

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SÍNTESE BIOCATALÍTICA, RECUPERAÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
DO ÁCIDO MALTOBIÔNICO

MAICON LAMB FLORES

CAXIAS DO SUL, 2019

MAICON LAMB FLORES

**SÍNTESE BIOCATALÍTICA, RECUPERAÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
DO ÁCIDO MALTOBIÔNICO**

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

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

CAXIAS DO SUL, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

F634s Flores, Maicon Lamb

Síntese biocatalítica, recuperação e caracterização físico-química do ácido maltobiônico / Maicon Lamb Flores. – 2019.

119 f. f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Eloane Malvessi.

Coorientação: Mauricio Moura da Silveira.

1. *Zymomonas mobilis*. 2. Enzimas. 3. Biotecnologia. I. Malvessi, Eloane, orient. II. Silveira, Mauricio Moura da, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 579.84

Catálogo na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

MAICON LAMB FLORES

**SÍNTESE BIOCATALÍTICA, RECUPERAÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
DO ÁCIDO MALTOBIÔNICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04 DE ABRIL DE 2019.

Orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Prof. Dr. Ivaldo Itabaiana Junior

Profa. Dra. Michelle Frazão Muzitano

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento que financiaram a execução deste trabalho – CNPq, FAPERGS e, em especial, a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade de Caxias do Sul, por disponibilizar a estrutura física e recursos para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, prof. Dra. Eloane Malvessi por todos os ensinamentos e toda a confiança depositada e também ao meu coorientador, prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira.

Agradeço aos professores da instituição, em especial aos prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva e prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, por todo apoio, que foi essencial, durante a execução deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica, Letícia, Taiane, Luiza, Débora, Júlio e Suélen, que com muito esforço e dedicação, ajudaram na construção deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Caroline Reginatto, Caroline Rossi, Analia, Bruna, Maria Gabriele, Lenara e prof. Tomás pelas risadas e ensinamentos, em especial a Sabrina Carra por todo companheirismo e coleguismo, por participar de cada etapa deste trabalho e ser essa pessoa maravilhosa que és.

À minha família e ao meu namorado, que me aguentaram e deram todo o suporte para a realização deste trabalho.

Aos amigos que escutaram os problemas e celebraram as vitórias.

Obrigado a todos!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Claudio e Silvia, à minha irmã Bruna, ao meu namorado Thales, a todos meus amigos, colegas de trabalho e professores.

RESUMO

O ácido maltobiônico consiste em um polihidroxiácido derivado da maltose que, devido ao seu poder umectante e atividade antioxidante, vem sendo usado, em maior proporção, em formulações de produtos com finalidade cosmetológica e dermatológica. O ácido maltobiônico é obtido em associação com sorbitol via ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) presente em células da bactéria *Zymomonas mobilis*. Neste trabalho foi avaliada a produção de ácido maltobiônico e sais – maltobionato, a partir de maltose e xarope de maltose, frente à concentração de substratos e diferentes valores de pH e de temperatura da reação enzimática. Tendo em vista a potencialidade de aplicações, foram realizadas as etapas de purificação e de caracterização físico-química dos referidos compostos. Na produção de ácido maltobiônico com o uso de xarope de maltose (700 mmol/L), valores superiores de concentração final de produto, produtividade e de máxima velocidade específica de formação de produto foram atingidas a 39 °C e pH 6,4, de 615 mmol/L, 5,62 mmol/h e 2,17 mmol/h/g, respectivamente. Utilizando maltose purificada, a concentração final de produto, a produtividade e a máxima velocidade específica de formação de produto foram superiores com o uso de 1000 mmol/L de substrato (868 mmol/L, 8,25 mmol/h, 5,24 mmol/h/g, respectivamente) quando comparados com 700 e 1500 mmol/L (618 mmol/L, 5,67 mmol/h, 4,06 mmol/h/g e 1131 mmol/L, 3,77 mmol/h, 1,73 mmol/h/g, respectivamente). Com relação à purificação, tanto com o uso de metanol ou etanol 80% (v/v), a 22 ± 2 °C, elevado grau de pureza dos sais de maltobionato foi atingido (~98%). Considerando a caracterização do ácido maltobiônico e seus sais, foram obtidos os dados sobre a estrutura molecular, análises térmicas, solubilidade, constante de dissociação ácida, ponto de fusão e poder rotatório específico. De forma geral, neste trabalho foi demonstrada a obtenção de alto rendimento em produtos - ácido maltobiônico e sais - via

ação de GFOR/GL de *Z. mobilis*, a purificação e a caracterização dos produtos formados, com contribuições importantes considerando a potencialidade de aplicação destes compostos e as reduzidas informações abordadas na literatura especializada.

ABSTRACT

Maltobionic acid consists in a polyhydroxy acid derived from maltose. Due to its humectant power and antioxidant activity, has been used to a greater extent in formulations of products with cosmetological and dermatological purposes. Maltobionic acid is obtained in association with sorbitol by the action of glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- δ -lactonase (GL) enzymatic complex present in *Zymomonas mobilis* bacteria cells. In this work the production of maltobionic acid and respective salts – maltobionate - from maltose and maltose syrup, was evaluated in relation to substrate concentration and with respect to pH and temperature of the enzymatic reaction. In view of the potential applications, the purification and physicochemical characterization of these compounds were carried out. In maltobionic acid production using 700 mmol/L of maltose syrup, higher values of productivity and maximum specific production rate were reached at 39 °C and pH 6.4 (5.62 mmol/h and 2.17 mmol/h/g, respectively). Using 1000 mmol/L of purified maltose, productivity and maximum specific production rate were superior (8.25 mmol/h and 5.24 mmol/h/g) when compared to utilization of 700 and 1500 mmol/L of maltose (5.67 mmol/h, 4.06 mmol/h/g and 3.77 mmol/h, 1.73 mmol/h/g, respectively). Regarding purification, using methanol or ethanol 80% (v/v) at 22 ± 2 °C, high purity of the maltobionate salts (~98%) was achieved. Considering the characterization of maltobionic acid and its salts, information of molecular structure, thermal analyzes, solubility, acid dissociation constant, melting point and specific rotational power were obtained. In general, this work demonstrated the high yield of products - maltobionic acid and salts – obtained in enzymatic reaction catalyzed by GFOR/GL and relevant data of products purification and characterization. These results are important considering the potentiality of application of these compounds and the reduced information addressed in the specialized literature.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura molecular do ácido maltobiônico (Fonte: o autor).....4
- Figura 2 - Conversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, via ação catalítica de glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e gliconolactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* (adaptado de Zachariou & Scopes, 1986).....10
- Figura 3 - Esquema das reações de obtenção de ácidos orgânicos via complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e gliconolactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* (adaptado de He et al., 2014).....11
- Figura 4 - Esquema representativo do processo de síntese do ácido maltobiônico e sorbitol por enzimas imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, recuperação e caracterização dos produtos.....19
- Figura 5 - Sistema da bioconversão utilizando hidróxido de cálcio para o controle de pH. (1) reator enzimático; (2) controlador de pH; (3) sonda de pH; (4) motor de passo com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 95%; (5) balança; (6) controlador de temperatura; (7) agitador magnético.....22
- Figura 6 - Sistema da bioconversão utilizando hidróxido de sódio para o controle de pH. (1) reator enzimático; (2) controlador de pH; (3) sonda de pH; (4) bureta com NaOH 7 mol/L; (5) bomba peristáltica; (6) controlador de temperatura; (7) agitador magnético.....22
- Figura 7 - Perfil da separação cromatográfica do xarope de maltose. (1) maltodextrina; (2) maltotriose; (3) maltose; (4) glicose. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C.....37
- Figura 8 - Perfil da separação cromatográfica da bioconversão de xarope de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente. (1) maltodextrina; (2) maltotriose; (3) maltose; (4) ácido maltobiônico; (5) frutose; (6) sorbitol. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C. 40
- Figura 9 - Ácido maltobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes concentrações de xarope de maltose (■) 300 mmol/L (●) 400 mmol/L (▲) 500 mmol/L (◆) 600 mmol/L (◄) 700 mmol/L (pH 6,4; 39°C; X = 20 g/L)42
- Figura 10 - Ácido maltobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes temperaturas de processo (■) 32°C (●) 36°C (▲) 39°C (◆) 45°C (◄) 50°C (pH 6,4; $S_0 = 700$ mmol/L; X = 20 g/L).....45

- Figura 11 - Ácido maltobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes valores de pH no processo (■) 5,5 (●) 6,0 (▲) 6,4 (◄) 7,0 (◆) 7,5 (39°C; X = 20 g/L; S₀= 700 mmol/L).47
- Figura 12 - Maltobionato de cálcio formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes concentrações de maltose e frutose (pH 6,4; 39°C; X = 20 g/L) Concentração de substrato inicial (■) 700 (●) 1000 (▲) 1500 mmol/L.51
- Figura 13 - Maltobionato de sódio formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes concentrações de maltose e frutose (pH 6,4; 39°C; X = 20 g/L) Concentração de substrato inicial (■) 700 (●) 1000 (▲) 1500 mmol/L51
- Figura 14 - Velocidade específica de formação de maltobionato de cálcio [A] e maltobionato de sódio [B] em função da concentração de maltose usada na bioconversão (—) 700 mmol/L; (···) 1000 mmol/L; (---) 1500 mmol/L (pH 6,4; 39°C; X = 20 g/L).54
- Figura 15 - Perfil da separação cromatográfica do sal do ácido maltobiônico e sorbitol obtidos após uma precipitação utilizando etanol 90% (v/v) [A] ou metanol 90% (v/v) [B] em relação ao caldo de bioconversão contendo maltobionato de cálcio [C]. (1) sal do ácido maltobiônico; (2) sorbitol. (Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C).57
- Figura 16 - Perfil da separação cromatográfica do maltobionato de cálcio [A] e maltobionato de sódio [B] depois de três precipitações consecutivas utilizando metanol 80%, a 22°C ± 2°C. (1) sal do ácido maltobiônico; (2) sorbitol. (Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C).63
- Figura 17 - Variação do pH em função da quantidade de resina catiônica a base de hidrogênio usada para a conversão de maltobionato de sódio ou de cálcio para ácido maltobiônico. (■) pontos experimentais; (—) ajuste sigmoidal.....64
- Figura 18 - Perfil da separação cromatográfica de amostras de ácido maltobiônico secas por *spray dryer* na presença dos adjuvantes (—) maltodextrina, (···) maltose e (---) lactose. (1) maltodextrina; (2) ácido maltobiônico; (3) lactose e maltose. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C. 66
- Figura 19 - Perfil da separação cromatográfica da amostra de (1) ácido maltobiônico seca por liofilização. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C.67

Figura 20 - Resultados dos testes de higroscopicidade para as amostras de ácido maltobiônico + 1% maltodextrina (1); ácido maltobiônico + 1% lactose (2); ácido maltobiônico + 1% maltose (3); ácido maltobiônico (4); maltobionato de cálcio (5). Barras de cor laranja, compostos secos por <i>spray dryer</i> ; cor roxa, por liofilização; cor verde, por estufa.	68
Figura 21 - Perfil da separação cromatográfica obtida por CLAE da amostra da solução padrão. Ácido maltobiônico (1); maltose (2); frutose (3); sorbitol (4). Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H ₂ SO ₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C, volume da amostra injetado, 5 µL, detector de índice de refração.	70
Figura 22 - Perfil do espectrograma de infravermelho FTIR para amostra de ácido maltobiônico.	82
Figura 23 - Perfil do espectrograma de infravermelho FTIR para amostra de maltobionato de cálcio (A) e maltobionato de sódio (B) obtidos na bioconversão de maltose purificada e maltobionato de cálcio (C) e maltobionato de sódio (D) obtidos na bioconversão de xarope de maltose.	83
Figura 24 - Curva de TG/DTG para o ácido maltobiônico obtido na bioconversão de maltose purificada. (—) TG (···) DTG.	84
Figura 25 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de cálcio obtido na bioconversão de maltose purificada. (—) TG (···) DTG.	86
Figura 26 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de sódio resultante da bioconversão utilizando maltose purificada. (—) TG (···) DTG.	87
Figura 27 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de cálcio resultante da bioconversão utilizando de xarope de maltose. (—) TG (···) DTG.	88
Figura 28 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de sódio obtido na bioconversão de xarope de maltose. (—) TG (···) DTG.	90
Figura 29 - Curva de DSC para a amostra de ácido maltobiônico.	92
Figura 30 - Curva de DSC para as amostras de maltobionato de cálcio (A), maltobionato de sódio (B), obtidos com o uso de maltose e de maltobionato de cálcio (C) e maltobionato de sódio (D) obtidos na bioconversão de xarope de maltose.	93
Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRMS-QToF-ESI+) para a amostra de ácido maltobiônico (A). Expansão do espectro em <i>m/z</i> 381 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).	96
Figura 32 - Espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRMS-QToF-ESI-)	

para a amostra de ácido maltobiônico (A). Expansão do espectro em m/z 357 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).	97
Figura 33 - Espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRMS-QToF-ESI+) para a amostra de maltobiônato de sódio (A). Expansão do espectro em m/z 381 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).	98
Figura 34 - Espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRMS-QToF-ESI-) para a amostra de maltobiônato de sódio (A). Expansão do espectro em m/z 357 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).	99
Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRMS-QToF-ESI+) para a amostra de maltobiônato de cálcio (A). Expansão do espectro em m/z 397 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).	100
Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRMS-QToF-ESI-) para a amostra de maltobiônato de cálcio (A). Expansão do espectro em m/z 357 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).	101
Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 300 MHz) do lactobionato de cálcio.	103
Figura 38 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do lactobionato de cálcio. No espectro foram observados todos os 12 sinais referentes aos 24 carbonos presentes na molécula.....	104

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1	Ácido maltobiônico	4
2.2	Produção de ácido maltobiônico	6
2.3	Aspectos gerais da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	8
2.3.1	Características do complexo enzimático GFOR/GL	9
2.3.2	Ácidos orgânicos de <i>Zymomonas mobilis</i>	11
2.3.3	Maltose e xarope de maltose empregados como substratos	14
2.4	Recuperação dos ácidos aldônicos e sorbitol	15
2.5	Caracterização físico-química do ácido maltobiônico	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Microrganismo	19
3.2	Meio de cultivo.....	20
3.3	Produção de células/enzimas e etanol	20
3.4	Imobilização celular	21
3.5	Ensaio de bioconversão	21
3.6	Recuperação dos produtos da bioconversão.....	24
3.7	Conversão dos sais de maltobionato à ácido maltobiônico.....	25
3.8	Secagem do ácido maltobiônico em diferentes condições	25
3.9	Parâmetros de análise do processo de bioconversão	26
3.10	Métodos analíticos.....	30
3.10.1	Determinação da atividade enzimática de GFOR/GL.....	30
3.10.2	Quantificação de substratos e produtos da bioconversão e validação do método analítico	30
3.11	Avaliação das características físico-químicas do ácido maltobiônico e sais	31
3.11.1	Determinação da solubilidade	32
3.11.2	Determinação de pK_a	32
3.11.3	Determinação do ponto de fusão	33
3.11.4	Determinação do poder rotatório específico	33
3.11.5	Caracterização estrutural	34
3.11.6	Caracterização por análises térmicas.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Bioprodução de ácido maltobiônico: uso de xarope de maltose e efeitos de pH e temperatura	37

4.1.1	Caracterização prévia do xarope de maltose	37
4.1.2	Ensaio de bioconversão com alteração na concentração de xarope de maltose, temperatura e pH de processo.....	41
4.2	Ensaio de bioconversão de maltose em maltobionato de sódio e de cálcio.....	49
4.3	Purificação do maltobionato de sódio e maltobionato de cálcio	55
4.4	Troca iônica para obtenção do ácido maltobiônico	64
4.5	Secagem do ácido maltobiônico.....	65
4.6	Caracterização do ácido maltobiônico e seus sais.....	69
4.6.1	Validação do método de quantificação dos substratos e produtos da bioconversão ..	68
4.6.2	Determinação do pK_a do ácido maltobiônico	76
4.6.3	Determinação da solubilidade	78
4.6.4	Determinação do poder rotatório específico	79
4.6.5	Determinação do ponto de fusão	80
4.6.6	Caracterização estrutural	81
4.6.7	Caracterização por análises térmicas (TG/DTG)	84
4.6.8	Caracterização por análises térmicas (DSC)	91
4.6.9	Caracterização estrutural	95
5	CONCLUSÕES	105
6	PERSPECTIVAS	1057
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	1088

1 INTRODUÇÃO

O ácido maltobiônico faz parte do grupo dos polihidroxi ácidos (PHA), ácidos orgânicos que possuem diversas hidroxilas em sua estrutura. São comumente utilizados em formulações cosméticas, com outras potenciais aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Entre as características do ácido maltobiônico, pode-se destacar a atividade antioxidante, o poder umectante, a capacidade de complexação com íons metálicos, entre outras.

São escassos os estudos de produção do ácido maltobiônico, com exceção a alguns processos patenteados ou relatos na literatura especializada, sendo, em geral, via oxidação química. São ainda mais raros os estudos que abordam a produção por rota biotecnológica, onde, destaca-se a utilização da bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis*. Esta, por sua vez, tem despertado interesse tecnológico em função da obtenção de etanol e gás carbônico a partir de açúcares como glicose, sacarose e frutose. Como resultado do catabolismo destes açúcares, além dos produtos citados, são obtidas as enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL). Este complexo enzimático atua na oxidação de diferentes aldoses em seus respectivos ácidos orgânicos e a concomitante redução de frutose a sorbitol.

A alta afinidade do complexo enzimático GFOR/GL pelo par de substratos glicose e frutose é descrita na literatura. A obtenção do ácido maltobiônico a partir de maltose é favorecida, possivelmente, por este substrato ser constituído de duas moléculas de glicose, substrato preferencial de GFOR. Como alternativa à maltose purificada, mesmo considerando o menor percentual de maltose, os xaropes comerciais podem ser aplicáveis como substratos no processo de conversão.

Nos ensaios de bioprodução de ácido maltobiônico e sais orgânicos do ácido maltobiônico (ou maltobionato) pode ser usado o complexo GFOR/GL contido em células

livres (na suspensão) ou imobilizado em suportes orgânicos, como o alginato de sódio. A imobilização agrega vantagens ao sistema, como o aumento da estabilidade do complexo enzimático durante a bioconversão, a possibilidade de reuso do biocatalisador e a facilidade de separação dos produtos do meio reacional.

Para a recuperação dos sais de ácido maltobiônico do meio reacional - no qual são identificadas concentrações residuais dos substratos maltose e frutose -, além do sorbitol, são aplicadas técnicas de separação, as quais são baseadas, principalmente, no uso de solventes orgânicos, com o intuito de obtenção do produto com alto grau de pureza. Ainda, considerando o fato de o ácido maltobiônico e seus sais serem compostos pouco explorados e com potencialidade de aplicações na área farmacêutica e de alimentos, a caracterização físico-química torna-se imprescindível.

Em estudos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos, no contexto da produção e recuperação de ácidos orgânicos e sorbitol, duas patentes de invenção foram depositadas envolvendo a utilização do complexo enzimático GFOR/GL. Neste trabalho, em particular, são propostas estratégias para potencializar a ação do complexo GFOR/GL na produção de ácido maltobiônico e sorbitol, de recuperação dos produtos e, com a finalidade de agregar informações técnicas referentes ao produto formado, a realização de estudos avançados de caracterização físico-química.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação catalítica do complexo enzimático GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* para a obtenção de ácido maltobiônico e sais (maltobionato) e realizar as etapas de purificação e posterior caracterização físico-química destes compostos.

Como objetivos específicos propostos neste trabalho, citam-se:

. comparar a ação catalítica do complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio frente ao uso de maltose purificada e xarope comercial (42% de maltose) na produção de ácido maltobiônico;

. avaliar a influência de variáveis como a concentração de xarope de maltose, pH e temperatura na formação de ácido maltobiônico, no sistema enzimático GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio;

. avaliar a influência da concentração de maltose purificada na formação dos sais orgânicos do ácido maltobiônico (maltobionato);

. avaliar o efeito do uso do metanol e etanol - em diferentes concentrações -, e da temperatura na recuperação dos sais do ácido maltobiônico e dos demais compostos presentes no caldo de bioconversão;

. validar a metodologia de quantificação simultânea de ácido maltobiônico e seus sais, maltose, frutose e sorbitol por cromatografia líquida de alta eficiência;

. caracterizar físico-quimicamente os compostos ácido maltobiônico e seus sais de sódio e cálcio, quanto à pureza, fórmula estrutural e massa molecular, número de átomos de carbono e hidrogênio, análises térmicas, solubilidade, pK_a , poder rotatório e ponto de fusão.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ácido maltobiônico

O ácido maltobiônico integra o grupo da terceira geração dos hidroxiácidos, no grupo dos ácidos biônicos, assim conhecidos por serem formados pela combinação de um açúcar com uma molécula de ácido glicônico (Figura 1).

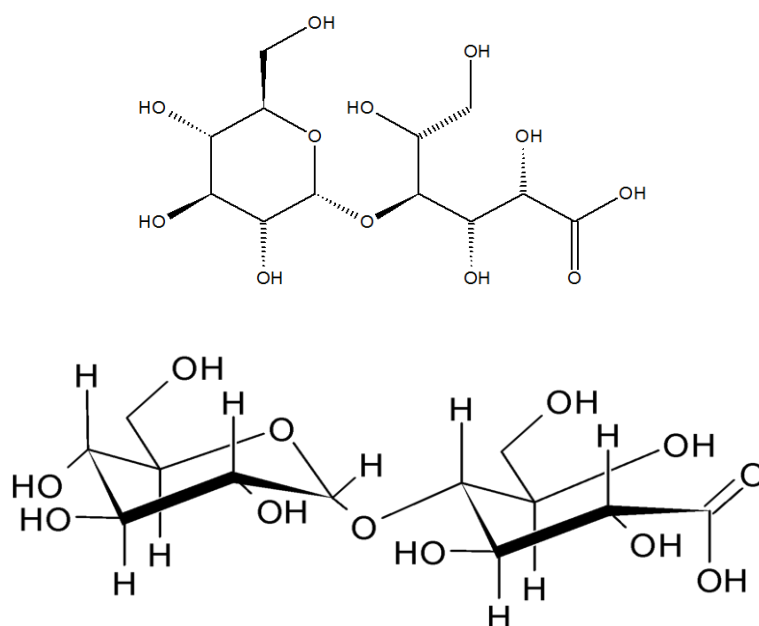


Figura 1 - Estrutura molecular (conformação plana e em cadeira) do ácido maltobiônico (Fonte: o autor).

O ácido maltobiônico também pode ser considerado um ácido orgânico, carboxílico ou polihidroxiácido, sendo este designado por possuir diversas hidroxilas em sua estrutura (Neostrata, 2010). Designado pela IUPAC com o nome de ácido 4-*O*- α -D-glicopiranosil-D-glicônico, tem similaridade a compostos como o ácido celobiônico (ácido 4-*O*- β -D-glicopiranosil-D-glicônico) e ácido lactobiônico (ácido 4-*O*- β -D-galactopiranosil-D-glicônico), porém com propriedades físico-químicas diferentes (FoodB, 2019; ChemSpider, 2019). Na Tabela 1, são apresentadas as propriedades do ácido maltobiônico reportadas na

literatura ou em banco de dados especializados na área de alimentos, cosméticos e fármacos. Cabe ressaltar que os valores encontrados nos bancos de dados são preditos, sendo gerados por softwares de predição de propriedades físico-químicas.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido maltobiônico

Nome (IUPAC) ^{1,2}	4- <i>O</i> - α -D-Glucopyranosyl-D-gluconic acid (<i>inglês</i>) Ácido 4- <i>O</i> - α -D-glicopiranosil-D-glicônico (<i>português</i>)
Fórmula molecular ^{1,2}	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂
Massa molar ^{1,2}	358,3 g/mol
Aparência ¹	Pó branco
Ponto de fusão ²	272,42 °C
Solubilidade ^{1,2}	Solúvel em água (207 g/L) Não solúvel em etanol e metanol
pK _a ¹	3,26
Poder rotatório ¹	+98,3°
Densidade ²	1,8 g/cm ³
Ponto de ebulição ²	864 °C a 760 mmHg

Referências: (1FoodB, 2019; 2ChemSpider, 2019)

A principal aplicação do ácido maltobiônico tem sido em formulações cosméticas em função de seu elevado poder umectante – devido à presença dos grupos hidroxila na molécula-, com maior capacidade de retenção de água do que o ácido lactobiônico e outros agentes hidratantes tradicionais. O ácido maltobiônico apresenta, ainda, a capacidade de atuar como antioxidante eficiente, preservando o colágeno e protegendo as células epiteliais da ação do estresse oxidativo (Brouda et al., 2010). Neste sentido, uma linha de produtos cosméticos tem sido comercializada pela empresa americana Neostrata Company® (Linha

Exuviance), que tem adotado o ácido maltobiônico como princípio ativo na formulação de produtos de uso tópico.

O ácido maltobiônico tem aplicação na indústria de alimentos, na formulação de alimentos e bebidas, possuindo a capacidade de incorporar e conferir viscosidade aos alimentos, além de ter gosto acidificado e açucarado (Miyake & Sato, 1975).

Na indústria farmacêutica, o ácido maltobiônico e seus sais podem ser aplicados no fortalecimento da estrutura óssea, pois agem como facilitadores na deposição de minerais, possuindo alta solubilidade quando em sua forma de sal, quando comparado a outros fármacos a base de cálcio, como o carbonato de cálcio (Hayakawa et al., 2016). Além disto, este ácido possui fácil complexação com ferro, que pode ser utilizado em formulações para fármacos no tratamento de pacientes em estado anêmico (Modena et al., 2013).

2.2 Produção do ácido maltobiônico

Os mecanismos envolvendo agentes químicos ou processos eletroquímicos e catalíticos para a produção de ácido maltobiônico apresentam algumas desvantagens. Existem dificuldades relacionadas ao tratamento dos produtos e reagentes, além de problemas ambientais devido ao descarte dos agentes catalisadores químicos. Ainda, estes tipos de processos, requerem, geralmente, temperatura e pressões extremas de reação, o que acaba impactando no custo de produção (Isbell e Schaffer, 1957; Yu e Van Scott, 2001; Mirescu e Prube, 2007).

Fuertes e Fleche (1991) relatam o processo patenteado de utilização do carbonato de paládio e bismuto como catalisador, em reação conduzida na presença de oxigênio para a oxidação de maltose em maltobionato de sódio, obtendo valores na ordem de 97% de rendimento.

Não há relatos na literatura especializada referente à produção do ácido maltobiônico em escala industrial. Da mesma forma, são raros os estudos que abordam a sua produção por rota biotecnológica, sendo a sua maioria na forma de patentes de invenção.

Miyake & Sato (1975) relataram a obtenção de ácidos aldônicos, entre estes, ácido maltobiônico, com o emprego de *Pseudomonas graveolens* em soluções contendo fosfato de cálcio e maltose. O ácido maltobiônico foi purificado por filtração para remover o cálcio, seguido do emprego de carvão ativado e resina de troca iônica com HCl concentrado. A conversão de maltose em ácido maltobiônico foi na ordem de 95%.

Nielsen (2008) evidencia a produção de maltobionato a partir da maltose presente em alimentos ricos em amido, utilizando enzimas produzidas pelo microrganismo *Microdochium nivale*. Conforme abordado na referida patente de invenção, o maltobionato resultante do metabolismo microbiano foi avaliado pelo efeito como antioxidante diretamente no preparo de alimentos.

Na patente depositada por Meiberg, Bruinenberg e Sloots (1990), são apresentados dados relativos ao processo de bioprodução de maltobionato de sódio e lactobionato de sódio a partir de *Pseudomonas cepacia*. No processo descrito pelos autores, são utilizados como substratos maltose e lactose purificadas, em reações conduzidas por até 72 horas, pH 7,0, controlado com a adição de NaOH, chegando a conversões na ordem de 72% para a produção de maltobionato de sódio e 85% para a produção de ácido lactobiônico.

