcio, [B] espectro expandido da m/z 378,0899, [C] da m/z 397,0630, [D] da m/z 755,1759, [E] da m/z 576,1168, [F] da m/z 557,1431 e [G] da m/z 208,0398.

Tabela 19: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas por espectrometria de massas do lactobionato de cálcio incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
378,0899	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_2 Ca + H]^+$	+2	378,0899	100,000
			378,5904	27,378
			379,0895	9,207
			379,5958	1,975
397,0630	$[(C_{12}H_{21}O_{12}Ca)_3]^+$	+3	397,0630	100,000
			397,3985	41,033
			397,7227	17,608
755,1759	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_2 Ca + H]^+$	+1	755,1759	100,000
			756,1778	27,367
			757,1783	9,203
576,0735	$[(C_{12}H_{22}O_{12})_3 Ca + (H_2O)_2 + H]^+$	+2	576,0735	100,000
			576,6218	41,212
			577,1165	16,758
			577,6141	4,711
557,1431	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_3 Na + H_2O + H]^+$	+2	557,1431	100,000
			557,6474	41,117
			558,1467	15,845
			558,6493	4,197
208,0398	$[C_{12}H_{22}O_{12} Ca + H_2O]^+$	+2	208,0398	100,000
			208,5409	13,750
			209,0414	4,214

Na Figura 31A, estão representados os picos obtidos na espectrometria de massas do lactobionato de cálcio. Nas Figuras 31B, 31C, 31D, 31E, 31F e 31G, estão representados os picos expandidos e na, Tabela 19, identificados as m/z e os respectivos isótopos, juntamente com a molécula identificada.

Observa-se a presença de adutos do lactobionato com íons Ca^+ , sendo detectados conjugados com duas moléculas do lactobionato [$2\text{M}+\text{Ca}^2$] (m/z 378,0899 e 755,1759) e com três moléculas do lactobionato [$3\text{M}+\text{Ca}^2$] (m/z 397,0630). Também foram identificadas adutos com a água tanto com uma molécula de lactobionato (m/z 208,0398), quanto com três (m/z 576,0735). Além disso, apresentou ligação com água juntamente com o Na^+ (m/z 557,1431).

A ligação do lactobionato de cálcio com o íon Na^+ é justificável, devido à utilização deste sal nas etapas de bioprodução. Em relação à molécula de água, na USP (2015), a estrutura do lactobionato de cálcio é definida na forma de dihidrato, $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{24}\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e massa molar de 790,68 g/mol.

A m/z correspondente ao sorbitol não foi detectada, salientando que a pureza do lactobionato de cálcio, determinada por cromatografia líquida, é de 96,75% (Tabela 11) e o sorbitol está presente em 1,94%.

Na Figura 32, está representada a estrutura do lactobionato de cálcio, onde dois íons de lactobionato interagem com uma molécula de Ca^{2+} .

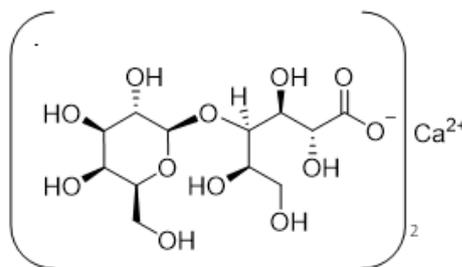


Figura 32: Estrutura química do lactobionato de cálcio.

Ns análises do lactobionato de cálcio, deste capítulo, foram indetificados, por cromatografia líquida e, por espectrometria de massas, somente o lactobionato, a lactose e o sorbitol. Ainda que observadas diferenças significativas na análise de pH e poder rotatório, não foram detectados indícios de degradação da estrutura, sugerindo que o insumo se manteve estável por seis meses de incubação a 40°C e 75% de UR.

Na Figura 33, os espectros de massas obtidos da amostra inicial, de três e seis meses do ácido lactobiônico são mostrados e na Tabela 20, descritas as m/z obtidas por espectrometria de massas e, em seguida, identificadas com as possíveis fórmulas moleculares correspondentes.

Na análise do ácido lactobiônico, observou-se que tanto a amostra inicial quanto de três e seis meses de incubação apresentaram praticamente os mesmos picos de maior intensidade, sendo estes demonstrados na Figura 33. Nas Figuras 33B, 33C, 33D e 33E são apresentados os espectros expandidos, onde estão representadas as m/z dos isótopos detectados.

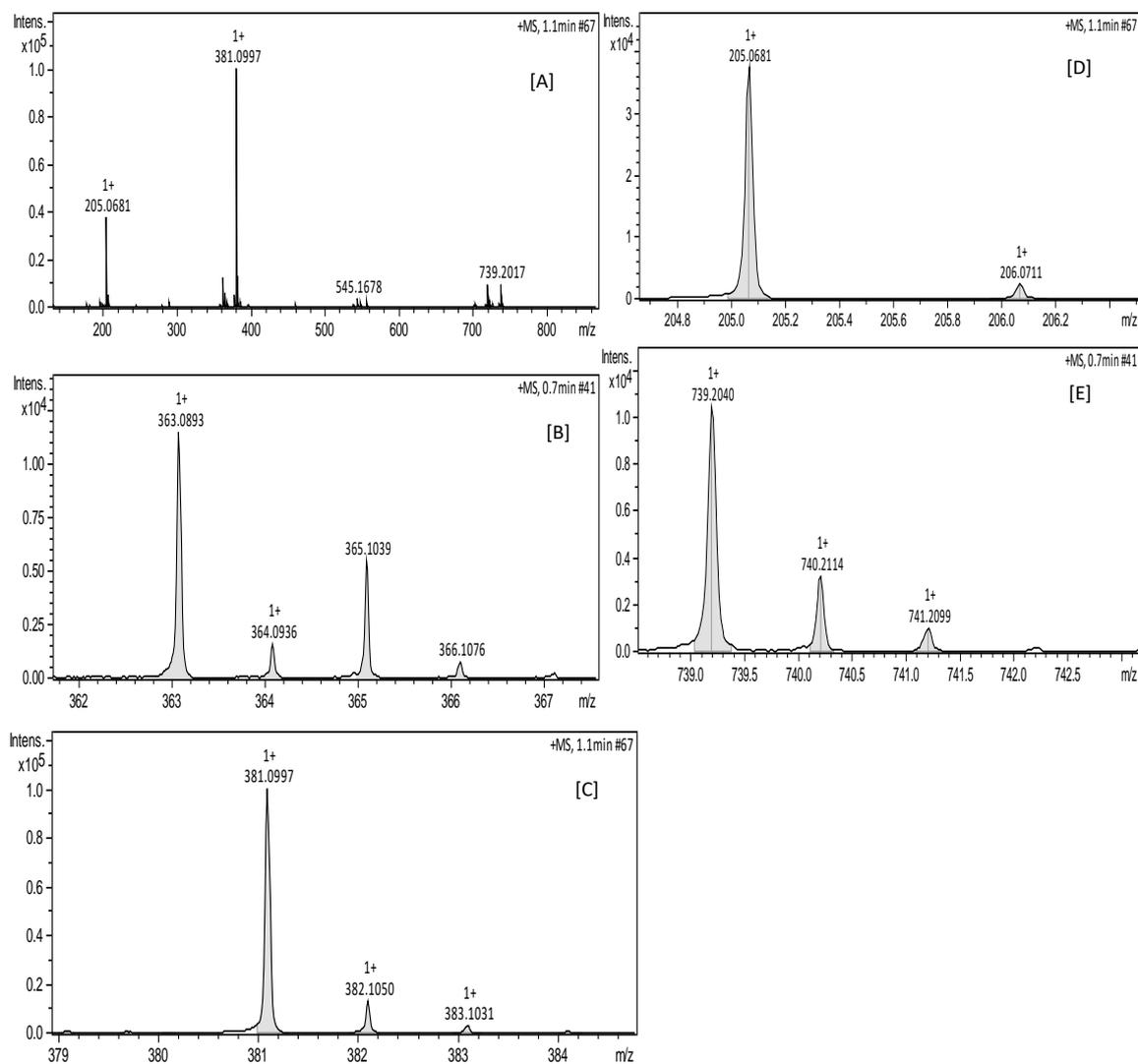


Figura 33: Espectro de massas, por injeção direta, de amostra de ácido lactobiônico incubada a 40°C e 75% de umidade relativa. [A] espectro de massas do ácido lactobiônico, [B] da m/z 363,0893 [C], da m/z 381,0997 [D] da m/z 205,0681 e [E] da m/z 576,1168.

Tabela 20: Fórmulas moleculares identificadas em relação m/z obtidas por espectrometria de massas do ácido lactobiônico incubado a 40°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
381,0997	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{Na}]^+$	+1	381,0997	100,000
			382,1050	13,689
			383,1031	3,333
205,0681	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{Na}]^+$	+1	205,0681	100,000
			206,0711	6,879
739,2056	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12})_2 + \text{Na}]^+$	+1	739,2073	100,000
			740,2120	27,378
			741,2013	8,539
363,0893	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{11}) + \text{Na}]^+$	+1	363,0893	100,000
			364,0936	13,628
			365,1039	3,119
			366,1076	0,340

Foram detectados, em todas as massas, adutos de sódio, onde o ácido lactobiônico se liga a uma molécula de Na^+ , assim, obtendo uma carga positiva. Este Na^+ pode ser proveniente tanto das etapas de bioprodução, quanto do próprio equipamento. Foram detectadas as m/z 381,0997 e 739,2056 correspondentes ao ácido lactobiônico ligado ao Na^+ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) e duas moléculas de ácido lactobiônico ligadas ao Na^+ ($[\text{M}+\text{M}+\text{Na}]^+$), respectivamente.

Nesta amostra, foi detectada a m/z 363,0893, possivelmente correspondente à interação da lactobionolactona com o Na^+ . Conforme demonstrado na Figura 25D, foi identificado no cromatograma a eluição de um pico em 9 min, possivelmente correspondente à forma δ -lactona. No doseamento (Tabela 16 e Figura 25D), o teor recuperado foi entre 70 e 90%. Neste caso, também, foi detectada a m/z 205,0681 correspondente ao sorbitol ligado ao Na^+ , sendo que a pureza do ácido lactobiônico é de 93,71% (Tabela 11), apresentando 3,11% de sorbitol.

Analisando os resultados obtidos na análise do ácido lactobiônico, destaca-se a formação da lactobionolactona, afetando o doseamento, analisado por cromatografia líquida e, ainda, foi detectada por espectrometria de massas. A formação deste composto, também, pode ter interferido na análise do pH. Visando à utilização do ácido lactobiônico, são necessários mais estudos para a avaliação da alteração do aspecto físico das amostras.

Também foi detectado o aumento da umidade do ácido lactobiônico levando à formação de um gel com alteração na coloração. A presença de água pode ser um dos fatores que favoreceram a formação da forma de lactona, mas, para a confirmação mais estudos são necessários.

Para finalizar o estudo de estabilidade acelerada, são apresentados os espectros de massas do ácido lactobiônico comercial das amostras de tempo inicial, de três e seis meses de exposição a 40°C e 75% UR. Para o ácido lactobiônico comercial, perfis semelhantes foram observados na amostra inicial e de três meses (Figura 34 e Tabela 21).

Analisando a Figura 34A, observa-se a presença do pico de maior intensidade correspondente a m/z de 381,0984, sendo identificado como ácido lactobiônico em forma de aduto de sódio ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) (Tabela 21). Também pode ser identificada a m/z de

359,1192 (Figura 34D), correspondente a $[M+H]^+$, assim, obtendo-se a carga positiva. Além disso, foram identificados os picos de m/z de 197,0656 e 179,0526 (Figura 34C e 34E), correspondentes aos produtos da quebra da ligação glicosídica entre o ácido glúcônico e a galactose, conforme representado na Figura 35.

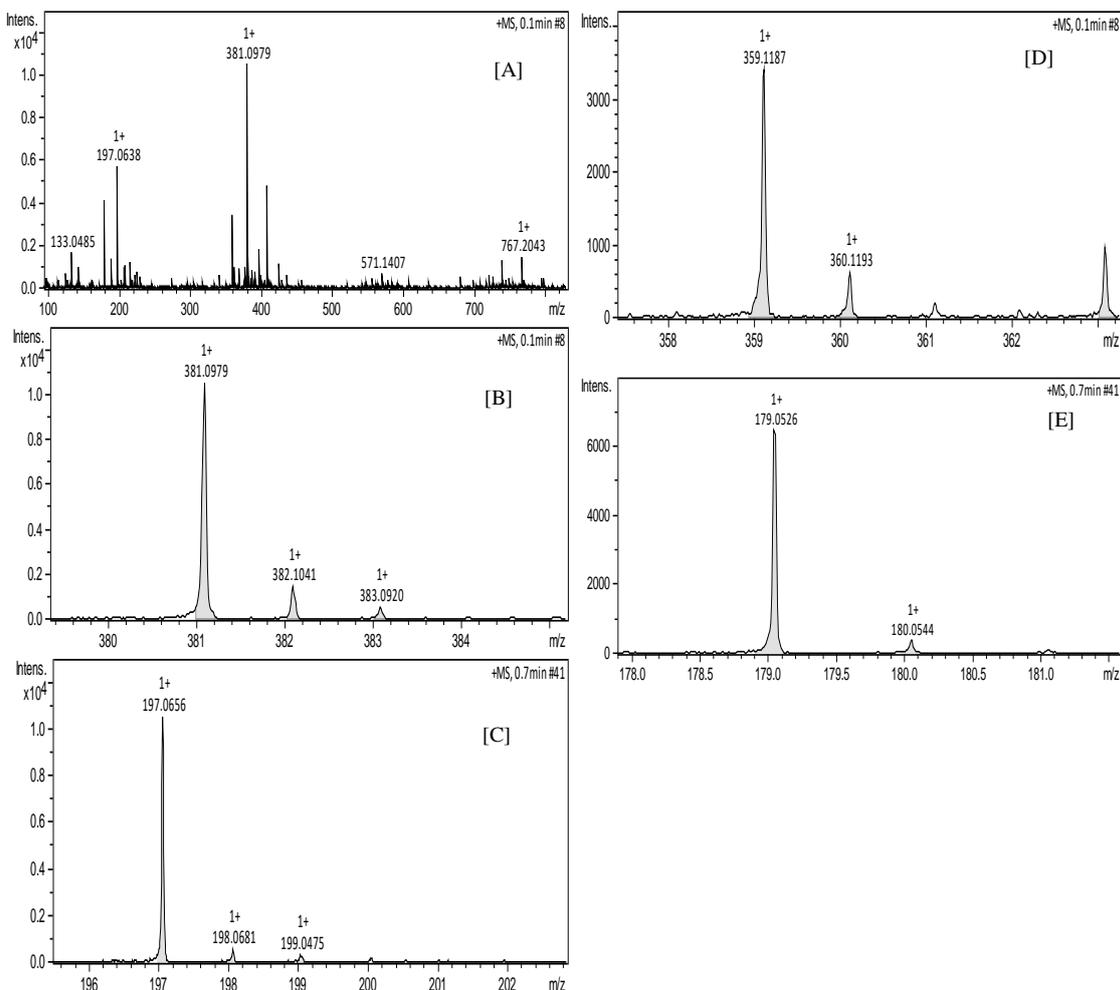


Figura 34: Espectro de massas, por injeção direta, de amostra de ácido lactobiônico comercial incubada a 40°C e 75% de umidade relativa. [A] espectro de massas do ácido lactobiônico comercial, [B] espectro expandido da m/z 381,0984, [C] da m/z 197,0656, [D] da m/z 359,1192 e [E] da m/z 179,0526.

Tabela 21: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas por espectrometria de massas do ácido lactobiônico comercial incubado a 40°C e 75% de umidade relativa (representativo da amostra inicial e de três meses).

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
381,0984	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{Na}]^+$	+1	381,0984	100,000
			382,1057	13,689
			383,0853	3,333
197,0656	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5) + \text{H}]^+$	+1	197,0656	100,000
			198,0681	6,906
			199,0475	1,642
359,1192	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}) + \text{H}]^+$	+1	359,1192	100,000
			360,1193	13,701
179,0526	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6) + \text{H}]^+$	+1	179,0526	100,000
			180,0544	6,845

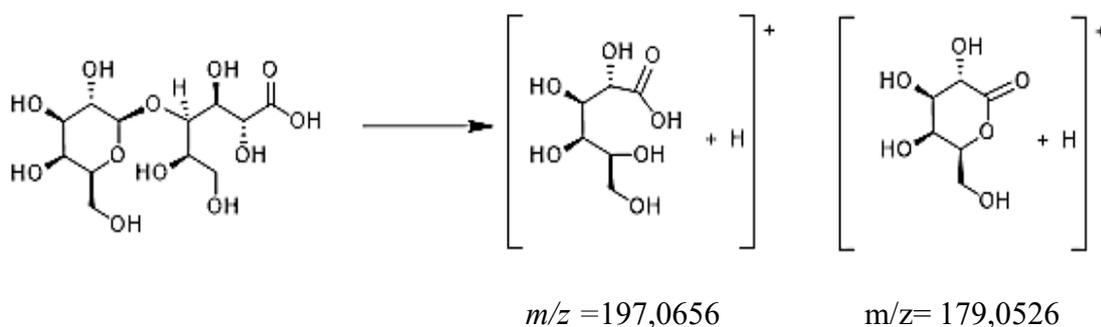


Figura 35: Reação de quebra da ligação glicosídica do ácido lactobiônico.

Na amostra de ácido lactobiônico comercial relativa a seis meses de incubação, pequena diferença no espectro foi observada em relação às anteriores (Figura 34), cujos dados são apresentados na Figura 36 e Tabela 22.

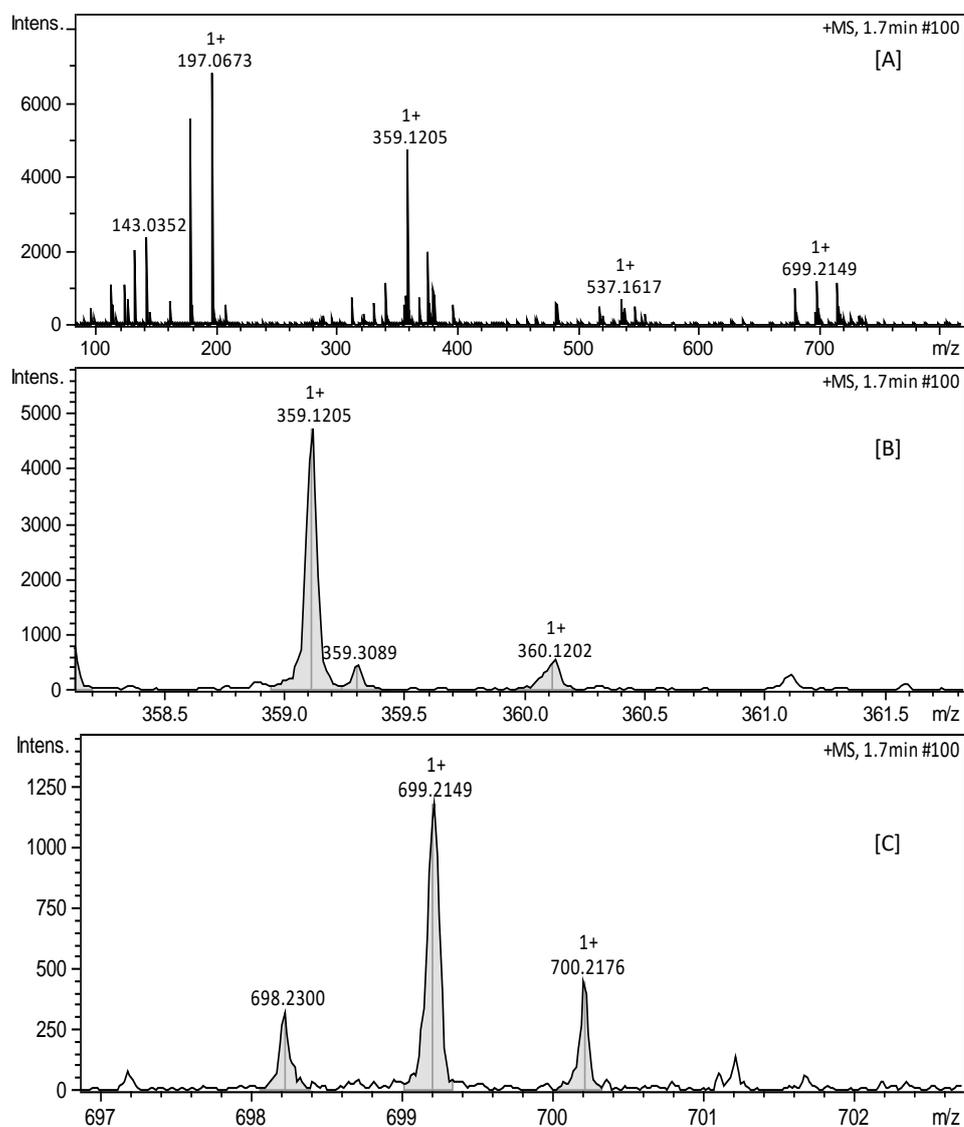


Figura 36: Espectro de massas, por injeção direta, de ácido lactobiônico comercial após seis meses em 40°C e 75% de umidade relativa. [A] espectro de massas do ácido lactobiônico comercial, [B] espectro expandido da m/z 359,12054 e [C] da m/z 699,2152.