Para a produção do maltobionato de eritromicina, Dutta e Basu (1979) utilizaram uma solução de maltobionato de lítio, a qual foi produzida a partir da eletrólise de maltose, carbonato de lítio e brometo de lítio, utilizando eletrodos de grafite (1 ampere) por 30 horas de reação. Posteriormente, a solução foi filtrada, concentrada a baixa pressão e o maltobionato de lítio foi precipitado usando álcool isopropílico como solvente. O precipitado foi então solubilizado em água, clarificado com carvão ativado e novamente

precipitado com o mesmo solvente, sendo atingido rendimento final de 85%. Após a produção do maltobionato de lítio, foi feita a reação com o fármaco de eritromicina para a formulação do referido composto.

Considerando a rota enzimática, estudos de Malvessi (2008) e Garin (2016) relatam a obtenção equimolar de ácido maltobiônico e sorbitol pela ação de glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), complexo enzimático obtido via fermentação de glicose por *Zymomonas mobilis*. Segundo os autores, conversão de maltose a ácido maltobiônico superior a 90% é obtida em cerca de 24 horas de processo.

2.3 Aspectos gerais da bactéria *Zymomonas mobilis*

A bactéria *Z. mobilis* desperta grande interesse tecnológico pela possibilidade de produzir etanol via a rota metabólica de Entner-Doudoroff, utilizando glicose como fonte de carbono na fermentação (Viikari, 1988; Doelle et al., 1993). Quando comparado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Escherichia coli*, *Z. mobilis* tem como vantagem a capacidade de metabolizar açúcares em altas concentrações, devido à característica osmotolerante. *Z. mobilis* converte apenas os açúcares glicose, frutose e sacarose, apresentando alta tolerância em elevadas concentrações de açúcar e etanol (Viikari, 1986; Sprenger, 1996). Além dos produtos etanol e CO₂, durante o crescimento microbiano há formação do complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidoreductase (GFOR)/glicono- δ -lactonase (GL), induzido por glicose (Zachariou & Scopes, 1986). Estas características fazem com que exista grande interesse pela utilização desse microrganismo em reações de biotransformação para a formação de compostos com maior valor agregado e de uma forma sustentável (He et al., 2014).

Partindo do pressuposto da sustentabilidade, em 2013 foi publicada, pelo Departamento de Energia dos EUA (DOE), uma listagem relativa à obtenção de compostos químicos de alto valor agregado a partir da biomassa. Entre estes, destacam-se ácidos orgânicos como succínico, fumárico, málico, aspártico, glutâmico, itacônico, levulínico, além da 3-hidroxi-butirilactona, glicerol, sorbitol e xilitol (He et al., 2014). O sorbitol, um dos compostos listados, pode, de forma alternativa, ser obtido via ação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, ainda, em associação à formação de outros ácidos aldônicos (Silveira & Jonas, 2002; Jonas & Silveira, 2004; Malvessi, 2008; Malvessi et al., 2013).

2.3.1 Características do complexo enzimático GFOR/GL

O mecanismo de oxidorredução das enzimas GFOR/GL de *Z. mobilis* foi inicialmente descrito por Zachariou & Scopes (1986), sendo o par glicose/frutose destacado como substratos preferenciais na reação. Por meio da enzima GFOR, *Z. mobilis* é capaz de, ao reduzir a coenzima NADP, promover a oxidação de glicose em glicono- δ -lactona. Com a oxidação da NADPH, ocorre a redução da frutose a sorbitol, seguida da reoxidação da coenzima. Na sequência, GL hidrolisa a glicono- δ -lactona em seu sal correspondente. A estrutura de GFOR comporta o cofator NADP fortemente ligado à estrutura proteica da enzima, tornando-a ativa independente da condição vital da célula e da improvável dissociação (Hardman & Scopes, 1988; Pedruzzi et al., 2011). Logo, para que GFOR/GL atue sobre os substratos, não é necessário que as células de *Z. mobilis* estejam viáveis (Canilha, 2006; Fernandes et al., 2010; Carra, 2012).

As reações de redução e oxidação da coenzima NADP acontecem no clássico mecanismo “ping-pong” em que um substrato sofre oxidação e o outro sofre redução a fim

de se manter o ciclo da coenzima ativo (Figura 2). Assim, quantidades equimolares dos produtos são formadas (Zachariou & Scopes, 1986; Hardman & Scopes, 1988; Satory et al., 1997).

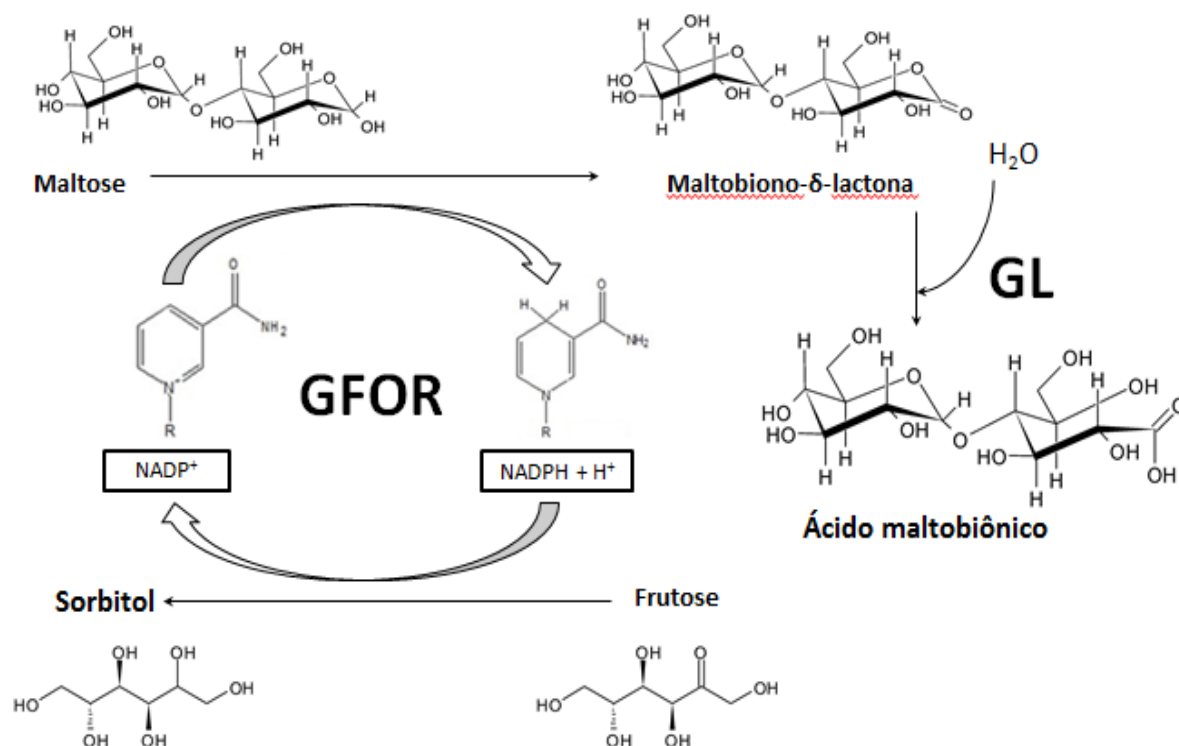


Figura 2 - Conversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, via ação catalítica de glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e gliconolactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* (adaptado de Zachariou & Scopes, 1986).

Zachariou e Scopes (1986) e Satory *et al.* (1997) mostraram que o complexo enzimático GFOR/GL tem a capacidade de oxidar, além da glicose, outras aldoses (xilose, galactose, arabinose, manose, maltose, celobiose e lactose), na presença de frutose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos. Além da formação do ácido aldônico, ocorre a formação, em base equimolar, de sorbitol, resultante da redução da frutose (Malvessi, 2008; Carra 2012; Garin, 2016; Delagustin et al., 2017).

2.3.2 Ácidos orgânicos de *Zymomonas mobilis*

A potencialidade de ação do complexo enzimático GFOR/GL frente às diferentes aldoses tem sido explorada, tendo em vista a síntese de compostos de interesse industrial, como os ácidos glicônico, lactobiônico, xilônico, maltobiônico, entre outros (Figura 3).

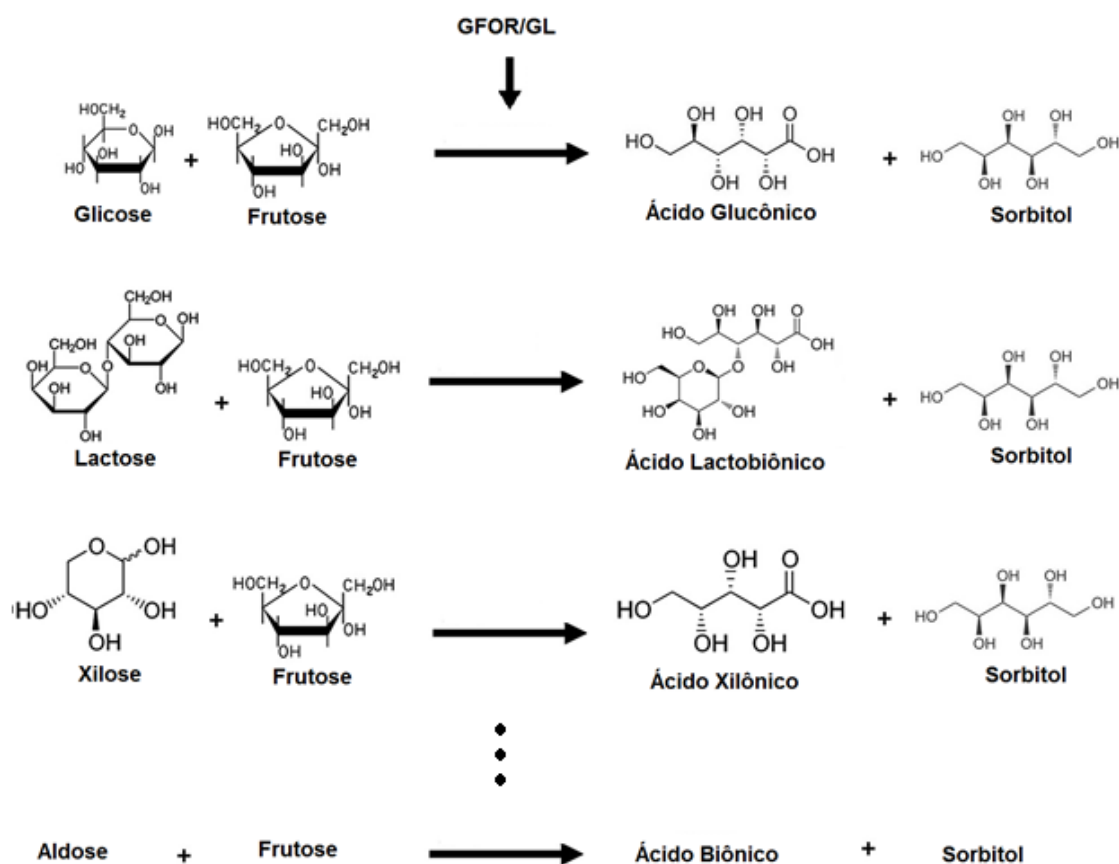


Figura 3 - Esquema das reações de obtenção de ácidos orgânicos via complexo enzimático glicose-frutose oxidorredutase (GFOR) e gliconolactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* (adaptado de He et al., 2014).

A atividade catalítica de GFOR/GL frente a outros substratos foi também abordada por Malvessi (2008), Carra (2012), Malvessi et al. (2013), Garin (2016) e Delagustin et al. (2017), com maior ênfase na bioprodução do ácido lactobiônico, composto com aplicações voltadas à área médica e farmacêutica (Alonso et al., 2013; Gutiérrez et al., 2012).

Conforme relatado em Malvessi et al. (2013), a formação dos produtos depende diretamente da atividade do complexo enzimático de *Z. mobilis* e dos parâmetros do processo de bioconversão - pH, temperatura, concentração de substrato-, os quais podem promover o máximo desempenho do biocatalisador na reação.

Nos trabalhos envolvendo a formação de ácido lactobiônico a partir de lactose, valores médios de conversão entre 60 e 80% são relatados. Carra (2012), na avaliação dos parâmetros cinéticos relativos à ação de GFOR/GL em lactose e frutose, visando à produção de ácido lactobiônico e sorbitol, relata a obtenção de valores de K_L e K_F de 0,39 e 0,005 mol/L (constante de Michaelis-Menten para substrato lactose e frutose, respectivamente) e V_{max} (velocidade máxima) de 7,69 U/g. Quanto ao uso do sistema enzimático imobilizado em alginato de cálcio, com o mesmo propósito de obtenção de ácido lactobiônico, o autor constata a utilização do biocatalisador por nove ciclos consecutivos de 24 horas de processo, comprovando a estabilidade do complexo e preservação da atividade do biocatalisador armazenado por 15 dias em solução tampão pH 6,4.

Delagustin et al. (2017), na avaliação da produção dos diferentes sais de ácido lactobiônico, relatam valores de conversão de lactose para lactobionato de cálcio, de potássio e de sódio de 84, 77 e 74%, respectivamente. Neste caso, as bases utilizadas para o controle do pH da reação enzimática foram determinantes para a formação do respectivo sal do ácido lactobiônico (lactobionato).

Zhang et al. (2017) estudaram a produção de ácido xilônico a partir do fermentado celulósico de etanol. A produção do fermentado foi realizada com *S. cerevisiae*, utilizando palha seca de milho (celulose, hemicelulose e lignina) como substrato, obtendo-se concentração de 59,80 g/L de etanol. Posteriormente, o fermentado foi destilado para a separação do etanol e de xilose. O ácido xilônico foi obtido pela oxidação da xilose

catalisada pelo microrganismo *Gluconobater oxydans*, sendo obtido concentração na ordem de 66,4 g/L, com total conversão da xilose a ácido xilônico.

Malvessi (2008) e Garin (2016) estudaram a conversão da maltose em ácido maltobiônico pela ação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, obtendo-se valores de conversão superiores a 90%. A maltose tem alta afinidade por GFOR, entretanto, inferior à obtida com o uso de glicose. Garin (2016), em ensaios enzimáticos utilizando maltose e frutose, relata a obtenção de K_M e K_F de 0,19 e 0,22 mol/L (constante de Michaelis-Menten para substrato maltose e frutose, respectivamente) e V_{max} de 25 U/g. Desta forma, os parâmetros de processo avaliados por Garin (2016) para a produção de ácido maltobiônico são superiores aos observados para a produção de ácido lactobiônico (Carra, 2012), caracterizado pela menor afinidade de GFOR por lactose, o que justificaria a avaliação de estratégias de produção de ácido maltobiônico por GFOR/GL e os estudos de recuperação e caracterização do composto, escassos na literatura.

2.3.3 Imobilização celular de *Zymomonas mobilis*

A imobilização de biocatalisadores consiste na técnica de encapsulamento de células ou enzimas em suportes orgânicos, impossibilitando que as mesmas solubilizem na fase líquida contendo os substratos e produtos (Kourkoutas et al., 2004).

Esta técnica possui diversas vantagens, frente à utilização de células ou enzimas livres, uma vez que aumenta a estabilidade do sistema de bioconversão, além de facilitar a remoção do biocatalisador do meio reacional (Kourkoutas et al., 2004; Vujcic et al., 2010). Outra vantagem é a possibilidade de reuso deste biocatalisador imobilizado em diversas bateladas de bioconversão, sem grandes perdas na atividade da enzima (Carra et al., 2015). Entre as desvantagens, podem ser citadas a possível perda na atividade da enzima e

problemas referentes a difusão de substratos e produtos através do suporte orgânico (Zanin & Moraes, 2004).

Para a imobilização celular de *Z. mobilis*, são relatadas na literatura a utilização de diferentes suportes orgânicos, como o alginato de sódio, k-carragena e ainda polímeros (Bertasso et al., 1996; Ferraz et al., 2000; Malvessi et al., 2010).

2.3.4 Maltose e xarope de maltose empregados como substratos

A maltose é um dissacarídeo redutor composto por duas moléculas de glicose, sintetizada naturalmente em grãos em germinação, sendo encontrada principalmente no malte ou, ainda, obtida pela hidrólise do amido. É o elemento estrutural básico da composição do amido, a principal fonte de armazenamento de carboidratos em células vegetais (Bobbio & Bobbio, 1992).

De acordo com Nigam & Singh (1995), a rota para a obtenção da maltose consiste na hidrólise ácida do amido, porém o processo utilizando rota biotecnológica apresenta vantagens em relação à utilização de catalisador químico. Uma delas é o fato de que a síntese enzimática resulta em xaropes com propriedades químicas e físicas bem definidas devido à especificidade da enzima; a outra é a condução do processo, o qual ocorre em condições mais amenas. As vantagens da produção de xarope de maltose por hidrólise enzimática são descritas por diversos autores, sendo caracterizada como a rota de obtenção mais indicada (Armbruster & Jacaway, 1970; Antrim & Lee, 2001; Furlan et al., 2014).

Antrim & Lee (2001) relatam a obtenção de xaropes ricos em maltose a partir da reação de hidrólise enzimática utilizando β -amilases, em condições específicas para a ação catalítica da enzima. Para a purificação dos produtos, foi necessária uma etapa de

ultrafiltração, na qual foi possível a obtenção de xaropes com concentrações de maltose entre 80 e 85%.

Furlan et al. (2014) relatam a hidrólise enzimática em várias etapas, sendo utilizado além de beta-amilase, as enzimas pululanase, iso-amilase e alfa-amilase. A produção do xarope com alta concentração de maltose foi realizada utilizando amido de trigo como substrato. A quantidade de maltose determinada nesse xarope foi superior a 85%.

A hidrólise enzimática de amido é processada utilizando o milho como principal fonte de carboidrato. No entanto, outras matérias-primas podem ser utilizadas, como é o caso da mandioca e do arroz (Eduardo, 2002; Medeiros e Stremel, 2009). A possibilidade do emprego de outras fontes de amido foi descrita por Yongping et al. (1987), os quais descrevem a obtenção de xaropes com teor médio de 78% de maltose.

No Brasil, o xarope de maltose pode ser adquirido comercialmente, sendo este composto por maltose (42%) e demais açúcares, com a maltodextrina e a glicose. Sua principal aplicação é na indústria alimentícia, utilizado na fabricação de cervejas e refrigerantes, além de geleias, sorvetes e doces (Lees e Jackson, 1973).

2.4 Recuperação dos ácidos aldônicos e sorbitol

Técnicas de recuperação de produtos devem ser realizadas eficientemente para que seja diminuído o custo global de produção do mesmo. Estas técnicas, em processos biotecnológicos, se tratam de processos com alta eficiência, ausência de agentes poluentes e elevada especificidade (Pessoa Jr. e Kilikian, 2005).

A recuperação dos produtos da bioconversão provenientes da biocatálise do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* pode ser realizada por sucessivas precipitações com solventes orgânicos comuns como etanol, metanol, ácido acético glacial,

entre outros (Silveira et al., 2007). Destaque é dado para a utilização de etanol, uma vez que este solvente é o produto principal da fermentação de glicose por *Z. mobilis*. A precipitação e a separação do ácido aldônico podem ser aplicadas, uma vez que existe diferença entre a solubilidade dos compostos envolvidos na bioconversão frente ao solvente orgânico usado (Malvessi, 2008; Carra, 2012).

O sorbitol apresenta alta solubilidade em solventes polares, como a água, etanol e metanol, característica também expressa para a lactose e a frutose. O ácido lactobiônico, assim como o ácido maltobiônico e o ácido glicônico, são praticamente insolúveis em solventes como etanol e metanol, sendo possível a separação do meio reacional (European Pharmopeia, 2009; Carra, 2012; Garin, 2016).

A precipitação de ácidos aldônicos com o uso de etanol tem sido relatada devido à simplicidade de operação e o baixo custo (Silveira et al., 2007). No entanto, para o ácido maltobiônico não há relatos de estudos na literatura especializada, sendo o único registro para sua recuperação o emprego de brucina. Entretanto, esta alternativa é inviável uma vez que se trata de um alcalóide altamente tóxico e de elevado custo (Isbell & Schaffer, 1957).

Em estudos com outros compostos aldônicos, a cristalização a partir de sais de cálcio com etapa de aquecimento e evaporação a baixa pressão tem sido relada como alternativa para recuperação destes compostos (Stoll & Burckhardt, 1938). A precipitação com solvente miscível também tem sido aplicada para recuperação do maltobionato de lítio, obtido a partir de eletrólise e concentrado com grupo de solventes que consiste em etanol, metanol e propanol (Isbell & Schaffer, 1957).

A eletrodialise também tem sido descrita com uma alternativa para separação dos produtos da bioconversão por *Z. mobilis*. Em estudos com ácido lactobiônico, Peretti et al. (2009) demonstraram a recuperação do mesmo por processo de separação por membranas, utilizando eletrodialise, com membranas catiônicas e aniônicas, comparando diferentes

potenciais elétricos. Os autores relatam a separação do ácido lactobiônico dos demais substratos residuais (lactose e frutose) e produto (sorbitol), justificando o uso da eletrodialise em função do elevado valor agregado do produto final.

Pezzotti & Therisod (2006) estudaram a síntese enzimática de ácidos aldônicos, em especial o ácido xilônico, a partir das enzimas glicose oxidase e catalase de *Aspergillus niger*. Para a separação da mistura reacional, foi empregada a técnica de filtração através de coluna de troca iônica com eluição dos ácidos em solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L. Os ácidos aldônicos recuperados foram então submetidos ao processo de evaporação a vácuo seguida de espectroscopia de massas a fim de confirmar a pureza. Os autores relatam a obtenção de teores na ordem de 70 a 90% em ácido xilônico.

Pedruzzi (2011) avaliou o desempenho de colunas de troca iônica variando três resinas comerciais em gel com diferentes contra-íons fixados ao grupo sulfônico (Ca^{2+} , H^+ , K^+). A mistura quartenária (ácido lactobiônico, sorbitol, frutose e lactose), resultante da bioconversão do par frutose/lactose por enzimas GFOR/GL de *Z. mobilis* foi separada, sendo observado que a resina com íons K^+ foi mais eficiente na separação que os demais íons avaliados.

2.5 Caracterização físico-química do ácido maltobiônico

A Farmacopeia Europeia (2009), considerada um compêndio oficial farmacêutico, estabelece os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. Conforme preconizado pela Farmacopeia Europeia (2009), a prévia caracterização físico-química destas substâncias é fundamental.

Para o ácido maltobiônico e/ou maltobionato de sódio ou cálcio, não são descritas, até o momento, as especificações farmacopeicas, somente são fornecidas as monografias

para o ácido lactobiônico e/ou lactobionatos. Desta forma, a caracterização do ácido maltobiônico se torna necessária, sendo indicada a realização de testes de identificação e pureza, determinação da fórmula estrutural e molecular, análises térmicas, de solubilidade, ponto de fusão, pK_a e poder rotatório específico (Farmacopeia Europeia, 2009). A caracterização realizada neste trabalho para o ácido maltobiônico e seus sais é inédita, sendo que ainda não foram reportados na literatura especializada trabalhos relacionados a esta etapa.

Considerando o exposto, o processo de produção de ácido maltobiônico e seus sais (maltobionato) - via ação do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* -, buscando o aumento da produtividade pode ser aperfeiçoado, também considerando a escassez de relatos sobre a obtenção destes compostos por rota enzimática. Outro aspecto a ser salientado sobre a utilização de GFOR/GL é a obtenção, de forma concomitante, de sorbitol, o qual é empregado em variados segmentos da indústria farmacêutica e de cosméticos.

Quanto às potenciais aplicações do ácido maltobiônico, os estudos voltados à purificação e a identificação de suas características e propriedades são direcionados a contribuir com a fundamentação teórica descrita na literatura especializada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas relacionadas à condução experimental dos estudos de bioprodução de ácido maltobiônico e sorbitol pelo sistema enzimático GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio são apresentadas na Figura 4.

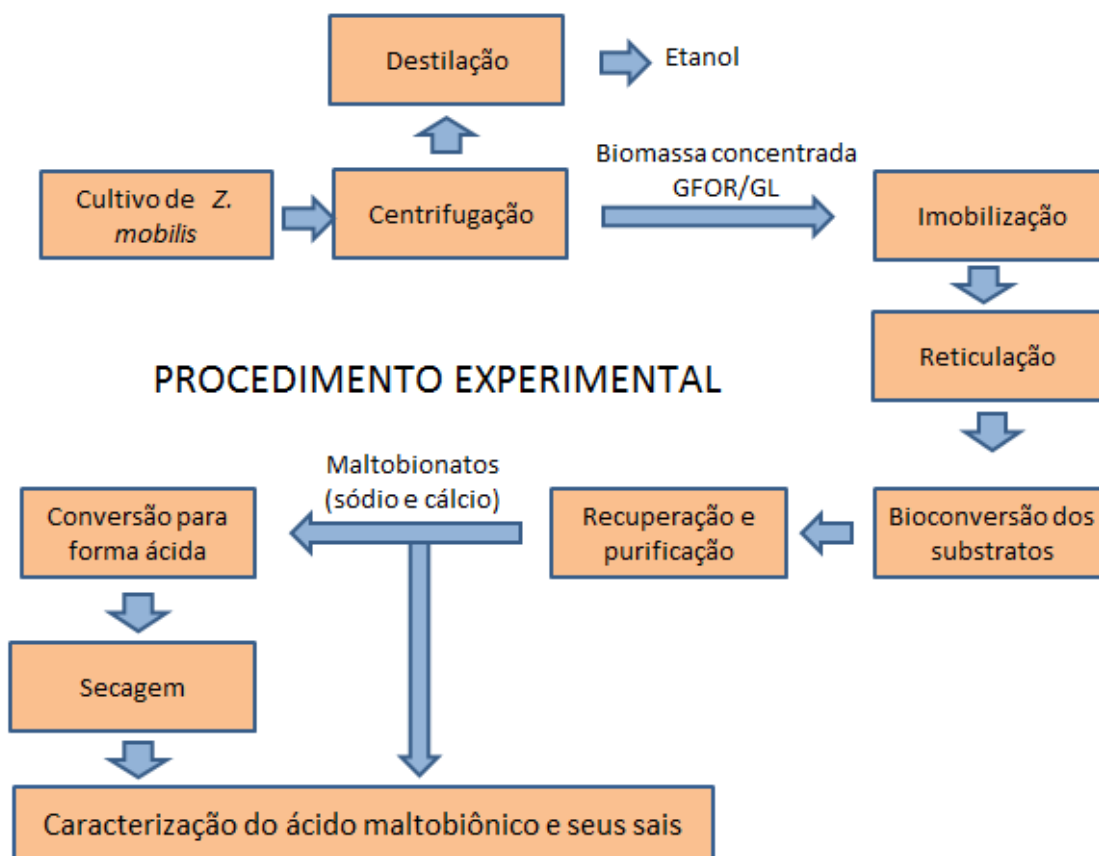


Figura 4 - Esquema representativo do processo de produção de ácido maltobiônico e sorbitol por enzimas imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, de recuperação e de caracterização dos produtos.

3.1 Microrganismo

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirida do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (RFA). As

culturas foram mantidas em meio líquido, repicadas mensalmente e estocadas a 4 °C (Malvessi et al., 2006).

3.2 Meio de cultivo

O meio líquido utilizado foi previamente descrito por Malvessi et al. (2006) com a seguinte composição (g/L): glicose, 20 (manutenção), 100 (inóculo), 150 (cultivo em biorreator); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; KH_2PO_4 , 1,0; extrato de levedura (Prodex Lac[®], Prodesa S.A, Brasil), 7,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave a 1 atm, por 15 min.

3.3 Produção de células/enzimas e etanol

Para a obtenção de suspensão celular de *Z. mobilis*, a cultura em estoque foi previamente cultivada em meio líquido. Os meios para a obtenção de inóculo foram preparados em frascos de 500 mL, contendo 450 mL de volume final, que compreendia 45 mL da cultura previamente ativada a 30 °C por 12 horas, solução de glicose, extrato de levedura e sais nutrientes. O pH do meio foi mantido em 5,5 com adição inicial de 5 g/L CaCO_3 (Malvessi et al., 2006). Os frascos eram dotados de tampas com filtros acoplados, com o intuito de proporcionar a injeção inicial de N_2 gasoso, para atingir a condição de anaerobiose e, posteriormente, para a liberação de CO_2 decorrente do metabolismo fermentativo. O cultivo foi conduzido a 30 °C, sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U/H – B. Braun Biotech, RFA), por 10 horas.