Tabela 22: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do ácido lactobiônico comercial nas amostras após seis meses de incubação a 40°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
359,1205	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{H}]^+$	+1	359,1205	100,000
			360,1202	13,701
699,2152	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{11})_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	+1	699,2152	100,000
			700,2173	27,328

Analisando o espectro de massas do ácido lactobiônico comercial, o pico de maior intensidade é correspondente a m/z 359,1205 (Figura 36B e Tabela 22), identificado como aduto $[\text{M}+\text{H}]^+$, assim obtendo-se a carga positiva. Não foi identificada a formação de aduto de sódio. Os picos de m/z de 197,0673 e 179,0526, também estão presentes, mas os sinais estão em maior intensidade que o pico da amostra (m/z 359,1205). Na Figura 36C, no espectro expandido da m/z 699,2152, se identifica o conjugado de lactobionolactona com uma molécula de água e H^+ para a obtenção da carga positiva (Tabela 22).

A partir dos resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerada do ácido lactobiônico comercial, destaca-se a formação da lactobionolactona, sendo esta detectada por cromatografia líquida e por espectrometria de massas. Entretanto, a forma de lactona não é considerada um produto de degradação. Quanto aos compostos relativos à quebra da ligação glicosídica, detectados por espectrometria de massas, mais

estudos devem ser realizados a fim de verificar se realmente a quebra da ligação ocorreu, devido à instabilidade da estrutura.

Também foi detectado o aumento da umidade levando à formação de um gel com alteração na coloração, sendo que a água pode ser um dos fatores que favoreceram a formação da forma de lactona, mas, para a confirmação, mais estudos são necessários.

Analisando os resultados da estabilidade acelerada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, evidencia-se que a forma de sal se mostrou mais estável. Para as formas salinas o doseamento se manteve em 100% (m/v) ao final dos seis meses e as características físicas se mantiveram inalteradas. Contudo, para os ácidos, foi detectada a presença da lactobionolactona além de ocorrer a formação de um gel com coloração caramelo.

4.2.3 Estabilidade de longa duração

No estudo de estabilidade de longa duração dos lactobionatos de sódio, potássio, e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, foram realizadas as análises de doseamento, determinação do pH, poder rotatório e análise por espectrometria de massas da amostra inicial, após três e seis meses de incubação nas condições padrão dos testes.

Na Tabela 23, estão descritos os resultados iniciais, de três e de seis meses da análise do pH da solução em concentração de 10 g/L.

Tabela 23: Leituras de pH das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, em concentração 10 g/L nos tempos inicial, após três e seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade. Os resultados estão descritos em média± desvio padrão.

Amostra	pH inicial	pH 3 meses	pH 6 meses
Lactobionato de sódio	6,40 ± 0,11 ^a	6,49 ± 0,05 ^a	6,36 ± 0,06 ^a
Lactobionato de potássio	6,41 ± 0,03 ^a	6,05 ± 0,03 ^b	6,17 ± 0,05 ^b
Lactobionato de cálcio	7,23 ± 0,05 ^a	7,55 ± 0,09 ^a	6,66 ± 0,13 ^b
Ácido lactobiônico	2,39 ± 0,05 ^a	2,40 ± 0,28 ^a	3,08 ± 0,04 ^b
Ácido lactobiônico comercial	2,74 ± 0,04 ^a	2,63 ± 0,10 ^a	2,75 ± 0,02 ^a

Resultados com letras iguais e apresentados nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Analisando os resultados da Tabela 23, o valor de pH inicial do lactobionato de sódio foi de 6,40 com baixa variação até o final de seis meses de incubação. Estes dados foram semelhantes ao encontrados no estudo de estabilidade acelerada, onde foi medido pH aproximado de 6,45 (Tabela 12) nas análises iniciais e após três meses de incubação. Este valor também foi similar ao determinado por Carra (2012), que destaca o pH de 6,38 para uma solução 1% (m/v) de lactobionato de sódio.

Com relação ao lactobionato de potássio, foi observada uma redução significativa no pH após três e seis meses de estudo (Tabela 22), com perfil semelhante ao observado no estudo de estabilidade acelerada, no qual identificou-se a queda do pH inicial de 6,40 para 6,10 após três e seis meses de incubação (Tabela 12).

Conforme apresentado na Tabela 22, valor inicial de pH de 7,23 foi medido para o lactobionato de cálcio e, após seis meses, o valor decaiu para 6,6, mesmo perfil

detectado no estudo de estabilidade acelerada. Ainda assim, os valores de pH estão dentro dos valores estipulados na monografia do lactobionato de cálcio - pH entre 5,4 e 7,4 - pela USP (2015). No caso do ácido lactobiônico, foi evidenciado aumento significativo do valor de pH da amostra inicial (2,39) em relação à amostra de seis meses (3,08). Entretanto, este comportamento não foi observado para o ácido lactobiônico comercial, que não apresentou diferença significativa entre o pH da amostra inicial em relação às amostras de três e seis meses.

Posteriormente, a análise do poder rotatório foi realizada, cujos resultados são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Análise do poder rotatório dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial em concentração 10% (m/v) inicial, após três e seis meses em 30°C e 75% umidade relativa. Os resultados estão descritos em média±desvio padrão.

Amostra	$[\alpha]_D^{20}$ inicial	$[\alpha]_D^{20}$ 3 meses	$[\alpha]_D^{20}$ 6 meses
Lactobionato de sódio	+20,23° ± 0,25 ^a	+21,65° ± 1,21 ^a	+20,49° ± 0,49 ^a
Lactobionato de potássio	+22,73° ± 0,25 ^a	+22,62° ± 0,64 ^a	+20,50° ± 0,50 ^b
Lactobionato de cálcio	+22,73° ± 0,25 ^a	+22,85° ± 0,57 ^a	+19,83° ± 1,15 ^b
Ácido lactobiônico	+20,63° ± 0,29 ^a	+20,75° ± 0,51 ^a	+17,93° ± 0,29 ^b
Ácido lactobiônico-comercial	+22,83° ± 0,29	na	na

Resultados com letras iguais e apresentados nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si (p<0,05). na: não analisado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 24, todas as amostras analisadas desviaram o plano da luz polarizada para a direita (+ ou D), como descrito na

British Pharmacopeia (2009). O lactobionato de sódio manteve o valor aproximado de $[\alpha]_D^{20}$ em $+20^\circ$ nas análises iniciais, de três e seis meses, valores semelhantes aos obtidos no estudo de estabilidade acelerada da amostra inicial ($+21,00^\circ$) e de três meses ($+20,29^\circ$) (Tabela 13). Estes resultados são pouco inferiores aos determinados por Carra (2012), cujo poder rotatório do lactobionato de sódio foi estimado em $+22,5^\circ$, valor igual ao definido por Valle (2009).

Tanto os lactobionatos de potássio, de cálcio quanto o ácido lactobiônico, apresentaram valores significativamente diferentes de $[\alpha]_D^{20}$ das amostras iniciais ($+22,73^\circ$) e de três meses ($\sim +22^\circ$) em relação às amostras de seis meses ($+20,50^\circ$ e $+19,83^\circ$). Comparando-se com os resultados da estabilidade acelerada, apresentados anteriormente na Tabela 13, observa-se a queda significativa dos valores de $[\alpha]_D^{20}$ das amostras de lactobionato de potássio ($+20,86^\circ$) e de cálcio ($+21,28^\circ$) em três meses de incubação quando comparados com as amostras iniciais ($+22,72^\circ$ e $+22,73^\circ$, respectivamente).

Para o ácido lactobiônico, ressalta-se também a queda nos valores de $[\alpha]_D^{20}$, do valor inicial de $+20,63^\circ$ para $+17,93^\circ$ após seis meses de testes. Novamente, o comportamento foi semelhante ao observado na avaliação da estabilidade acelerada, onde foram obtidos valores de $+20,62^\circ$ e $+17,93^\circ$ na amostra inicial e após seis meses, respectivamente. No caso do ácido lactobiônico comercial, somente foi determinado o poder rotatório da amostra inicial ($+22,83^\circ$), visto a escassez de amostra para a realização do ensaio em função da característica higroscópica do material (Figura 37).

Na Figura 37, estão apresentadas as imagens das amostras durante o estudo de estabilidade de longa duração.

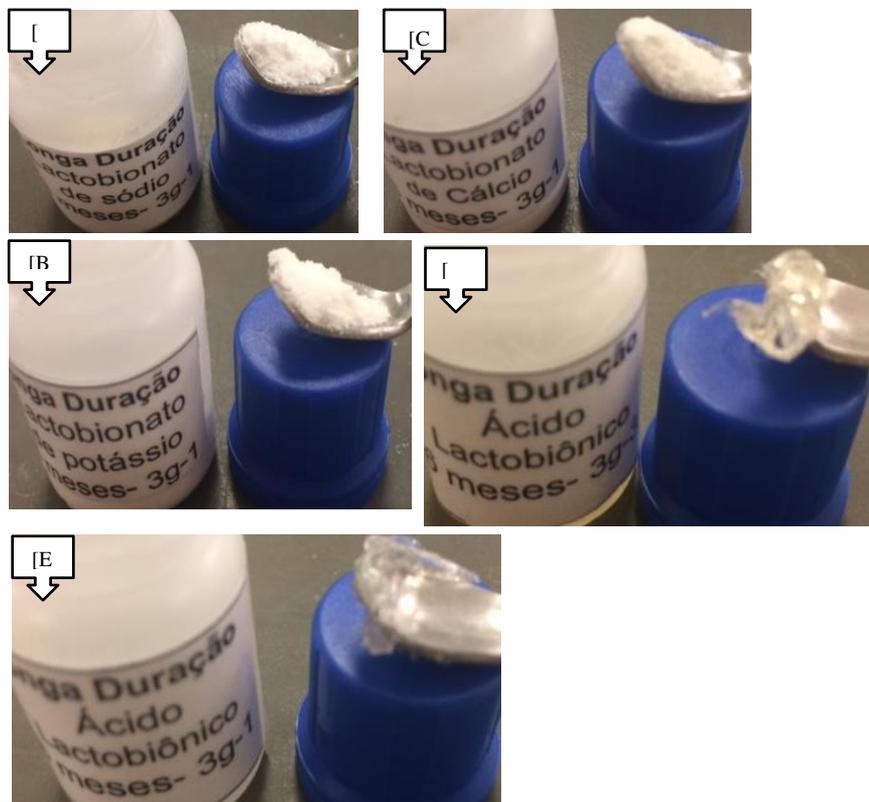


Figura 37: Imagens após seis meses de incubação em 30°C e 75% de umidade relativa dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C], do ácido lactobiônico [D] e do ácido lactobiônico comercial [E].

Observa-se que os sais de lactobionato (Figuras 37A, 37B e 37C) apresentaram o mesmo aspecto inicial, um pó branco, ao final do estudo. Entretanto, o ácido lactobiônico e o ácido lactobiônico comercial (Figuras 37D e 37E), apresentaram aspecto de pó branco, inicialmente, e sendo observada a alteração para o aspecto gelatinoso, caracterizando a alta higroscopicidade do material, como relatado no estudo de estabilidade acelerada. Ainda, neste caso em particular, não foi identificada alteração na coloração, como observado no estudo acelerado, onde as amostras apresentaram-se na forma de gel de cor caramelo (Figura 24).

Os resultados do doseamento do ácido lactobiônico e dos sais de lactobionato são apresentados na Tabela 25, que resume as concentrações teóricas, as concentrações obtidas por cromatografia em fase líquida e o percentual recuperado nos tempos iniciais

de três e seis meses de avaliação. Na Figura 38, por sua vez, são exibidos os cromatogramas do lactobionato de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, nos tempos inicial e após três e seis meses de exposição a 30°C e 75% de UR.

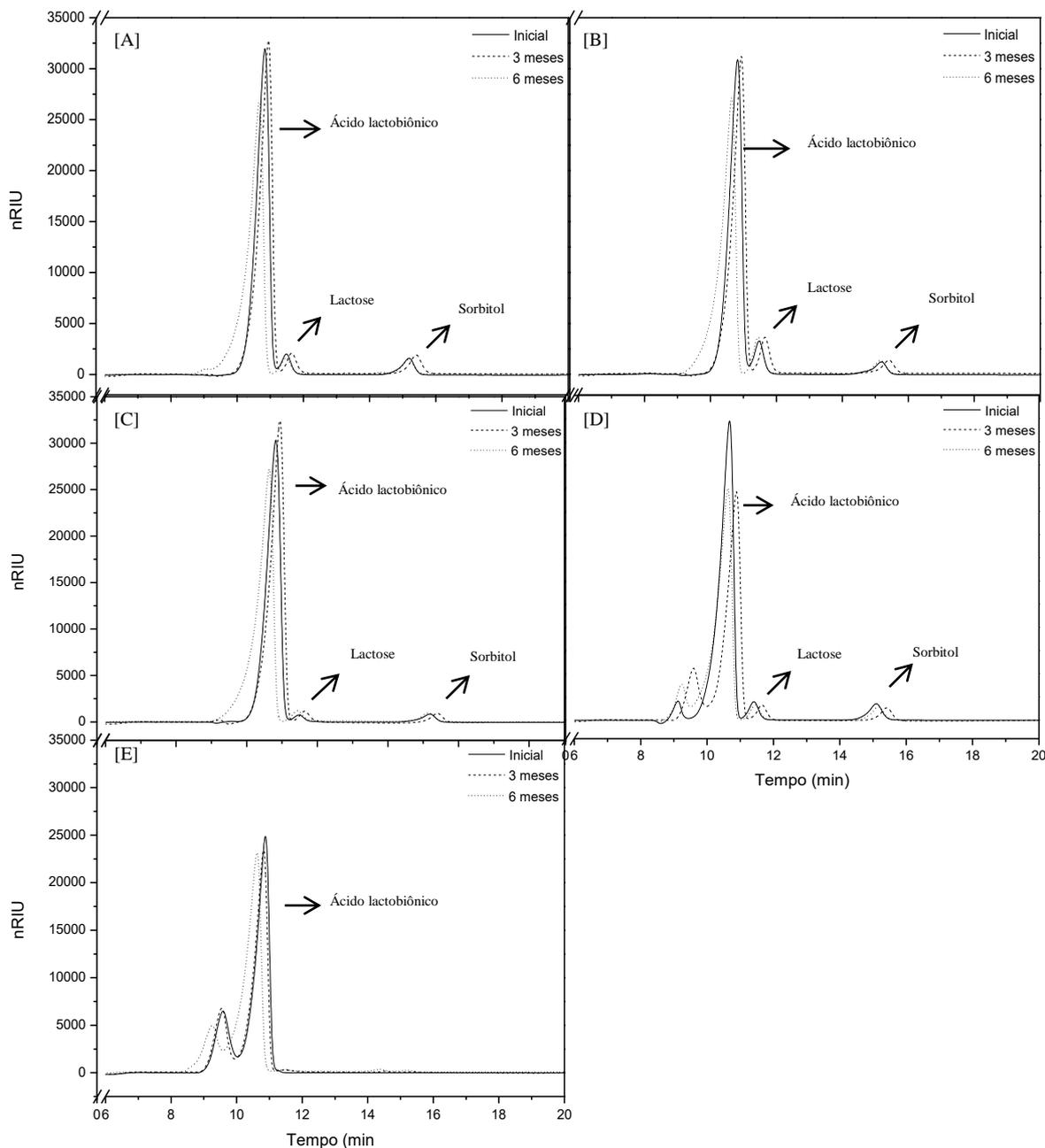


Figura 38: Cromatogramas obtidos dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C], do ácido lactobiônico [D] e do ácido lactobiônico comercial [E], das amostras inicial, após três e seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade relativa.

Nas Figuras 38A, 38B e 38C, podem ser identificados os picos relativos às amostras de ácido lactobiônico/lactobionato, lactose e sorbitol nos tempos de retenção de 10,5, 11,5 e 15 min, respectivamente. Estes resultados eram esperados, visto que, na análise do doseamento (Tabela 25), não foram observadas diferenças significativas em termos de percentual recuperado da amostra inicial em comparação com as amostras expostas por três e seis meses às condições definidas dos testes. Em relação ao cromatograma do ácido lactobiônico (Figura 38D), também foram identificados os picos do ácido, da lactose, do sorbitol, além da lactobionolactona, em 9,5 min.

Conforme apresentado na Tabela 25, o teor recuperado no tempo inicial, em três e seis meses foi de 91,30, 82,89 e 69,42%, respectivamente, corroborando o cromatograma (Figura 38D), onde o pico inicial eluído em 9,5 min apresenta menor intensidade em relação aos das amostras de três e seis meses. Salienta-se, ainda, o aumento do pH da amostra inicial de ácido lactobiônico em relação à de seis meses (Tabela 23), sendo, possivelmente, consequência da formação da lactobionolactona. Na Figura 38E, que representa o ácido lactobiônico comercial, o tempo de retenção foi de 10,5 min, posterior ao pico da lactobionolactona, em 9,5 min. Neste caso, também, o teor recuperado no tempo inicial, em três e seis meses foi de 92,70, 77,83 e 65,45%, respectivamente (Tabela 25).

Tabela 25: Concentração, obtida por cromatografia líquida, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, das amostras inicial, após três e seis meses de incubação a 30°C e 75% de umidade relativa. Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.

		Lactobionato de	Lactobionato de	Lactobionato de	Ácido lactobiônico	Ácido lactobiônico
		sódio	potássio	cálcio		comercial
Inicial	Teórico (g/L)	9,63 ± 0,33	9,49 ± 0,28	9,33 ± 0,41	9,24 ± 0,23	9,22 ± 0,02
	Real (g/L)	9,77 ± 0,15	9,71 ± 0,26	9,39 ± 0,20	8,43 ± 0,27	8,55 ± 0,30
	Recuperado (%)	101,49 ± 2,33 ^a	102,34 ± 2,26 ^a	100,75 ± 1,78 ^a	91,30 ± 2,29 ^a	92,70 ± 3,05 ^a
3 meses	Teórico (g/L)	9,29 ± 0,01	9,56 ± 0,33	9,66 ± 0,31	9,82 ± 0,37	10,67 ± 0,10
	Real (g/L)	9,63 ± 0,07	9,71 ± 0,13	9,46 ± 0,26	6,83 ± 0,63	6,98 ± 0,49
	Recuperado (%)	104,71 ± 0,77 ^a	101,55 ± 0,55 ^a	99, 15 ± 2,22 ^a	82,89 ± 0,87 ^b	77,83 ± 0,73 ^b
6 meses	Teórico (g/L)	9,17 ± 0,08	9,11 ± 0,02	9,42 ± 0,30	9,25 ± 0,26	9,59 ± 0,078
	Real (g/L)	9,24 ± 0,11	9,46 ± 0,06	9,17 ± 0,07	7,67 ± 0,29	7,46 ± 0,07
	Recuperado (%)	100,73 ± 1,94 ^a	103,83 ± 0,86 ^a	100,36 ± 2,53 ^a	69,42 ± 4,35 ^c	65,45 ± 4,43 ^c

Resultados com letras iguais e apresentados nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Em complementação, os resultados obtidos por espectrometria de massas dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, do ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial nos tempos iniciais, três e seis meses são exibidos. Na Tabela 26, estão descritas as m/z detectadas no espectro e identificadas com as possíveis fórmulas moleculares correspondentes e, ainda, as m/z dos isótopos destas moléculas e as respectivas abundâncias.