O cultivo para a produção de biomassa/enzimas foi realizado em regime descontínuo, em biorreator de bancada de 5,5 litros de volume de meio útil (Tecbio, Tecnal, Brasil). O inóculo foi definido em função do volume necessário de suspensão celular que

correspondesse a 20 unidades de D.O. (densidade óptica) no meio. O cultivo foi conduzido em anaerobiose, a 450 rpm, temperatura mantida em 30 °C e pH 5,5, controlado pela adição automática de NaOH 5 mol/L (Malvessi et al., 2006). Ao final do cultivo, o caldo fermentado foi recolhido e concentrado por centrifugação, a 6000 rpm, por 10 min (Centrífuga Sigma, modelo 4-15).

3.4 Imobilização celular

A biomassa concentrada foi ressuspensa em água destilada a 70 g/L e diretamente misturada com solução de alginato de sódio 4% (m/v) (Carra, 2012). Posteriormente, a mistura de células/enzimas e alginato foi lentamente gotejada em uma solução de cloreto de cálcio 0,3 mol/L, com a finalidade de promover a troca iônica entre o sódio e o cálcio, formando, então, as esferas de alginato de cálcio, as quais são insolúveis (Carra, 2012). Estas esferas foram tratadas, ao final da imobilização, com glutaraldeído 0,5% (v/v) (Folle et al., 2018).

3.5 Ensaio de bioconversão

Com o intuito de avaliar a formação de ácido maltobiônico e sorbitol frente aos diferentes substratos e condições de pH e temperatura, foram realizados ensaios de bioconversão utilizando o complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio,

Foi utilizado um reator encamisado de 400 mL, com volume reacional final de 200 mL, mantido sob agitação magnética ou mecânica. Como condições padrão de bioconversão citam-se a utilização de 20 g/L de biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio, temperatura de 39 °C e pH 6,4. Os sistemas de bioconversão empregados para a produção de maltobionato de cálcio ou maltobionato de sódio são mostrados na Figura 5 e na Figura 6,

respectivamente. A adição de base, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou NaOH , durante o processo de bioconversão foi monitorada com o auxílio da plataforma Arduino (Vargas e Polidoro, 2015).

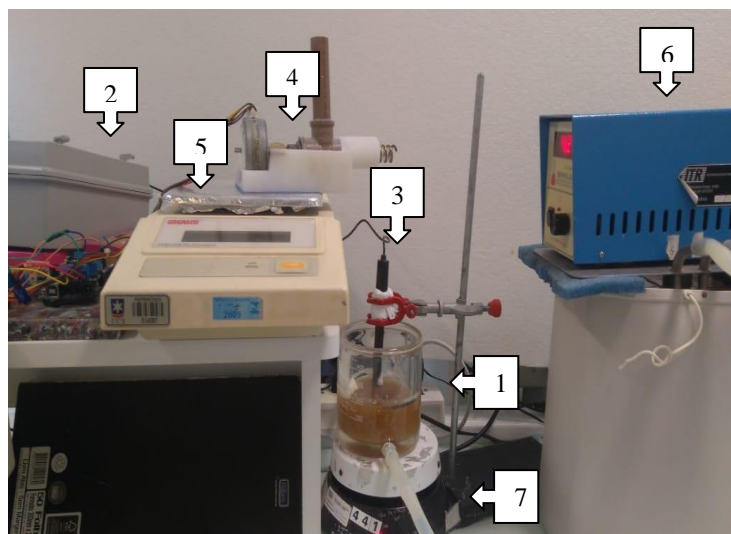


Figura 5 - Sistema da bioconversão utilizando hidróxido de cálcio para o controle de pH. (1) reator enzimático; (2) controlador de pH; (3) sonda de pH; (4) motor de passo com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 95%; (5) balança; (6) controlador de temperatura; (7) agitador magnético.

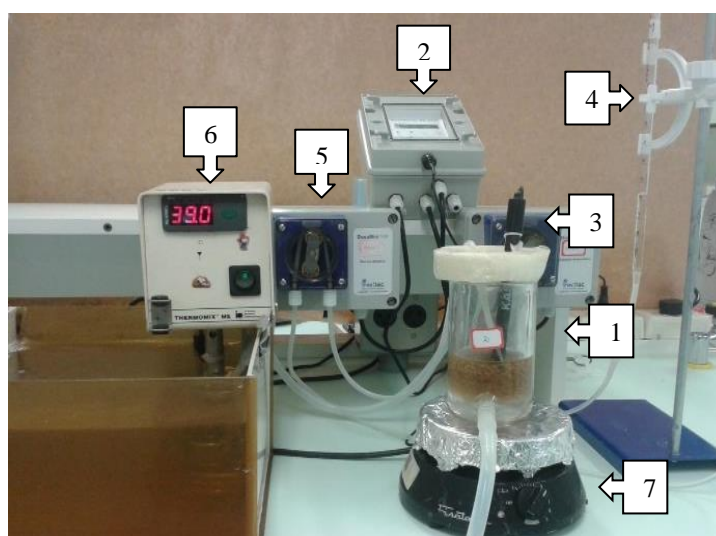


Figura 6 - Sistema da bioconversão utilizando hidróxido de sódio para o controle de pH. (1) reator enzimático; (2) controlador de pH; (3) sonda de pH; (4) bureta com NaOH 7 mol/L; (5) bomba peristáltica; (6) controlador de temperatura; (7) agitador magnético.

Para a produção de maltobionato de cálcio (Figura 5), o pH da reação foi controlado com a adição de Ca(OH)_2 em pó, em função da baixa solubilidade. O consumo de base foi avaliado pela alteração de massa, determinada em balança semi-analítica (Delagustin, 2016). Com relação à obtenção de maltobionato de sódio (Figura 6), o pH da reação foi controlado pela adição automática de solução NaOH 7,0 mol/L, contida em uma bureta de 50 mL, acoplada ao controlador de pH.

Para os testes de substratos, foram empregados xarope de maltose (Ingredion Brasil Ing. Ind. Ltda.) e maltose purificada (INLAB, Brasil). Para o xarope de maltose, foram avaliadas concentrações entre 300 a 700 mmol/L, considerando-se o teor de maltose presente na matéria-prima e a limitação em termos de solubilidade quando em concentrações superiores a 700 mmol/L (Garin, 2016). A concentração de frutose foi fixada em 700 mmol/L para a realização destes testes. Neste mesmo grupo de ensaios, os efeitos relacionados à temperatura e pH da reação também foram avaliados, de 32 a 50 °C e pH entre 5,5 e 7,5, conforme descrito por Flores et al. (2018a).

A concentração de maltose purificada foi avaliada entre 700 e 1500 mmol/L, nas condições operacionais padronizadas de bioconversão, com concentração equimolar de frutose. Neste caso, foi avaliada a produção de ambos os sais do ácido maltobiônico - maltobionato de cálcio e maltobionato de sódio -, sendo que o efeito do pH e da temperatura sobre os parâmetros da reação não foram realizados neste trabalho em função da efetivação de testes anteriores (Garin, 2016). O processo de bioconversão foi conduzido em regime descontínuo, variando de 24 a 72 horas ou até a obtenção de rendimento médio de 90% em produto, constatado pelo consumo de base.

3.6 Recuperação dos produtos da bioconversão

O procedimento usado na etapa de recuperação do maltobionato de sódio e maltobionato de cálcio do meio reacional de bioconversão foi baseado no descrito por Silveira et al. (2007) e Carra (2012). Em avaliação preliminar, foram avaliados os solventes orgânicos aplicáveis para a etapa de precipitação de algum dos compostos envolvidos na bioconversão, considerando a solubilidade destes nos solventes em questão, entre estes, metanol, etanol, 2-propanol, isopropanol, butanol, 4-metil-2-pentanol, acetilacetona, acetona, ácido acético glacial e clorofórmio.

Cerca de 2 mL do caldo resultante de cada bioconversão – da produção de maltobionato de sódio ou de maltobionato de cálcio - foram adicionados, gota a gota, a 50 mL de cada solvente orgânico. Foi avaliado qual solvente proporcionaria a separação do sal do ácido maltobiônico dos demais compostos envolvidos na bioconversão em função da identificação visual de fases distintas na mistura.

Após a definição dos melhores solventes para a precipitação, os testes foram continuados com a avaliação das concentrações variadas, entre 60 e 90% (v/v) e temperaturas entre 5 e 40 °C (Flores et al., 2018b). A vazão de adição de solvente para realizar a precipitação foi a mesma utilizada por Carra (2012) para a purificação de lactobionato de sódio com etanol.

A separação dos produtos da mistura reacional da bioconversão foi realizada procedendo-se sucessivas repetições de precipitação do sal de sódio e de cálcio nas condições definidas. A precipitação se deve à diferença de solubilidade dos compostos. Na sequência, o material precipitado resultante foi separado e o solvente presente no sobrenadante foi coletado para a posterior destilação, visando à recuperação. Após a retirada do sobrenadante, a mistura precipitada foi mantida em estufa durante 48 horas, a 50 °C.

3.7 Conversão dos sais de maltobionato à ácido maltobiônico

A conversão de maltobionato para o ácido maltobiônico - tanto para o sal de sódio quanto de cálcio - foi realizada utilizando resina de troca iônica (Amberlite 120, Sigma-Aldrich). Neste ensaio, amostra de 5 g do sal de maltobionato purificado foi diluída em 100 mL de água destilada e submetido a diferentes quantidades da resina. A adição de resina foi realizada parceladamente, com o acompanhamento contínuo do pH da solução. A conversão total do maltobionato em ácido maltobiônico era atingida quando não observada a alteração do pH da solução.

3.8 Secagem do ácido maltobiônico em diferentes condições

A secagem do ácido maltobiônico foi realizada de três maneiras distintas: i) por *spray-dryer* (LabPlant SD-05, Keison Products - Inglaterra), teste realizado na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI - Erechim); ii) por liofilização (Labconco FreeZone 4.5, EUA); iii) por secagem em estufa.

Os testes em *spray-dryer* foram conduzidos a 120 °C e fluxo de 10 mL/min. A amostra consistiu de uma mistura de 100 mL de ácido maltobiônico purificado (99%) e 1% (m/m) de maltodextrina, de maltose ou de lactose, compostos empregados como encapsulantes com o intuito de facilitar a secagem do produto.

A secagem por liofilização foi realizada a -50 °C, sob vácuo. O tempo para atingir a total secagem por liofilização do ácido maltobiônico purificado variou de 24 a 48 horas.

Para a secagem em estufa, realizada a 60 °C, o tempo médio foi de 7 dias, sendo a massa medida diariamente até a obtenção de valor constante.

Ainda nesta etapa, foi avaliada a higroscopicidade dos compostos pós-secagem e comparada com uma amostra de maltobionato de cálcio, sendo que as amostras de maltobionato de sódio não ficaram completamente secas. Os testes foram realizados a partir da utilização de 0,2 g de cada composto, que foram submetidos à atmosfera úmida, dentro de um dessecador com uma solução saturada de sulfato de amônio, com teor de umidade relativa de 80%. As amostras foram pesadas diariamente, por 7 dias, conforme metodologia proposta por Callahan et al. (2008) e Farmacopeia Europeia (2009).

3.9 Parâmetros de análise do processo de bioconversão

A equação 1 foi utilizada para determinar a concentração de produtos da reação de bioprodução de maltobionato de sódio.

$$C_{\text{produto formado}} = \frac{(V_{\text{base}} \cdot M \cdot MM)}{(V_{\text{total}} + V_{\text{base}})} \quad (1)$$

Onde:

$C_{\text{produto formado}}$, concentração de maltobionato de sódio formado (mmol/L);

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

M , concentração da solução de base (mol/L);

MM , massa molar do produto (ácido maltobiônico – 358,3 g/mol e sorbitol - 182,1 g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão.

Tendo em vista o processo de bioprodução de maltobionato de cálcio, a concentração do produto foi definida utilizando a equação 2.

$$C_{\text{produto.formado}} = \frac{(g_{\text{base}} \cdot MM \cdot 1000)}{V_{\text{total}} \cdot MM2} \quad (2)$$

Onde:

$C_{\text{produto.formado}}$, concentração de maltobionato de cálcio formado (mmol/L);

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

MM , massa molar do produto (maltobionato de cálcio, 754,6 g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão;

$MM2$, massa molar do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (74,1 g/mol).

A concentração de substrato convertido em produto durante o processo de bioconversão foi determinada a partir da equação 3.

$$C_{\text{substrato consumido}} = C_{\text{substrato inicial}} - \frac{(V_{\text{base}} \cdot M \cdot MM_{\text{substrato}})}{(V_{\text{total}} + V_{\text{base}})} \quad (3)$$

Onde:

$C_{\text{substrato consumido}}$, concentração de substrato convertido em maltobionato de sódio (mmol/L);

$C_{\text{substrato inicial}}$, concentração de substrato inicial (mmol/L);

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

M , concentração de base (mol/L);

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

V_{total} , volume total da bioconversão.

Do mesmo modo que para os produtos, a equação 4 foi empregada na determinação do substrato consumido utilizando como base o hidróxido de cálcio.

$$C_{\text{substrato consumido}} = C_{\text{substrato inicial}} - \frac{CM_{\text{Ca}} \cdot C_{\text{substrato inicial}}}{C_{\text{maxMCa}}} \cdot MM \quad (4)$$

Onde:

$C_{\text{substratoconsumido}}$, concentração de substrato convertido em maltobionato de cálcio (mmol/L);

$C_{\text{substrato.inicial}}$, concentração de substrato inicial (mmol/L);

$CMCa$, concentração de maltobionato de cálcio formado (mmol/L);

C_{maxMCA} , concentração máxima teórica de maltobionato de cálcio (mmol/L);

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

O rendimento em termos de formação de ácido maltobiônico nos ensaios foi determinado de acordo com a equação 5.

$$\rho = \frac{Mac.formado \cdot 100}{Mac.esperado} \quad (5)$$

Onde:

ρ , rendimento (%);

$M_{\text{ac.formado}}$, massa de ácido maltobiônico formado (g);

$M_{\text{ac.esperado}}$, massa de ácido maltobiônico esperado para 100% conversão (g).

A conversão de substrato em produto (Y_{P/S_0}) foi determinada pela relação entre o ácido maltobiônico formado e a concentração de maltose inicial, segundo a Equação 6.

$$Y_{P/S_0} = \frac{P_f}{S_0} \quad (6)$$

Onde:

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

P_f , concentração de ácido maltobiônico formado (mmol);

S_0 , concentração de maltose inicial (mmol).

A produtividade mássica foi calculada a partir da equação 7.

$$P_m = \frac{P_f - P_i}{t} \quad (7)$$

Onde:

P_m , produtividade mássica (mmol/h);

P_i , massa inicial de produto (mmol);

P_f , massa final de produto (mmol)

t , tempo de processo (h).

Para determinar a produtividade específica nos ensaios de bioconversão, será empregada a equação 8.

$$q = \frac{p}{g} \quad (8)$$

Onde:

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

p , produtividade mássica (mmol);

g , massa celular de *Z. mobilis* em gramas de (g);

t , tempo de processo (h).

A velocidade específica de formação de produto (μ_p) será determinada conforme equação 9.

$$\mu_p = \frac{1}{M_x} \cdot \frac{dM_p}{dt} \quad (9)$$

Onde:

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

M_x , massa de células (g);

dM_p/dt , derivada do produto em função do tempo (g/h).

3.10 Métodos analíticos

3.10.1 Determinação da atividade enzimática de GFOR/GL

A atividade enzimática do complexo GFOR/GL foi determinada após a produção das células de *Z. mobilis*, conforme metodologia proposta por Malvessi et al. (2006). Neste experimento foi utilizado biorreator encamisado com 100 mL de meio reacional contendo 700 mmol/L de glicose, 700 mmol/L de frutose e 4 g/L de células livres de *Z. mobilis*. Este ensaio foi conduzido por 45 min, a 39 °C e pH controlado em 6,4 com adição de NaOH 1 mol/L.

Uma unidade enzimática de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1mmol de ácido orgânico por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células em base seca (U/g).

3.10.2 Quantificação de substratos e produtos da bioconversão e validação do método analítico

Durante a bioconversão, substratos e produtos foram quantificados pelo método direto, que se baseia na determinação do volume e da concentração da base adicionada para controlar o pH reacional (Malvessi, 2008; Pedruzzi et al., 2011). A concentração de sorbitol é inferida a partir da concentração de ácido orgânico formado, considerando que os produtos são formados em base equimolar.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi empregada como método de quantificação dos produtos - ácido maltobiônico, maltobionato e sorbitol – e substratos residuais – frutose e maltose - baseando-se no descrito por Pedruzzi et al. (2007) e Carra (2012). Foi utilizada coluna Aminex HPX-87H (BioRad), com dimensões de 300 mm x

7,8mm, 9 μm , acondicionada a 60 °C, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, previamente filtrada (filtro de poliamida 0,2 μm), detector de índice de refração (RID) e fluxo de 0,6 mL/min.

Neste ponto cabe ressaltar que foi realizada a validação do método de quantificação simultânea dos compostos envolvidos na bioconversão. Desta forma, foi preparada uma solução padrão contendo maltose, sorbitol, frutose e ácido maltobiônico, este último com alto grau de pureza, obtido neste trabalho. Esta solução padrão foi utilizada como curva de calibração, nas concentrações de 0,5 a 10 g/L dos compostos envolvidos, servindo para a quantificação dos mesmos por CLAE. Deste modo, de acordo com o preconizado na RE N° 899 da ANVISA (Brasil, 2003), a curva de calibração foi examinada da seguinte forma: i) análise de três curvas de calibração, com a mesma solução padrão; ii) após, esta curva de calibração foi analisada em três dias consecutivos. Por final, o efeito matriz foi verificado adicionando uma concentração conhecida de caldo da bioconversão na solução padrão, sendo que a quantificação foi feita de ambos caldos (usando maltose ou xarope de maltose) e solução padrão, simultaneamente.

Para a validação do método foram avaliadas especificidade e seletividade; linearidade; intervalo; precisão; limite de detecção (sensibilidade); limite de quantificação; exatidão e robustez (Brasil, 2003). Tendo em vista a presença de outros carboidratos no xarope de maltose, estes foram previamente identificados por cromatografia em fase líquida (Carra, 2012).

3.11 Avaliação das características físico-químicas do ácido maltobiônico e seus sais

Os testes de caracterização físico-química foram realizados para amostras de ácido maltobiônico, maltobionato de sódio e maltobionato de cálcio obtidos na bioconversão com o uso de xarope de maltose e com maltose purificada.

Estes testes foram os preconizados pela Farmacopeia Europeia (2009), sendo: análises de identificação e pureza, solubilidade, pK_a , determinação do ponto de fusão, desvio ótico, além identificação da estrutura química das moléculas, comprovação da massa molecular e análises termogravimétricas e calorimétricas.

3.11.1 Determinação da solubilidade

A solubilidade foi determinada seguindo a metodologia descrita na Farmacopeia (2009). As amostras de ácido maltobiônico e maltobionato de cálcio e de sódio (0,1g) foram distribuídas em tubos de ensaio e adicionadas determinadas alíquotas dos solventes água MilliQ ou metanol (80%). Os testes foram realizados em temperaturas de 5 ± 2 °C, 22 ± 2 °C e 40 ± 2 °C.

3.11.2 Determinação de pK_a

A determinação do pK_a foi realizada a partir de medições de soluções de ácido maltobiônico, nas quais foram alterados o pH da amostra. A equação 10 descreve equação de Henderson-Hasselbalch, utilizada na determinação do pK_a , na qual foram avaliados o K_a e o pH, a partir de concentrações conhecidas de ácido maltobiônico, conforme descrito em Vogel (1981). Neste contexto, 2 g de ácido maltobiônico foi diluído em 100 mL de água MilliQ, com pH inicial $\sim 2,0$. Com a medição do pH sendo realizada constantemente, foi realizada a adição de 50 mL de água MilliQ até ser atingido pH próximo a 3,8, valor descrito na literatura para o pK_a do ácido lactobiônico (Farmacopeia Europeia, 2009).

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (10)$$

A determinação do pH foi feita pela leitura no pH metro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. A medida de pH forneceu os valores correspondentes para a concentração de íons H^+ e posteriormente, o cálculo da constante K_a e respectivo pK_a .

3.11.3 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado pela temperatura na qual a amostra inicia o processo de fusão (Farmacopeia Europeia, 2009). Desta forma, foi separada uma pequena alíquota das amostras de ácido maltobiônico e os maltobionatos de cálcio e de sódio, obtidos pela bioconversão de maltose purificada e xarope de maltose, para serem analisados no medidor de ponto de fusão (PF1500 Gehaka), com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min até completa fusão da amostra.

3.11.4 Determinação do poder rotatório específico

Para esta análise, foram preparadas soluções de 100 g/L de concentração do ácido maltobiônico e maltobionato de cálcio e de sódio, diluindo-os em água MilliQ. As amostras foram analisadas em triplicada, no equipamento Polax 2L (Atago), a 20 °C, conforme preconizado na Farmacopeia Europeia (2009). A equação 11 descreve o cálculo do parâmetro do desvio da luz polarizada, o poder rotatório específico ($[\alpha]_D^{20}$).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c \times l} \quad (11)$$

Onde:

$[\alpha]_D^{20}$, poder rotatório específico a 20 °C

α , ângulo da rotação;

C, concentração de amostra (g/mL);

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

3.11.5 Caracterização estrutural

As análises de FTIR foram realizadas no equipamento Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Scientific), no Laboratório de Polímeros (LPOL) da Universidade de Caxias do Sul. As amostras do ácido maltobiônico e seus sais foram submetidas à leitura no equipamento.

Os espectros de RMN das amostras 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 ^{13}C . As amostras foram diluídas em D_2O (água deuterada). Posteriormente, os valores de deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

A análise por espectrometria de massas foi realizada com as amostras descritas, sendo que as mesmas 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 de m/z foi realizada com auxílio do software Bruker Daltonics – Compass DataAnalysis e IsotopePattern.

Ambas as análises de RMN e EM foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia, Produtos Naturais e Sintéticos (LBIOP) da Universidade de Caxias do Sul.

3.11.6 Caracterização por análises térmicas

As análises termogravimétricas e de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas no Laboratório de Polímeros (LPOL) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). O equipamento utilizado para estas análises foi o TGA-50 (Shimadzu, Brasil), com uma quantidade de amostra de 10 mg, taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, panela de alumínio,

com fluxo de ar de 63 mL/min. As temperaturas do equipamento na qual as amostras foram submetidas foram de 30 até 800 °C.

Para DSC, foi utilizado o equipamento DSC-50 (Shimadzu, Brasil), sendo avaliados os eventos endotérmicos e exotérmicos em determinada temperatura de análise. Nos testes, 10 mg de amostra foram adicionados em placas de alumínio e submetidas à temperatura de 30 °C até 200 °C, com taxa de aumento de temperatura de 10 °C/min. A atmosfera utilizada no equipamento foi nitrogênio, com fluxo de 50 mL/min. A entalpia dos pontos de fusão foram calculadas seguindo metodologia descrita pelas normas ASTM E793-06, ASTM E794-06 e ASTM E968-02.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho. A etapa experimental de produção de células/enzimas e etanol por *Z. mobilis* foi realizada em biorreator de bancada, em regime descontínuo. Embora não apresentados, os cultivos de *Z. mobilis* foram realizados de acordo com a necessidade de obtenção de células/enzimas a serem usadas nos testes de bioconversão de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente. Como não foram propostas alterações em termos de parâmetros operacionais de cultivo (item 3.3 e 3.4), os resultados em termos de crescimento celular e consumo de substrato foram semelhantes entre si, corroborando os estudos anteriores do grupo de pesquisa. Como parâmetro importante em termos de conversão, a atividade enzimática foi avaliada ao final de cada cultivo.

Na sequência dos estudos, serão apresentados os resultados relacionados aos ensaios de bioconversão de xarope de maltose + frutose ou de maltose + frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Os parâmetros avaliados foram a concentração de substrato e no caso particular do uso de xarope de maltose, a temperatura e o pH do processo de bioconversão.

Finalmente, são apresentados e discutidos os testes de recuperação e caracterização físico-química dos compostos na forma ácida (ácido maltobiônico) e de sais (maltobionato de sódio e de cálcio).

4.1 Bioprodução de ácido maltobiônico: uso de xarope de maltose e efeitos de pH e temperatura

4.1.1 Caracterização prévia do xarope de maltose

Foi testada a utilização do xarope de maltose, alternativamente à maltose purificada, como substrato na reação de bioconversão usando o sistema GFOR/GL. Inicialmente, foi realizada a caracterização de uma amostra de xarope de maltose (10 g/L) com a finalidade de identificar e quantificar, além da maltose, os outros compostos presentes no material. O laudo de análise do produto comercial é apresentado no Anexo 1.

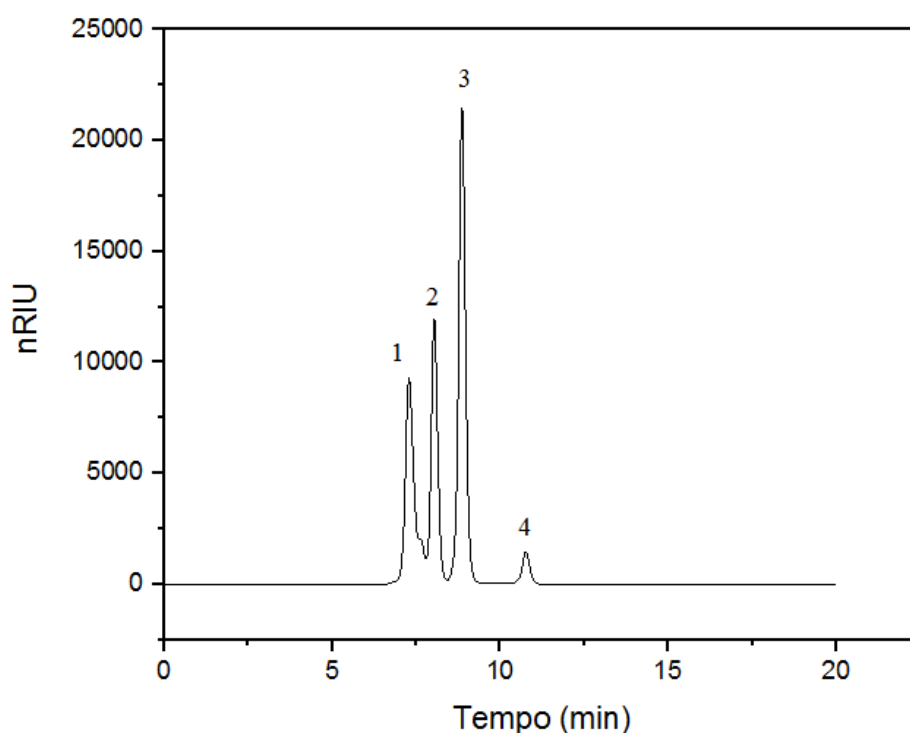


Figura 7 - Perfil da separação cromatográfica do xarope de maltose. (1) maltodextrina; (2) maltotriose; (3) maltose; (4) glicose. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C.

O perfil cromatográfico do xarope de maltose é apresentado na Figura 7. Podem ser observados quatro picos, sendo o de maior intensidade relativo à maltose, em tempo de retenção de cerca de 9 min. Os picos eluídos em 7,3 e 11,3 min são referentes à maltodextrina e glicose, respectivamente. A substância detectada em 7,9 min pode estar relacionada à presença de maltotriose que, embora citada no laudo do fabricante, não foi confirmada por CLAE em função da ausência de padrão (ANEXO 1).

Na Tabela 2, são comparadas as informações do fornecedor (ANEXO 1) e os dados obtidos neste estudo, determinados por cromatografia em fase líquida. A composição da maltose presente no xarope de maltose detectada por CLAE foi semelhante à informada pelo fabricante e, para fins de cálculos a serem praticados para os testes posteriores de bioconversão, a composição de maltose presente no xarope de maltose foi fixada em 44%. As demais informações dos outros açúcares são descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de açúcares presentes na composição do xarope de maltose comercial indicada no laudo do fabricante e determinada em cromatografia em fase líquida

Açúcar	Composição (fabricante)	Composição (CLAE)
Maltodextrina	Entre 23% e 28%	-
Maltotriose	Min 10%	-
Maltose	Min 42%	44%
Glicose	Max 12%	13%

Garin (2016), em estudos cinéticos de GFOR/GL na conversão de maltose - presente no xarope de maltose - em ácido maltobiônico, relata a obtenção de valores de K_X de 0,03 mol/L (constante de Michaelis-Menten para substrato xarope de maltose) e V_{max} (velocidade máxima) de 56 U/g. Por outros lado, os parâmetros cinéticos para a conversão de maltose

purificada a ácido maltobiônico foram de K_M (constante de Michaelis-Menten para substrato maltose) de 0,19 mol/L e V_{max} de 25 U/g, ou seja, velocidade máxima de formação de produto menor com maior concentração de substrato se comparado com a utilização de xarope de maltose. O autor relata que os parâmetros cinéticos desta reação foram diretamente influenciados pela glicose contida no xarope de maltose comercial utilizado, a qual é o substrato preferencial do complexo enzimático GFOR/GL, como descrito em Satory et al. (1997), Malvessi (2008) e Malvessi et al. (2013).

O complexo enzimático GFOR/GL, como relatado por Satory et al. (1997), é capaz de catalisar a conversão de açúcares que tem em sua estrutura a ligação α -1,4 e β -1,4, sendo oxidados a suas respectivas lactonas, considerando que estes são formados a partir de monossacarídeos e dissacarídeos.

Na Figura 8, é apresentado o perfil cromatográfico de amostra final de bioconversão realizada com o uso de solução contendo a mistura de xarope de maltose e frutose (700 mmol/L). Em comparação com a Figura 7, pode-se observar a ausência dos picos referentes a glicose, uma vez que este composto é observado no mesmo tempo de retenção que a frutose. Observa-se também o pico correspondente ao sorbitol, resultante da bioconversão da frutose. O pico correspondente a maltose, na Figura 8, diminuiu em relação a Figura 7, sendo identificado o pico de ácido maltobiônico formado. A concentração dos demais açúcares se mantém

Cabe ressaltar que o pico correspondente à glicose não foi identificado, sendo observado o pico do ácido glicônico (em 8,5 min), o qual, por esta metodologia, é sobreposto pela eluição do ácido maltobiônico, resultante da conversão da maltose presente no xarope (pico 4, em 8,5 min). inalterada.

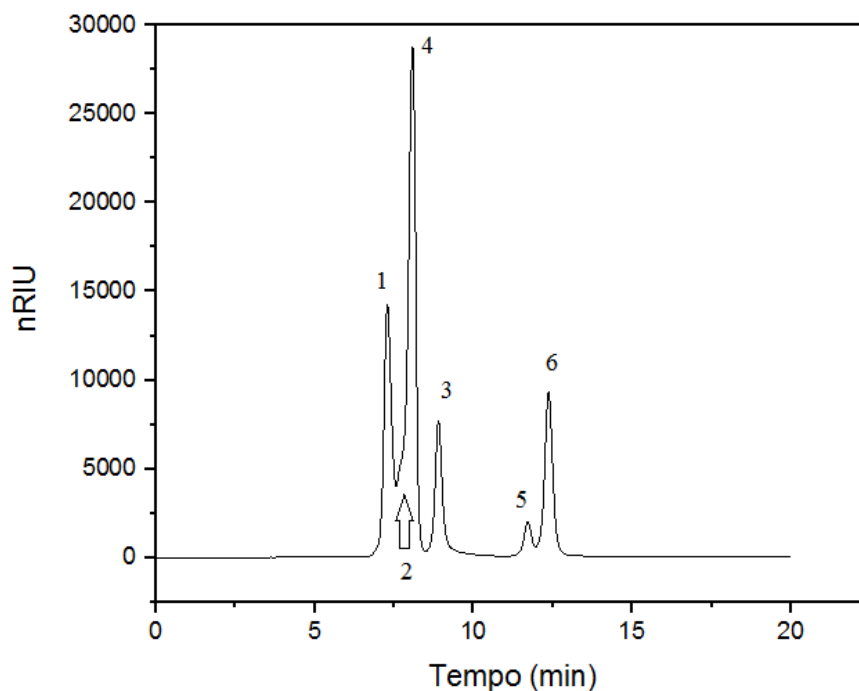


Figura 8 - Perfil da separação cromatográfica da bioconversão de xarope de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente. (1) maltodextrina; (2) maltotriose; (3) maltose; (4) ácido maltobiônico; (5) frutose; (6) sorbitol. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C.

Observa-se distintamente a eluição dos picos da maltodextrina (7,3 min), maltose (8,9 min), frutose (11,3 min) e sorbitol (12,3 min). O pico que poderia ser correspondente à maltotriose (pico 2, em 7,9 min) foi sobreposto pelo ácido maltobiônico (8,5 min), como mostrado na Figura 8. Entretanto, a conversão destes oligossacarídeos por GFOR/GL não foi identificada na condição analítica proposta.

Desta forma, foi estudada a produção de ácido maltobiônico considerando a variação da concentração de xarope de maltose, a temperatura e o controle de pH do processo de bioconversão utilizando o complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio.

4.1.2 Ensaios de bioconversão com alteração na concentração de xarope de maltose, temperatura e pH de processo

Os ensaios realizados nesta etapa foram para a avaliação da concentração do xarope de maltose e o efeito da temperatura e do pH no processo, levando em conta a maltose presente, fixando-se a concentração de frutose em 700 mmol/L.

Na Figura 9, é apresentado o perfil de produção de ácido maltobiônico com o uso de diferentes concentrações de xarope de maltose em função do tempo de bioconversão. Foi observada a similaridade entre os perfis de produção de ácido maltobiônico nas primeiras duas horas de processo, condizendo com a presença de glicose no xarope de maltose.

Além disso, a maltose, devido às duas moléculas de glicose presentes na sua estrutura, possui alta afinidade por GFOR, sendo observado que, em concentrações mais baixas (300, 400 e 500 mmol/L) o substrato foi totalmente convertido ao final de 24 horas. Por outro lado, em concentrações mais altas (600 e 700 mmol/L) foi observada a presença de substrato residual. Cabe ressaltar que para as concentrações de 600 e 700 mmol/L, quando atingido 20 horas de processo, o rendimento era superior a 90%. Para as demais concentrações, rendimento de 90% foi atingido em cerca de 8 horas de processo (Figura 9).

Observa-se, ainda, que a concentração final de produto obtida entre as concentrações de xarope de maltose de 600 e 700 mmol/L foram semelhantes. Em ambos os casos, a viscosidade no sistema foi superior às demais concentrações, sendo resultado da alta concentração de açúcar presente no meio reacional, e pode ser relacionada com o fato de a concentração máxima de produto ter sido atingida após 20 horas de processo.

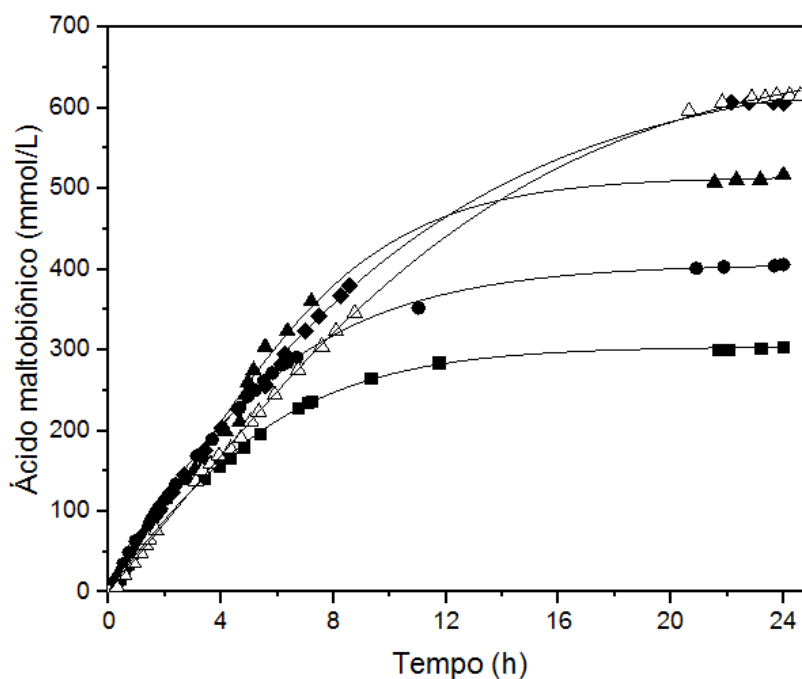


Figura 9 - Ácido maltobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes concentrações de xarope de maltose (■) 300 mmol/L (●) 400 mmol/L (▲) 500 mmol/L (◆) 600 mmol/L (△) 700 mmol/L (pH 6,4; 39 °C; X = 20 g/L)

A partir dos resultados experimentais de cada bioconversão, foram determinados, além da concentração de produto, outros parâmetros avaliativos do processo como rendimento, produtividade, produtividade específica, máxima velocidade específica de formação de produtos e substrato residual, apresentados na Tabela 3.

O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração máxima de ácido maltobiônico formado ao final de cada bioconversão. Para as concentrações testadas, 300, 400, 500, 600 e 700 mmol/L de xarope de maltose foram obtidas as concentrações de 313, 451, 527, 592 e 615 mmol/L de ácido maltobiônico, respectivamente. O aumento da concentração até 500 mmol/L favoreceu a concentração máxima de produto, sendo observado pelo aumento do rendimento de 105, 113, 106, 99 e 88%, para as concentrações de xarope de maltose testadas, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados gerais referentes à bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico, utilizando diferentes concentrações de xarope de maltose e concentração de frutose fixa em 700 mmol/L (pH 6,4; 39 °C; X = 20 g/L; 24 h)

	Concentração de substrato (mmol/L)				
	300	400	500	600	700
P_{\max} (mmol/L)	313	451	527	592	615
ρ (%)	105	113	106	99	88
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	1,04	1,20	1,13	1,07	0,96
P_m (mmol/h)	2,73	4,02	4,72	5,39	5,62
q (mmol/g/h)	0,68	1,0	1,18	1,34	1,40
$\mu_{P,\max}$ (mmol/g/h)	2,38	3,8	3,51	2,72	2,17
S_f (mmol/L)	0	0	0	0	23

P_{\max} , concentração máxima de ácido maltobiônico; ρ , rendimento do processo; $Y_{P/S0}$, conversão em produto considerando substrato inicial; P_m , produtividade mássica; q , produtividade específica; $\mu_{P,\max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , maltose residual.

O fator de conversão em produto considerando o substrato inicial foi de 1,04, 1,20, 1,13, 1,04 e 0,96 mmol/mmol para as concentrações testadas. Estas concentrações são definidas levando em conta a formação de ácido glicônico juntamente com o ácido maltobiônico, sendo que a quantificação por CLAE ou pelo consumo de base não faz distinção entre ambos os ácidos. Com o aumento da concentração de xarope de maltose, observou-se também o aumento da produtividade em ácido maltobiônico, sendo obtidos valores de 2,73, 4,02, 4,72, 5,39 e 5,62 mmol/h para produtividade mássica e de 0,68, 1,0, 1,18, 1,34 e 1,40 para produtividade específica, respectivamente, considerando o aumento

das concentrações de xarope de maltose. A máxima velocidade de formação de produto foi crescente até 500 mmol/L de xarope de maltose, assim como a concentração máxima de produto, com posterior redução dos valores atingidos na reação, a qual pode estar relacionada ao aumento da viscosidade da solução, que dificulta a transferência de massa entre substrato e o biocatalisador imobilizado (Tabela 3).

Cabe ressaltar que 700 mmol/L foi a máxima concentração que proporcionou a solubilização do xarope de maltose, sendo que a viscosidade da solução foi elevada, como discutido anteriormente. Em altas concentrações de xarope, a concentração de glicose equivalente, por sua vez, influencia a velocidade inicial da reação, como observado na Figura 10. A concentração de maltose ao final do processo foi nula em todos os experimentos, com exceção do teste realizado com a utilização de 700 mmol/L, no qual foi identificado que nem toda maltose foi convertida a ácido maltobiônico, conforme observado na Tabela 3.

Mesmo considerando a afinidade de GFOR por maltose, a imobilização do biocatalisador pode dificultar a acessibilidade do substrato à enzima, por restrições à transferência de massa através do suporte, prejudicando ainda o controle do pH e da temperatura do processo (Zanin e Moraes, 2004; Malvessi et al., 2013; Carra et al., 2015). Subsequentemente foi, então, avaliada a influência da temperatura na reação de bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico via ação do sistema GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio.

Na Figura 10, é apresentado o perfil de produção de ácido maltobiônico em função do tempo em diferentes temperaturas de processo.

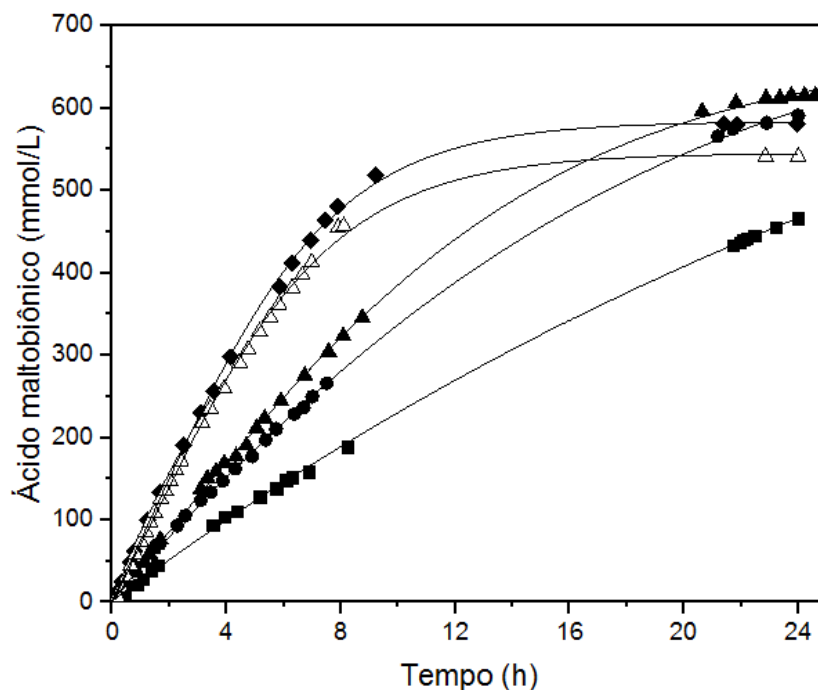


Figura 10 - Ácido maltobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes temperaturas de processo (■) 32 °C (●) 36 °C (▲) 39 °C (◆) 45 °C (Δ) 50 °C (pH 6,4; $S_0 = 700$ mmol/L; $X = 20$ g/L)

Pela acentuação das curvas de produção de ácido maltobiônico, observou-se que a velocidade inicial da reação é incrementada com o aumento da temperatura da reação. Concentrações médias de 585 e 565 mmol/L foram atingidas a 45 e 50°C, em 24 horas, respectivamente. O aumento da temperatura leva à melhoria na transferência de massa, com a difusão sendo facilitada do substrato para o biocatalisador imobilizado, característica também observada por Malvessi et al. (2013) e Garin (2016). Entretanto, como observado na Figura 10, a temperatura mais favorável de ação do complexo enzimático GFOR/GL foi a 39 °C, como também relatado por outros autores (Zachariou e Scopes, 1986; Garin, 2016). Segundo Carra et al. (2015), considerando a produção de ácido lactobiônico, maior concentração final de produto foi atingida a 43 °C, de 530 mmol/L, em 24 horas de bioconversão, utilizando o complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio.

Na Tabela 4, são resumidos os resultados dos parâmetros da bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis*, sob a influência de diferentes temperaturas, em bateladas de 24 horas.

Tabela 4 - Resultados gerais referentes à bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico com diferentes temperaturas de processo (pH 6,4; X = 20 g/L; S₀ = 700 mmol/L; 24 h)

	Temperatura de processo (°C)				
	32	36	39	45	50
P _{max} (mmol/L)	466	590	615	585	565
ρ (%)	67	85	88	84	81
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	0,74	0,93	0,96	0,91	0,91
P _m (mmol/h)	4,16	5,37	5,62	5,31	5,12
q (mmol/g/h)	1,04	1,34	1,40	1,34	1,28
μ _{P,max} (mmol/g/h)	1,74	1,96	2,17	4,70	4,41
S _f (mmol/L)	160	24	23	29	50

P_{max}, concentração máxima de ácido maltobiônico; ρ, rendimento do processo; Y_{P/S0}, conversão em produto considerando substrato inicial; P_m, produtividade mássica; q, produtividade específica; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f, maltose residual.

A máxima velocidade específica de formação de produto obtida na temperatura de 50 °C foi inferior em relação a 45 °C, sendo que em temperaturas mais elevadas, o complexo enzimático GFOR/GL não tem sua atividade intensificada (Zachariou e Scopes. 1986). Isso pode ter estar relacionado à instabilidade da proteína frente à alta temperatura reacional ao longo do processo. Carra et al (2014), relatam que em temperaturas superiores a 47 °C ocorria a desnaturação da enzima, influenciando a produção de ácido lactobiônico.

Garin (2016), em estudos de produção de ácido maltobiônico frente à temperatura, concentração média de 590 mmol/L foi atingida a 39 °C, utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis*. Em temperaturas superiores, de 43 e 47 °C, o autor relata o aumento na velocidade específica de formação de produto e uma queda na concentração média de produto formado, o mesmo observado neste trabalho. Cabe ressaltar a utilização da temperatura de 39 °C para a bioconversão é a mais indicada, uma vez que não compromete a integridade do biocatalisador imobilizado.

Posteriormente, testes envolvendo diferentes valores de pH no processo de bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico foram realizados. As curvas de produção de ácido maltobiônico em diferentes pH da reação são exibidos na Figura 11.

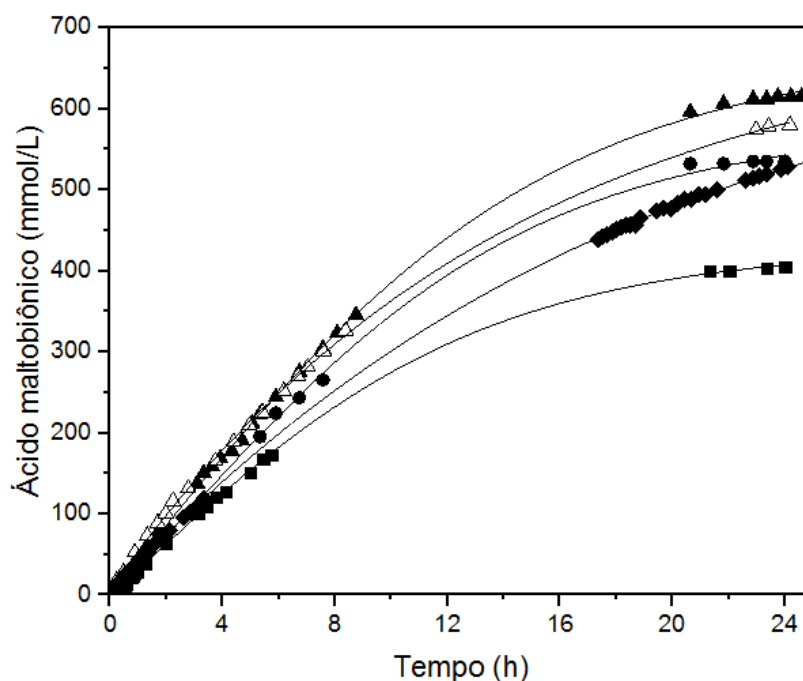


Figura 11 - Ácido maltobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes valores de pH no processo (■) 5,5 (●) 6,0 (▲) 6,4 (△) 7,0 (◆) 7,5 (39 °C; X = 20 g/L; S₀ = 700 mmol/L).

Com exceção da velocidade específica de formação de produto, os parâmetros como produtividade mássica e específica e concentração final de produto não diferiram entre si quando avaliadas as temperaturas entre 36 e 50 °C. Entretanto, na reação conduzida a 32 °C, todos os parâmetros da bioconversão avaliados foram inferiores, o que indica a influência da temperatura na reação catalisada enzimaticamente.

Na Tabela 5, são apresentados os valores gerais de produção de ácido maltobiônico utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis* obtidos frente aos diferentes valores de pH da reação de bioconversão.

Tabela 5 - Resultados gerais referentes à bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico em diferentes valores de pH (39 °C; X = 20 g/L; S₀ = 700 mmol/L; 24 h)

	pH da reação				
	5,5	6,0	6,4	7,0	7,5
P _{max} (mmol/L)	408	517	615	581	534
ρ (%)	58,5	74	88	83	76
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	0,645	0,80	0,96	0,94	0,83
P _m (mmol/h)	3,61	4,67	5,62	5,27	4,83
q (mmol/g/h)	0,9	1,16	1,40	1,32	1,21
μ _{P,max} (mmol/g/h)	1,63	2,93	2,17	2,30	1,83
S _f (mmol/L)	223	129	23	34	110

P_{max}, concentração máxima de ácido maltobiônico; ρ, rendimento do processo; Y_{P/S0}, conversão em produto considerando substrato inicial; P_m, produtividade mássica; q, produtividade específica; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f, maltose residual.

Assim como observado nos testes que visaram à avaliação da temperatura sobre a ação catalítica de GFOR/GL, a maior produção de ácido maltobiônico foi atingida na condição padrão, pH 6,4 (615 mmol/L). Com o aumento do pH no processo de bioconversão, a concentração máxima de produto foi também incrementada entre pH 5,5 até pH 6,4. Em pH 7,0 ou superior a concentração de produto formado diminuiu, sendo constatada uma queda na velocidade específica de formação de produto. Este resultado corrobora com os dados obtidos por Carra et al. (2015) e Malvessi et al. (2010), nos quais o processo controlado em pH 6,4 favoreceu os parâmetros de produtividade e rendimento.

De forma geral, a pequena diferença observada na produção de ácido maltobiônico nas condições de pH e temperatura avaliados pode estar relacionada com a faixa definida para a condução dos testes, não extrema. Um perfil de ação catalítica muito semelhante à observada nestes testes foi relatado por Carra et al. (2015), na avaliação da produção de ácido lactobiônico com *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. Nestas condições, a condução do processo na faixa entre pH 6,4 e 7,0 e temperatura de 39 °C dispensaria a necessidade de um controle mais acurado do pH durante a bioconversão. Estes dados sugerem, ainda, o efeito protetor do suporte, o que levaria à maior estabilidade catalítica das células/enzimas de *Z. mobilis* quando imobilizadas (Malvessi et al., 2010; Malvessi et al., 2013; Carra et al., 2014; Carra et al., 2015; Garin, 2016).

4.2 Ensaios de bioconversão de maltose em maltobionato de sódio e maltobionato de cálcio

A produção de diferentes sais de ácido maltobiônico é resultado da utilização de diferentes soluções alcalinas para o controle de pH da reação. Desta forma, no presente trabalho foi avaliada a produção de maltobionato de sódio e de maltobionato de cálcio,

utilizando a solução alcalina NaOH e de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em pó, respectivamente, para o controle do pH na bioconversão, em meio contendo maltose purificada.

A utilização de concentrações de maltose a partir de 700 mmol/L se deve à complementaridade de estudos realizados anteriormente (Garin, 2016) e em função dos resultados obtidos com o uso de xarope de maltose, limitados a 700 mmol/L. Esta avaliação foi realizada com o intuito de determinar a quantidade máxima de maltose que poderia ser utilizada na bioconversão que levasse ao aumento da concentração máxima de produto formado e dos outros parâmetros avaliativos globais do processo. Cabe ressaltar que a concentração máxima de maltose avaliada foi de 1500 mmol/L - associado à quantidade equimolar de frutose – e limitada também pela alta viscosidade da solução. O aumento da viscosidade envolveria problemas de transferência de massa considerando o uso de biocatalisador imobilizado na reação.

A produção tanto de maltobionato de cálcio quanto de maltobionato de sódio foi avaliada. Neste caso, cabe ressaltar que as razões estequiométricas nestas reações são diferentes, sendo que para a produção de maltobionato de sódio a razão é de 1:1 e para maltobionato de cálcio é de 2:1, levando em conta o ácido formado e a solução alcalina utilizada.

Na Figura 12 e na Figura 13 são exibidas as curvas de produção de maltobionato de cálcio e de maltobionato de sódio, respectivamente, utilizando diferentes concentrações de maltose, via ação do complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio. As reações de bioprodução com a utilização de 700 e 1000 mmol/L de maltose, para ambos os casos, tiveram duração média de 24 horas, sendo atingidos valores de rendimento superiores a 95%. Por outro lado, com o uso de 1500 mmol/L de substratos, o período médio para a obtenção de maior rendimento foi de cerca de 72 horas (Figuras 12 e 13).

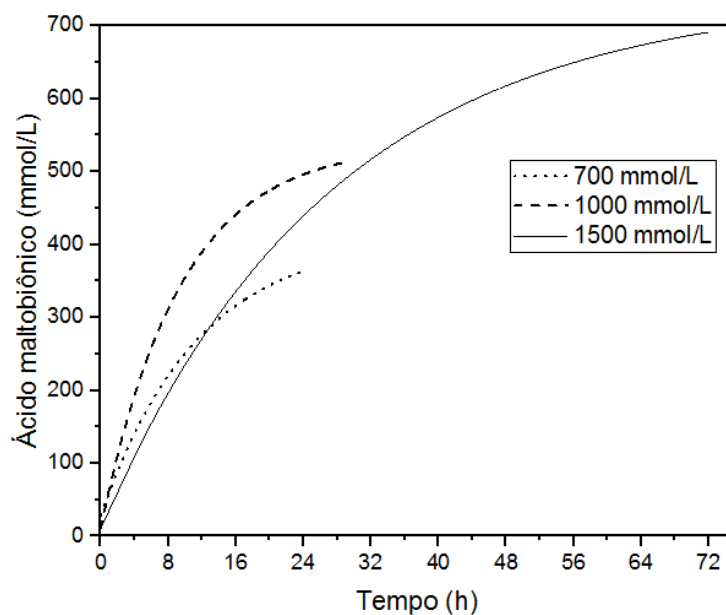


Figura 12 - Maltobionato de cálcio formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes concentrações de maltose e frutose (pH 6,4; 39 °C; X = 20 g/L)

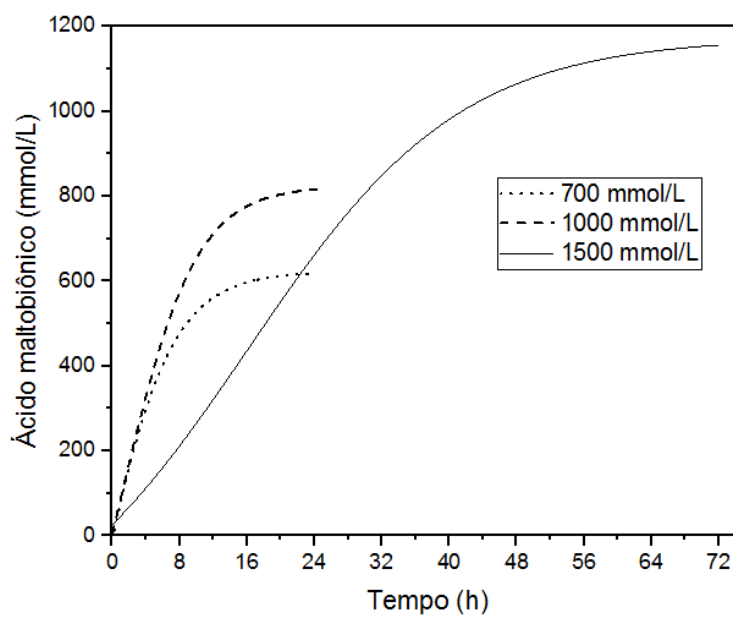


Figura 13 - Maltobionato de sódio formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando diferentes concentrações de maltose e frutose (pH 6,4; 39 °C; X = 20 g/L).