Tabela 26: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de sódio incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundancia (%)
381,1313	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{Na} + \text{H}]^+$	+1	381,1313	100,000
			382,1343	13,689
			383,1345	3,333
205,0776	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{Na}]^+$	+1	205,0776	100,000
			206,0803	6,891
739,2853	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12})_2 + \text{Na}]^+$	+1	739,2853	100,000
			740,2908	27,378
			741,2794	8,539
557,1461	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12})_3 + \text{Na} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	+2	557,1456	100,000
			557,6491	41,117
			558,1552	15,845

As amostras do tempo inicial, de três e de seis meses apresentaram o mesmo perfil cromatográfico. A partir do espectro de massas, foi possível identificar o

lactobionato de sódio formando adutos $[M+H]^+$ com m/z de 381,1313, conjugado de dois lactobionatos ligados ao Na^+ , $[2M+Na]^+$ com m/z de 739,2853, além de conjugados de lactobionato ligados com uma molécula de água (m/z 557,1461). Nesta análise, também foi detectada a m/z 205,0776 relativa ao sorbitol.

Os resultados da espectrometria de massas do lactobionato de sódio corroboram os resultados do doseamento, onde o percentual recuperado (doseamento por cromatografia líquida) se manteve em torno de 100%. Os resultados das análises indicam a estabilidade da amostra de lactobionato de sódio pelo período de seis meses quando exposta às condições dos testes (30°C e 75% de UR). Os resultados da estabilidade de longa duração corroboram os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade acelerada, onde não foram evidenciados produtos de degradação confirmando a estabilidade do insumo quando submetido às condições de temperatura e umidade.

Para o lactobionato de potássio, os resultados foram semelhantes nos três tempos de amostragem, cujos resultados de m/z e os respectivos isótopos estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de potássio incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
397,0733	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{K} + \text{H}]^+$	+1	397,0733	100,000
			398,0765	13,702
			399,0734	10,551
557,1477	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12})_3 + \text{Na} + \text{H}_2\text{O}]^+$	+2	557,1477	100,000
			557,6504	41,117
			558,1547	15,845
755,1776	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12})_2 \text{K}]^+$	+1	755,1776	100,000
			756,1830	27,391
			757,1851	15,759
221,0426	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{K}]^+$	+1	221,0426	100,000
			223,0386	8,652
208,0433	$[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{12} + \text{K} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	+2	208,0433	100,000
			208,5435	13,774
			209,0470	10,767
381,0811	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{Na}]^+$		381,0811	100,000
			382,0913	13,689
			383,0859	3,333

Como observado na Tabela 27, foi detectada a m/z 397,0733 correspondente ao lactobionato de potássio ligado ao H^+ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), conjugado de dois lactobionatos ligados a um íon de K^+ ($[2\text{M} + \text{K}]^+$ com m/z de 755,1776, além das ligações do composto

com a água e íons K^+ e Na^+ (m/z 208,0433 e 557,1477, respectivamente) e interações com o Na^+ (m/z 381,0811). A m/z 221,0426 correspondente ao sorbitol também foi detectada, visto que este composto está presente em porcentagem de 2,09% na amostra (Tabela 11).

Os espectros de massas obtidos eram esperados, visto que não foi observada diferença significativa no doseamento entre os três tempos de análise (Tabela 25), não sendo, também, observados picos distintos no cromatograma (Figura 38B). Juntamente com os demais ensaios realizados neste estudo, sugere-se que o lactobionato de potássio se manteve estável no período analisado e nas condições de exposição relativas aos testes propostos.

Na Tabela 28, estão descritas as m/z , os respectivos isótopos e a abundância, juntamente com a possível identificação do lactobionato de cálcio. Perfis semelhantes nos três tempos de análises foram também observados para amostras de lactobionato de cálcio (Tabela 28).

Tabela 28: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do lactobionato de cálcio incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
378,0938	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_2 Ca + H]^+$	+2	378,0938	100,000
			378,5954	27,378
			379,0933	9,207
			379,5977	1,975
			380,0912	2,559
397,0689	$[(C_{12}H_{21}O_{12}Ca)_3]^+$	+3	397,0689	100,000
			397,4026	41,033
			397,7333	17,608
			398,0710	5,339
			398,4019	7,926
755,1737	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_2 Ca + H]^+$	+1	755,1737	100,000
			756,1803	27,367
			757,1705	9,203
208,0435	$[C_{12}H_{22}O_{12} Ca + H_2O]^+$	+2	208,0435	100,000
			208,5451	13,750
			209,0458	4,214
			209,5466	0,632
			210,0383	2,252
576,1242	$[(C_{12}H_{22}O_{12})_3 Ca + (H_2O)_2 + H]^+$	+2	576,1242	100,000
			576,6247	41,212
			577,1252	16,758
			577,6231	4,711
			578,1192	3,362
557,1463	$[(C_{12}H_{21}O_{12})_3 Na + H_2O + H]^+$	+2	557,1463	100,000
			557,6478	41,117
			558,1477	15,845
			558,6507	4,197

Foram identificadas m/z referentes ao lactobionato de cálcio na forma de conjugados de dois lactobionatos (2M) (m/z 378,0938 e 755,1737) e três lactobionatos (3M) (m/z 397,0689). Além disso, foram detectadas interações com a água e Ca^{2+} (m/z 576,1242) e com Na^+ (m/z 557,1463). A m/z correspondente ao sorbitol não foi detectada, salientando que a pureza do lactobionato de cálcio é de 96,75% (Tabela 11) e o sorbitol está presente em percentual de 1,94%.

Os resultados dos espectros de massas do lactobionato de cálcio corroboram os resultados obtidos por cromatografia líquida, do estudo de longa duração, onde foi observada a manutenção do doseamento pelo período de seis meses, a 30°C e 75% de UR. Juntamente com os demais resultados da estabilidade de longa duração (pH e poder rotatório), não foram evidenciados produtos de degradação, resultados similares aos encontrados no estudo de estabilidade acelerada. Ainda, não foi observada alteração no aspecto físico do lactobionato de cálcio.

Com os resultados da espectrometria de massas do ácido lactobiônico, foi possível obter as m/z descritas na Tabela 29, relativas às amostras do tempo inicial, de três e seis meses de incubação. Foram detectados adutos de sódio, tanto com o lactobionato (m/z 381,0994 e 739,2072) quanto com lactobionolactona (m/z 363,0893) e o sorbitol (m/z 205,0681). Ainda, foi detectado aduto de cálcio com duas moléculas de lactobionolactona (m/z 721,1946). Outros sinais detectados, mas em baixa intensidade, foram os sinais m/z 197,0646 e 179,0526, correspondentes aos picos de quebra da ligação glicosídica entre a galactose e o ácido glicônico.

Tabela 29: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do ácido lactobiônico incubado a 30°C e 75% de umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmula molecular	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
381,0994	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{Na}]^+$	+1	381,0994	100,000
			382,1060	13,689
			383,1035	3,333
205,0681	$[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{Na}]^+$	+1	205,0681	100,000
			206,0712	6,879
739,2072	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12})_2 + \text{Na}]^+$	+1	739,2072	100,000
			740,2094	27,378
			741,1951	8,539
363,0893	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{11}) + \text{Na}]^+$	+1	363,0902	100,000
			364,0894	13,628
			365,1029	3,119
			366,1091	0,340
721,1946	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{11})_2 + \text{Ca}]^+$	+1	721,1946	100,000
			722,2020	27,267
			723,2025	8,765
			724,2134	1,853
197,0646	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5) + \text{H}]^+$	+1	197,0646	100,000
			198,0649	6,906
			199,0339	1,642
179,0526	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6) + \text{H}]^+$	+1	179,0534	100,000
			180,0591	6,845

A partir dos resultados da cromatografia em fase líquida e do espectro de massas, foi identificada a presença da lactobionolactona, que, como argumentado

anteriormente, não é considerada um produto de degradação (Simms *et al.*, 1994; Pedruzzi *et al.*, 2007; British Pharmacopoeia, 2009). Além deste composto, foram detectadas presenças de m/z resultantes da quebra da ligação glicosídica. Em vista disso, mais estudos são necessários, pois em função do uso de temperatura elevada na análise de espectrometria de massas, a quebra da ligação pode ocorrer durante a injeção da amostra no equipamento.

Os resultados da espectrometria de massas corroboram os resultados da cromatografia líquida, onde foi detectada a presença da lactobionolactona, interferindo no doseamento das amostras. Este composto foi identificado tanto nas amostras iniciais, em menor intensidade, quanto nas amostras de três e seis meses, entretanto, não foram observados indícios de produtos de degradação. Ainda, foi observada alteração no aspecto da amostra, sendo necessária a realização de estudos visando à estabilização deste insumo.

Na análise do ácido lactobiônico comercial foram detectados m/z semelhantes para a amostra inicial, de três e de seis meses. Os picos foram identificados com auxílio da m/z dos respectivos isótopos e a abundância dos mesmos. Os resultados são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30: Fórmulas moleculares identificadas a partir das m/z obtidas pelo espectro de massas do ácido lactobiônico comercial incubado a 30°C e 75% umidade relativa.

Pico base m/z	Fórmulas moleculares	Carga	Distribuição isotópica	
			m/z	Abundância (%)
359,1205	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{H}]^+$	+1	359,1205	100,000
			360,1192	13,701
			361,1177	3,334
197,0665	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5) + \text{H}]^+$	+1	197,0665	100,000
			198,0695	6,906
			199,0652	1,642
179,0526	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6) + \text{H}]^+$	+1	179,0537	100,000
			180,0550	6,845
381,0970	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + \text{Na}]^+$	+1	381,0970	100,000
			382,1011	13,689
699,2152	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{11})_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	+1	699,2157	100,000
			700,2193	27,328
			701,2181	8,320
681,2007	$[(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{11})_2 + \text{H}]^+$	+1	681,2007	100,000
			682,2091	27,267
			683,2158	8,098

Foram detectadas m/z do ácido lactobiônico formando interações com H^+ (m/z 359,1205) e com o Na^+ (m/z 381,0970), sendo que a intensidade do sinal do aduto de Na^+ apresentou menor intensidade. Ainda, foram detectados conjugados da

lactobionolactona, representando os sinais m/z 699,2152 e 681,2007. Neste caso também foram detectadas as m/z de 197,0665 e 179,0526, correspondentes aos produtos da quebra da ligação glicosídica, sendo que a intensidade do sinal na amostra de seis meses foi superior às demais.

A presença da lactobionolactona e a quebra da ligação glicosídica consistem em fatores que interferiram no doseamento do ácido lactobiônico comercial. Na amostra inicial, o percentual recuperado foi de 92,7%, seguido de 77% em três meses e de 65,45% em seis meses de avaliação (Tabela 25). Neste caso, também, foi observada a alteração no aspecto físico da amostra, contudo não foi observada alteração da coloração como observado nas amostras da estabilidade acelerada.

Concluindo este estudo de estabilidade acelerada e de longa duração, foram inicialmente identificados os produtos lactobionato de sódio, potássio, cálcio e ácido lactobiônico com pureza de 92,32, 92,27, 96,75 e 93,71% (m/v). Os lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio se mostram estáveis por seis meses de análise durante o estudo de estabilidade acelerada (40°C e 75% de UR) e de estabilidade de longa duração, (30°C e 75% UR). Para as amostras dos ácidos lactobiônico e lactobiônico comercial, foi detectada a presença da lactobionolactona e um aumento significativo da umidade, fato não ocorrido com os lactobionatos – sais.

Os resultados obtidos nestes estudos são utilizados para determinar o prazo de validade do insumo, sendo que o estudo de estabilidade acelerada é projetado para acelerar a possível degradação física ou química, sendo posteriormente confirmado pelo estudo de estabilidade de longa duração.

O prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado pelo estudo de estabilidade de longa duração, de acordo com os parâmetros pré definidos na legislação. O registro poderá ser concedido, com prazo de validade

provisório de 24 meses, se aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de doze meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de seis meses. O prazo de validade deve ser confirmado pelo estudo de estabilidade de longa duração de 24 meses de duração (Brasil, 2009). Como não foram evidenciados produtos de degradação, sugere-se que o prazo de validade provisório dos sais de lactobionato seja de 24 meses.

4.3 Capítulo 3: Estudo de degradação forçada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico

Os testes de degradação forçada visam à degradação, em pequena extensão (de 10 a 30%) do insumo ativo, evitando-se a formação de compostos secundários. É um estudo auxiliar, tanto na identificação de prováveis produtos de degradação quanto no desenvolvimento das metodologias analíticas. Para isso, são avaliados os efeitos da temperatura, umidade, oxidação, luz e a susceptibilidade à hidrólise em ampla faixa de pH.

4.3.1 Estabilidade frente ao pH

Para a avaliação da estabilidade frente ao pH ácido e básico, foram conduzidos ensaios onde adicionou-se uma solução ácida (HCl) ou básica (NaOH) à solução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e de ácido lactobiônico. Foram utilizadas diferentes concentrações das soluções de HCl e NaOH visando à avaliação em uma ampla faixa de pH.

Na Tabela 31 e na Tabela 32, são apresentados os valores de pH das amostras após a adição de NaOH 0,01 mol/L e os valores obtidos do doseamento, por cromatografia líquida, referentes ao estudo de degradação forçada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico frente à solução alcalina (1:1).

O estudo teve duração de dez dias, conduzido em temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e as amostras foram analisadas no tempo inicial, em 120 e 240 h de exposição às condições dos testes.

Tabela 31: Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas a solução de NaOH 0,01 mol/L a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo	pH		
	Inicial	120h	240h
Lactobionato de sódio	11,39 \pm 0,02 ^a	10,71 \pm 0,01 ^b	10,49 \pm 0,12 ^c
Lactobionato de potássio	11,13 \pm 0,08 ^a	10,40 \pm 0,04 ^b	10,15 \pm 0,01 ^c
Lactobionato de cálcio	10,79 \pm 0,09 ^a	10,41 \pm 0,06 ^b	9,26 \pm 0,06 ^c
Ácido lactobiônico	2,82 \pm 0,02 ^a	2,89 \pm 0,04 ^a	1,63 \pm 0,02 ^b

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

O pH das amostras do lactobionato de sódio, após a adição do NaOH 0,01 mol/L, foi determinado nos tempos inicial, após 120 e 240h, cujos respectivos valores foram de 11,39, 10,71 e 10,49 (Tabela 31). Para esta mesma amostra, em relação ao doseamento, foram observadas alterações no decorrer do período de análise, sendo inicialmente quantificado 9,22 g/L e ao final, 10,12 g/L (Tabela 32).

No caso do lactobionato de potássio, foi observado um comportamento levemente mais estável durante os dez dias de análises, não sendo identificada diferença significativa em termos de doseamento. Valores de 9,53 g/L e 9,86 g/L em lactobionato de potássio foram obtidos no tempo inicial e após 240 h de exposição, respectivamente (Tabela 32).

Para as amostras de lactobionato de cálcio, também foi identificada estabilidade em pH 10,79 (Tabela 31). Em termos de doseamento, foi relatada a diferença significativa da concentração da amostra inicial (8,95 g/L) em relação às amostras de 120 h (8,70 g/L) e 240 h (8,66 g/L). Entretanto, mesmo com a observação de diferenças

significativas no doseamento das amostras dos lactobionatos de sódio e de cálcio, não foram identificados picos distintos nos cromatogramas.

Tabela 32: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 0,01 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido Lactobiônico (g/L)
0	9,22 \pm 0,03 ^a	9,53 \pm 0,16 ^a	8,95 \pm 0,13 ^a	6,27 \pm 0,09 ^a
3	9,11 \pm 0,13 ^a	9,57 \pm 0,15 ^a	8,95 \pm 0,18 ^a	6,93 \pm 0,11 ^b
5	9,28 \pm 0,13 ^a	9,64 \pm 0,25 ^a	8,93 \pm 0,13 ^a	7,17 \pm 0,12 ^c
10	9,29 \pm 0,32 ^a	9,63 \pm 0,16 ^a	8,98 \pm 0,12 ^a	7,77 \pm 0,14 ^d
17	9,48 \pm 0,14 ^a	9,62 \pm 0,26 ^a	8,98 \pm 0,12 ^a	8,21 \pm 0,12 ^c
24	9,48 \pm 0,26 ^a	9,59 \pm 0,11 ^a	8,95 \pm 0,12 ^a	8,51 \pm 0,15 ^f
48	9,30 \pm 0,01 ^a	9,52 \pm 0,18 ^a	8,91 \pm 0,09 ^a	9,07 \pm 0,11 ^g
120	9,66 \pm 0,06 ^b	9,67 \pm 0,0604 ^a	8,70 \pm 0,02 ^b	9,16 \pm 0,13 ^h
240	10,12 \pm 0,14 ^c	9,86 \pm 0,0816 ^a	8,66 \pm 0,09 ^c	9,51 \pm 0,09 ⁱ

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

O ácido lactobiônico apresentou perfil diferente dos demais, inicialmente com teor de 6,27 g/L e atingindo ao final de 240 h, 9,51 g/L, com diferenças significativas entre todos os tempos analisados. Analisando os perfis cromatográficos apresentados na Figura 39, observa-se a presença do pico do lactobionato no tempo de retenção de 10,5 min, da lactose em 11,5 min e do sorbitol em 15,2 min. A presença da lactose e do

sorbitol é justificável, visto que, na etapa de purificação, o ácido lactobiônico apresentou pureza de 93% (Tabela 11 - Capítulo 2). Além disso, observa-se a presença de um pico em 9,5 min, sendo que este tende a diminuir em função do tempo. Estudos indicam que o pico detectado é correspondente à forma lactobionolactona (Simms *et al.*, 1994; Pedruzzi *et al.*, 2007), entretanto, não é considerado um produto de degradação, visto que, dependendo do pH, o ácido lactobiônico pode se converter à forma δ -lactona (British Pharmacopeia, 2009). Ao analisarmos o pH da amostra (Tabela 31), observa-se, inicialmente, valor de 2,8, demonstrando que o NaOH 0,01 mol/L adicionado não foi suficiente para elevar o pH da amostra, mantendo-se em condição ácida. O equilíbrio da reação da interconversão do ácido lactobiônico em lactobionolactona, foi favorável para a formação da lactobionolactona, sendo, posteriormente, gradativamente convertida a ácido lactobiônico e, assim, levando à redução do pH de 2,82 para 1,63.

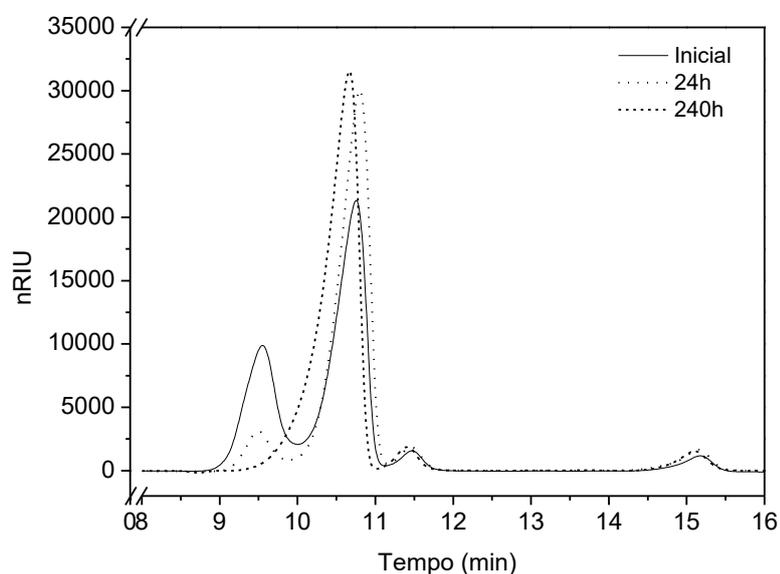


Figura 39: Cromatogramas das amostras de ácido lactobiônico no tempo inicial, em 24 h e 240 h de exposição à solução de NaOH 0,01 mol/L (1:1).