As concentrações médias obtidas para a produção de maltobionato de cálcio foram de 340, 513 e 688 mmol/L (Figura 12) e de maltobionato de sódio foram de 618, 868 e 1131 mmol/L, para as concentrações de maltose de 700, 1000 e 1500 mmol/L, respectivamente (Figura 13).

Os parâmetros de processo de produção de ambos os sais do ácido maltobiônico são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados gerais referentes à bioconversão de maltose em maltobionato de sódio e maltobionato de cálcio utilizando diferentes concentrações de substrato (pH 6,4; 39 °C; X = 20 g/L).

	Maltobionato de cálcio			Maltobionato de sódio		
	Concentração de substrato (mmol/L)					
	700	1000	1500	700	1000	1500
P_{\max} (mmol/L)	340	513	688	618	868	1131
t (h)	24	26	72	24	28	72
ρ (%)	92	98	87	83	82	71
Y_{P/S_0} (mmol/mmol)	0,97	0,99	0,92	0,97	0,99	0,91
p (mmol/h)	2,9	3,66	1,91	5,67	8,25	3,77
q (mmol/g/h)	0,73	0,91	0,48	1,41	2,06	0,94
$\mu_{P,\max}$ (mmol/g/h)	3,03	3,80	1,34	4,06	5,24	1,73
S_f (mmol/L)	1,05	0	122	17	8	116

P_{\max} , concentração máxima de ácido maltobiônico; ρ , rendimento do processo; Y_{P/S_0} , conversão em produto considerando substrato inicial; P_m , produtividade mássica; q, produtividade específica; $\mu_{P,\max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , maltose residual.

Como observado na Tabela 6, os resultados foram obtidos em tempos diferentes, sendo o processo encerrado quando estabilizado o consumo de solução alcalina. Cabe destacar o rendimento para a produção de maltobionato de cálcio utilizando 1000 mmol/L de substratos, chegando ao valor de 98%. As maiores produtividades mássica e específica foram observadas com o uso de 1000 mmol/L de maltose, para ambos os casos, assim como a menor quantidade de maltose residual foi determinada. Os maiores valores de máxima velocidade específica de formação de produto também foram observados com 1000 mmol/L de substrato inicial. Isto corrobora o fato de que nestas condições, as produtividades são maiores, aumentando a capacidade de produção de ácido maltobiônico na reação. Para a concentração de maltose de 1500 mmol/L, a redução da produtividade mássica e específica pode estar vinculada também aos efeitos de relação enzima/substrato, além das questões de transferência de massa apontadas anteriormente.

Os perfis de velocidade específica de formação de produto em função da concentração de maltose são apresentados na Figura 14, tanto para o maltobionato de cálcio como para o maltobionato de sódio. Observa-se que ao longo do processo com a concentração de maltose de 1000 mmol/L, a velocidade específica de formação de produto alcançada foi superior às demais concentrações de maltose testadas, apresentando um perfil linear em ambos os casos. Os valores máximos das velocidades, para ambos os casos, foram apresentados na Tabela 6. Para as concentrações de 700 mmol/L, observa-se que para ambos os casos, os perfis não apresentaram comportamento linear. Para a concentração de 1500 mmol/L na formação de maltobionato de sódio (Figura 14B), observou-se que a velocidade máxima foi atingida quando a concentração de maltose estava próxima a 1000 mmol/L. Na produção de maltobionato de cálcio (Figura 14A), observa-se o perfil linear da velocidade de formação de produto, sendo que não foi observado o mesmo comportamento na produção de maltobionato de sódio.

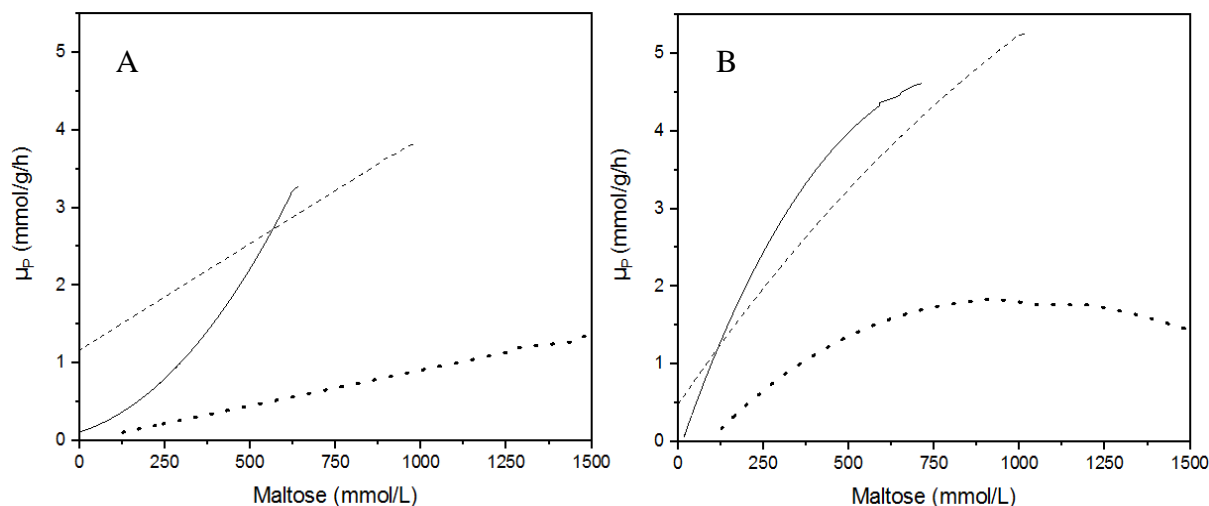


Figura 14 - Velocidade específica de formação de maltobionato de cálcio [A] e maltobionato de sódio [B] em função da concentração de maltose usada na bioconversão (—) 700 mmol/L; (···) 1000 mmol/L; (---) 1500 mmol/L (pH 6,4; 39 °C; X = 20 g/L).

No intuito de aumentar a concentração de substrato na reação e, conseqüentemente, a formação de produto, Folle et al. (2018) relatam a realização de bateladas alimentadas de bioconversão envolvendo a produção de lactobionato de sódio por células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Os parâmetros avaliativos de processo foram comparados em regime descontínuo e descontínuo alimentado, sendo observada a redução da produtividade mássica de 22 para 17 mmol/L/h, relacionada ao longo tempo de processo, de 24 e 42 horas, respectivamente. A concentração de produto formado aumentou de 530 para 754 mmol/L sem que os demais parâmetros fossem alterados significativamente, mostrando a possibilidade para o escalonamento industrial deste processo.

Como observado na Figura 14, os melhores resultados para os parâmetros de produção foram atingidos utilizando 1000 mmol/L de maltose purificada. Este resultado mostra o aumento nos parâmetros de processo para a obtenção de maltobionato de sódio e de cálcio, sendo que a produtividade e a velocidade de formação de produto foram favorecidas utilizando esta concentração.

4.3 Purificação do maltobionato de sódio e maltobionato de cálcio

A etapa de purificação dos sais de ácido maltobiônico, posterior à bioconversão, foi avaliada com o intuito de obter compostos com alto grau de pureza, considerando a potencial aplicação destes na indústria farmacêutica e de alimentos.

No Quadro 1 são apresentados os resultados comparativos do uso dos diferentes solventes orgânicos na purificação do maltobionato de sódio e de cálcio presentes no caldo final da bioconversão. A utilização de solventes como metanol, etanol, 2-propanol, isopropanol, entre outros, é relatada para a purificação e recuperação de sais orgânicos, os quais apresentam influência sobre a solubilidade dos compostos envolvidos na reação (Isbell e Schaffer, 1957; Silveira et al., 2007).

No caso da utilização da acetona, além da identificação de precipitado, duas fases líquidas distintas também foram visualizadas. Para o isopropanol, foi identificada um pouco de precipitação, em proporção inferior à observada com o uso de metanol e etanol. Os demais solventes avaliados não ocasionaram diferença visual, sendo totalmente miscíveis com o caldo da bioconversão, portanto não foram investigados ao longo deste trabalho.

Resultados positivos em termos de utilização de etanol e metanol foram também observados na recuperação de lactobionato de sódio e de cálcio. Carra (2012) e Delagustin et al. (2017) relatam o uso do etanol 75% (v/v) para a obtenção de lactobionato de sódio e de cálcio com graus de pureza superiores a 95%.

Garin (2016) relata o uso do etanol na purificação de maltobionato de sódio, obtendo pureza média de 90%.

Quadro 1 - Utilização de solventes orgânicos na separação dos sais de ácido maltobiônico presentes no caldo final da bioconversão.

Solvente	Maltobionato de sódio	Maltobionato de cálcio	Características
Metanol	+	+	Fase líquida e com precipitado de coloração branca
Etanol	+	+	Fase líquida e com precipitado de coloração branca
Isopropanol	+/-	+/-	Precipitado de coloração branca (aspecto gelatinoso)
Butanol	-	-	Sem diferenças na fase líquida
4-metil-2-pentanol	-	-	Sem diferenças na fase líquida
Acetilacetona	-	-	Sem diferenças na fase líquida, com coloração amarelada
Acetona	+/-	+/-	Dois fases líquidas distintas
Ácido acético glacial	-	-	Sem diferenças na fase líquida
Clorofórmio	-	-	Sem diferenças na fase líquida

+, formação de precipitado; -, sem alteração na mistura; +/-, alteração de fase, com baixa formação de precipitado.

A partir dos resultados mostrados no Quadro 1, foram testados os solventes que proporcionaram a obtenção de melhores resultados no processo de purificação do sal de ácido maltobiônico, sendo estes o metanol (99,8%, Neon LTDA., Brasil) e o etanol (99,5%, Neon LTDA., Brasil), ambos na concentração de 90% (v/v) em solução.

Os perfis cromatográficos das primeiras precipitações com etanol e metanol para a purificação do maltobionato de cálcio são apresentados na Figura 15.

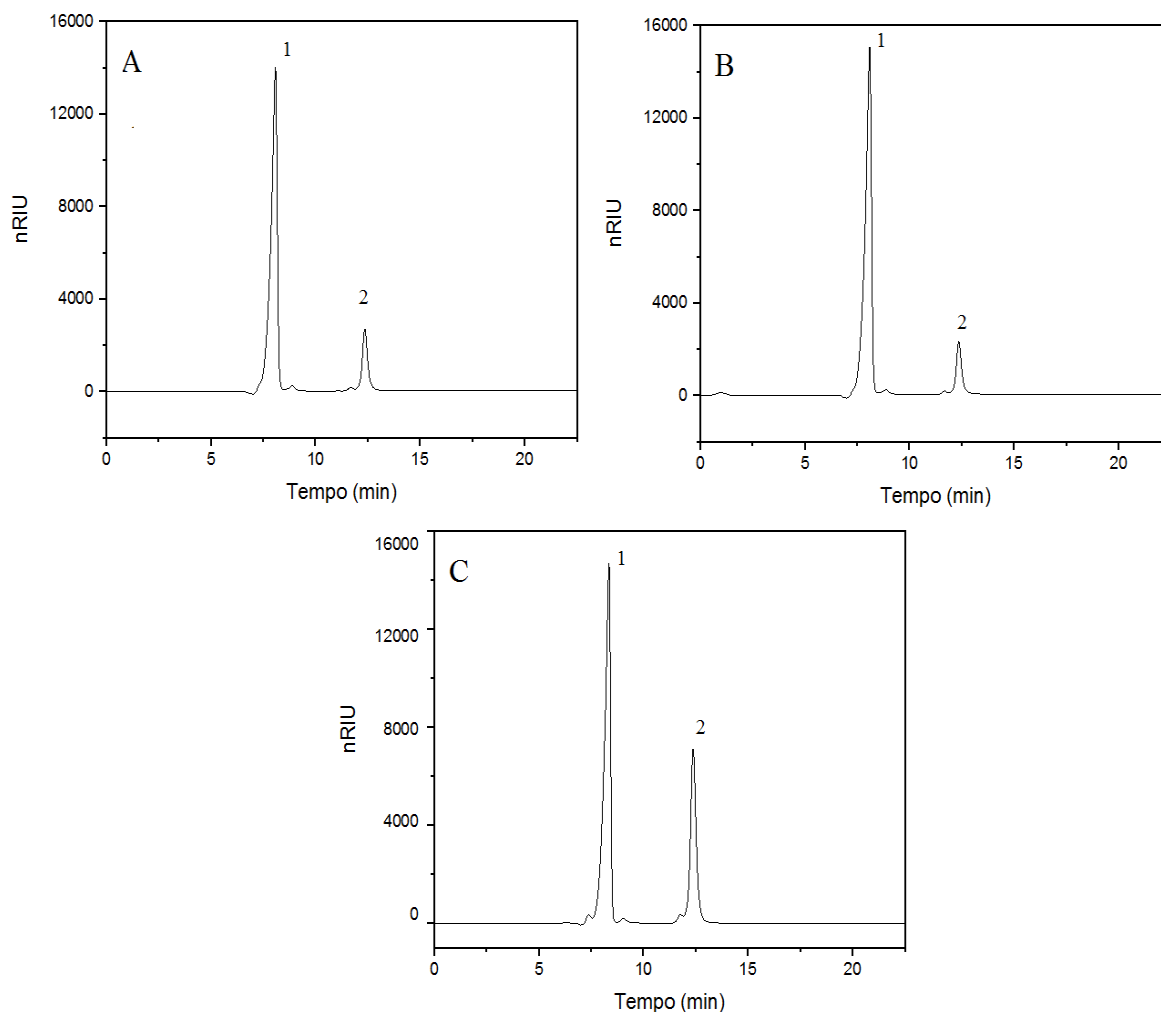


Figura 15 - Perfil da separação cromatográfica do sal do ácido maltobiônico e sorbitol obtidos após uma precipitação utilizando etanol 90% (v/v) [A] ou metanol 90% (v/v) [B] em relação ao caldo de bioconversão contendo maltobionato de cálcio [C]. (1) sal do ácido maltobiônico; (2) sorbitol. (Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C).

O caldo ao final da bioconversão, tanto de maltobionato de sódio quanto de maltobionato de cálcio, foi avaliado anterior e posteriormente à purificação por CLAE, partindo de valores de concentração de 230 g/L para o sal do ácido maltobiônico e 90 g/L de sorbitol, em ambos os casos. As concentrações de substratos residuais, maltose e frutose, eram inferiores a 10 g/L, considerando o rendimento final da bioconversão em questão,

superior a 95%. Nos perfis cromatográficos apresentados nas Figuras 15A e 15B, observa-se a diminuição da intensidade do pico correspondente ao sorbitol promovido após uma precipitação com os solventes.

Na Tabela 7, são mostrados os percentuais de recuperação de cada composto do caldo de bioconversão referente à primeira precipitação utilizando metanol e etanol e para ambos os maltobionatos testados.

Tabela 7 - Quantificação de produtos e de substratos residuais do caldo resultante da bioprodução de maltobionato de sódio ou maltobionato de cálcio, após a primeira purificação (concentração de solvente 90% v/v, fluxo de 10 mL/min, 22 ± 2 °C).

Amostra	Etanol			
	Sal (%)	Sorbitol (%)	Maltose (%)	Frutose (%)
Maltobionato de sódio	79	20	1	0
Maltobionato de cálcio	82	17	1	0
Amostra	Metanol			
	Sal (%)	Sorbitol (%)	Maltose (%)	Frutose (%)
Maltobionato de sódio	84	14	2	0
Maltobionato de cálcio	85	13	2	0

Para ambos os casos, a recuperação total dos produtos foi de cerca de 80% na primeira precipitação, resultado semelhante aos obtidos por Carra (2012) e Delagustin et al. (2017) para a purificação dos sais do ácido lactobiônico. A quantidade de frutose ao final da primeira purificação do caldo proveniente da produção de maltobionato de sódio foi nula, sendo que a frutose possui maior solubilidade nestes dois solventes do que os demais compostos presentes no respectivo caldo de bioconversão (Farmacopeia Europeia, 2009). A maltose e o sorbitol são pouco solúveis nestes solventes, sendo necessária a realização de até

três precipitações sucessivas para que pureza próxima a 99% seja atingida para o sal do ácido maltobiônico. O maltobionato de sódio e o maltobionato de cálcio são praticamente insolúveis nestes solventes, assim como os sais do ácido lactobiônico, sendo então indicada a separação por este método.

Como observado, tanto metanol como etanol são eficazes na separação do sal de ácido maltobiônico dos demais compostos da bioconversão. Levando em conta a secagem dos sais, a qual foi realizada para a preparação das amostras dos sais de ácido maltobiônico, a utilização do metanol teria vantagens sobre o etanol em função do seu menor ponto de ebulição (64,5 °C) quando comparado com o etanol (78,4 °C). Nesta etapa, a secagem dos sais foi realizada na estufa, com a finalidade da fácil estocagem, diminuição da chance de contaminação por microrganismos e também a facilidade de manuseio. Com a secagem, as amostras que foram precipitadas com metanol apresentavam aspecto de pequenos cristais, em pó, enquanto as precipitadas com etanol ficaram com aspecto de gel, necessitando de tempo mais prolongado (48h/metanol e 96h/etanol) e temperatura superior (50 °C/metanol e 65 °C etanol) para a devida secagem e formação de cristais.

Na sequência, foi avaliada a concentração dos solventes para que fosse atingido o maior grau de pureza e, da mesma forma, a menor quantidade de solvente na precipitação. Para isso, foram avaliadas as concentrações de 60, 70, 80 e 90%, valores baseados na concentração de metanol relatada na literatura para a precipitação do ácido glicônico (Jonas e Silveira, 2004).

Na Tabela 8, são mostrados os valores correspondentes à purificação, nas concentrações testadas, utilizando metanol como solvente e na Tabela 9, os resultados obtidos na purificação utilizando etanol. Salienta-se que a eficiência da recuperação, neste caso, para o metanol ficou na média de 80% e para o etanol em 70%. Esta avaliação foi realizada por gravimetria, analisado pela massa seca do material. Neste caso, a eficiência foi

avaliada levando em conta a quantidade esperada na recuperação, levando em conta a pureza, em gramas pela quantidade final obtida após a precipitação, em gramas.

Tabela 8 - Quantificação dos produtos e substratos residuais do caldo da bioconversão em maltobionato de sódio ou maltobionato de cálcio, após a primeira purificação com o uso de diferentes concentrações de metanol (fluxo de 10 mL/min, 22 ± 2 °C)

Metanol (%) (v/v)	Maltobionato de cálcio (%)				Maltobionato de sódio (%)			
	Sal	Sorbitol	Maltose	Frutose	Sal	Sorbitol	Maltose	Frutose
60	74	20	4	2	73	20	4	3
70	77	17	4	2	77	18	4	1
80	82	13	3	2	82	13	3	2
90	85	13	2	0	84	14	2	0

Na Tabela 8, observa-se que o aumento da concentração de metanol influenciou positivamente os resultados de purificação dos sais do ácido maltobiônico. Em ambos, maltobionato de cálcio e sódio, os valores obtidos para as concentrações de 80% e 90% (v/v) foram superiores, uma vez que a quantidade de maltose e sorbitol recuperadas foram menores, influenciando nas precipitações consecutivas que garantem o elevado grau de pureza do composto.os

Na Tabela 9, são identificados os resultados de purificação com diferentes concentrações de etanol. A purificação do maltobionato de sódio foi mais instável do que para o maltobionato de cálcio, resultado de uma camada de gel formada após a secagem do maltobionato de sódio. Este aspecto gelatinoso foi observado por Delagustin (2016), que também relata a obtenção de grau de pureza levemente superior para o lactobionato de cálcio quando comparado aos outros sais do ácido lactobiônico. Com base nesta proposição, pode-

se destacar a baixa solubilidade de compostos a base de cálcio em água, o que auxilia na secagem do material, tornando-o, ainda, mais estável (Harris, 2005).

Tabela 9 - Quantificação dos produtos e substratos residuais do caldo da bioconversão em maltobionato de sódio ou maltobionato de cálcio após a primeira purificação em diferentes concentrações de etanol (fluxo de 10 mL/min, 22 ± 2 °C)

Concentração de etanol (%)	Maltobionato de cálcio (%)				Maltobionato de sódio (%)			
	Sal	Sorbitol	Maltose	Frutose	Sal	Sorbitol	Maltose	Frutose
60	73	20	4	3	71	22	4	3
70	78	17	3	2	74	20	4	3
80	80	15	3	2	78	19	2	1
90	82	17	1	0	79	20	1	0

Na continuidade dos testes, foi avaliado o efeito da temperatura na etapa de purificação em três condições experimentais, designadas temperatura baixa (5 ± 2 °C), temperatura ambiente (22 ± 2 °C) e temperatura alta (40 ± 2 °C). A temperatura alta foi escolhida para que a evaporação do metanol e etanol não influenciasse a concentração final da solução (precipitado + sobrenadante). A amostra avaliada foi de maltobionato de cálcio, usando metanol 80% como solvente, condição definida a partir dos testes anteriores.

Na Tabela 10, apresentam-se os resultados da purificação do maltobionato de cálcio após uma precipitação utilizando metanol 80% como solvente, em diferentes temperaturas operacionais.

Tabela 10 - Quantificação dos produtos e substratos residuais do caldo da bioconversão de maltose purificada em maltobionato de cálcio, após a primeira purificação com metanol 80% (v/v) em diferentes temperaturas (fluxo de 10 mL/min).

Temperatura de processo	Maltobionato de cálcio (%)			
	Sal	Sorbitol	Maltose	Frutose
$5 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$	84	12	3	1
$22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$	83	12	3	2
$40 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$	84	12	3	1

Pode ser observada, na Tabela 10, a similaridade dos resultados quando avaliadas as temperaturas da reação de precipitação. Neste caso, considerando os custos que poderiam estar envolvidos com aquecimento ou resfriamento, a purificação do referido composto sendo executada a temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$) seria vantajosa. Este aspecto pode ser justificado, uma vez que o sal do ácido maltobiônico não apresenta alterações em termos de solubilidade quando exposto à diferentes faixas de temperatura, como avaliado no item 4.6.3.

Para garantir maior grau de pureza dos sais, foram realizadas precipitações consecutivas, para a completa separação entre o sal e o sorbitol remanescente. Ao final de três precipitações, detectou-se o elevado grau de pureza de ambos maltobionato de cálcio e maltobionato de sódio, superior a 99%, o que indica a eficiência do método de purificação empregado.

Na Figura 16, são apresentados os perfis cromatográficos dos sais do ácido maltobiônico após três precipitações consecutivas com metanol 80% como solvente e em temperatura de $22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$.

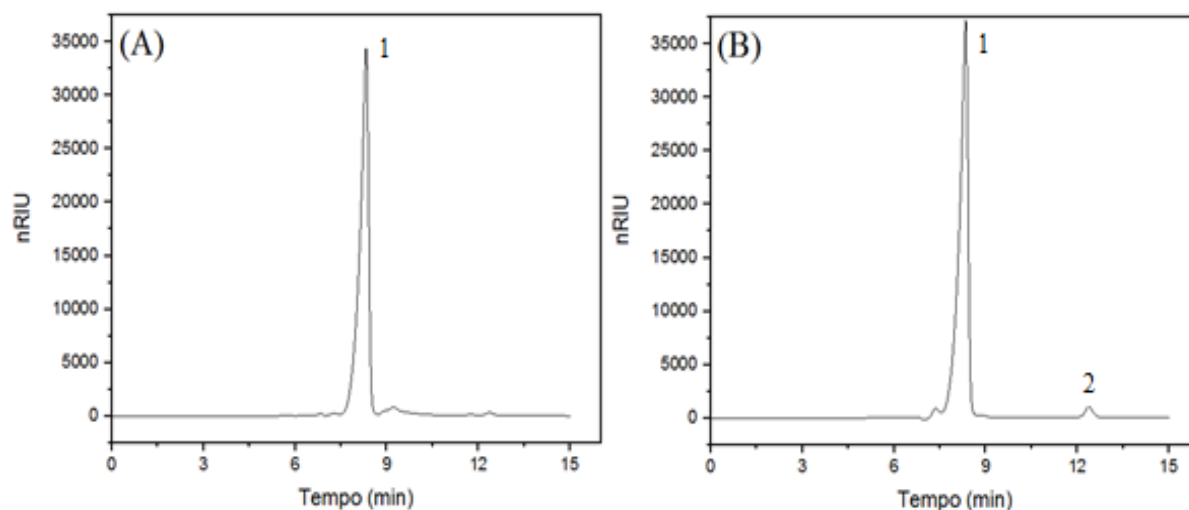


Figura 16 - Perfil da separação cromatográfica do maltobionato de cálcio [A] e maltobionato de sódio [B] depois de três precipitações consecutivas utilizando metanol 80%, a 22 ± 2 °C. (1) sal do ácido maltobiônico; (2) sorbitol. (Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C).

De acordo com os perfis cromatográficos apresentados na Figura 16, o resultado foi a obtenção de produtos de elevado grau de pureza. Dá-se destaque para o maltobionato de cálcio (Figura 16A), detectado em tempo de retenção de 8,5 min e sem a identificação de outros compostos no cromatograma, sendo sua pureza superior a 99%. Para o maltobionato de sódio, cromatograma apresentado na Figura 16B, observa-se a eluição em 8,5 min, sendo também detectada quantidade mínima de sorbitol, sendo a pureza final de maltobionato de 98%.

Considerando com os resultados apresentados, a utilização de ambos os solventes garante a obtenção de elevado grau de pureza e a quantidade de produto recuperado foi superior a 70%, utilizando o etanol e 80% utilizando o metanol. Após três precipitações, a pureza do sal foi superior a 98%, sendo que este processo pode ser realizado em temperatura ambiente (22 ± 2 °C), que não acarreta em custos ao processo.

4.4 Troca iônica para obtenção do ácido maltobiônico

Concluída a purificação dos sais de ácido maltobiônico, foi realizada a etapa de troca iônica, com a finalidade de converter o sal para sua forma ácida. Este processo de troca iônica é importante, uma vez que em formulações cosméticas e farmacêuticas são utilizados estes compostos em pH em torno de 3,8 (Farmacopeia Brasileira, 2010). Foi utilizada, neste teste, a resina catiônica a base de hidrogênio, na qual foi avaliada a mudança do pH da solução contendo o sal de acordo com a quantidade adicionada de resina. Na Figura 17, é apresentado o perfil da troca iônica, relacionando os valores do inverso do pH pela massa de resina adicionada na solução.

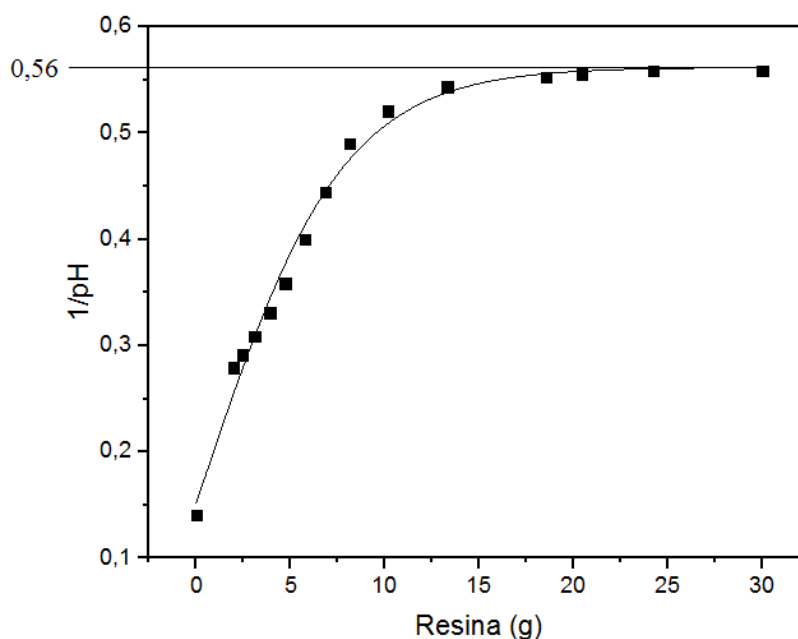


Figura 17 - Variação do pH em função da quantidade de resina catiônica a base de hidrogênio usada para a conversão de maltobionato de sódio ou de cálcio para ácido maltobiônico. (■) pontos experimentais; (—) ajuste sigmoide.

Pode-se observar, na Figura 17, que a quantidade de resina influenciou diretamente o pH. A quantidade de maltobionato de cálcio ou de sódio foi mantida em 5g. O pH inicial da

solução contendo o sal do ácido maltobiônico era pH 7 e, na medida que a resina foi sendo adicionada à solução, observou-se a queda do pH, até ser atingido o valor constante de pH 1,78. A massa máxima de resina utilizada foi de 30g, seis vezes superior à da solução de maltobionato, sendo que o aumento da quantidade de resina não proporcionou a alteração do pH.

A metade do valor do máximo pH atingido, no caso, o valor do inverso do pH no qual o composto está 50% ionizado poderia ser relacionado ao valor do pK_a do ácido (Pathare et al., 2014). O valor definido para o pK_a do ácido maltobiônico, neste caso, seria de 3,5. De toda forma, a utilização da resina catiônica à base de hidrogênio proporcionou a conversão total do sal do ácido maltobiônico para sua forma ácida, independentemente se utilizado maltobionato de sódio ou de cálcio, comprovado pela mudança do pH da amostra.

4.5 Secagem do ácido maltobiônico

O procedimento de secagem do ácido maltobiônico foi avaliado sob três condições distintas: por *spray dryer*, liofilização ou secagem em estufa a 60 °C. Dentre as condições testadas, o menor tempo de secagem foi obtido com o uso de *spray dryer*, com secagem praticamente instantânea, atribuída à condição operacional do equipamento. A presença de adjuvante na etapa de secagem foi necessária uma vez que este composto possui alta higroscopicidade (Brouda et al., 2010; Baldwin et al., 2010; Barcelos et al., 2014).

Primeiramente, foi realizado um teste de secagem do ácido maltobiônico, sem a adição de adjuvantes, sendo que o material ficou na forma de gel e totalmente retido no equipamento. Neste contexto, foi avaliada a adição de 1% (m/m) de maltodextrina, 1% (m/m) de lactose ou 1% (m/m) de maltose como adjuvantes de secagem do ácido maltobiônico, considerando que a presença destes compostos não comprometeria o uso do

ácido maltobiônico como matéria-prima para fármacos ou cosméticos (Vaniski et al., 2017; Sena et al., 2018). Com a adição dos adjuvantes, foi observada a completa secagem do ácido maltobiônico nas três misturas propostas, com aparência final na forma de pó branco cristalino. Entretanto, a recuperação das amostras foi desfavorecida, uma vez que a maior parte do material ficou retida nas paredes do equipamento, mesmo utilizando os adjuvantes de secagem. Na Figura 18, é apresentado o perfil cromatográfico das três misturas contendo os adjuvantes, após a secagem por *spray dryer*, onde todos os compostos presentes na amostra foram detectados.

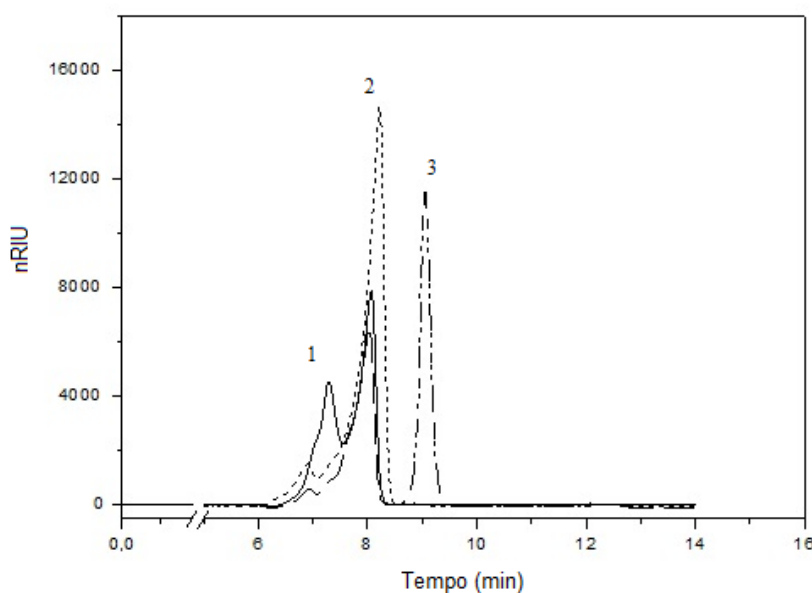


Figura 18 - Perfil da separação cromatográfica de amostras de ácido maltobiônico secas por *spray dryer* na presença dos adjuvantes (—) maltodextrina, (···) maltose e (---) lactose. (1) maltodextrina; (2) ácido maltobiônico; (3) lactose e maltose. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C.

A utilização de adjuvantes pode ser uma alternativa para auxiliar na secagem do ácido maltobiônico por *spray dryer*, com vantagens quando comparado aos demais métodos. Estas vantagens seriam a rapidez na qual o material é seco, a uniformidade das partículas, o baixo tempo de exposição da amostra a elevadas temperaturas, entre outros (Barcelos et al.,

2014). Como desvantagens, pode se destacar a quantidade de produto que fica retida no equipamento, diminuindo a eficiência da recuperação por este método.

Na secagem por liofilização, por sua vez, não foi necessária a incorporação de adjuvantes na amostra, com a obtenção de alto grau de pureza, como observado na Figura 19. Entretanto, o tempo empregado para a devida secagem no equipamento de liofilização foi de 48 horas.

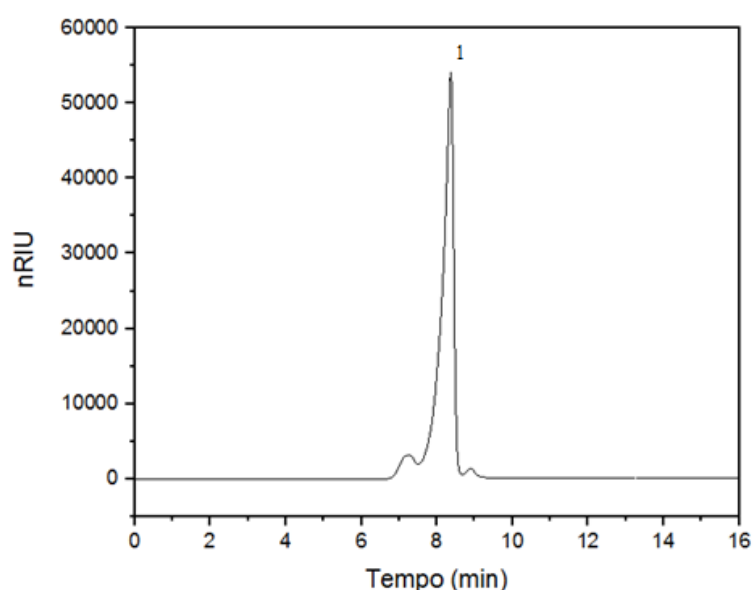


Figura 19 - Perfil da separação cromatográfica da amostra de (1) ácido maltobiônico seca por liofilização. Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C.

Dependendo da aplicação, ambos os métodos podem ser realizados para a secagem do ácido maltobiônico, com a obtenção de um composto mais puro - obtido em maior período de secagem, no caso da liofilização - ou com composto com outros compostos em sua formulação, devido a adição de adjuvantes de secagem, porém com alta velocidade de secagem, no caso do uso de *spray dryer*.

Com relação à secagem das amostras de ácido maltobiônico em estufa, aspecto de matriz gelatinosa e coloração caramelo foi observada após 7 dias de exposição a 60 °C, que

pode estar relacionado ao alto poder umectante do ácido (Brouda et al., 2010), não sendo, portanto, a condição mais indicada para a secagem do composto ácido.

Na sequência, foi feita a avaliação quanto à higroscopicidade, levando em conta a quantidade de água absorvida nas amostras. Foram avaliadas as amostras de ácido maltobiônico secas por *spray dryer* e por liofilização, além da amostra de maltobionato de cálcio seca na estufa, usada como forma de comparação entre a forma ácida e forma de sal do produto. Na Figura 20, são apresentados os valores gerais obtidos nos testes de higroscopicidade. O teor de umidade absorvido foi identificado, sendo que quanto maior o teor de umidade, mais alta é a higroscopicidade do composto (Callahan et al., 2008).

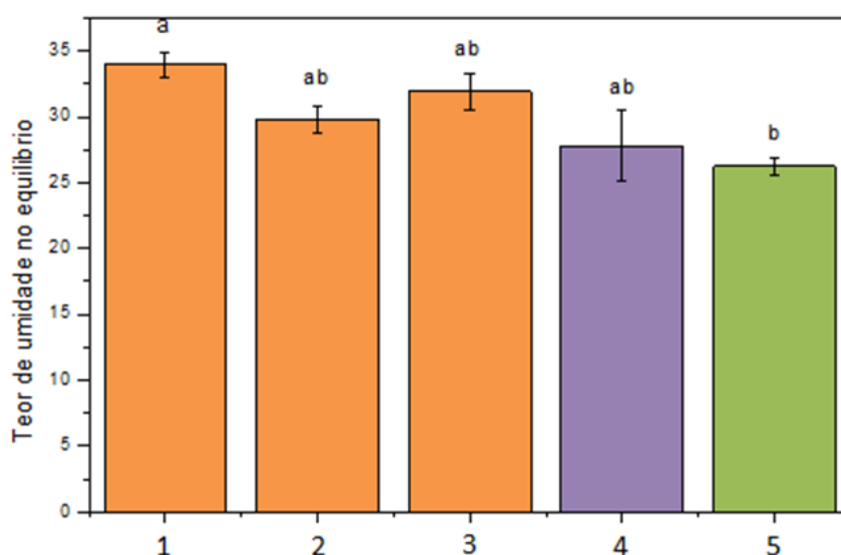


Figura 20 - Resultados dos testes de higroscopicidade para as amostras de ácido maltobiônico + 1% maltodextrina (1); ácido maltobiônico + 1% lactose (2); ácido maltobiônico + 1% maltose (3); ácido maltobiônico (4); maltobionato de cálcio (5). Barras de cor laranja, compostos secos por *spray dryer*; cor roxa, por liofilização; cor verde, por estufa.

Como observado na Figura 20, a amostra de ácido maltobiônico + 1% de maltodextrina (1) resultou em maior higroscopicidade do que o composto na forma de sal (5). As demais amostras não mostraram diferenças significativas entre si. Nas amostras

contendo os adjuvantes de secagem, por *spray dryer*, maior teor de umidade foi observado em relação à amostra seca por liofilização, o que pode estar relacionado pela diferença no método de secagem, um envolvendo baixas temperaturas e o outro envolvendo elevadas temperaturas. Nos testes gravimétricos, as amostras secas por *spray dryer* apresentaram menor teor de umidade inicial (média de 5%) do que as amostras do liofilizador (média de 10%). Neste caso, todos compostos foram classificados como higroscópicos, seguindo o preconizado pela Farmacopeia Europeia (2009).

4.6 Caracterização do ácido maltobiônico e seus sais

A caracterização do ácido maltobiônico e seus sais foi realizada com a finalidade de contribuir com a restrita quantidade de informações sobre estes compostos na literatura especializada. As amostras avaliadas foram o ácido maltobiônico (1) e seus sais, maltobionato de cálcio (2) e maltobionato de sódio (3), obtidos em meio de bioconversão contendo maltose e, também, com o uso de xarope de maltose. No caso do xarope, a caracterização foi avaliada tendo em vista a composição mais complexa deste substrato, com as amostras na forma salina, maltobionato de cálcio (4) e maltobionato de sódio (5).

4.6.1 Validação do método de quantificação dos substratos e produtos da bioconversão

A validação do método de análise por CLAE foi realizada com a finalidade de avaliar a eficiência e rapidez do método para a quantificação dos substratos e produtos da bioconversão, uma vez que o método propõe a determinação da concentração de ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol conjuntamente (Carra, 2012; Pedruzzi et al., 2007). Para esta metodologia de separação dos substratos e dos produtos, foi utilizada a coluna de

troca iônica Aminex HPX-87H, composta pelo copolímero estireno-divinilbenzeno sulfonado (S-Sty-DVB). Segundo dados do fabricante, este material é apropriado para a separação de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois. A fase móvel utilizada neste caso foi ácido sulfúrico 5 mmol/L, de acordo com o fabricante (Bio-Rad Laboratories Inc., 2018).

Cabe ressaltar que o ácido maltobiônico utilizado como padrão primário nesta validação foi obtido no desenvolvimento experimental deste trabalho. A amostra foi submetida às etapas de purificação aqui relatadas para que o resultado fosse um composto com alto grau de pureza. Para os demais compostos envolvidos - a frutose, a maltose e o sorbitol - foram utilizados reagentes disponíveis comercialmente. Seguindo o preconizado pela Anvisa (Brasil, 2003), o primeiro parâmetro apresentado foi a especificidade e a seletividade, sendo possível observar, distintamente, a eluição dos compostos. Na Figura 21, são apresentados os perfis de separação cromatográfica das amostras de ácido maltobiônico e seus sais, além de maltose, frutose e sorbitol.

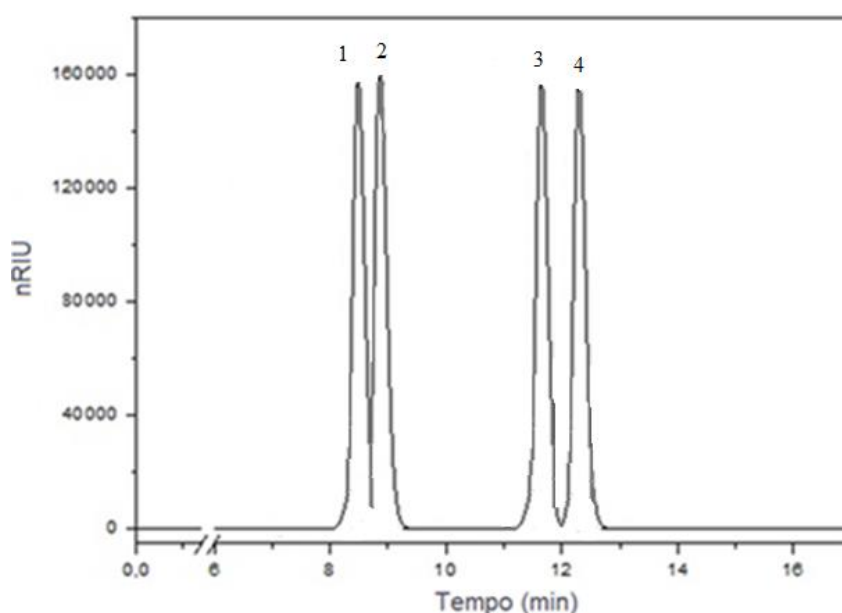


Figura 21 - Perfil da separação cromatográfica obtida por CLAE da amostra da solução padrão. Ácido maltobiônico (1); maltose (2); frutose (3); sorbitol (4). Coluna Aminex HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,6 mL/min, 60 °C, volume da amostra injetado, 5 μL , detector de índice de refração.

Os compostos envolvidos na bioconversão foram detectados, na sequência de ácido maltobiônico e/ou sais - maltobionato (8,5 min), maltose (8,9 min), frutose (11,3 min) e sorbitol (12,3 min). O método também é aplicável para a identificação de amostras relativas à bioprodução de ácido lactobiônico, excetuando a presença de maltose por lactose (Pedruzzi et al, 2007; Carra, 2012; Delagustin et al., 2017). O método possui seletividade e especificidade, fornecendo a medição distinta da concentração dos quatro compostos da solução padrão, podendo-se utilizar, para esta determinação, a medida da altura dos picos cromatográficos.

Para a validação do método também foi avaliada a linearidade, cujos resultados são diretamente proporcionais à concentração dos compostos presentes na amostra (Brasil, 2003). A relação linear foi avaliada utilizando sete soluções de concentrações diferentes da amostra padrão - entre 0,5 e 10 g/L. As determinações foram realizadas em triplicata, em três dias consecutivos. Na Tabela 11, são apresentados os valores obtidos para a linearidade da solução padrão contendo ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol, em diferentes concentrações, assim como o desvio padrão relativo.

Tabela 11 - Parâmetros de linearidade para as substâncias de referência - ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol - analisadas por cromatografia em fase líquida.

Analito/deteccção	r²	a	b	DPR (%)
Ácido maltobiônico	0,999	591,39	-68,04	0,96
Maltose	0,999	-470,74	5035,44	0,57
Frutose	0,999	-9,77	5176,23	1,33
Sorbitol	0,999	-68,04	4758,43	0,15

r², coeficiente de regressão linear; a, coeficiente linear; b, coeficiente angular; DPR, desvio padrão relativo

As curvas de calibração obtidas para todos os compostos avaliados foram lineares na faixa de concentração entre 0,5 e 10 g/L. Como observado, os valores de coeficiente da regressão (r^2) calculados foram $\geq 0,999$ e o DPR foi inferior a 5%, como preconizado pela Anvisa (Brasil, 2003). Os dados indicam a proporcionalidade em termos de concentração do analito na mistura.

Os parâmetros avaliados na sequência foram os limites de detecção (LD), relativo à menor quantidade de determinado composto capaz de ser detectado na amostra, e o limite de quantificação (LQ), ou seja, a menor concentração possível na qual se pode quantificar com precisão e exatidão na amostra. Na Tabela 12, são apresentados os resultados para LD e LQ, obtidos a partir da solução padrão contendo ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol.

Tabela 12 - Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para as substâncias de referência - ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol - analisadas por cromatografia em fase líquida.

Analito/deteccção	LD (g/L)	LQ (g/L)
Ácido maltobiônico	0,03	0,10
Maltose	0,16	0,48
Frutose	0,04	0,13
Sorbitol	0,03	0,08

LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação

Os valores de LD e LQ são importantes parâmetros para a determinação da faixa de concentração para todos os compostos e que, neste caso, foi inferior à faixa definida para os testes. Conforme observado na Tabela 12, concentrações superiores a 0,5 g/L (valor mínimo da curva padrão) podem ser detectados e quantificados nas condições estabelecidas para a

análise cromatográfica. Desta forma, a confiabilidade em termos de preparo das amostras a serem quantificadas é melhorada, respeitando os limites propostos nesta etapa da validação.

Na Tabela 13, são apresentados os resultados dos parâmetros de repetibilidade e a precisão intermediária do método. A repetibilidade foi avaliada em três dias, nos quais as concentrações medidas experimentalmente neste período devem se aproximar das concentrações teóricas. Os testes de precisão intermediária foram analisados utilizando as normas propostas pela Anvisa (Brasil, 2003), avaliados em dois dias consecutivos.

Tabela 13 - Repetibilidade e precisão intermediária para as substâncias de referência - ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol - analisadas por cromatografia em fase líquida, em diferentes concentrações.

Analito	Concentração	Repetibilidade	Precisão intermediária
	teórica (g/L)	DPR (%)	DPR (%)
Ácido maltobiônico	1,94	0,89	1,06
	4,78	0,03	0,58
	9,43	0,01	0,95
Maltose	2,02	0,16	0,02
	4,96	0,06	1,49
	9,78	0,03	0,48
Frutose	1,89	0,17	0,50
	4,69	0,01	0,55
	9,44	0,04	1,21
Sorbitol	1,98	0,17	0,34
	4,92	0,01	0,53
	9,90	0,08	0,34

DPR, desvio padrão relativo de três concentrações de cada amostra.

Como observado na Tabela 13, os valores de DPR para estes parâmetros foram inferiores a 5%, como preconizado pela Anvisa (Brasil, 2003). Os resultados demonstram que o método de quantificação foi preciso para a quantificação da solução padrão em questão e nas concentrações testadas. Deste modo, a exatidão do método foi avaliada demonstrando as concentrações dos analitos na amostra comparadas com a concentração teórica esperada, sendo apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 - Exatidão do método de cromatografia em fase líquida na análise das substâncias de referência - ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol - preparadas em diferentes concentrações.

Analito	Concentração teórica (g/L)	Concentração experimental (g/L)	Recuperado (%)
Ácido maltobiônico	1,94	1,94 ± 0,019	100,02
	4,78	4,87 ± 0,001	101,70
	9,43	9,51 ± 0,000	100,90
Maltose	2,02	2,06 ± 0,003	102,21
	4,96	5,03 ± 0,002	101,37
	9,78	9,79 ± 0,003	100,13
Frutose	1,89	1,88 ± 0,003	99,63
	4,69	4,72 ± 0,000	100,69
	9,44	9,51 ± 0,004	100,77
Sorbitol	1,98	1,98 ± 0,003	99,62
	4,92	4,92 ± 0,000	100,01
	9,90	9,92 ± 0,008	100,28

Cabe ressaltar que a repetibilidade e a precisão são parâmetros importantes, garantindo que a metodologia proposta para a quantificação simultânea dos compostos é válida.

Os valores correspondentes às concentrações teórica e experimental, levando em conta o efeito matriz, são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Exatidão do método correspondente à análise da amostra de caldo de bioconversão adicionado de diferentes concentrações das substâncias de referência (ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol).

Mistura do caldo da bioconversão + solução padrão	Concentração teórica (g/L)	Concentração experimental (g/L)	Recuperado (%)	DPR (%)
Ácido maltobiônico	5,98 + 0,97	7,03 ± 0,002	101,14	0,80
	5,98 + 2,36	8,24 ± 0,007	98,80	0,84
	5,98 + 4,98	10,55 ± 0,008	98,96	0,73
Maltose	3,31 + 1,00	4,29 ± 0,003	99,43	0,40
	3,31 + 2,44	5,74 ± 0,006	99,70	0,21
	3,31 + 4,86	8,24 ± 0,003	100,93	0,65
Frutose	traços + 0,95	0,95 ± 0,041	100,33	0,23
	traços + 2,36	2,40 ± 0,020	101,79	1,25
	traços + 4,72	4,79 ± 0,013	101,37	0,96
Sorbitol	2,26 + 1,00	3,18 ± 0,103	97,45	1,82
	2,26 + 2,48	4,75 ± 0,022	100,43	0,31
	2,26 + 4,95	7,24 ± 0,013	100,34	0,24

A recuperação está diretamente relacionada à exatidão do método, sendo que estes valores devem ser próximos a 100%, com um desvio padrão de $\pm 20\%$, conforme preconizado pela Anvisa (Brasil, 2003). No caso, os valores determinados ficaram próximos a 100%, o que demonstra que o método de quantificação proporciona a exatidão necessária para fornecer um valor confiável da concentração do analito.

Subsequentemente, a exatidão do método foi avaliada em uma mistura da solução padrão e o caldo da bioconversão (efeito matriz), ambas contendo os quatro compostos analisados, com o intuito de quantificar simultaneamente os compostos envolvidos na reação de bioconversão de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente.

Os valores determinados de DPR foram inferiores a 5% e a recuperação em torno de 100%, conforme preconizado pela Anvisa (Brasil, 2003). Nestas condições, é identificada a exatidão do método para a quantificação dos compostos envolvidos na reação. Pode-se observar que a quantificação da mistura do caldo proveniente da bioconversão com a solução padrão foi precisa, validando assim o método proposto.

A gama de informações relativas ao desenvolvimento e validação do método de quantificação simultânea de ácido maltobiônico, maltose, frutose e sorbitol por CLAE, o tornam confiável para a execução de análises relacionadas com o processo de produção de ácido maltobiônico e sorbitol por GFOR/GL de *Z. mobilis*.

4.6.2 Determinação do pK_a do ácido maltobiônico

A partir do pK_a , ou a constante de dissociação ácida, pode-se definir a acidez ou basicidade de um composto. Quanto maior o valor de pK_a , menor é a acidez deste composto (Harris, 2005). A avaliação foi feita a partir da medida de pH de soluções de concentrações

conhecidas de ácido maltobiônico. Os valores foram determinados a partir da equação 10, sendo apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados dos testes de determinação da constante de dissociação ácida (pK_a) para o ácido maltobiônico, partindo de soluções de diferentes concentrações.

pH medido	Concentração do ácido (mol/L)	Concentração do H_3O^+ (mol/L)	pK_a
2,27	0,1111	0,00537	3,56
2,56	0,0279	0,00275	3,52
2,61	0,0223	0,00245	3,51
2,65	0,0186	0,00224	3,51
2,7	0,0160	0,00199	3,54
2,73	0,0140	0,00186	3,54
2,76	0,0120	0,00173	3,54
2,79	0,0111	0,00162	3,55
2,81	0,0101	0,00155	3,55
2,84	0,0093	0,00144	3,57
2,90	0,0065	0,00126	3,52
2,93	0,0058	0,00117	3,53
2,96	0,0053	0,00109	3,54

Na Tabela 16, observam-se que os valores de pK_a em cada nível de pH são próximos ao valor determinado no procedimento experimental descrito no item 4.4, no qual foi realizada a troca iônica do sal do ácido maltobiônico para sua forma ácida. Em ambos os casos, o pK_a do ácido maltobiônico ficou na média de 3,54. Este valor é próximo ao definido

na literatura para o ácido lactobiônico, pK_a 3,8 (Farmacopeia Europeia, 2009). Para o ácido maltobiônico são relatados em banco de dados o valor de pK_a 3,26, porém estes valores são dados preditos por softwares, não sendo valores experimentais (FoodB, 2019). Sendo assim, tanto o ácido maltobiônico como o lactobiônico se enquadram como ácidos fracos, sendo que sua constante (pK_a) fica entre os valores -2 e 12 (Bruice, 2004).

4.6.3 Determinação da solubilidade

A solubilidade foi determinada considerando o preconizado na Farmacopeia Brasileira (2009), com a devida classificação das amostras de acordo com a solubilidade em água. Os resultados de solubilidade do ácido maltobiônico e sais são apresentados no Quadro 2. A concentração de amostra está relacionada com a quantidade de água utilizada para a completa solubilização.

Quadro 2 - Solubilidade do ácido maltobiônico e seus sais em água, em temperatura ambiente (22 ± 2 °C).

Amostra	Solubilidade	Concentração
Ácido maltobiônico	Solúvel	3,3 g/100 mL
Maltobionato de cálcio	Pouco solúvel	0,3 g/100 mL
Maltobionato de sódio	Pouco solúvel	0,22 g/100 mL
Maltobionato de cálcio (xarope)	Pouco solúvel	0,3 g/100 mL
Maltobionato de sódio (xarope)	Pouco solúvel	0,25 g/100 mL

Solúvel: entre 1 e 3 ml de H₂O; Pouco solúvel: entre 10 e 100 ml de H₂O

De acordo com os dados apresentados no Quadro 2, o ácido maltobiônico é mais solúvel em água que seus sais. Isto ocorre uma vez que as amostras na forma de sal são menos solúveis em água que a amostra na forma ácida (Mahan e Myers, 1994).

4.6.4 Determinação do poder rotatório específico

O poder rotatório específico ($[\alpha]_D^{20}$) das amostras de ácido maltobiônico e dos sais de cálcio e de sódio, obtidos na bioconversão de maltose purificada e de xarope de maltose, foi determinado. Este parâmetro é dependente de fatores como a temperatura, o comprimento de onda da luz incidente, o solvente utilizado, a natureza da substância e sua concentração. Os resultados gerais são expressos na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados referentes à determinação do poder rotatório específico das amostras do ácido maltobiônico, maltobionato de cálcio e sódio e substratos envolvidos na reação de bioconversão.