Após a análise dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico em solução de NaOH 0,01 mol/L, foi realizado o ensaio com maior concentração da base, com o intuito de intensificar a condição de estresse, para posterior análise de degradação.

Na Tabela 33, são descritos os valores de doseamento obtidos por cromatografia em fase líquida, referentes ao estudo de degradação forçada dos lactobionatos de sódio, de potássio, de cálcio e do ácido lactobiônico frente à solução de NaOH 0,1 mol/L (1:1).

Tabela 33: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 0,1 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido lactobiônico (g/L)
0	9,67 \pm 0,36 ^a	9,73 \pm 0,48 ^a	9,19 \pm 0,43 ^a	9,45 \pm 0,34 ^a
3	9,69 \pm 0,53 ^a	9,84 \pm 0,46 ^a	9,09 \pm 0,33 ^a	9,39 \pm 0,37 ^a
5	9,67 \pm 0,46 ^a	9,53 \pm 0,45 ^a	8,81 \pm 0,29 ^a	9,28 \pm 0,40 ^a
10	9,67 \pm 0,53 ^a	9,66 \pm 0,33 ^a	9,08 \pm 0,42 ^a	9,48 \pm 0,29 ^a
17	9,79 \pm 0,44 ^a	9,58 \pm 0,12 ^a	9,15 \pm 0,40 ^a	9,45 \pm 0,41 ^a
24	9,80 \pm 0,43 ^a	9,63 \pm 0,48 ^a	9,20 \pm 0,51 ^a	9,71 \pm 0,53 ^a
48	9,83 \pm 0,16 ^a	9,87 \pm 0,30 ^a	9,30 \pm 0,27 ^a	9,85 \pm 0,36 ^a
120	9,79 \pm 0,35 ^a	9,79 \pm 0,41 ^a	9,09 \pm 0,50 ^a	9,62 \pm 0,53 ^a
240	9,94 \pm 0,08 ^a	9,99 \pm 0,16 ^a	9,24 \pm 0,42 ^a	9,61 \pm 0,05 ^a

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Analisando os dados apresentados na Tabela 33, não se observaram variações no doseamento, no decorrer de dez dias e nas condições dos testes para as amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico. Em relação ao pH, um leve aumento em termos de valores foi verificado ao final de dez dias para as quatro amostras avaliadas (Tabela 34). A solução de NaOH 0,1 mol/L adicionada foi suficiente para elevar o pH da solução de ácido lactobiônico (pH 12), assim, não favorecendo a formação da lactobionolactona.

Tabela 34: Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à solução de NaOH 0,1 mol/L a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo	pH		
	Inicial	120 h	240 h
Lactobionato de sódio	12,63 \pm 0,00 ^a	12,66 \pm 0,01 ^{ab}	12,79 \pm 0,02 ^c
Lactobionato de potássio	12,50 \pm 0,07 ^a	12,67 \pm 0,01 ^b	12,78 \pm 0,03 ^c
Lactobionato de cálcio	12,41 \pm 0,10 ^a	12,63 \pm 0,05 ^b	12,66 \pm 0,02 ^{bc}
Ácido lactobiônico	12,04 \pm 0,01 ^a	12,38 \pm 0,03 ^b	12,28 \pm 0,04 ^c

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Pelo fato de não ter sido observada a degradação do lactobionato/ácido lactobiônico na presença de solução NaOH 0,1 mol/L, procedeu-se o ensaio com NaOH 1,0 mol/L. Na Tabela 35, estão representados os resultados obtidos por cromatografia em fase líquida referentes ao estudo de degradação forçada dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e ácido lactobiônico frente à solução de NaOH 1,0 mol/L (1:1).

Tabela 35: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e ácido lactobiônico submetidas à solução de NaOH 1,0 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido lactobiônico (g/L)
0	9,39 \pm 0,49 ^a	9,62 \pm 0,48 ^a	9,25 \pm 0,49 ^a	9,64 \pm 0,34 ^a
3	9,52 \pm 0,48 ^a	9,32 \pm 0,18 ^a	9,29 \pm 0,47 ^a	9,77 \pm 0,46 ^a
5	9,59 \pm 0,48 ^a	9,38 \pm 0,10 ^a	9,37 \pm 0,41 ^a	9,68 \pm 0,28 ^a
10	9,69 \pm 0,47 ^a	9,57 \pm 0,36 ^a	9,47 \pm 0,44 ^a	9,75 \pm 0,40 ^a
17	9,66 \pm 0,43 ^a	9,55 \pm 0,27 ^a	9,45 \pm 0,47 ^a	9,63 \pm 0,22 ^a
24	9,62 \pm 0,49 ^a	9,70 \pm 0,40 ^a	9,44 \pm 0,28 ^a	9,84 \pm 0,36 ^a
48	9,66 \pm 0,47 ^a	9,46 \pm 0,28 ^a	9,41 \pm 0,38 ^a	9,37 \pm 0,26 ^a
120	9,72 \pm 0,26 ^a	9,52 \pm 0,38 ^a	9,55 \pm 0,47 ^a	9,54 \pm 0,45 ^a
240	9,83 \pm 0,44 ^a	9,6711 \pm 0,19 ^a	9,56 \pm 0,43 ^a	9,53 \pm 0,49 ^a

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Analisando os resultados relativos ao doseamento das amostras submetidas à solução de NaOH 1,0 mol/L, descritos na Tabela 35, verifica-se, no decorrer do ensaio, a manutenção da concentração para as quatro amostras. As leituras de pH, descritas na Tabela 36, relativas às amostras iniciais, em valor médio de pH 12, apresentaram um aumento significativo em relação às leituras do pH das amostras após 240 h, cerca de pH 13. Entretanto, também, não foi detectada a degradação em valor de pH 12.

Tabela 36: Valores de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas a solução de NaOH 1,0 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo	pH		
	Inicial	120h	240h
Lactobionato de sódio	12,83 \pm 0,00 ^a	13,34 \pm 0,03 ^b	13,23 \pm 0,00 ^c
Lactobionato de potássio	12,71 \pm 0,01 ^a	13,24 \pm 0,06 ^b	13,31 \pm 0,03 ^{bc}
Lactobionato de cálcio	12,62 \pm 0,17 ^a	13,15 \pm 0,00 ^b	13,06 \pm 0,03 ^{bc}
Ácido lactobiônico	12,46 \pm ,08 ^a	13,07 \pm 0,02 ^b	13,09 \pm 0,02 ^{bc}

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Para a análise de degradação forçada frente ao pH ácido, foram utilizadas soluções de HCl em concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mol/L, adicionadas à solução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico na proporção de 1:1.

Na Tabela 37, são mostrados os resultados dos respectivos doseamentos e, na Figura 40, apresentados os cromatogramas das amostras submetidas à solução de HCl 0,01 mol/L.

Tabela 37: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 0,01 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido lactobiônico (g/L)
0	9,40 \pm 0,02 ^a	9,38 \pm 0,17 ^a	9,17 \pm 0,32 ^a	8,53 \pm 0,05 ^a
3	9,22 \pm 0,02 ^a	9,46 \pm 0,06 ^a	9,01 \pm 0,08 ^a	8,55 \pm 0,04 ^a
5	9,38 \pm 0,26 ^a	9,50 \pm 0,15 ^a	9,11 \pm 0,04 ^a	8,60 \pm 0,07 ^b
10	9,39 \pm 0,06 ^a	9,54 \pm 0,06 ^a	9,05 \pm 0,07 ^a	8,90 \pm 0,05 ^b
17	9,44 \pm 0,05 ^a	9,38 \pm 0,18 ^a	9,03 \pm 0,04 ^a	8,97 \pm 0,07 ^b
24	9,51 \pm 0,35 ^a	9,55 \pm 0,17 ^a	9,05 \pm 0,01 ^a	9,04 \pm 0,06 ^b
48	9,45 \pm 0,33 ^a	9,56 \pm 0,04 ^a	8,99 \pm 0,02 ^a	9,26 \pm 0,01 ^{cd}
120	9,52 \pm 0,13 ^a	9,43 \pm 0,07 ^a	9,00 \pm 0,02 ^a	9,34 \pm 0,10 ^{de}
240	9,47 \pm 0,18 ^a	9,38 \pm 0,03 ^a	8,91 \pm 0,05 ^b	9,23 \pm 0,16 ^e

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Na análise do doseamento, observa-se que não houve diferenças significativas em termos de concentração durante o período de dez dias de análises para as amostras dos lactobionatos de sódio e de potássio (Tabela 37). Inicialmente, foram quantificados 9,40 e 9,38 g/L e ao final de 240 h, 9,47 e 9,38 g/L, respectivamente, para os lactobionatos de sódio e de potássio. O resultados do doseamento da amostra do lactobionato de cálcio, em 240 h de incubação, de 8,91 g/L foi significativamente diferente em relação aos demais tempos ($\sim 9,0$ g/L). Ainda, foi detectado aumento na

concentração da amostra do ácido lactobiônico durante o ensaio, determinada inicialmente em 8,53 g/L e ao final de 240 h, em 9,23 g/L.

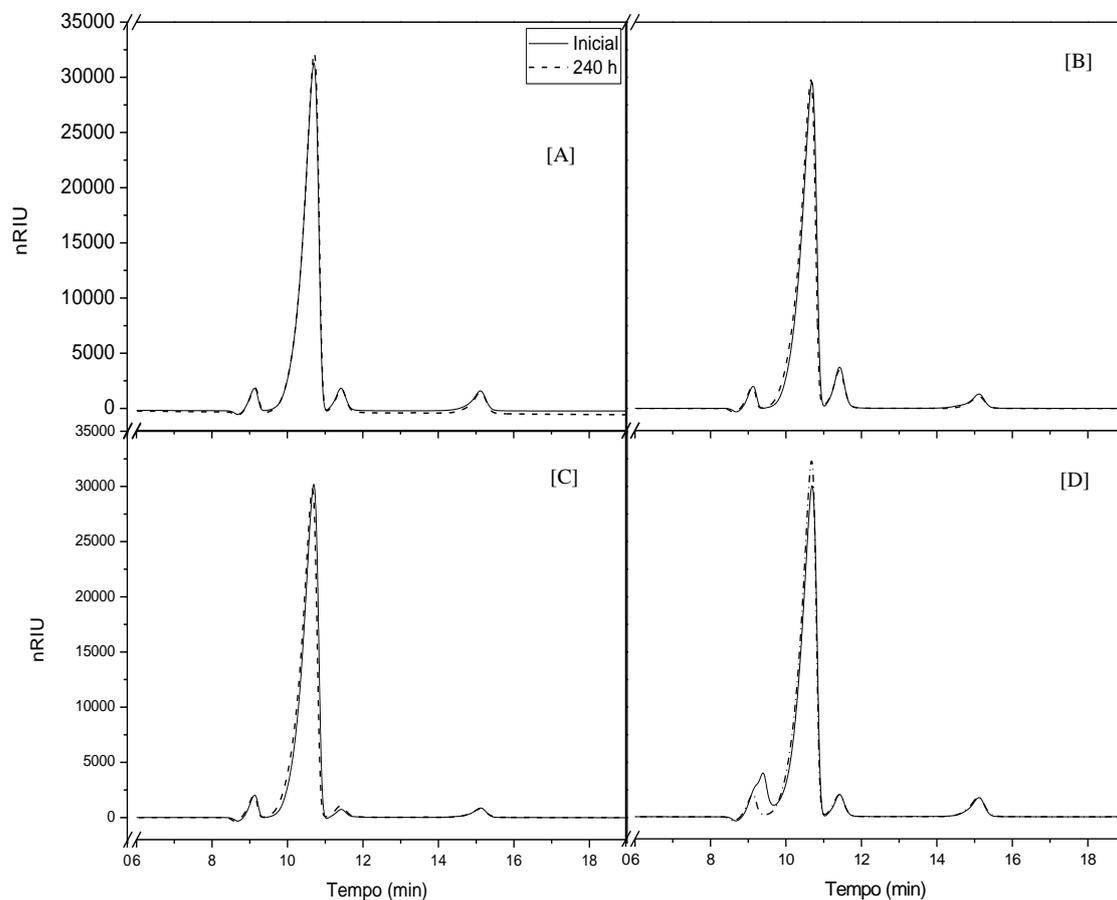


Figura 40: Cromatogramas das amostras de lactobionato de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] no tempo inicial e em 240 h de exposição à solução de HCl 0,01 mol/L (1:1).

Ao analisar os cromatogramas, apresentados na Figura 40, observam-se nas quatro amostras (Figuras 40A, 40B, 40C e 40D) a eluição de quatro picos, ou seja, lactobionato/ácido lactobiônico (10,5 min), lactose (11,5 min), sorbitol (15 min) e, possivelmente, a lactobionolactona, em 9 min. Para as amostras dos sais, este pico manteve-se com a mesma intensidade, não alterando o doseamento. Contudo, para a

amostra do ácido lactobiônico, inicialmente, o pico da lactobionolactona apresentou maior intensidade, diminuindo ao longo da análise, interferindo, como observado, no doseamento (Tabela 37).

Na Tabela 38, são apresentados os valores medidos de pH em função do tempo, nos testes propostos e correspondentes às amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico.

Tabela 38: Leituras de pH inicial, após 120h e 240h das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas a solução de HCl 0,01 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo	pH		
	Inicial	120h	240h
Lactobionato de sódio	3,31 \pm 0,02 ^a	3,68 \pm 0,02 ^b	3,55 \pm 0,06 ^c
Lactobionato de potássio	3,40 \pm 0,01 ^a	3,68 \pm 0,01 ^{bc}	3,72 \pm 0,22 ^c
Lactobionato de cálcio	3,17 \pm 0,02 ^a	3,61 \pm 0,02 ^b	3,40 \pm 0,03 ^c
Ácido lactobiônico	2,01 \pm 0,00 ^{ac}	1,87 \pm 0,02 ^b	1,99 \pm 0,03 ^c

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Para a amostra dos lactobionatos, inicialmente, foram determinados os valores de 3,31, 3,40 e 3,17, e, ao final de 240 h, foi observado aumento para 3,55, 3,72 e 3,40, respectivamente. Ao analisar o pH da solução de ácido lactobiônico, este se manteve praticamente sem alteração do início ao final da análise. Visto que não houve sinal de degradação frente ao pH ácido com a adição de HCl 0,01 mol/L, procedeu-se a exposição em solução de maior concentração, sendo, então, utilizado o HCl 0,1 mol/L.

Na Figura 4, são apresentados os cromatogramas e na Tabela 39 e Tabela 40, os valores obtidos no doseamento e leituras de pH dos lactobionatos e do ácido lactobiônico.

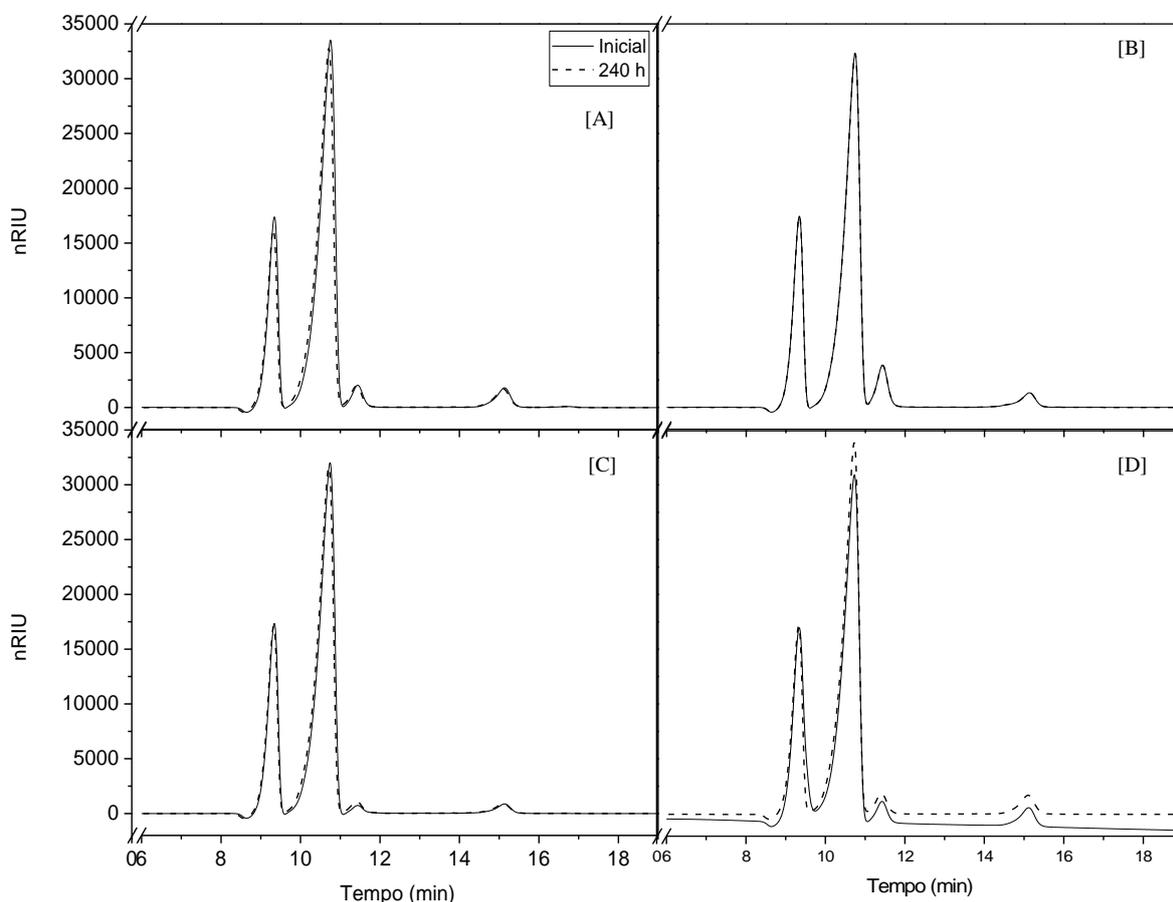


Figura 41: Cromatogramas das amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] no tempo inicial e em 240 h de exposição à solução HCl 0,1 mol/L (1:1).

Analisando os cromatogramas da Figura 41, identificam-se os picos dos lactobionatos e de ácido lactobiônico (10,5 min), lactose (11,5 min), sorbitol (15 min) e um pico em 9 min. Este último pico citado teve sua eluição no mesmo tempo de retenção da lactobionolactona, entretanto, não é possível afirmar que, neste caso, seja

esta substância. Isto porque a área e a intensidade são elevadas e com perfis semelhantes nas quatro amostras (Figura 41A, 41B, 41C e 41D). Ainda, não foi verificada a queda na concentração das amostras. Para a confirmação da identificação deste pico em particular, estudos adicionais serão necessários.

Tabela 39: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 0,1 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido Lactobiônico (g/L)
0	9,21 \pm 0,01 ^a	9,16 \pm 0,01 ^a	8,72 \pm 0,06 ^a	8,61 \pm 0,03 ^a
3	9,46 \pm 0,02 ^a	9,50 \pm 0,06 ^b	8,95 \pm 0,01 ^b	8,66 \pm 0,38 ^a
5	9,41 \pm 0,04 ^a	9,49 \pm 0,03 ^b	8,96 \pm 0,160 ^b	8,65 \pm 0,17 ^b
10	9,42 \pm 0,24 ^a	9,54 \pm 0,03 ^b	8,99 \pm 0,04 ^b	9,21 \pm 0,19 ^b
17	9,41 \pm 0,01 ^a	9,52 \pm 0,24 ^b	8,90 \pm 0,03 ^b	9,25 \pm 0,20 ^b
24	9,48 \pm 0,08 ^a	9,55 \pm 0,01 ^b	8,99 \pm 0,06 ^b	9,20 \pm 0,21 ^b
48	9,41 \pm 0,18 ^a	9,48 \pm 0,30 ^b	8,92 \pm 0,03 ^b	9,21 \pm 0,04 ^b
120	9,46 \pm 0,20 ^a	9,46 \pm 0,10 ^b	8,98 \pm 0,10 ^b	9,09 \pm 0,10 ^b
240	9,42 \pm 0,23 ^a	9,44 \pm 0,12 ^b	8,94 \pm 0,09 ^b	9,02 \pm 0,10 ^b

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

No doseamento do lactobionato de sódio (Tabela 39), foram determinadas concentrações de 9,21 e 9,42 g/L para as amostras de tempo 0 h e após 240 h, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas entre os demais tempos

de amostragem. Na leitura do pH, foi verificado aumento significativo dos valores de 0,53, 1,24 e 1,20 da amostra inicial, após 120 e 240 h, respectivamente (Tabela 40).