Amostra	($[\alpha]_D^{20}$) experimental	($[\alpha]_D^{20}$) literatura*
Ácido maltobiônico	+83,2°	+98,3°
Maltobionato de cálcio	+79,75°	+97,5°
Maltobionato de sódio	+93,43°	-
Maltobionato de cálcio (xarope)	+100,3°	-
Maltobionato de sódio (xarope)	-	-
Maltose	+126°	+126° a +131°
Frutose	-83,5°	-91° a -93°
Sorbitol	-1,1°	+4° a +7°

*Fonte: (Glattfeld e Hanke, 1918; Rowe et al., 2009; Duarte, 2012)

Salienta-se que não há dados recentes relativos ao poder rotatório específico do ácido maltobiônico e seus sais. Conforme Glattfeld e Hanke (1918), em estudos de oxidação de maltose a ácido maltobiônico em solução de peróxido de hidrogênio, são relatados valores de poder rotatório do ácido maltobiônico e do maltobionato de cálcio de +98,3° e +97,5°, respectivamente. Como pode ser observado, os resultados apresentados na Tabela 17 diferem dos dados relatados na literatura. Esta alteração pode estar relacionada ao tipo de equipamento ou erros experimentais, um vez que a obtenção dos resultados depende de avaliação visual. Pode ser salientado o fato de que a forma de ácido do composto, em contrapartida à forma de sal, tende a ter o poder rotatório menor, como observado para o ácido maltobiônico (+83,2°) e para a maltose (+131°) (Glattfeld e Hanke, 1918; FoodB, 2019; ChemSpider, 2019).

4.6.5 Determinação do ponto de fusão

Os resultados referentes ao ponto de fusão das amostras de ácido maltobiônico e seus sais, obtidos como resultados da reação de bioconversão com maltose e com xarope de maltose, são apresentados na Tabela 18. Como observado, de forma geral, os dados relativos às amostras de ácido maltobiônico e seus sais são inferiores aos reportados para o ácido lactobiônico e seus sais (Carra, 2012; Delagustin, 2016). Além disto, o ácido maltobiônico e o maltobionato de sódio apresentaram valores inferiores aos demais. Isto pode ser justificado pelo fato de que, visualmente, as amostras de ácido de maltobiônico e maltobionato de sódio apresentam a característica de gel em temperatura inferior às demais amostras. Ressalta-se, mais uma vez, que a composição do maltobionato de cálcio e de sódio resultantes da bioconversão de xarope de maltose apresentaram ponto de fusão superior aos demais,

podendo estar relacionado à sua composição, contendo os açúcares não convertidos via ação catalítica de GFOR/GL.

Tabela 18 - Resultados referentes à determinação do ponto de fusão das amostras do ácido maltobiônico e seus sais de sódio e cálcio, obtidos pela bioconversão de maltose purificada e/ou xarope de maltose.

Amostra	Ponto de fusão (°C)
Ácido maltobiônico	97,3
Maltobionato de cálcio	126,4
Maltobionato de sódio	87
Maltobionato de cálcio (xarope)	154,2
Maltobionato de sódio (xarope)	138,4

4.6.6 Caracterização estrutural

Na análise de morfologia por FTIR são determinadas as ligações químicas presentes na estrutura da molécula. A caracterização foi feita para a forma ácida (ácido maltobiônico) e para os sais (maltobionato de sódio e de cálcio). Na Figura 22 são apresentados os perfis obtidos para cada amostra, sendo representadas por suas respectivas bandas de comprimento de onda que são reportadas as ligações químicas.

Na Figura 22, observam-se as bandas correspondentes às ligações químicas ao longo da estrutura da molécula de ácido maltobiônico. Por ser um estereoisômero do ácido lactobiônico, há similaridade nas ligações químicas e, conseqüentemente, no perfil do espectrograma (Bisinela et al., 2017). Foram observadas nas bandas entre 3300 até 3600 cm^{-1} , a ligação de H-O; entre 2800 e 3000 cm^{-1} , a ligação de C-H; entre 1600 e 1700 cm^{-1} , a ligação de C=O na função ácida; entre 1550 e 1600 cm^{-1} , a ligação de C-H; entre

1300 e 1250 cm^{-1} , a ligação C-O na função ácida; entre 1000 e 1100 cm^{-1} , a ligação entre C-O; e entre 600 e 900 cm^{-1} , a ligação entre C-H cíclica (Silverstein e Webster, 1998).

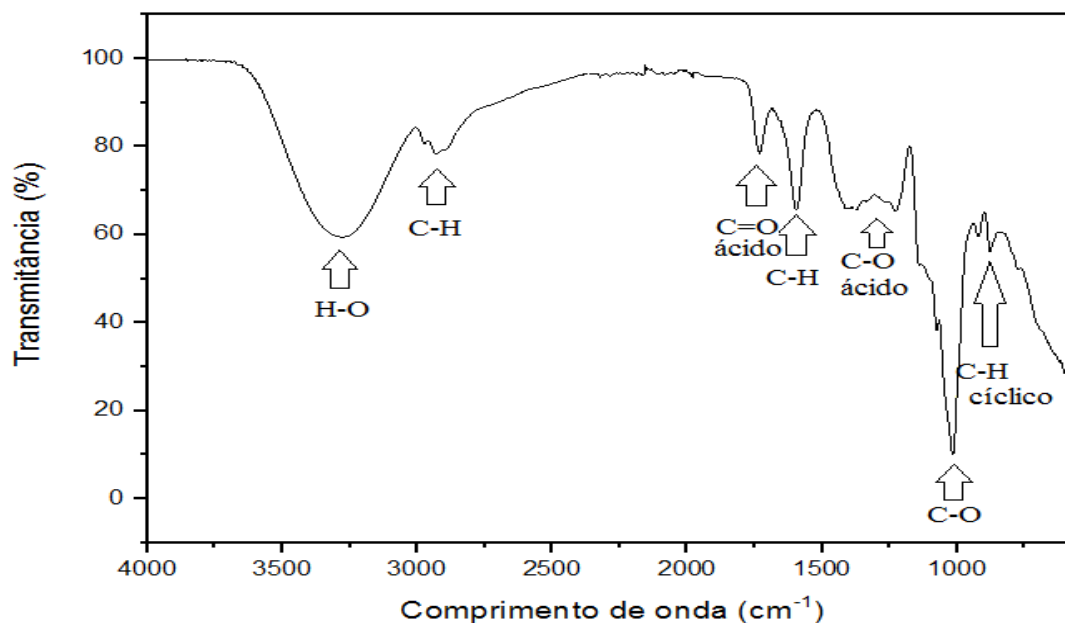


Figura 22 - Perfil do espectrograma de infravermelho FTIR para amostra de ácido maltobiônico.

Da mesma forma, foram avaliados os demais sais do ácido maltobiônico, podendo-se comparar com sua forma ácida, por possuírem estruturas moleculares semelhantes. Na Figura 23 são apresentados os espectrogramas de FTIR para as amostras de maltobionato de cálcio (A), maltobionato de sódio (B), ambos obtidos no processo de bioconversão com o uso de maltose e, por fim, maltobionato de cálcio (C) e maltobionato de sódio, ambos resultantes do processo de bioconversão com xarope de maltose (D).

Como observado na Figura 23, o perfil do maltobionato de cálcio (Fig. 23A) se assemelha ao espectrograma do ácido maltobiônico (Figura 22), no qual são observadas as mesmas bandas e nos mesmos comprimentos de onda. Para os demais, as amostras foram semelhantes entre elas, no caso dos espectrogramas do maltobionato de sódio (Fig. 23B), do

maltobionato de cálcio obtido pela bioconversão do xarope de maltose (Fig. 23C) e do maltobionato de sódio também obtido pela bioconversão do xarope de maltose (Fig. 23D), identificaram-se as mesmas bandas e nos mesmos comprimentos de onda.

As bandas de comprimento de onda correspondente às ligações químicas encontradas para os sais são as praticamente as mesmas do ácido maltobiônico, sendo que a pequena diferença entre estas pode estar atrelada a algum erro experimental decorrente do procedimento analítico ou até mesmo devido às diferenças na estrutura molecular do sal e do ácido.

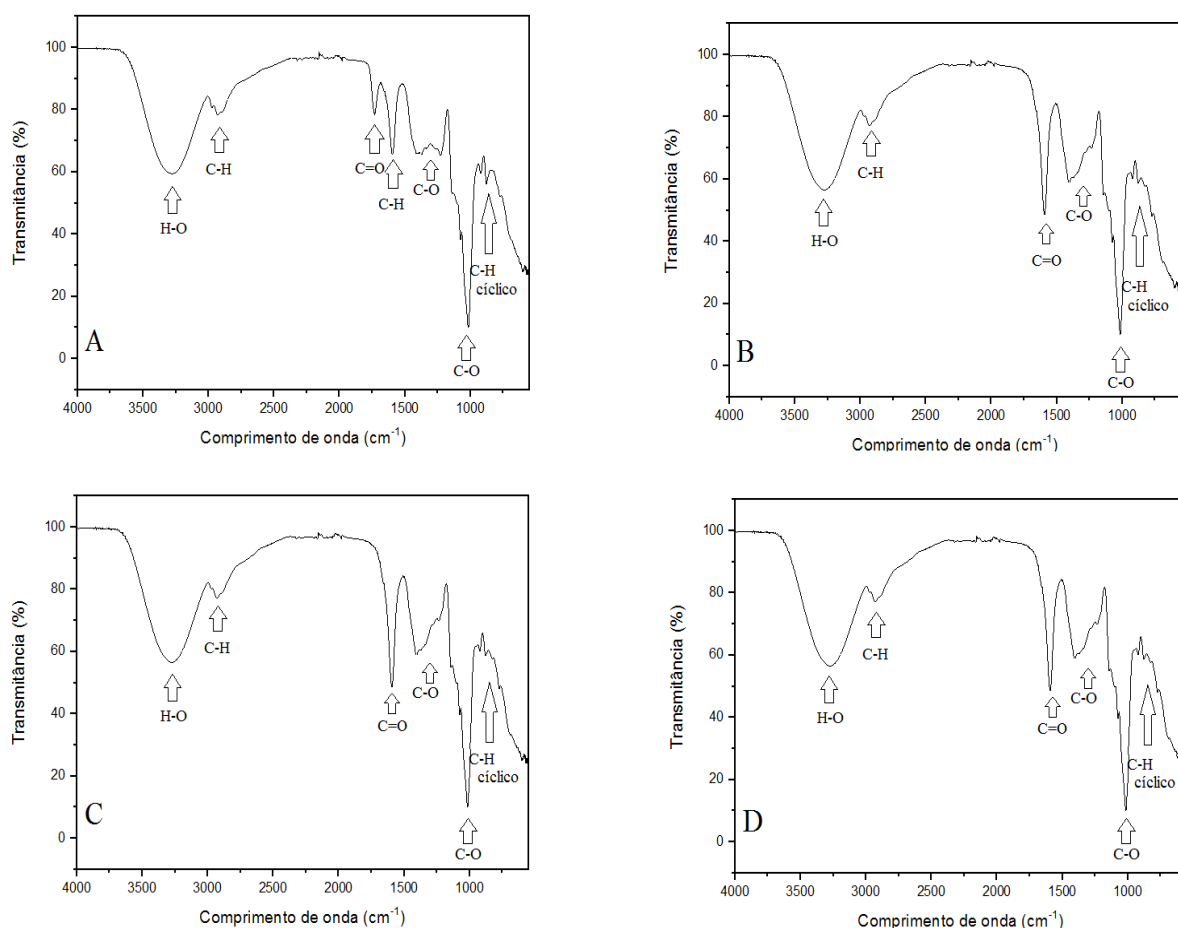


Figura 23 - Perfil do espectrograma de infravermelho FTIR para amostra de maltobionato de cálcio (A) e maltobionato de sódio (B) obtidos na bioconversão de maltose purificada e maltobionato de cálcio (C) e maltobionato de sódio (D) obtidos na bioconversão de xarope de maltose.

4.6.7 Caracterização por análises térmicas (TG/DTG)

As análises termogravimétricas (TG/DTG) foram realizadas com o propósito de avaliar o perfil de variação de massa das amostras frente ao aumento da temperatura, avaliado de 23 a 700 °C. As Figuras 24, 25, 26, 27 e 28 representam as curvas de TG/DTG para o ácido maltobiônico e dos sais - maltobionato de cálcio e de sódio - obtidos com o uso de maltose purificada ou de xarope de maltose na reação de bioconversão, em função do incremento da temperatura da análise.

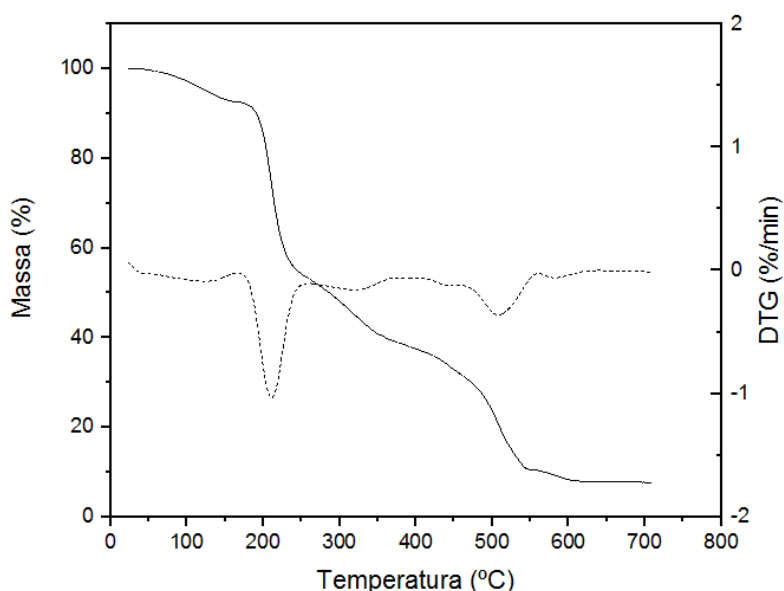


Figura 24 - Curva de TG/DTG para o ácido maltobiônico obtido na bioconversão de maltose purificada. (—) TG (···) DTG.

Na Figura 24, podem ser observados os eventos em que ocorre a perda de massa, identificado pela análise da curva de TG, e as respectivas temperaturas que ocorrem estes eventos, observados de acordo com os perfis das curvas DTG. Os eventos decorrentes do aumento da temperatura são apresentados na Tabela 19. Foram observados quatro eventos

para a amostra de ácido maltobiônico. O primeiro pode estar relacionado à perda da umidade, que ocorre aproximadamente a 100 °C e os demais são relativos à degradação e oxidação do composto orgânico, como relatado por Bisinella et al. (2016) em estudos com ácido lactobiônico.

Tabela 19 - Resultados referentes aos eventos térmicos de acordo com aumento da temperatura para amostra do ácido maltobiônico

Amostra	TG		DTG	
	Ti – Tf (°C)	Δ massa (%)	T _{onset} -T _{endset} (°C)	T _p (°C)
Ácido maltobiônico				
1° evento	29 - 173	8	34 - 164	126
2° evento	173 - 253	38	173 - 250	211
3° evento	265 - 386	14	263 - 390	321
4° evento	446 - 582	24	460 - 562	509

Estes eventos de degradação estão associados à quebra das ligações químicas, sendo que primeiramente são rompidas as ligações C-C (346,8 kJ/mol), devido à energia de ligação das demais ligações do composto, como C-H (413,4 kJ/mol), C-O (353,5 kJ/mol), C=O (804,3 kJ/mol), H-O (463,5 kJ/mol) e C=C (612 kJ/mol). Este efeito faz com que o composto se degrade antes que sejam rompidas as ligações químicas, formando outros compostos ou produtos da degradação (Clayden et al., 2001). Este fenômeno pode ser observado para todas as amostras testadas, sendo que estas possuem o mesmo tipo de ligação, sem levar em conta a ligação com as moléculas de Ca e Na, que possuem baixa energia de ligação (Chang, 1994; Paiva e Ferreira, 2015; Simões et al., 2015).

Na Figura 25, representando a curva TG/DTG para o maltobionato de cálcio, observam-se similaridades com o perfil observado com composto na forma ácida (Figura 24).

Os dados relativos às temperaturas de cada evento estão dispostos na Tabela 20.

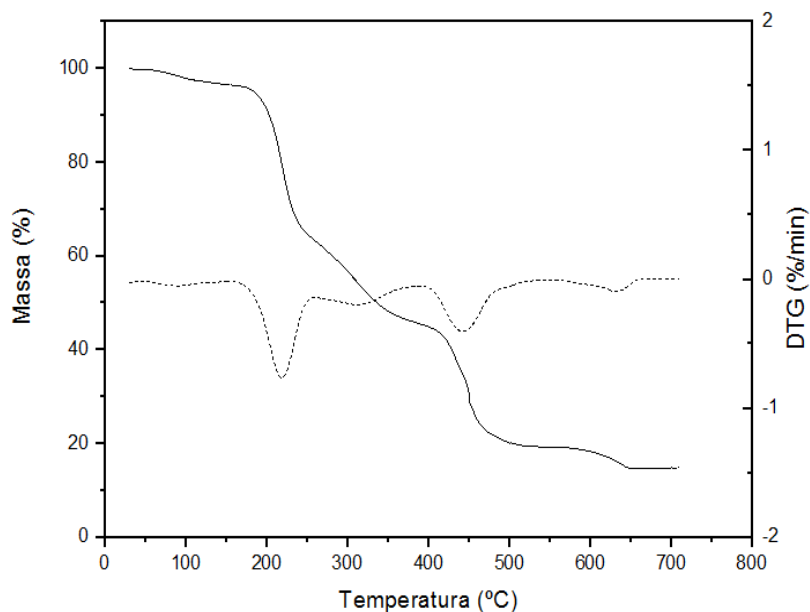


Figura 25 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de cálcio obtido na bioconversão de maltose purificada. (—) TG (···) DTG.

Tabela 20 - Resultados referentes aos eventos térmicos de acordo com aumento da temperatura para amostra do maltobionato de cálcio, resultante da bioconversão utilizando maltose purificada como substrato.

Amostra – maltobionato de cálcio	TG		DTG	
	Ti – Tf (°C)	Δ massa (%)	T _{onset} -T _{endset} (°C)	T _p (°C)
1° evento	37 - 161	4	34 - 159	90
2° evento	176 - 262	34	168 - 260	218
3° evento	264 - 408	16	263 - 400	310
4° evento	413 - 516	25	403 - 515	442
5° evento	585 - 650	5	594 - 658	630

Diferentemente do ácido maltobiônico, para o maltobionato de cálcio foram identificados cinco eventos distintos. O primeiro também foi atribuído à perda de umidade e os demais, resultantes de oxidação e degradação do composto orgânico (Tabela 20).

Para o maltobionato de sódio, os perfis das curvas de TG/DTG são apresentados na Figura 26, sendo identificados quatro eventos distintos. Cabe ressaltar que nem todos os eventos ficaram evidenciados no DTG, sendo o terceiro evento apenas de perda de massa e não atribuído a alguma degradação ou oxidação.

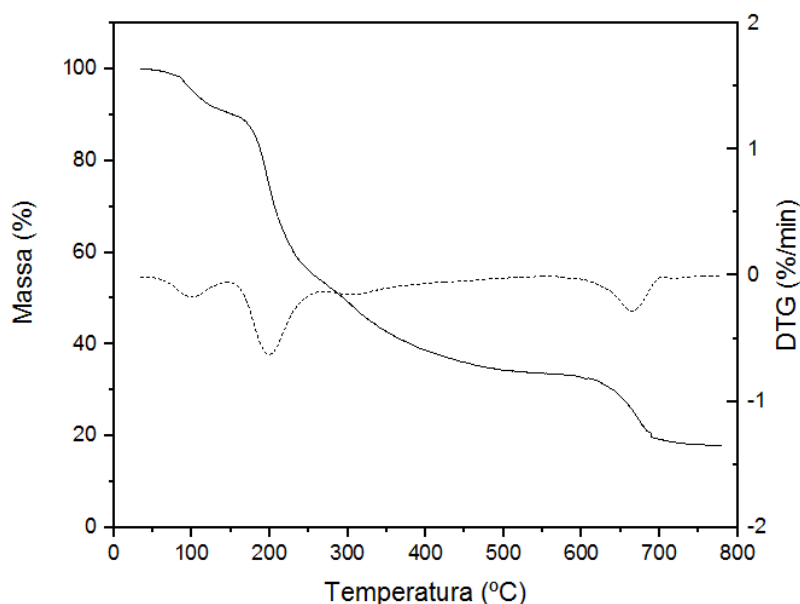


Figura 26 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de sódio resultante da bioconversão utilizando maltose purificada. (—) TG (···) DTG.

Na Tabela 21, são resumidos os dados relativos às curvas de TG/DTG da amostra de maltobionato de sódio. Para tanto, o primeiro evento foi atribuído à perda de umidade e os demais eventos à degradação e à oxidação da matéria orgânica, assim observado por Bisinella et al. (2016).

Tabela 21 - Resultados referentes aos eventos térmicos de acordo com aumento da temperatura para amostra do maltobionato de sódio resultante da bioconversão utilizando maltose purificada como substrato.

Amostra – maltobionato de sódio	TG		DTG	
	Ti – Tf (°C)	Δ massa (%)	T _{onset} -T _{endset} (°C)	T _p (°C)
1° evento	34 - 154	11	47 - 144	100
2° evento	162 - 268	36	155 - 262	199
3° evento	270 - 614	20	-	-
4° evento	622 - 713	14	623 - 710	664

Na Figura 27, são evidenciados os perfis das curvas de TG/DTG para o maltobionato de cálcio obtido a partir de xarope de maltose.

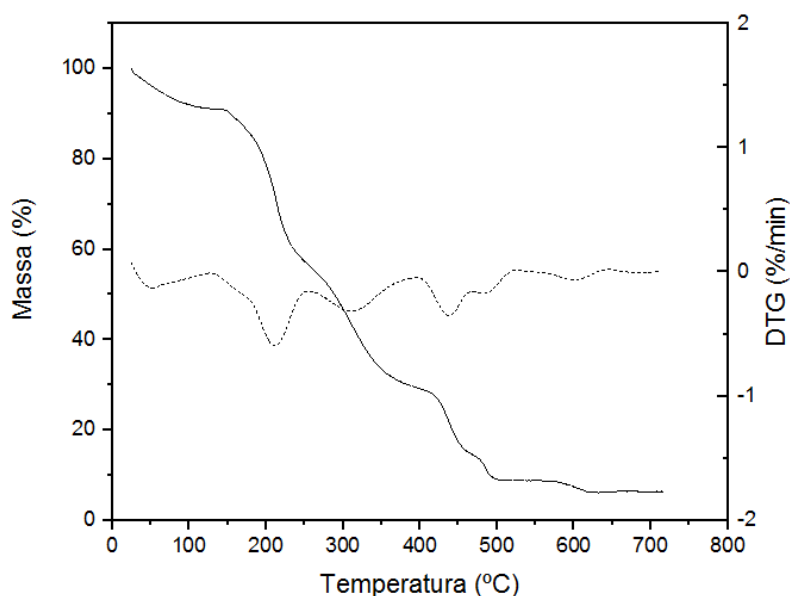


Figura 27 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de cálcio resultante da bioconversão utilizando de xarope de maltose. (—) TG (···) DTG.

A partir da curva de TG/DTG apresentada na Figura 27, foram tabelados os dados referentes às temperaturas dos eventos decorrentes do aumento da temperatura da reação, conforme demonstrado na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultados referentes aos eventos térmicos de acordo com aumento da temperatura para amostra do maltobionato de cálcio resultante da bioconversão utilizando xarope de maltose como substrato.

Amostra – maltobionato de cálcio (xarope)	TG		DTG	
	Ti – Tf (°C)	Δ massa (%)	T _{onset} -T _{endset} (°C)	T _p (°C)
1° evento	29 - 135	9	28 - 135	50
2° evento	151 - 266	36	144 - 257	210
3° evento	276 - 401	27	261 - 399	315
4° evento	404 - 510	20	402 - 519	436
5° evento	570 - 641	2	564 - 642	603

Neste caso, assim como o maltobionato de cálcio produzido com o uso de maltose purificada, observaram-se cinco eventos distintos, nos quais o primeiro é caracterizado pela perda da umidade e os demais eventos pela degradação do composto seguida da quebra das ligações químicas remanescentes.

Na Figura 28, é mostrado o perfil da curva TG/DTG para o maltobionato de sódio obtido com a utilização de xarope de maltose. Os perfis apresentados seguiram o mesmo identificado para o maltobionato de sódio obtido com maltose purificada, assim como para as amostras de maltobionato de cálcio.

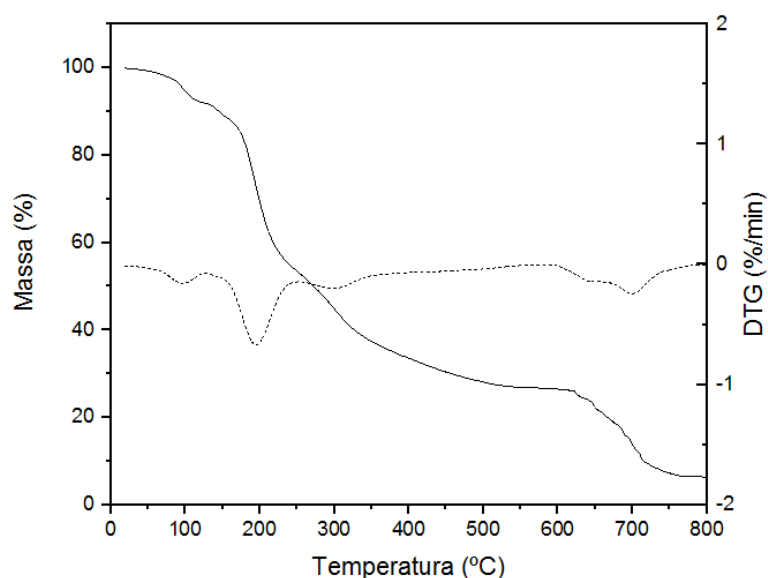


Figura 28 - Curva de TG/DTG para o maltobionato de sódio obtido na bioconversão de xarope de maltose. (—) TG (···) DTG.

A partir da Figura 29, foram identificadas as temperaturas dos eventos, representados na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados referentes aos eventos térmicos de acordo com aumento da temperatura para amostra do maltobionato de sódio resultante da bioconversão utilizando xarope de maltose como substrato.

Amostra – maltobionato de sódio (xarope)	TG		DTG	
	Ti – Tf (°C)	Δ massa (%)	T _{onset} -T _{endset} (°C)	T _p (°C)
1° evento	60 - 121	8	64 - 123	95
2° evento	151 - 250	35	152 - 251	195
3° evento	241 - 450	24	260 - 365	304
4° evento	614 - 730	18	602 - 739	700

A partir destas análises, pode-se concluir que todas as amostras apresentaram eventos de perda de umidade até 200 °C. Com o incremento da temperatura, ocorrem eventos de degradação da matéria orgânica do composto. Os demais eventos foram relativos ao rompimento das demais ligações químicas, sendo características para cada molécula.

Mesmo usando soluções de substrato de composições diferentes, o maltobionato de sódio e de cálcio obtidos da bioconversão de xarope de maltose apresentam características semelhantes em relação aos produtos maltobionato de sódio e de cálcio resultantes da conversão de maltose purificada. Este resultado indica a aplicabilidade do xarope de maltose, substrato de menor custo, para a produção de ácido maltobiônico pelo complexo GFOR/GL de *Z. mobilis*.

A avaliação dos perfis característicos de TG/DTG das referidas amostras foi utilizada como parâmetro para as análises térmicas (DSC), apresentadas e discutidas a seguir.

4.6.8 Caracterização por análises térmicas (DSC)

Para as análises de DSC, foi necessário garantir que as amostras não fossem degradadas no interior do equipamento e, neste sentido, os resultados de TG/DTG (apresentados no item 4.6.7) serviram como base para a determinação da temperatura a ser usada na realização desta análise. Sendo assim, as corridas de DSC foram feitas entre 23 e 140 °C e ficou constatado que a temperatura de degradação, para todas as amostras, foi superior a 180 °C. A temperatura final da corrida das amostras no equipamento de DSC (140 °C) foi escolhida para evitar a degradação das amostras no interior do sistema, como abordado anteriormente. Na Figura 29, é apresentada a curva de DSC para a amostra de ácido maltobiônico.