Para as amostras dos lactobionatos de potássio e de cálcio valores em termos de concentração inicial de 9,16 e 8,72 g/L diferiram significativamente dos demais tempos de amostragem (~9,4 e 8,9 g/L). A leitura do pH inicial foi de aproximadamente 0,5 e final de 1,1 (Tabela 40).

Com relação ao doseamento da amostra do ácido lactobiônico, descritos na Tabela 39, foi demonstrada concentração média de 8,6 g/L para a amostra inicial e de 3h, valores que diferem estatisticamente dos demais tempos de amostragem, onde concentrações superiores foram determinadas, de aproximadamente 9,0 g/L. Na análise do pH (Tabela 40) foram obtidas leituras de 1,03, 0,71 e 1,21 nos tempos inicial, 120 e 240 h, respectivamente.

Tabela 40: Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 0,1 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo	pH		
	Inicial	120 h	240 h
Lactobionato de sódio	0,53 \pm 0,02 ^a	1,24 \pm 0,04 ^b	1,20 \pm 0,03 ^b
Lactobionato de potássio	0,58 \pm 0,03 ^a	1,33 \pm 0,03 ^b	1,14 \pm 0,12 ^c
Lactobionato de cálcio	0,53 \pm 0,06 ^a	1,33 \pm 0,06 ^b	1,15 \pm 0,16 ^b
Ácido lactobiônico	1,03 \pm 0,01 ^a	0,71 \pm 0,02 ^b	1,21 \pm 0,06 ^c

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma condição ácida ainda mais concentrada, de HCl 1,0 mol/L. Os cromatogramas resultantes dos testes de degradação propostos são apresentados na Figura 42 e os dados referentes ao doseamento e leituras de pH, são dispostos na Tabela 41 e na Tabela 42, respectivamente.

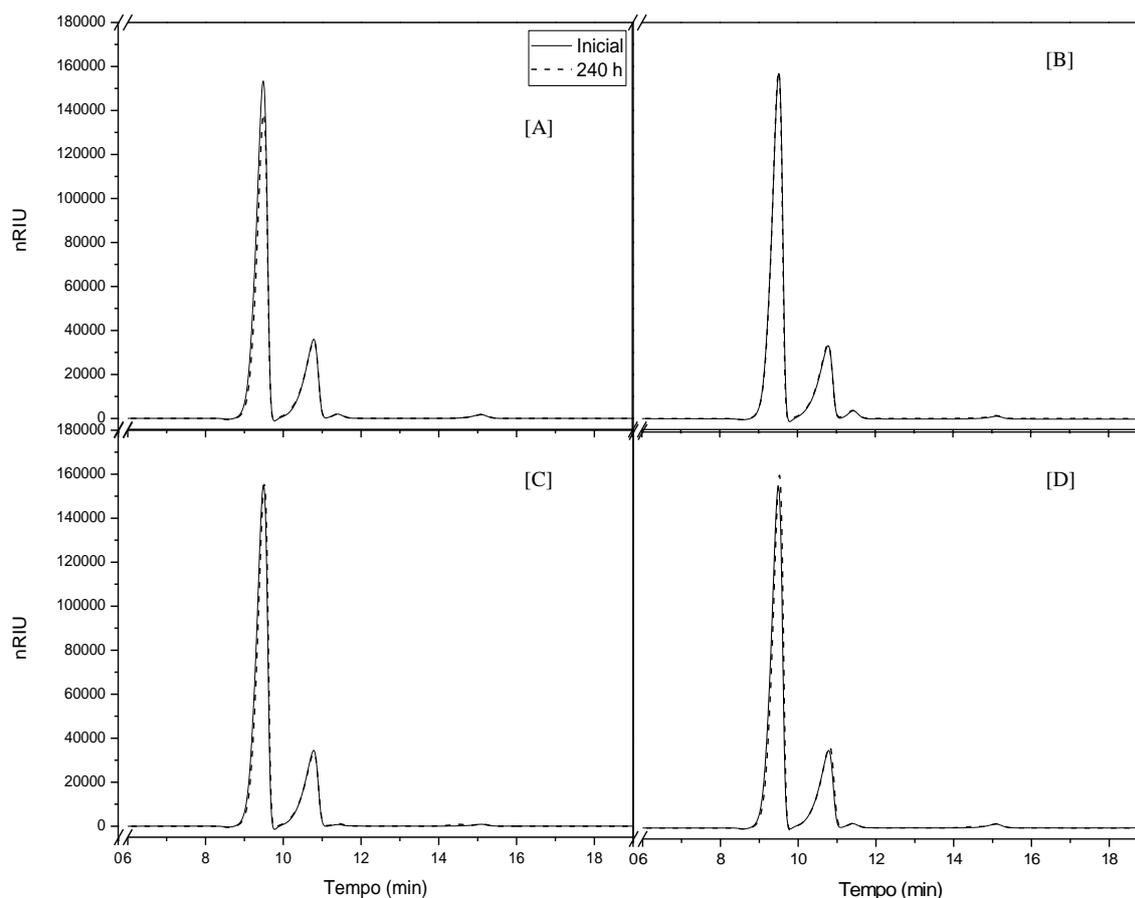


Figura 42: Cromatogramas das amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] no tempo inicial e em 240 h de exposição à solução HCl 1,0 mol/L (1:1).

Nos cromatogramas apresentados na Figura 42, são identificados lactobionato (10,5 min), lactose (11,5 min), sorbitol (15 min) e um pico em 9 min. Ainda, observa-se a intensidade elevada deste último pico, que também foi detectado nas amostras

submetidas à exposição em HCl 0,1 mol/L. Entretanto, ao serem analisados os resultados do doseamento, descritos na Tabela 41, não se observa a redução em termos de concentração que justifique a presença deste pico, o que indica, novamente, a necessidade de realização de testes adicionais para a identificação desta substância.

Tabela 41: Doseamento, por cromatografia líquida, das amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas à solução de HCl 1,0 mol/L por dez dias, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido lactobiônico (g/L)
0	9,68 \pm 0,05 ^a	9,64 \pm 0,37 ^a	9,22 \pm 0,42 ^a	8,98 \pm 0,07 ^a
3	9,69 \pm 0,36 ^a	9,69 \pm 0,43 ^a	9,29 \pm 0,41 ^a	9,42 \pm 0,34 ^b
5	9,69 \pm 0,30 ^a	9,72 \pm 0,28 ^a	9,29 \pm 0,40 ^a	9,64 \pm 0,28 ^c
10	9,75 \pm 0,29 ^a	9,73 \pm 0,26 ^a	9,38 \pm 0,54 ^a	9,63 \pm 0,42 ^c
17	9,74 \pm 0,27 ^a	9,66 \pm 0,41 ^a	9,35 \pm 0,41 ^a	9,69 \pm 0,32 ^c
24	9,77 \pm 0,18 ^a	9,68 \pm 0,43 ^a	9,36 \pm 0,45 ^a	9,67 \pm 0,45 ^c
48	9,72 \pm 0,28 ^a	9,62 \pm 0,52 ^a	9,33 \pm 0,58 ^a	9,65 \pm 0,01 ^c
120	9,74 \pm 0,23 ^a	9,66 \pm 0,33 ^a	9,27 \pm 0,35 ^a	9,67 \pm 0,30 ^c
240	9,76 \pm 0,30 ^a	9,65 \pm 0,40 ^a	9,17 \pm 0,27 ^a	9,65 \pm 0,31 ^c

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas colunas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Considerando os resultados do doseamento das amostras dos sais de lactobionato, não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de exposição nas condições ácidas propostas dos testes (Tabela 41). Com relação às

amostras dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio, concentrações iniciais de 9,68, 9,64 e 9,22 g/L e de 9,76, 9,65 e 9,17 g/L após 240 h, foram determinadas, respectivamente. Na análise do ácido lactobiônico, a concentração da amostra inicial (8,98 g/L) diferiu significativamente das amostras medidas a partir de 3 h (9,42 g/L) de análise.

Com relação à análise do pH (Tabela 42), inicialmente para os sais, foram obtidos valores em torno de pH 0,50 e ao final de 240 h, constatou-se um leve aumento para pH 1,10. Para o ácido lactobiônico foi determinado pH inicial de 0,90 e de 1,05 ao final do experimento (240 h).

Tabela 42: Leituras de pH inicial, após 120 h e 240 h dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidas a solução de HCl 1,0 mol/L, a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão

Tempo	pH		
	Inicial	120 h	240 h
Lactobionato de sódio	$0,49 \pm 0,02^a$	$1,22 \pm 0,00^b$	$1,17 \pm 0,03^c$
Lactobionato de potássio	$0,57 \pm 0,03^a$	$1,25 \pm 0,05^b$	$1,08 \pm 0,01^c$
Lactobionato de cálcio	$0,46 \pm 0,01^a$	$1,19 \pm 0,08^b$	$1,12 \pm 0,08^b$
Ácido lactobiônico	$0,90 \pm 0,04^a$	$0,65 \pm 0,05^b$	$1,05 \pm 0,01^c$

Resultados com letras iguais e apresentadas nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Com os resultados obtidos no estudo de degradação forçada frente ao pH básico e ácido, foi possível verificar a estabilidade dos sais de lactobionato e do ácido lactobiônico por dez dias, em temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). Foi, ainda, detectada a

lactobionolactona, nas amostras do ácido lactobiônico submetidas ao pH básico, que não é classificada como produto de degradação.

Para a confirmação do pico eluído em 9 min na presença de HCl 0,01, 0,1 e 1 mol/L, estudos adicionais se tornam necessários.

4.3.2 Degradação frente à temperatura

Para a análise de degradação frente à temperatura foram realizados ensaios de duração de quinze dias em estufa com temperatura controlada a 60 e 80°C. Na Figura 43, são apresentados os resultados referentes ao percentual recuperado dos lactobionatos de sódio, de potássio, de cálcio e do ácido lactobiônico, durante quinze dias, a 60°C.

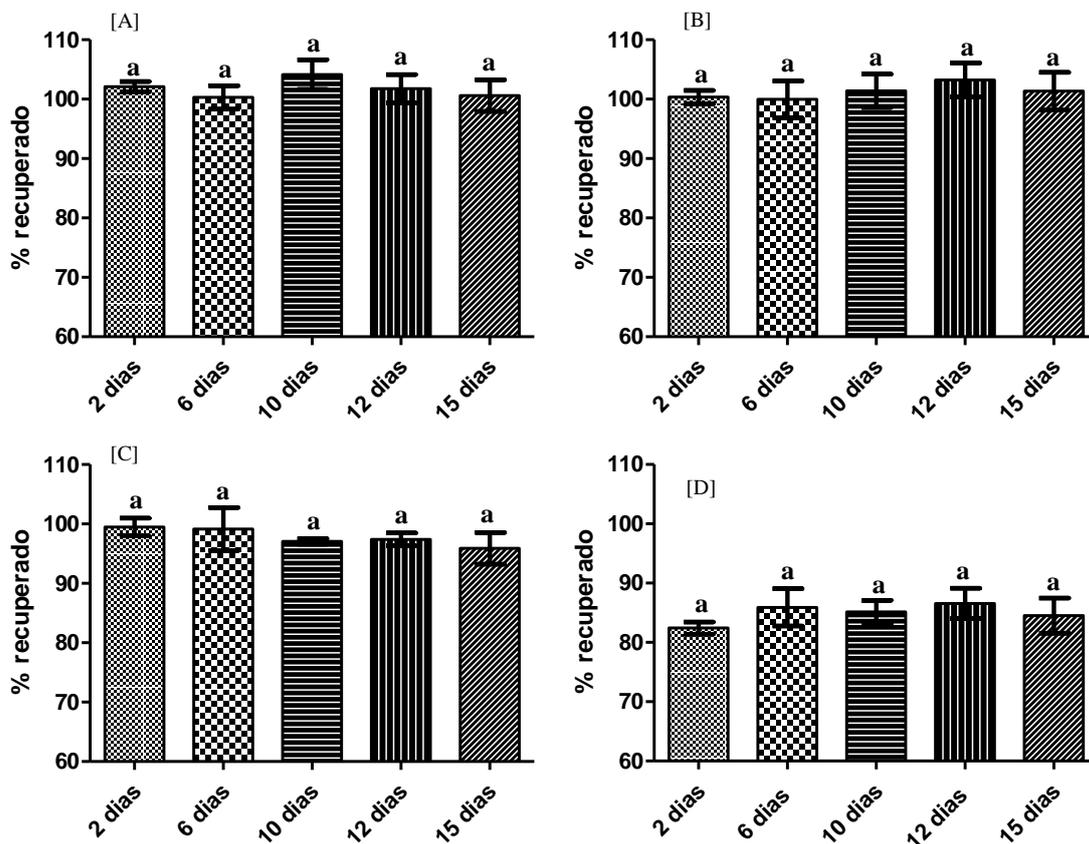


Figura 43: Doseamento das amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] em função do tempo de exposição a 60°C. Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão

Resultados com letras iguais e apresentadas nos mesmos gráficos não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Ao analisar os resultados do percentual recuperado dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio, nos tempos estipulados, descritos na Figura 43, observa-se a manutenção em torno de 100%, não apresentando diferenças significativas entre os tempos de amostragem. Entretanto, em relação à amostra do ácido lactobiônico, o percentual recuperado se manteve constante pelo período do estudo, mas em aproximadamente 85%.

Na Figura 44, estão representados os cromatogramas do ácido lactobiônico nos tempos estipulados, sendo identificado, novamente, um pico em 9 min, sugerindo a presença da lactobionolactona (Simms *et al.*, 1994; Pedruzzi *et al.*, 2007).

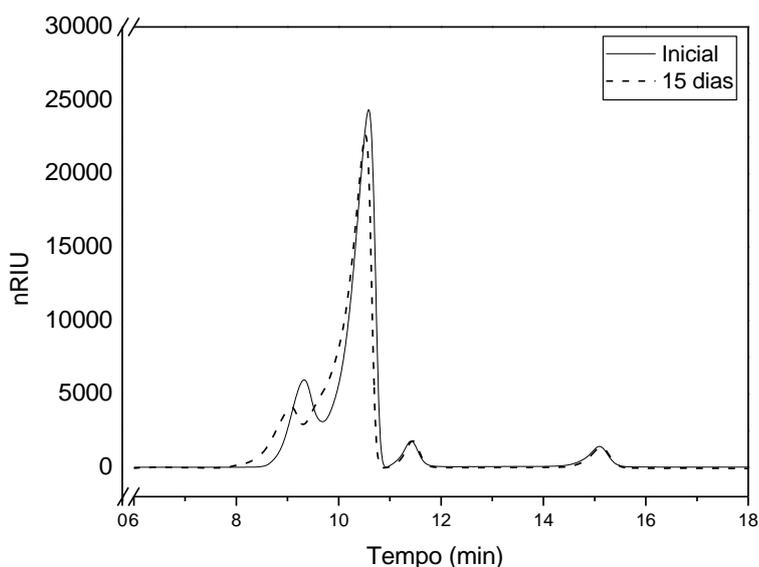


Figura 44: Cromatogramas da amostra do ácido lactobiônico no tempo inicial e ao final de quinze dias de exposição a 60°C.

Na Figura 45, são apresentadas imagens de amostras dos compostos ao final de quinze dias de exposição nas condições dos testes, onde pode ser identificada a formação de um gel transparente, caracterizando o comportamento higroscópico do

ácido lactobiônico, em particular (Figura 45). Ainda, observa-se que, no caso dos sais (Figura 45A, 45B e 45C), as características sólidas foram preservadas.

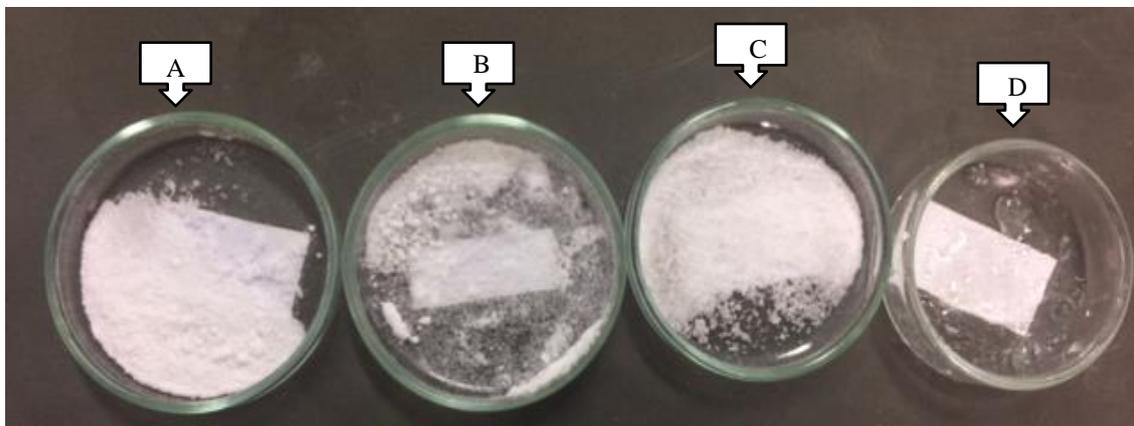


Figura 45: Amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] após quinze dias de exposição a 60°C.

Visto que não ocorreu degradação na temperatura de 60°C no período proposto, procedeu-se o estudo em temperatura de 80°C, também por quinze dias. Na Figura 46, são apresentados os resultados referentes ao percentual recuperado dos lactobionatos de sódio, de potássio de cálcio e do ácido lactobiônico nos devidos períodos de análise.

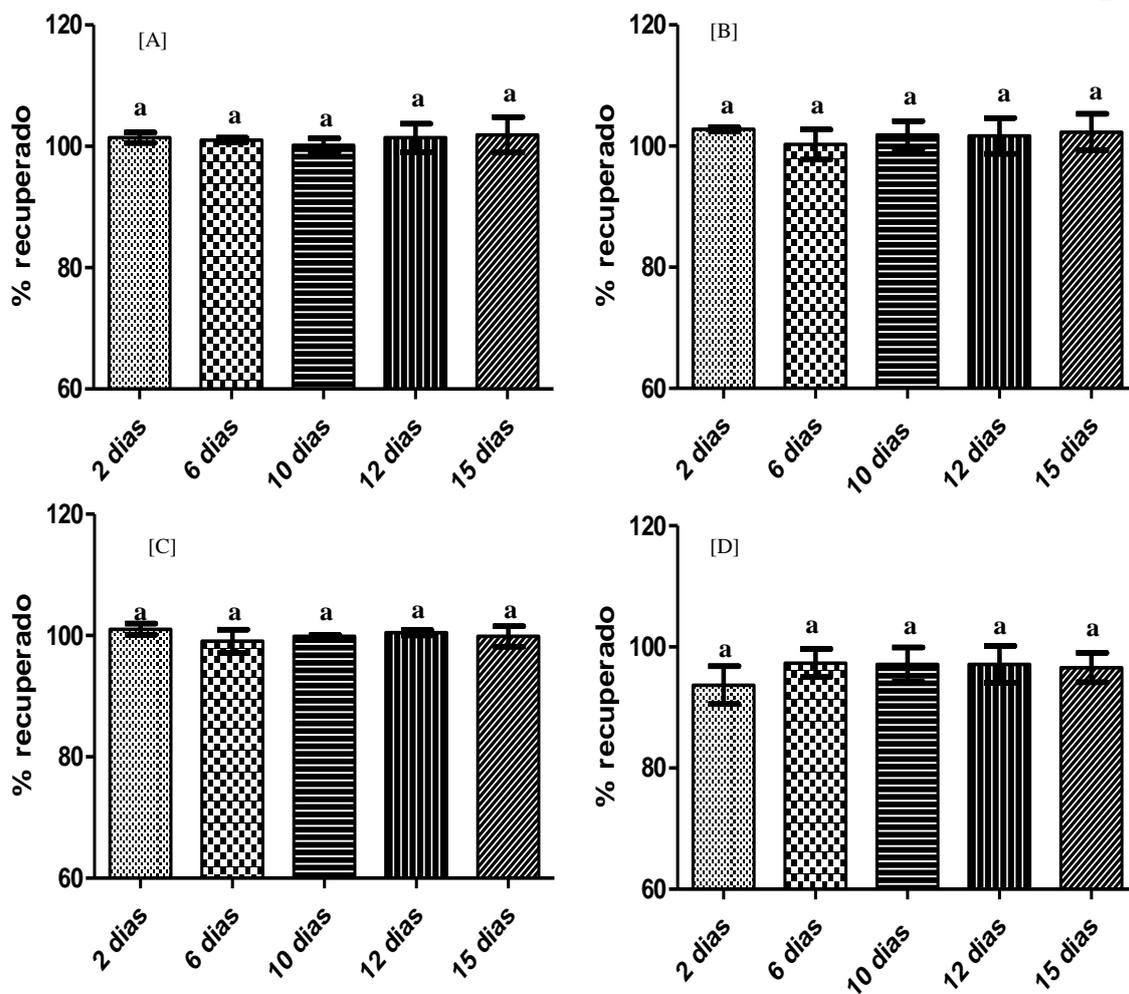


Figura 46: Doseamento das amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] em função do tempo de exposição a 80°C por quinze dias. Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão.

Resultados com letras iguais e apresentadas nos mesmos gráficos não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Conforme observado na Figura 46, o percentual recuperado dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio foi constante, em torno de 100%, sem diferença significativa ao longo do estudo proposto. O perfil de recuperação do ácido lactobiônico foi diferente do argumentado anteriormente nos testes a 60°C (Figura 43D), que, embora apresentando teor constante, o percentual recuperado foi superior, em torno de 95%.

Pode ser observado no cromatograma da amostra de ácido lactobiônico, apresentado na Figura 47, que o já referido pico eluído em 9 min, provavelmente representando a forma de lactona, não é identificado.

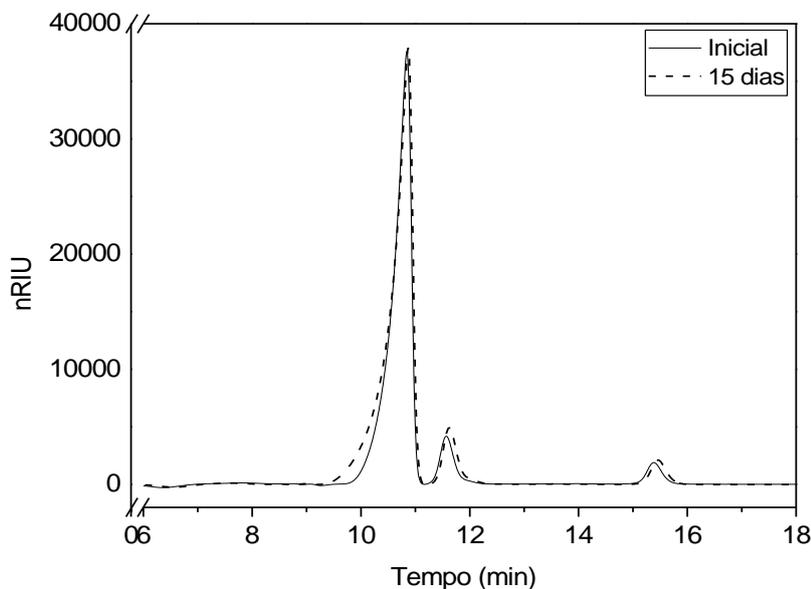


Figura 47: Cromatogramas da amostra do ácido lactobiônico no tempo inicial e ao final de quinze dias de exposição a 80°C.

Na Figura 48, são apresentadas as imagens relativas às amostras avaliadas após quinze dias de incubação a 80°C. No caso do ácido lactobiônico, em particular (Figura 48D), o aspecto da amostra é diferente do anteriormente observado após a exposição a 60°C (Figura 45D). Neste caso, não ocorreu a formação de gel, sendo observada somente a constituição de um agregado, possivelmente, devido à absorção de água (hidratação), porém em menor quantidade em relação ao estudo a 60°C. Neste caso, a temperatura superior, de 80°C, pode ter interferido no teor de umidade do ambiente, diminuindo a absorção pela amostra. Possivelmente, a água presente na amostra seja um

fator que favoreça a formação da lactobionolactona. Para corroborar este resultado, mais estudos devem ser realizados.

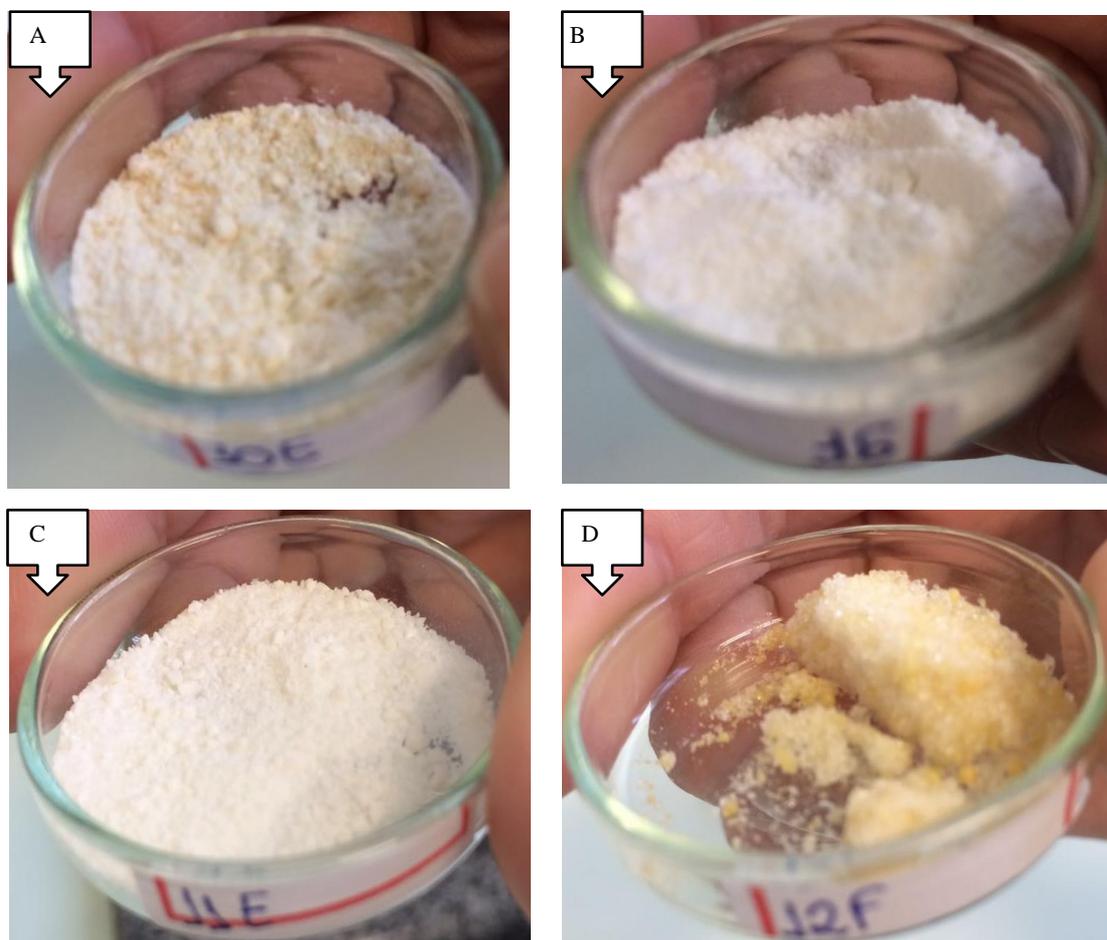


Figura 48: Amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] após quinze dias de exposição a 80°C.

4.3.3 Degradação oxidativa

Para a avaliação da estabilidade frente a uma substância oxidativa, procedeu-se o ensaio em que as amostras dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico foram mantidas em H_2O_2 (substância oxidante) por um período de sete dias, em temperatura ambiente ($23\pm 2^\circ C$) e protegidos da luz.

Para o doseamento e avaliação, as amostras foram analisadas por cromatografia em fase líquida. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 43 e na Figura 49.

Tabela 43: Doseamento, por cromatografia líquida, dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à solução de 3% (m/v) de H₂O₂ por sete dias a 23^o±2^oC. Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão.

Tempo (horas)	Lactobionato de sódio (g/L)	Lactobionato de potássio (g/L)	Lactobionato de cálcio (g/L)	Ácido lactobiônico (g/L)
0	8,82 ± 0,11 ^a	8,94 ± 0,08 ^a	8,88 ± 0,05 ^a	6,72 ± 0, 0,28 ^a
2	8,72 ± 0,02 ^b	9,03 ± 0,05 ^a	8,83 ± 0,05 ^a	6,44 ± 0,07 ^b
5	8,60 ± 0,01 ^c	8,89 ± 0,13 ^a	8,86 ± 0,05 ^a	6,39 ± 0,06 ^b
10	8,46 ± 0,07 ^c	8,91 ± 0,12 ^a	8,75 ± 0,05 ^b	6,10 ± 0,12 ^c
24	8,24 ± 0,06 ^d	8,55 ± 0,18 ^b	8,50 ± 0,05 ^c	5,34 ± 0,09 ^d
48	8,03 ± 0,08 ^e	8,60 ± 0,11 ^c	8,20 ± 0,05 ^d	4,69 ± 0,06 ^e
72	6,20 ± 0,14 ^f	8,29 ± 0,10 ^d	6,62 ± 0,04 ^e	4,41 ± 0,05 ^f
120	5,47 ± 0,09 ^g	5,49 ± 0,16 ^e	5,36 ± 0,03 ^f	4,18 ± 0,10 ^f
144	4,29 ± 0,13 ^h	4,59 ± 0,13 ^f	4,31 ± 0,02 ^g	3,90 ± 0,03 ^g
168	3,57 ± 0,10 ⁱ	4,09 ± 0,12 ^g	3,27 ± 0,02 ^h	3,73 ± 0,12 ^h

Resultados com letras iguais e apresentadas na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Analisando os resultados do ensaio de degradação forçada do lactobionato de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico, frente à solução oxidativa de H₂O₂, observa-se uma queda gradual no doseamento em função do tempo de análise (Tabela 43). Para o lactobionato de sódio, inicialmente, foi quantificado 8,82 g/L, com queda gradual para 3,57 g/L, medido em 168 h. Para as amostras de lactobionato de potássio e

cálcio, perfis semelhantes ao de sódio foram observados, com valores iniciais de 8,94 e 8,88 g/L e de 4,09 e 3,27 g/L ao final, respectivamente. Para o ácido lactobiônico também foi observada queda na concentração final, entretanto, na amostra inicial, apresentou valores relativamente inferiores aos demais (6,72 g/L) e, ao final, foi atingido 3,73 g/L.

Ao analisarmos os cromatogramas apresentados na Figura 49, observa-se a presença de picos correspondentes ao lactobionato/ácido lactobiônico, lactose e sorbitol nos tempos de retenção de 10,5, 11,5 e 15,5 min, respectivamente. No decorrer do tempo, em geral, foram identificados os mesmos picos iniciais, ressaltando a diminuição da intensidade do sinal do lactobionato/ácido lactobiônico.

Ainda, foram detectados dois picos anteriores e de comportamentos muito semelhantes entre 9,5 e 10 minutos nas amostras dos lactobionatos (Figuras 49A, 49B e 49C), quase sobrepostos ao pico correspondente à eluição do lactobionato/ácido lactobiônico. No decorrer da análise, observou-se a eluição de outros picos, nos tempos de retenção de 12,5 e 19 min, este último, entretanto, com alta intensidade do sinal. Possivelmente, um dos picos detectados em cerca de 9 min seja da lactobionolactona e os demais, até o momento, não foram identificados. No cromatograma da amostra do ácido lactobiônico (Figura 49D), foi observada, inicialmente, a presença do pico em 9 min, porém com, oscilação do sinal conforme o tempo de amostragem.

A diminuição no doseamento dos lactobionatos e do ácido lactobiônico, juntamente com a identificação de picos distintos, são indicativos da degradação dos insumos. Para as quatro amostras, o mesmo perfil cromatográfico foi obtido, significando que, possivelmente, os produtos de degradação sejam os mesmos.

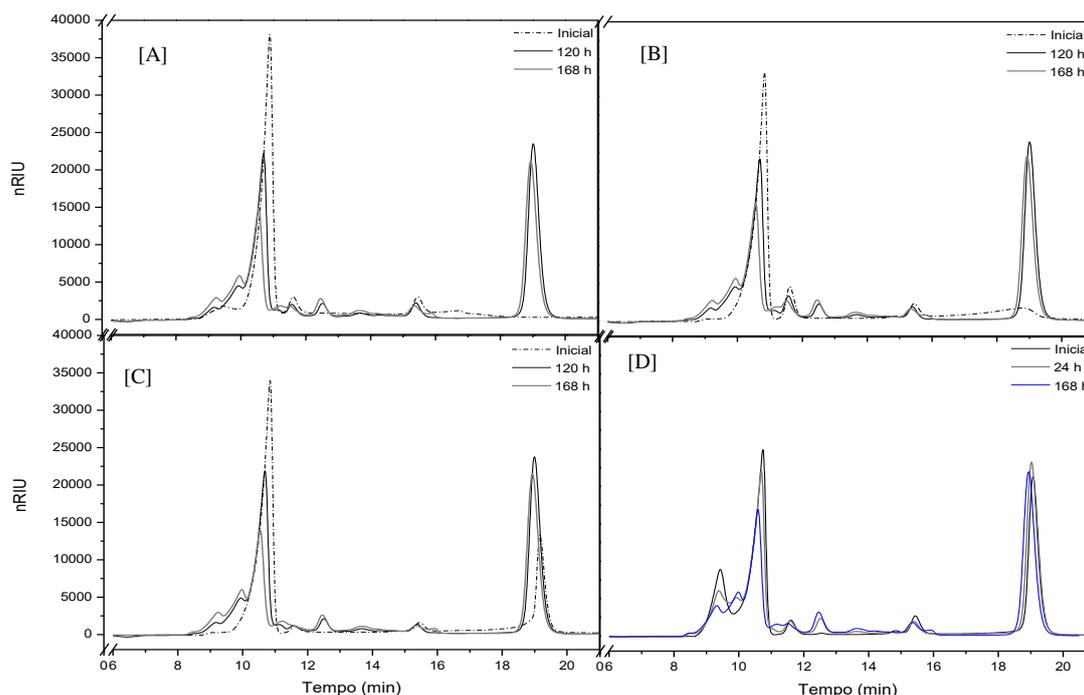


Figura 49: Cromatogramas das amostras dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] no tempo inicial e ao final de sete dias de exposição à solução de H_2O_2 3% (m/v).

Após a análise do doseamento frente à solução oxidativa H_2O_2 3% (m/v), foram plotados os gráficos de concentração (C), log da concentração (Log C) e 1/concentração (1/C) em função do tempo (t) para verificar a ordem cinética de degradação. Na Figura 50, são exibidos os gráficos da cinética de degradação do lactobionato de sódio.

Analisando os gráficos e os valores do coeficiente de correlação linear (r) é possível determinar que o gráfico que melhor se ajusta é o C x t, com valor de r de 0,91561, sugerindo que a cinética de degradação siga a reação de ordem zero. Nas reações de ordem zero, a velocidade de reação é independente da concentração da droga e é constante em relação ao tempo (Aulton, 2005; Waterman & Adami, 2005). Portanto, significando que a degradação da amostra não depende de sua concentração.

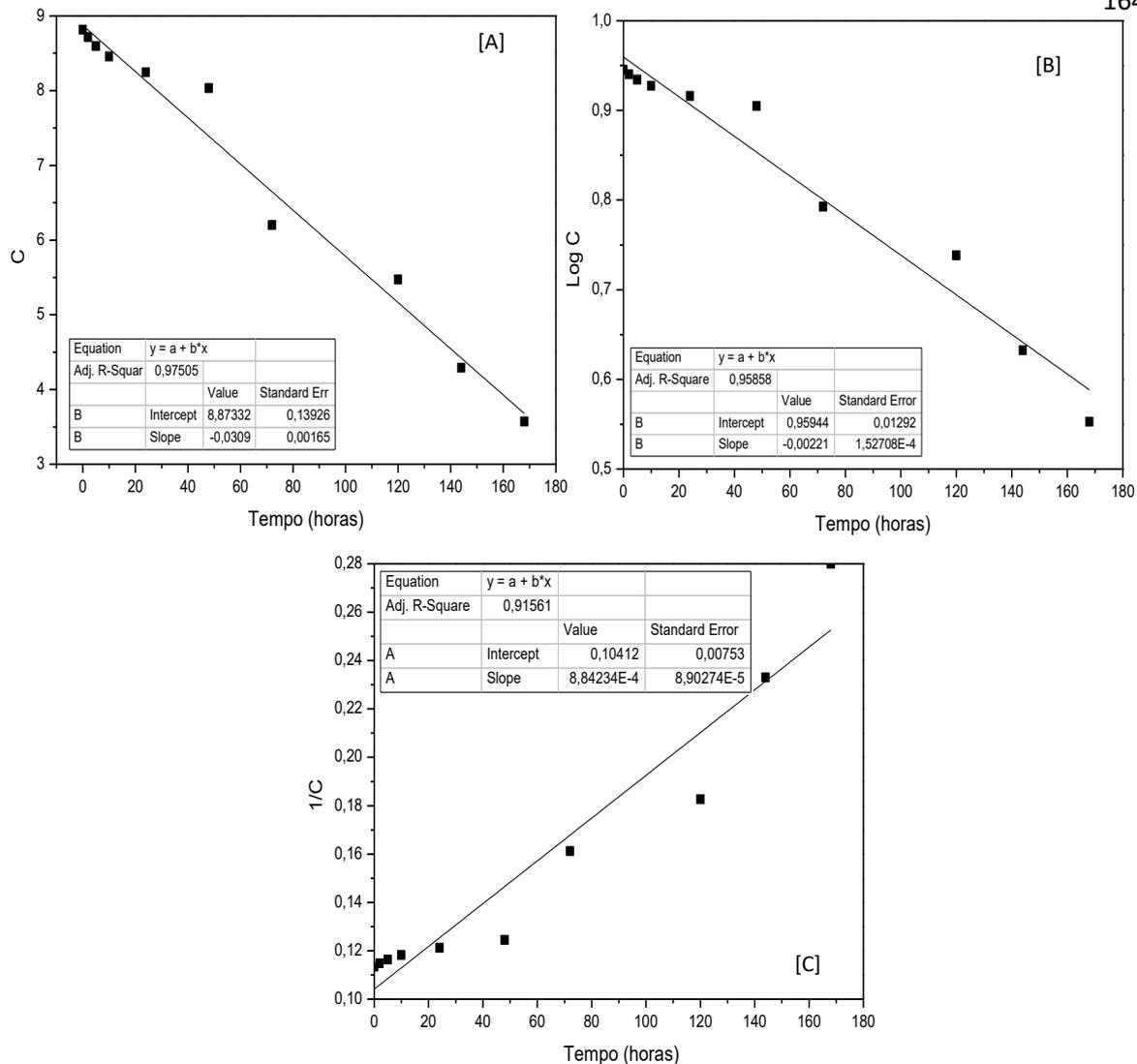


Figura 50: Gráficos da concentração x tempo [A], log da concentração x tempo [B] e 1/concentração x tempo [C] do lactobionato de sódio submetidas à solução 3% (m/v) de H_2O_2 por sete dias, em temperatura ambiente.

Na Figura 51, estão representados os perfis da cinética de degradação do lactobionato de potássio frente à solução oxidativa. Em função dos valores do coeficiente de correlação linear (r), observa-se que o perfil de melhor ajuste é relativo a $C \times t$, com valor de r de 0,92578, sugerindo que a cinética de degradação do lactobionato de potássio, assim como o lactobionato de sódio, segue a reação de ordem zero.

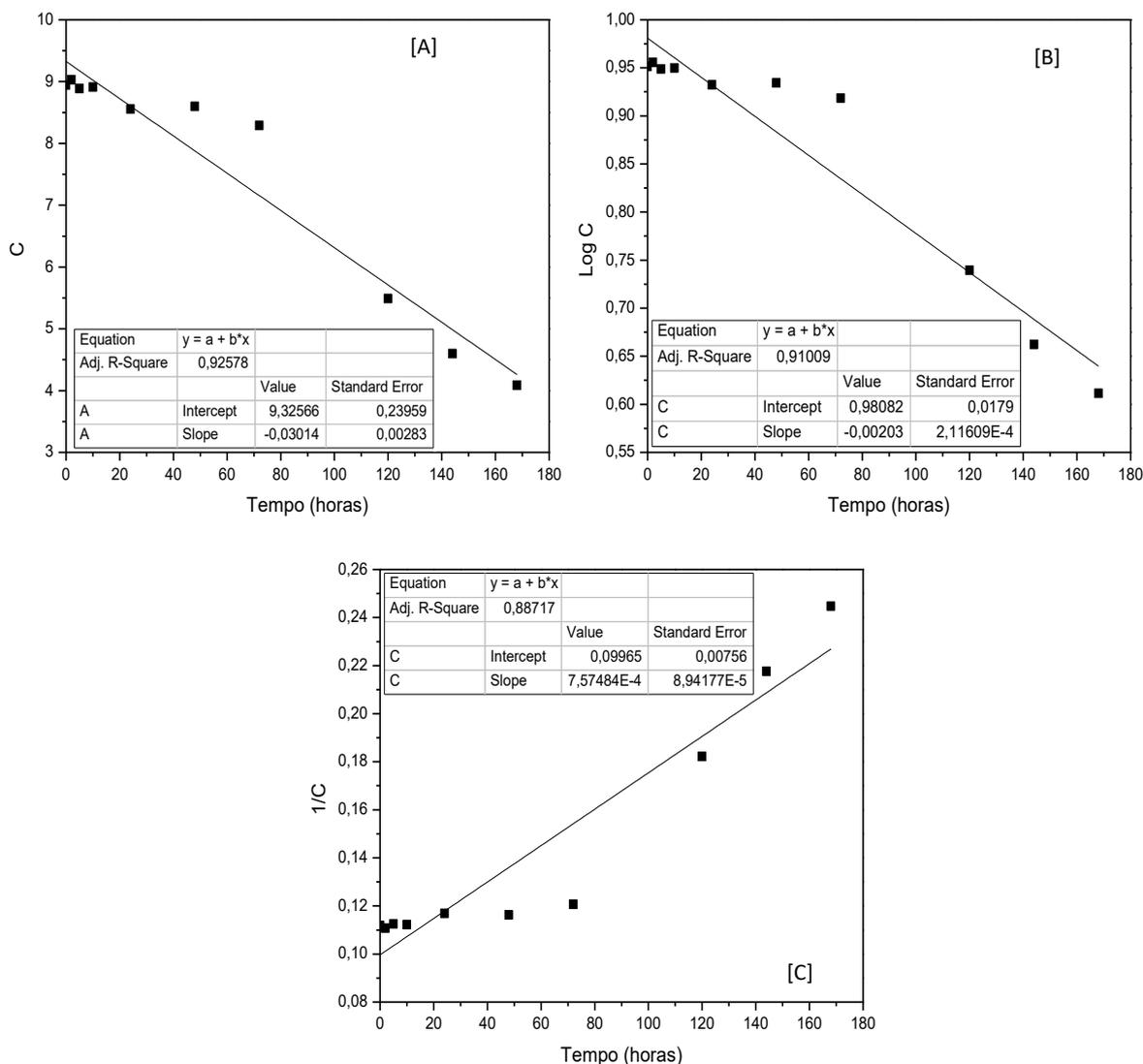


Figura 51: Concentração x tempo [A], log da concentração x tempo [B] e 1/concentração x tempo [C], do lactobionato de potássio submetido à solução 3% (m/v) de H₂O₂ por sete dias em temperatura ambiente.

Nas Figuras 52 e 53, estão representados os gráficos do doseamento da solução de lactobionato de cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à solução oxidativa em relação ao tempo.

Na Figura 52, estão apresentados os gráficos de C x t, log C x t e 1/C x t e os respectivos valores do coeficiente de correlação linear (r). O gráfico com melhor ajuste é C x t, com valor de r de 0,97956, sugerindo que a cinética de degradação do

lactobionato de cálcio siga a reação de ordem zero (Aulton, 2005; Waterman & Adami, 2005).

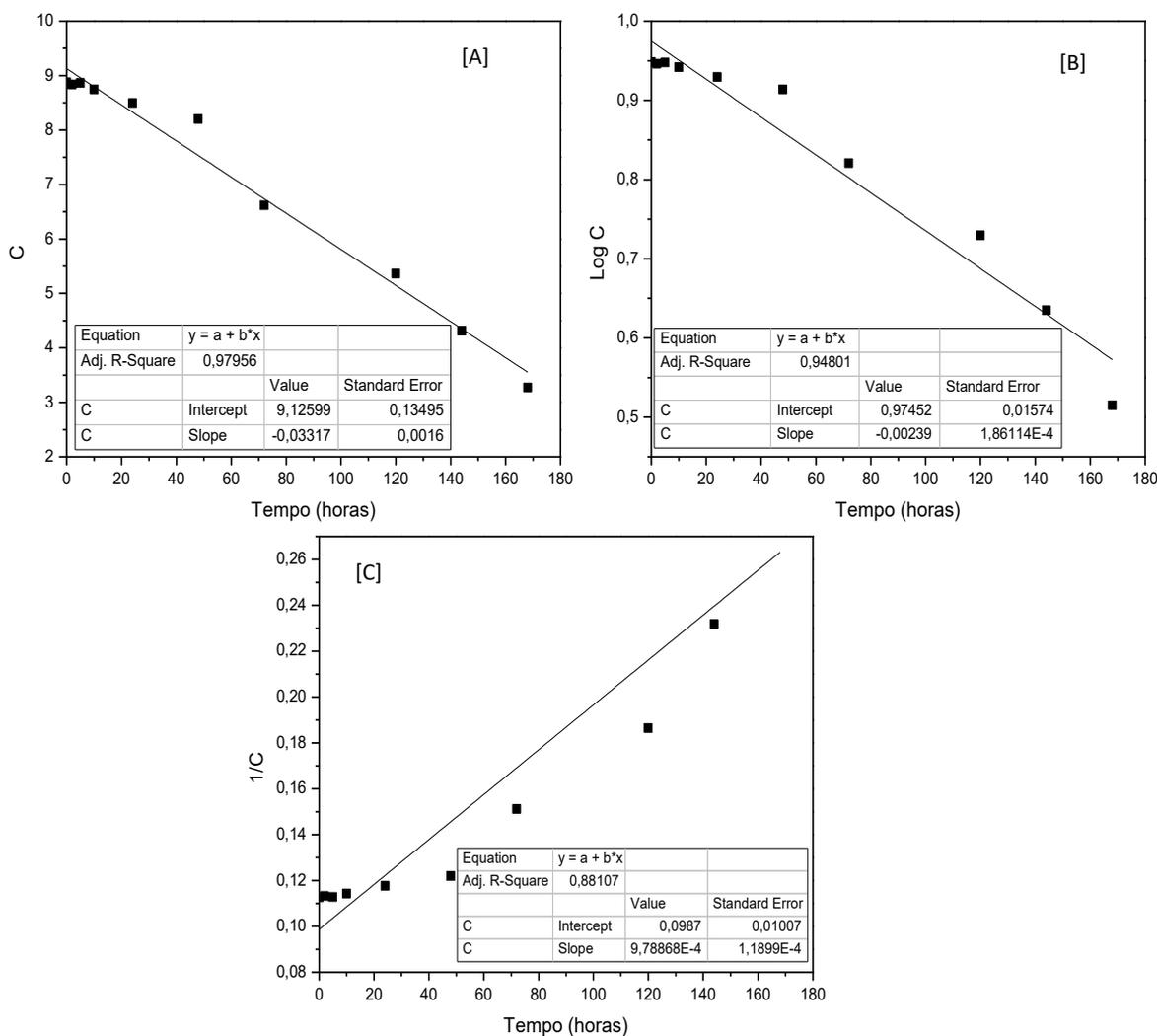


Figura 52: Concentração x tempo [A], log da concentração x tempo [B], e 1/concentração x tempo [C] do lactobionato de cálcio submetido à solução 3% (m/v) de H_2O_2 por sete dias em temperatura ambiente.

Na comparação, para o ácido lactobiônico foram identificadas diferenças significativas em relação aos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio. Na Figura 53, estão apresentados os gráficos plotados com informação da $C \times t$, $\log C \times t$ e $1/C \times t$, sendo que o gráfico com melhor valor de correlação linear é o de $1/C \times t$, onde o valor

de r obtido foi de 0,9304, o que sugere que a degradação do ácido lactobiônico seja representada pela reação de segunda ordem, quando a velocidade de reação é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes (Aulton, 2005; Waterman & Adami, 2005).

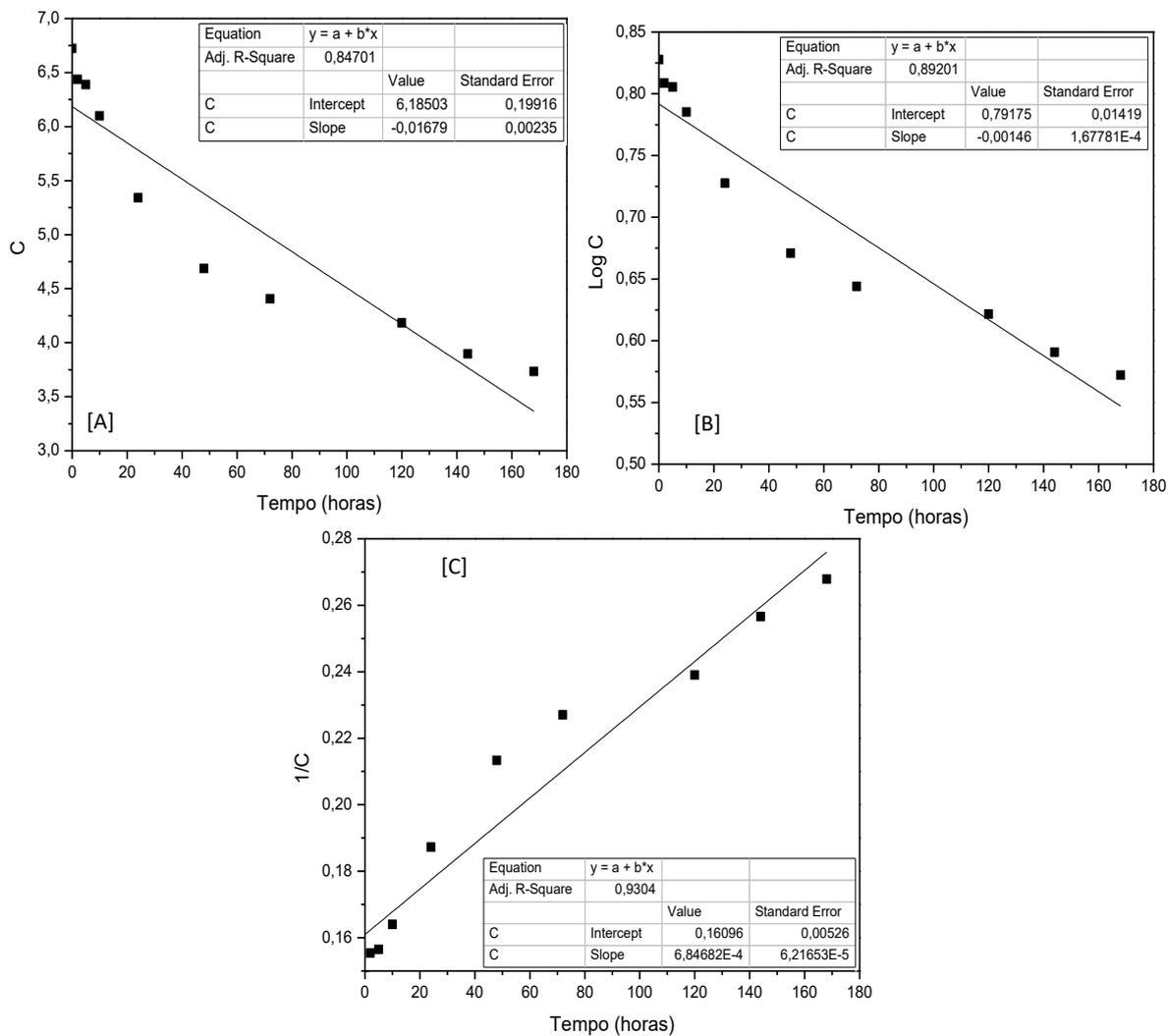


Figura 53: Gráficos da concentração x tempo [A], log da concentração x tempo [B] e 1/concentração x tempo [C] do ácido lactobiônico submetidos à solução 3% (m/v) de H_2O_2 por sete dias, em temperatura ambiente.

4.3.4 Degradação frente à luz ultravioleta

Na Figura 54, estão apresentados os resultados referentes ao percentual recuperado dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e do ácido lactobiônico submetidos à luz UV em comparação à amostra controle.

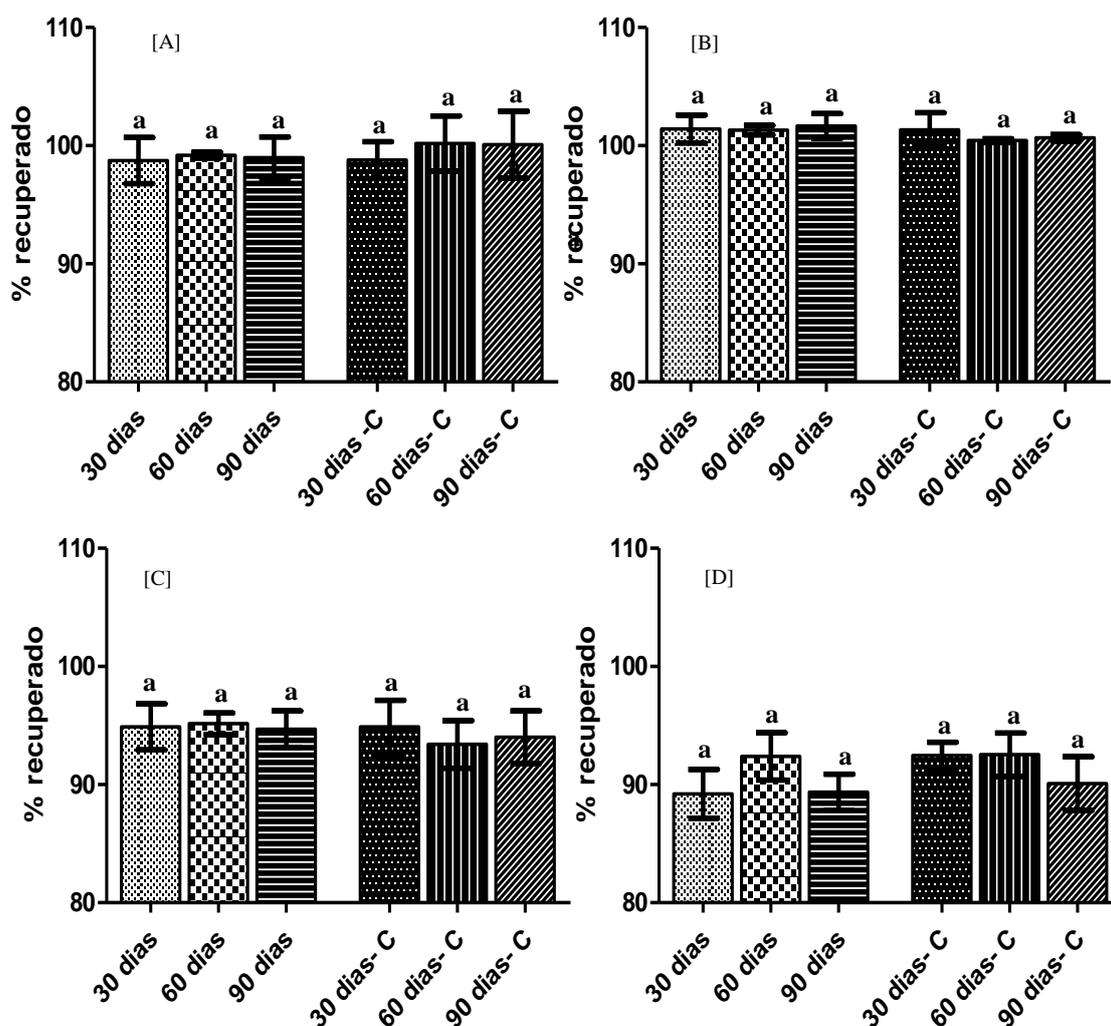


Figura 54: Percentual recuperado dos lactobionatos de sódio [A], potássio [B] e cálcio [C] e do ácido lactobiônico [D] submetidos à ação da luz ultravioleta por 90 dias em comparação com os controles [dias- C], sob proteção da luz ultravioleta. Os resultados estão descritos em média±desvio padrão

Resultados com letras iguais e apresentadas nos mesmos gráficos não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Analisando os resultados apresentados na Figura 54, não foram observadas diferenças significativas no doseamento tanto para as amostras expostas à luz UV quanto para as amostras controle, quando consideradas as amostras de 30, 60 e 90 dias de incubação. Em relação às amostras dos lactobionatos de sódio e de potássio (Figura 54A e 54B), o percentual recuperado da amostra exposta e o controle foram mantidos em torno de 100%. Entretanto, ao analisarmos as amostras do lactobionato de cálcio e do ácido lactobiônico (Figura 54C e 54D), estes apresentaram percentual recuperado inferior, em torno de 95% e 90%, respectivamente.

Os testes de fotoestabilidade têm como objetivo demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações no produto. Como não houve diferença, no doseamento, entre os controles e as amostras submetidas à luz UV, sugere-se a ausência de degradação nas condições dos testes. Estes dados indicam que, nas condições avaliadas, os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e o ácido lactobiônico são estáveis frente à luz UV, ou seja, são fotoestáveis.

De uma forma geral, este estudo traz uma quantidade expressiva de resultados como contribuição às escassas informações relativas à caracterização e estabilidade físico-química do ácido lactobiônico e dos lactobionatos de sódio, de potássio e de cálcio. Estes dados poderão ser úteis e servir como referência, tendo em vista as aplicações multipropósito dos referidos compostos.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo estão resumidas as principais conclusões deste trabalho.

Na etapa de bioprodução dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio e os substratos lactose e frutose, resultados semelhantes em termos de rendimento (75%) são obtidos.

Na bioprodução de lactobionato de potássio em bateladas sucessivas, os valores de rendimento decrescentes obtidos – 78, 65, 64 e 56%, nas bateladas 1, 2, 3 e 4, respectivamente – são inferiores aos relatados em estudos anteriores do grupo de pesquisa para a produção de lactobionato de sódio. Para o lactobionato de cálcio, leve diminuição nos valores de rendimento foi observada no decorrer das bateladas, embora não significativa, com valor médio determinado de 80% em produto. Estas diferenças são justificadas pela perda da rigidez das esferas, mais acentuada no processo de obtenção do lactobionato de potássio.

Quanto à purificação dos lactobionatos de sódio, potássio e cálcio, pureza média da ordem de 95% (m/v) é alcançada. Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência, detecta-se a eluição dos picos relativos ao lactobionato (10,5 min), lactose (11,5) e sorbitol (15 min). Na caracterização por espectrometria de massas, são demonstradas m/z correspondentes aos sais de lactobionato, formando adutos com íons H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e com H_2O , além da m/z correspondente ao sorbitol. Com relação às análises por RMN de ^{13}C , detectam-se os picos dos doze carbonos representantes das amostras.

Os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio e o ácido lactobiônico são recuperados com elevada pureza. Nas condições deste trabalho, os níveis de purificação atingiram 92,32, 92,27, 96,75 e 93,71% (m/v), respectivamente. Os sais (lactobionatos) são estáveis, já que tanto nos estudos de estabilidade acelerada (40°C e

75% de UR) quanto nos de estabilidade de longa duração (30°C e 75% de UR) mantêm suas características por, no mínimo, seis meses. Em análises de amostras de ácido lactobiônico e do ácido lactobiônico comercial, empregando cromatografia em fase líquida e espectrometria de massas, constata-se a presença de lactobionolactona, substância que interfere no doseamento. O composto na forma ácida apresenta elevada higroscopicidade, verificando-se, nos estudos de estabilidade de longa duração e acelerada, a alteração do seu aspecto, com a formação de um gel transparente e com coloração caramelo, respectivamente.

Quanto ao estudo de degradação forçada, os sais e o ácido lactobiônico apresentam estabilidade frente ao pH ácido e básico, à temperatura de 60 e 80°C e frente à luz UV, com a identificação da lactobionolactona nas amostras do ácido lactobiônico. Entretanto, ao analisar a degradação frente ao peróxido de hidrogênio, evidencia-se a degradação dos lactobionatos e do ácido lactobiônico, com a eluição de diferentes picos ainda não identificados na análise por cromatografia em fase líquida. Ainda, na cinética de degradação, sugere-se que os lactobionatos de sódio, potássio e cálcio seguem a reação de ordem zero e o ácido lactobiônico, cinética de segunda ordem.

Com a elucidação das estruturas químicas, a caracterização e os estudos de estabilidade dos diferentes lactobionatos e do ácido lactobiônico, sugere-se que o prazo de validade seja, provisoriamente, definido em 24 meses, não sendo necessário o acondicionamento sob proteção da luz UV.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem efetivamente para a avaliação da aplicabilidade industrial dos lactobionatos e do ácido lactobiônico obtidos por via biotecnológica com o uso do sistema enzimático de *Z. mobilis*.

Como perspectivas deste trabalho, para a continuidade dos estudos, sugerem-se as atividades listadas a seguir:

- avaliar a bioprodução e a purificação dos lactobionato de sódio, potássio e cálcio em escala piloto;

- dar continuidade ao estudo de estabilidade de longa duração até completar 24 meses de incubação;

- realizar o doseamento da lactobionolactona e avaliar formas de prevenir a sua formação;

- identificar os compostos que foram detectados nos estudos de degradação frente ao pH ácido e à solução oxidativa;

- avaliar a aplicação prática dos sais de lactobionato em comparação ao ácido lactobiônico em formulações nas áreas farmacêutica e de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adebola, O.O.; Corcoran, O.; Morgan, W.A. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. **J. Funct. Foods.** 10: 75-84.

Alonso, S.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. **Bioresour. Technol.** 102: 9730-9736.

Alonso, S.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2012). Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresour. Technol.** 109:140-147.

Alonso, S.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2013). Feeding strategies for enhanced lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresour. Technol.** 134: 134-142.

Ansel, H.C.; Popovich, N.G.; Allen Jr., L.V. (2000). **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6. ed. São Paulo: Premier. 568 p.

Aulton, M.E. (2005). **Delimitação de formas farmacêuticas.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 677 p.

Bajaj, S.; Singla, D.; Sakhuja, N. (2012). Stability testing of pharmaceutical products. **J. App. Pharm. Sci.** 2(3): 129-138.

Barbosa, L.C.A. **Introdução à química orgânica.** 2.ed. São Paulo: Pearson, 2011- Disponível em: <<https://ucsvirtual.ucs.br/startservico/PEA/>>. Acesso em: 06 out. 2011.

Barquet, A.P.; Finch, A. P.; Koesters, L.S. (2006). Comparação entre alfa-hidroxiácidos e poli-hidroxiácidos na cosmética e dermatologia. **Rev. Bras. Farm.** 87: 67-73.

Beraldo, N.M.C.; Rodrigues, D.C.; Carra, S.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2014). Efeito do pH e da temperatura na síntese de ácido lactobiônico e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. In: XXII Encontro de Jovens Pesquisadores e IV Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. **Resumos**. Caxias do Sul, 2014.

Bergfeld, W.F.; Remzi, B.K.; Green, B.; Patel, P.; Ravas, R. (1998). An evaluation of the gluconolactone sensitive skin care products. In: Amer. Acad. Derm. **Anais**. Orlando, 1998.

Bertasso, M.; Silveira, M.M.; Mancilha, I.M. (1996). Preservação da atividade da enzima glicose-frutose oxidoreductase em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações. **Anais**. pp. 476. São Carlos, 1996.

Blessy, M.; Patel, R.D.; Prajapati, P.N.; Agrawal, Y.K. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - a review. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 4(3): 159-165.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Resolução - RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 12 de agosto de 2003.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004). Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). Resolução RE nº1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 1 de agosto de 2005.

Brasil. (2008). Informe técnico nº01, de 15 de julho de 2008 – Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº 01 de 29/07/2005, que trata do Guia para

realização dos estudos de estabilidade. Poder executivo. Diário Oficial da União, Brasília, 15 jul. 2008.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2012). Resolução RDC n° 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de agosto, 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2012). Formulário nacional da farmacopeia brasileira / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa. 224 p.

British Pharmacopoeia Commission (2009). **British Pharmacopoeia**. London: The Stationery Office. CD-ROM Manual.

USP United States Pharmacopoeia (2015). USP Monographs: calcium lactobionate.

Brouda, I.; Edison, B.L.; Weinkauff, R.L.; Green, B.A. (2010). Lactobionic acid anti-aging mechanisms: antioxidant activity, MMP inhibition, and reduction of melanogenesis. In: Summer Academy Meeting of the American Academy of Dermatology. **Anais**. pp. 4-8. Chicago, 2010.

Carini, J.P.; Kaiser, S.; Ortega, G.G.; Bassani, V.L. (2013). Development, optimisation and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs. **Phytochem. Anal.** 24(3): 193-200.

Carra, S. (2012). Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS.

Charloux, C.; Paul, M.; Loisançe, D.; Astier, A. (1995). Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. **Free Radical Biol. Med.** 19(5): 699-704.

Chen, G.; Liz, D.; Li, J.; Luo, Y.; Wang, J.; Shi, X.; Guo, R. (2015). Targeted delivery of doxorubicin by lactobionic acid-modified laponite to hepatocarcinoma cells. **J Control Release.** 213: e8–e152.

Chilukuri, M.; Narayanareddy, P.; Hussianreddy, K. (2014). Stability-indicating HPLC method for determination of fosamprenavir calcium. **J. Chromatogr. Sci.** 52:781-787.

Chun, U.H.; Rogers, P.L. (1988). The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 29: 19-24.

Covizzi, L.G.; Giese, E.C.; Gomes, E.; Dekker, R.F.H.; Silva, R. (2007). Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Tech. Ex.** Londrina. 28 (2): 143-160.

Delagustin, M.G.; Gonçalves, E.; Carra, S.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2016). Produção e purificação de lactobionato de cálcio obtido por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC. **Anais.** 4514. Caxias do Sul, 2016.

Demoliner, M.; Oliveira, A.P.; Carra, S.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2016). Lactose, frutose e ácido lactobiônico: validação de método qualitativo e quantitativo. In: XXIII Encontro de Jovens Pesquisadores e IV Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. **Resumos.** Caxias do Sul, 2016.

Doelle, M.B.; Doelle, H.W.; Kirk, L. Crittenden, R.; Sientoh, H. (1993). *Zymomonas mobilis*: science and industrial application. **Crit. Rev. Biotechnol.** 13(1): 57-58.

- Doelle, W.; Greenfield, P.F. (1985) The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22: 405-410.
- European Pharmacopoeia Commission (2008). **European Pharmacopoeia**. 6 ed. Strasbourg: Council of Europe.
- Ferraz, H.C.; Borges, C.P.; Alves, T.L.M. (2000). Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 89: 43-53.
- Gibbs, M.; De Moss, R.D. (1954). Anaerobic dissimilation of C¹⁴ – labeled glucose on fructose by *Pseudomonas lindneri*. **J. Biol. Chem.** 207: 689-694.
- Gil, E.S. (2010). **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3.ed. São Paulo: Pharmabooks. 511 p.
- Goderska, K.; Szwengiel, A.; Czarnecki, Z. (2014). The utilization of *Pseudomonas taetrolens* to produce lactobionic acid. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 173(8): 2189-97.
- Goldstein, S.; Meyerstein, D.; Czapski, G. (1993). The Fenton reagentes. **Free Radical Biol. Med.** 15(4): 435-445.
- Gollhofer, D.; Nidetzky, B.; Fuerlinger, M.; Kulbe, K.D. (1995). Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 235-240.
- Gonçalves, E.; Delagustin, M.G.; Carra, S.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2016). Produção e purificação de lactobionato de cálcio obtido por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC. **Anais.** 4514. Caxias do Sul, 2016.

Green, B.A.; Yu, R.Y.; Van Scott, E.J. (2009). Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. **Clin. Dermatol.** 27: 495-501.

Green, B.A. (2005). After 30 years... the future of hydroxyacids. **J. Cosmet. Dermatol.** 4: 44-45.

Green, B. A.; Edison, B.L.; Wildnauer, R.H. (2006). Lactobionic acid: a bionic acid enhances skin clarity and provides skin plumping and firming effects. In: 64th Annual American Academy of Dermatology Meeting. **Anais.** San Francisco, 2006.

Grimes, P.E.; Green, B.A.; Wildnauer, R.H.; Edison, B. L. (2004). The use of polyhydroxy acids (PHAs) in photoaged skin. **Cutis.** 73(2): 3-13.

Gutierrez, L.F.; Hamoudi, S.; Belkacemi, K. (2012). Lactobionic acid: a high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **Int. Dairy. J.** 26: 103-111.

Hardman, M. J.; Scopes, R.K. (1988). The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **Eur. J. Biochem.** 173: 203-209.

Hardman, M.J.; Tsao, M.; Scopes, R.K. (1992). Changes in the fluorescence of bound nucleotide during the reaction catalyzed by glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **Eur. J. Biochem.** 205(2): 715-20.

ICH. International Conference of Harmonization Q1B. (1996). Photostability Testing of New Drug Substances and Products.

ICH. International Conference of Harmonization Q1C. (1996). Stability Testing for New Dosage Forms.

ICH. International Conference of Harmonization Q3B(R). (2003a). Impurities in new drug products (revised guideline).

ICH. International Conference of Harmonization Q1A (R2). (2003b). Guidance for Industry: Stability Testing of New Drug Substances and Products.

ICH. International Conference of Harmonization (ICH) Q6A. (2006). Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (including Decision Trees).

Jang, K.H.; Jung, S.J.; Chang, H.S.; Chun, U.H. (1996). Improvement of the process for sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilised in κ -carageenan. **Process Biochem.** 31: 485-492.

Jones, W. E.; Ho, C.Y. (2001). Novel techniques for the preparation and crystallization of 4-0-beta-d-galactopyranosyl-d-gluconic acid. **European Patent Office.** WO/2001/051498. United States

Kakde, R.B.; Satone, D.D.; Gadapayale, K.K.; Kakde, M.G. (2013). Stability indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of escitalopram oxalate and clonazepam. **J. Chromatogr. Sci.** 51:490-495.

Kim, K.H.; Park, S.S.; Adhikary, S.; Cho, J.H.; Kang, N.; Jeong, S.H. (2016). Stability of β -lapachone upon exposure to various stress conditions: resultant efficacy and cytotoxicity. **Chem. Pharm. Bull.** 64: 381–389.

Koka, R.; Mehnert, D.W.; Fritsch, R.J.; Steffan, W.; Habermeier, P.; Bradbury, A.G. W.; Pombo, A.W.; Rose, M.; Lynglev, G.B.; Hansen, H.P.H. (2002). Processo para fabricar um produto de queijo contendo ácido lactobiônico, produto de queijo, processo para fabricar um produto laticínio contendo ácido lactobiônico, queijo do processo, e, processo para preparar o queijo do processo. **Patente de Invenção.** INPI, PI0209467, Brasil.

Kommanaboyina, B.; Rhodes, C.T. (1999). Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** 25(7): 857-68.

Kornhauser, A.; Coelho, S.G.; Hearing, V.J. (2010). Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. **Clin. Cosmet. Inv. Dermatol.** 3: 135-142.

Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.M.; Merchant, R.; Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiol.** 21: 377-397.

Lee, K.Y.; Mooney, D.J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. **Prog. Polym. Sci.** 37: 106126.

Leite, E.G. (2005). Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. **Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Malvessi, E. (2008). Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. **Tese de Doutorado.** Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Malvessi, E.; Carra, S.; Pasquali, F.C.; Kern, D.B.; Silveira, M.M.; Ayub, M.A.Z. (2013). Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 40: 1-10.

Malvessi, E.; Concatto, K.; Carra, S.; Silveira, M.M. (2006). Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 49: 139-144.

- Mukherjee, R.; Yun, J.W. (2015). Lactobionic acid reduces body weight gain in diet-induced obese rats by targeted inhibition of galectin-1. **Biochem. Bioph. Res. Co.** 463: 1311-1316.
- Murakami, H.; Seko, A.; Azumi, M.; Kiso, T.; Kiryu, T.; Kitahata, S.; Shimada, Y.; Nakano, H. (2008). Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. **J. Appl. Glycosci.** 50: 117-120.
- Murakami, H.; Kawano, J.; Yoshizumi, H.; Nakano, H.; Kitahata, S. (2002). Screening of lactobionic acid producing microorganisms. **J. Appl. Glycosci.** 49: 469-477.
- Nielsen, P.M.; Hoeier, E. (2009). Food products containing aldobionic acid. **Google Patents.**
- Nishizuka, Y.; Hayaishi, O. (1962). Enzymic formation of lactobionic acid from lactose. **J. Biol. Chem.** 237: 2721-2728.
- Nordkvist, M.; Nilesen, P M.; Villadsen, J. (2007). Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnol. Bioeng.** 97: 694-707.
- Oliveira, A.P.; Demoliner, M.; Carra, S.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2016). Recuperação e purificação de lactobionato de sódio obtido por rota enzimática. In: XXIII Encontro de Jovens Pesquisadores e IV Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. **Resumos.** Caxias do Sul, 2016.
- Patel, J.A.; Panigrahi, B.; Patel, C.N.; Ramalingan, B. (2011). Stress degradation studies on citicoline sodium and development of a validated stability-indicating HPLC assay. **Chron. Young. Sci.** 2(3):150-154.

Pak, C.Y.C.; Avioli, L.V. (1988). Factors affecting absorbability of calcium from calcium salts and food. **Calcif. Tissue Int.** 43(2): 55–60.

Pedruzzi, I.; Malvessi, E.; Mata, V.G.; Silva, E.A.; Silveira, M.M.; Rodrigues, A.E. (2007). Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.** 1145: 128-132.

Pedruzzi, I. (2010). Produção biotecnológica de sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea em sistema de leito móvel simulado. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. Porto.

Pedruzzi, I.; da Silva, E.A.B.; Rodrigues, A.E. (2011). Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: a kinetic study. **Enzyme Microb. Technol.** 49: 183–191.

Rehr, B.; Wilhem, C.; Sahm, N. (1991). Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Microbiol. Biotechnol.** 35: 144-148.

Ribeiro, J.C.B.; Granato, D.; Masson, M.L.; Andriot, I.; Mosca, A.C.; Salles, C.; Guichard, E. (2016). Effect of lactobionic acid on the acidification, rheological properties and aroma release of dairy gels. **Food Chem.** 207:101–106.

Rowe, R.C.; Sheskey, P.J.; Quinn, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients.** (2009). 6. ed. Pharmaceutical Press. 917p.

Satory, M.; Fuerling, M.; Haltrich, D.; Kulbe, K.D.; Pittner, F.; Nidetzky, B. (1997). Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnol. Lett.** 19: 1205-1208.

Silveira, M.M.; Malvessi, E.; Carra, S.; Pasquali, F.C.; Polidoro, T.A. (2007). Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácidos orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos ou seus sais. **Patente de invenção**. INPI, PI 0700421-4, Brasil.

Simms, P.J.; Hicks, K.B.; Haines, R.M.; Hotchkiss Jr., A.T.; Osman, S.F. (1994). Separation of lactose, lactobionic acid and lactobionolactone by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr A**. 667:67-73.

Southard, J.D.H.; Belzer, F.O. (1995). Organ preservation. **Ann. Rev. Med.** 46: 235-247.

Sprenger, G.A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes. **FEMS Microbiol. Lett.** 145: 301-307.

Sumimoto, R.; Kamada, N. (1990). Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. **Transpl. Proc.** 22: 2198-2199.

Swings, J.; De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. **Bacteriol. Rev.** 41: 1-46.

Tasic-Kostov, M.; Savic, S.; Lukic, M.; Tamburic, S.; Pavlovic, D.; Vuleta, G. (2010). Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. **J. Cosmet. Dermatol.** 9: 3-10.

Tasic-Kostov, M.; Pavlovic, D.; Lukic, M.; Jaksic, I.; Arsic, I.; Savic, S. (2012). Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. **Int. J. Cosmetic. Sci.** 34: 424-434.

USP. United States Pharmacopoeia (2015). USP Monographs: calcium lactobionate.

- Valle, T.A.; Ruzza, Â.A.; Mastroeni, M.F.; Malvessi, E.; da Silveira, M.M.; de Souza, O.; Erzinger, G.S. (2013). Lactobionic acid produced by *Zymomonas mobilis*: Alternative to prepare targeted nanoparticles. **Pharmaceut. Anal Acta.** 4: 220-225.
- Van Scott, E.J.; Yu, R.J. (1974). Control of keratinization with alpha-hydroxy acids and related compounds. I. Topical treatment of ichthyotic disorders. **Arch. Dermatol.** 110: 586-590.
- Van Scott, E.J.; Ditre, C.M.; Yu, R.J. (1996). Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. **Clin. Dermatol.** 14: 217-220.
- Vavrusova, M.; Liang, R.; Skibsted, L.H. (2014). Thermodynamics of dissolution of calcium hydroxycarboxylates in water. **J. Agric. Food Chem.** 62: 5675-5681.
- Villa, R.; Cerroni, B.; Viganò, L.; Margheritelli, S.; Abolafio, G.; Oddo, L.; Paradossi, G.; Zaffaroni, N. (2013). Targeted doxorubicin delivery by chitosan-galactosylated modified polymer microbubbles to hepatocarcinoma cells. **Colloid. Surf. B-Biointerfaces.** 110: 434-442.
- Vignoli, J.A.; Celligoi, M.A.P.C.; Silva, R.S.F. (2006). Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. **Process Biochem.** 41: 240-243.
- Viikari, L. (1986). By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Rev. Biotechnol.** 7: 237-261.
- Yatsu, F.K.J.; Pedrazza, G.P.R.; Argenta, D.F.; Barreto, F.; Nemitz, M.C.; Teixeira, H.F.; Koester, L.S.; Bassani, V.L. (2014). A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices. **Food Anal. Methods.** 7(9): 1881-1890.

Yoshioka, S.; Stella, V.J. (2000). **Stability of drugs and dosage forms**. 1.ed. Springer-US.

Yu, R.J.; Van Scott, E.J. (2004). Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. **J. Cosmetic Dermatol.** 3: 76–87.

Walling, C. (1975). Fenton's reagent revisited. **Acc. Chem. Res.** 8(4): 125–131.

Waterman, K.C.; Adami, R.C. (2005). Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.** 293: 101–125.

Zakeri-Milani, P.; Mousavian-Fathi, N.; Ghanbarzadeh, S.; Zarrintan, M.; Valizadeh, H. (2012). Application of lactobionic acid and nonionic surfactants as solubilizing agents for parenteral formulation of clarithromycin. **Adv. Pharm. Bull.** 2(1): 37-42.

Zachariou, M.; Scopes, R.K. (1986). Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **J. Bacteriol.** 3: 863-869.

Zagonel, T.P. (2013). Obtenção de ácido lactobiônico por processo de transformação utilizando *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR.

Zhao, Q.; Chen, W.; Chen, Y.; Zhang, L.; Zhang, J.; Zhang, Z. (2011). Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. **Bioconjugate Chem.** 22: 346-352.