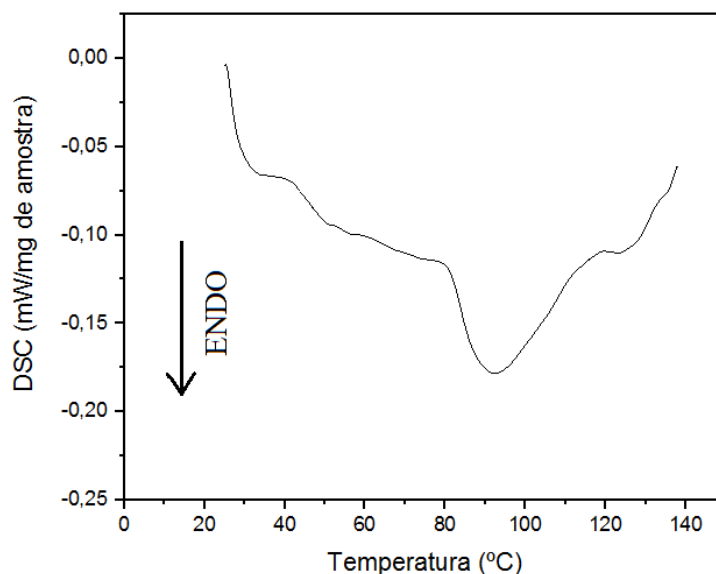


Figura 29 - Curva do DSC para a amostra de ácido maltobiônico

Na curva de DSC apresentada na Figura 29, observaram-se dois eventos em que ocorrem variações na linha de base, a 46 e 68 °C. Estes eventos podem estar relacionados a T_g do ácido maltobiônico, porém estes valores são inferiores ao reportados por outros autores para este ácido (Fukami et al., 2016). Esta variação pode estar relacionada às condições operacionais, sendo que a vazão de nitrogênio utilizada nestas análises foi inferior à reportada por outros autores (Fukami et al., 2016; Bisinella et al., 2017). No trabalho de Bisinella et al. (2017), em particular, não foi avaliada a T_g do ácido lactobiônico, sendo as análises realizadas em temperaturas crescentes, até 220 °C. Outro fator que pode ter influenciado a determinação de T_g seria o teor de água presente na amostra, o qual não foi analisado ao longo deste trabalho. A temperatura de fusão, podendo ser representada pela temperatura máxima do pico identificado entre 80 e 110 °C, foi determinada em 93 °C, diferentemente da temperatura definida nos testes realizados neste trabalho, de 97,3 °C (item 4.6.5).

Na Figura 30, são apresentadas as curvas de DSC para as demais amostras - sais do ácido maltobiônico. Na amostra de maltobionato de cálcio (Figura 30A), foi observado um

evento térmico entre 60 e 80 °C, com entalpia de 48,3 J/g e T_p de 70 °C. Este evento não foi associado à temperatura do ponto de fusão previamente determinado, sendo que, nestas condições, os eventos identificados estariam, possivelmente, relacionados à perda de umidade.

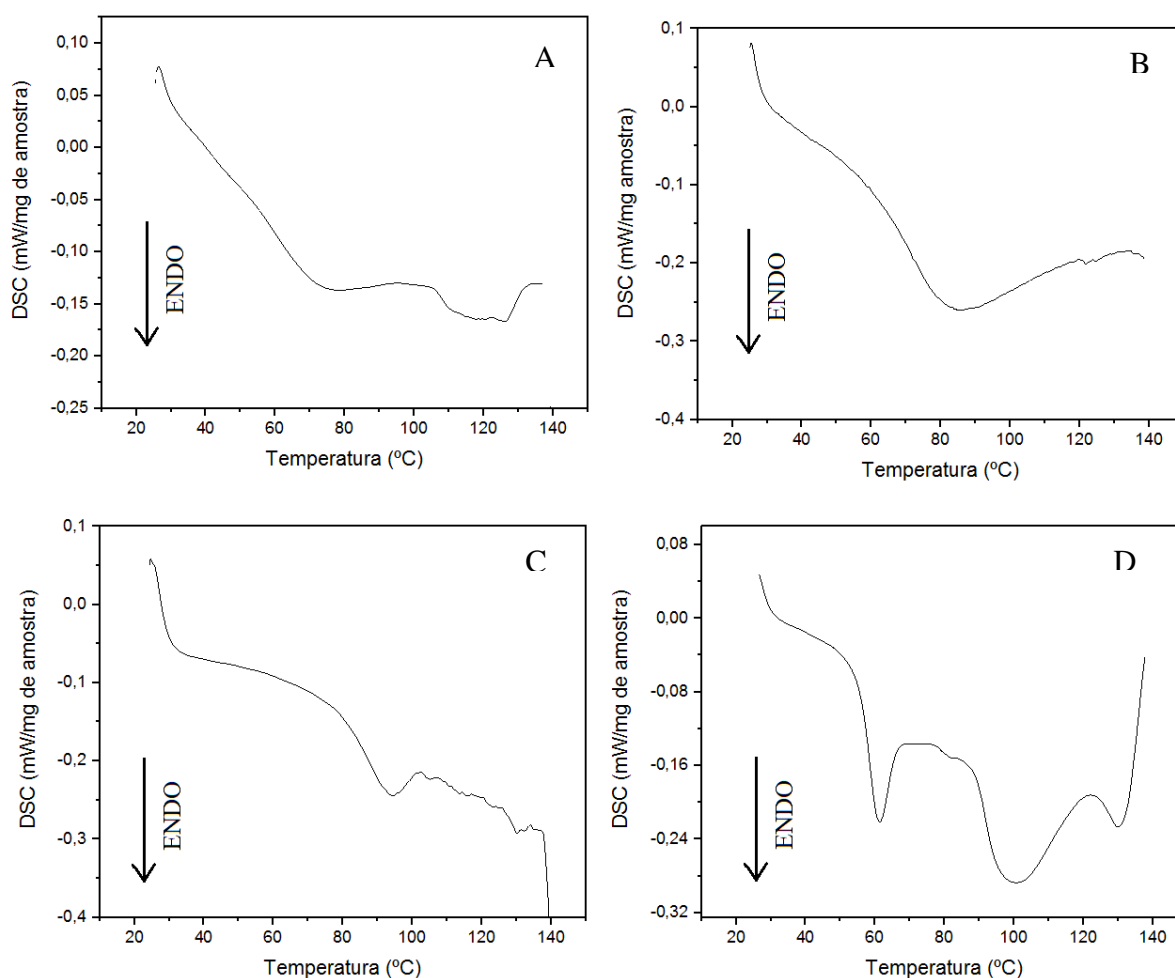


Figura 30 - Curva de DSC para as amostras de maltobionato de cálcio (A), maltobionato de sódio (B), obtidos com o uso de maltose e de maltobionato de cálcio (C) e maltobionato de sódio (D) obtidos na bioconversão de xarope de maltose.

Nas curvas de DSC das amostras dos sais do ácido maltobiônico, como demonstrado na Figura 30, observam-se os eventos que ocorrem em temperaturas inferiores a 140 °C. Como reportado por outros autores, a T_g do maltobionato de cálcio (148,1 °C) é superior ao limite testado no equipamento. Sendo assim, para as amostras dos sais não foram

identificadas as temperaturas de transição vítrea (T_g). As temperaturas de fusão, ou dos eventos que ocorreram na determinada temperatura, e suas respectivas entalpias estão apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados referentes à temperatura e entalpia dos eventos apresentados nas curvas de DSC das amostras do ácido maltobiônico e seus sais.

Amostras	Temperatura (°C)			Entalpia (J/g)
	T_o	T_p	T_e	ΔH_f
Ácido maltobiônico	81	93	115	71,7
Maltobionato de cálcio	106	126	136	50,2
Maltobionato de sódio	83	94	102	47,1
Maltobionato de cálcio (xarope)	70	85	107	115,1
Maltobionato de sódio (xarope)	Os eventos estão descritos abaixo			
1º evento	57	61	67	22,5
2º evento	87	100	120	95,5
3º evento	122	129	133	28,2

A amostra de ácido maltobiônico apresentou um evento distinto, podendo ser relacionado à temperatura de fusão. Este evento teve início a 81 °C e terminou em 115 °C, com a temperatura de pico atingida a 93 °C e entalpia de fusão de 71,7 J/g. Bisinella et al. (2017) relatam a identificação de 4 eventos endotérmicos distintos para a curva de DSC do ácido lactobiônico, sendo que destes, um evento possuiu a maior entalpia (97 J/g) entre as temperaturas de 67 e 117 °C, com temperatura de pico em aproximadamente 82 °C. Os autores não atribuíram nenhum fenômeno a este evento em particular.

Para o maltobionato de cálcio (Figura 30A), o evento foi identificado de 106 a 136 °C, com pico em 126 °C e entalpia de 50,2 J/g, sendo que a temperatura de fusão para esta amostra - determinada no item 4.6.5 - foi de 126 °C. No caso de maltobionato de sódio (Figura 30B), identificou-se evento entre as temperaturas de 83 e 102 °C, com pico em 94°C e entalpia de 47,1 J/g. Para esta amostra, foi calculado um valor de ponto de fusão de 87°C. As temperaturas nos eventos das amostras de maltobionato de cálcio (Figura 30C) e de sódio (Figura 30D) obtidos com o uso de xarope de maltose foram inferiores às determinadas para a temperatura de fusão, definida no item 4.6.5. Desta forma, os eventos que ocorreram nesta faixa de temperatura não foram relacionados com as temperaturas de fusão destas amostras.

4.6.9 Caracterização estrutural

As estruturas químicas do ácido maltobiônico e dos respectivos sais de sódio e cálcio foram confirmadas, até o momento por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS, do inglês: *High Resolution Mass Spectrometry*), por meio da injeção direta dos analitos e empregando uma fonte de ionização por “electrospray” (ESI, do inglês: *ElectroSpray Ionization*), operando no modo positivo (ESI+) e no modo negativo (ESI-).

Na ionização por “electrospray” comumente são gerados íons moleculares ($[M]^+$ ou $[M]^-$), moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) e ainda moléculas cationizadas, como por exemplo $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$, ou moléculas anionizadas, como por exemplo $[M-Cl]^-$. Desta forma, podemos inferir a fórmula elementar considerando a massa exata calculada para o ácido maltobiônico e os sais de sódio e cálcio, e a massa obtida experimentalmente, ou seja, a massa acurada. Na análise do ácido maltobiônico no modo positivo (ESI+), não foi observado o íon molecular ou a molécula protonada. No entanto, foi

observado o íon referente à molécula cationizada $[M+Na]^+$ em m/z 381,0998, como apresentado na Figura 31 e na Tabela 25.

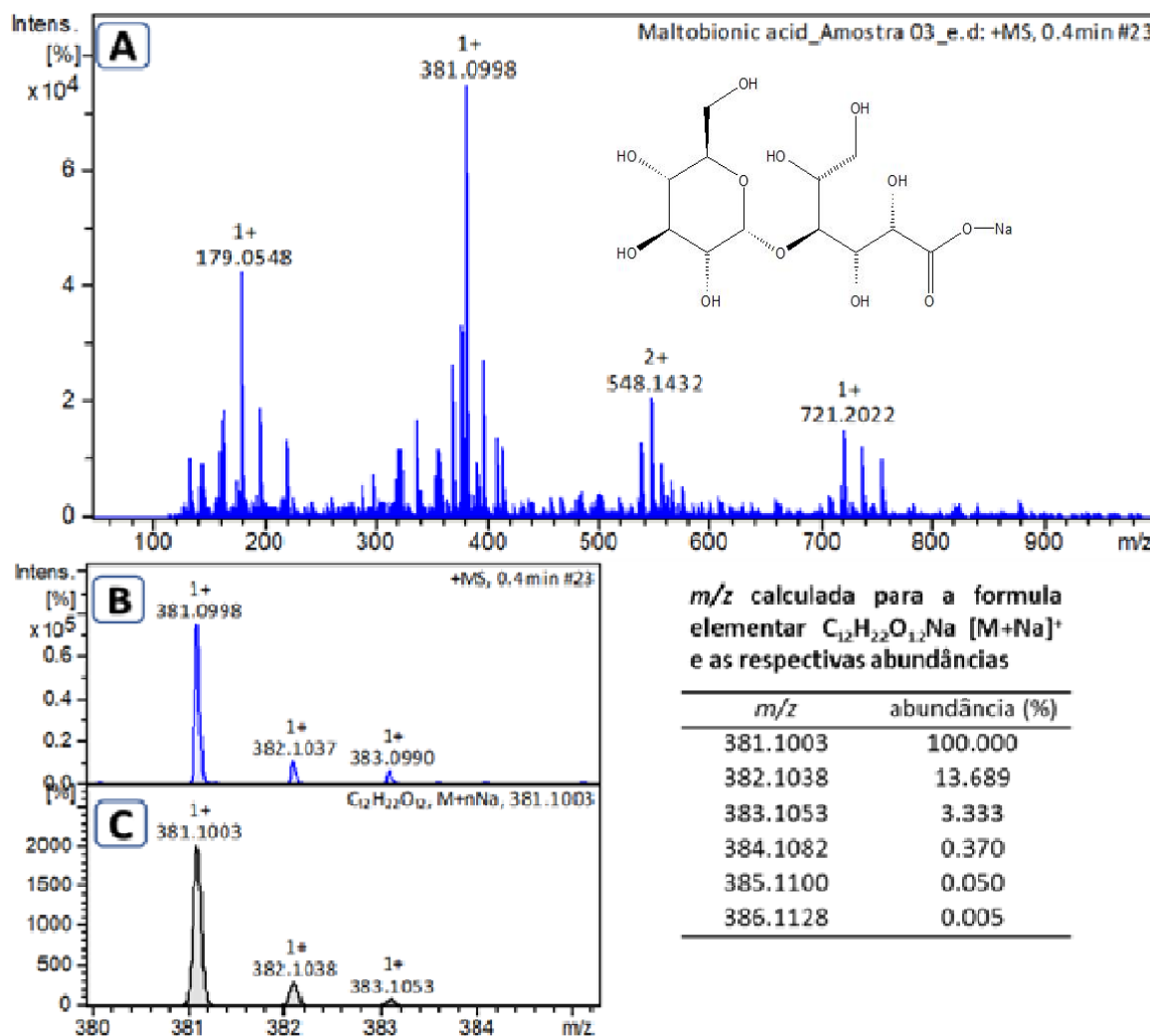


Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRMS-QToF-ESI+) para a amostra de ácido maltobiônico (A). Expansão do espectro em m/z 381 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).

Na análise no modo negativo (ESI⁻) foi observado o íon em m/z de 357,1147, ao qual foi atribuído a molécula deprotonada $[M-H]^-$, sendo referente a formula elemental $C_{12}H_{21}O_{12}$, ou seja, o ânion maltobionato. Na Figura 32 é apresentado o espectro gerado da

análise do ácido maltobiônico (Figura 32- Espectro A) e a respectiva expansão na região em m/z 357 (Figura 32- Espectro B), em que é observada a distribuição isotópica, a qual pode ser comparada com o espectro calculado para a fórmula elemental $C_{12}H_{21}O_{12} [M-H]^-$.

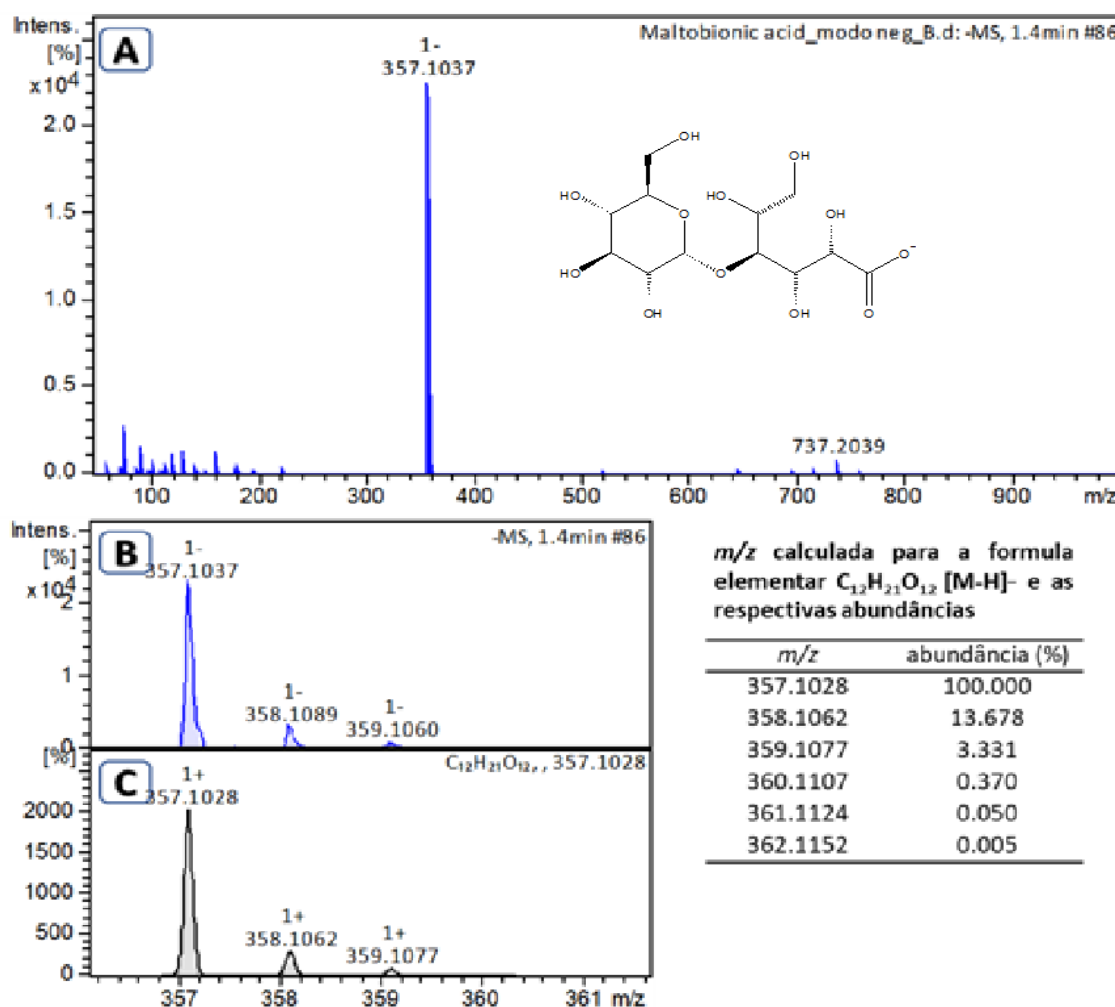


Figura 32 - Espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRMS-QToF-ESI-) para a amostra de ácido maltobiônico (A). Expansão do espectro em m/z 357 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).

Para o maltobionato de sódio, na análise no modo ESI+ foi observado a geração da molécula protonada $[M+H]$, em m/z 381,099 como mostrado na Figura 33. Nesta análise, foi também detectado com relativa intensidade o íon em m/z 205,0679 $[M+Na]^+$, o qual foi

atribuído ao sorbitol. Embora o sorbitol tenha sido observado, é importante salientar que a análise de HRMS não pode ser empregada para avaliar a pureza de um determinado analito. A intensidade do sinal está relacionada estabilidade do íon gerado na fonte. Assim, mesmo em pequena quantidade, caso o íon gerado seja bastante estável, este será observado na análise.

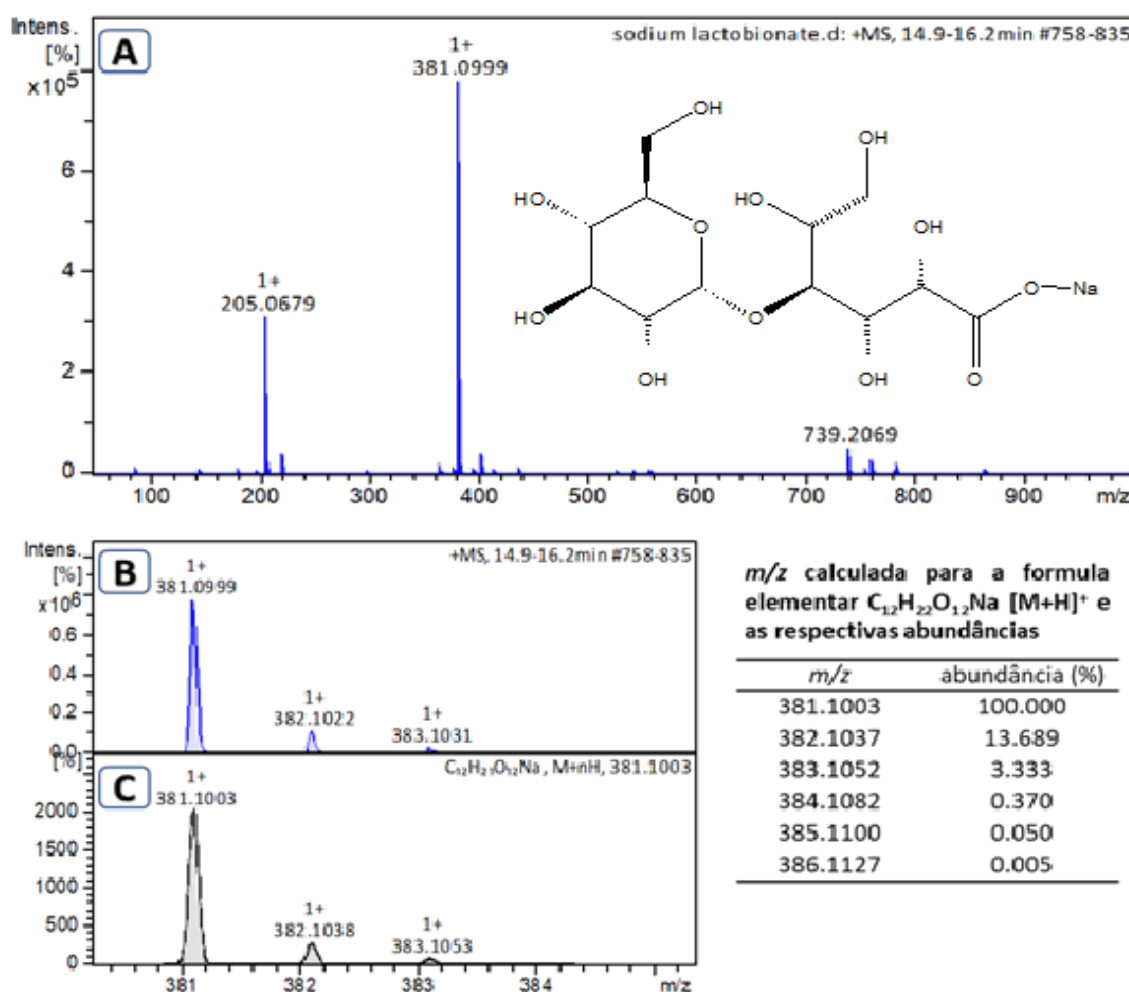


Figura 33 - Espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRMS-QToF-ESI+) para a amostra de maltobionato de sódio (A). Expansão do espectro em *m/z* 381 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).

No modo negativo, da forma similar ao que foi observado para o ácido maltobiônico, foi gerado na fonte a molécula decationizada $[M-Na]^-$ em m/z 357,1036, o qual foi atribuída ao ânion maltobionato (Figura 34). Nenhum outro íon com intensidade apreciável foi gerado nas condições de análise.

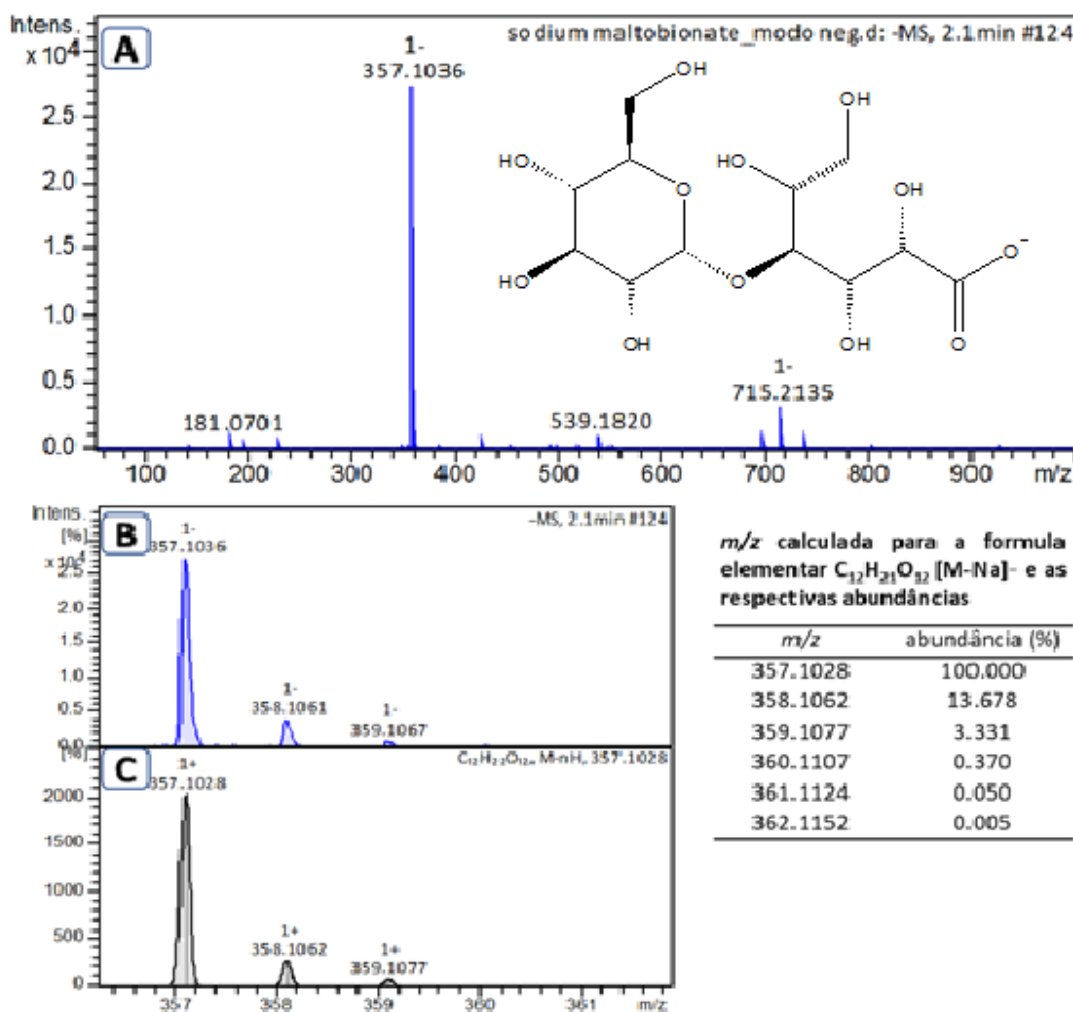


Figura 34 - Espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRMS-QToF-ESI-) para a amostra de maltobionato de sódio (A). Expansão do espectro em m/z 357 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).

No espectro resultante da análise do maltobionato de cálcio, foi observado, no modo positivo um íon em m/z 397,0658. Analisando a distribuição isotópica deste íon, pode-se

atribuir a formação do íon $[M-C_{12}H_{21}O_{12}]^+$, o qual foi gerado com apenas uma carga positiva, e referente à fórmula elementar $C_{12}H_{21}O_{12}Ca$, e ao íon $[M+Ca]^{2+}$, o qual apresenta duas cargas positivas, e é referente à fórmula elementar $C_{24}H_{42}O_{24}Ca_2$ (Figura 35). Como o cátion cálcio é um cátion divalente, e, portanto, a molécula de maltobionato de cálcio possui dois ânions maltobionato, a perda de um dos ânions no processo de ionização geraria o íon $[M-C_{12}H_{21}O_{12}]^+$, o qual foi identificado. No entanto, pela distribuição isotópica, nota-se também a presença de um íon divalente, no qual a massa acurada é decorrente da relação massa-carga (m/z), sendo a carga 2+. Este íon, o qual também apresenta m/z em 397,0658, é proveniente do íon $[M+Ca]^{2+}$.

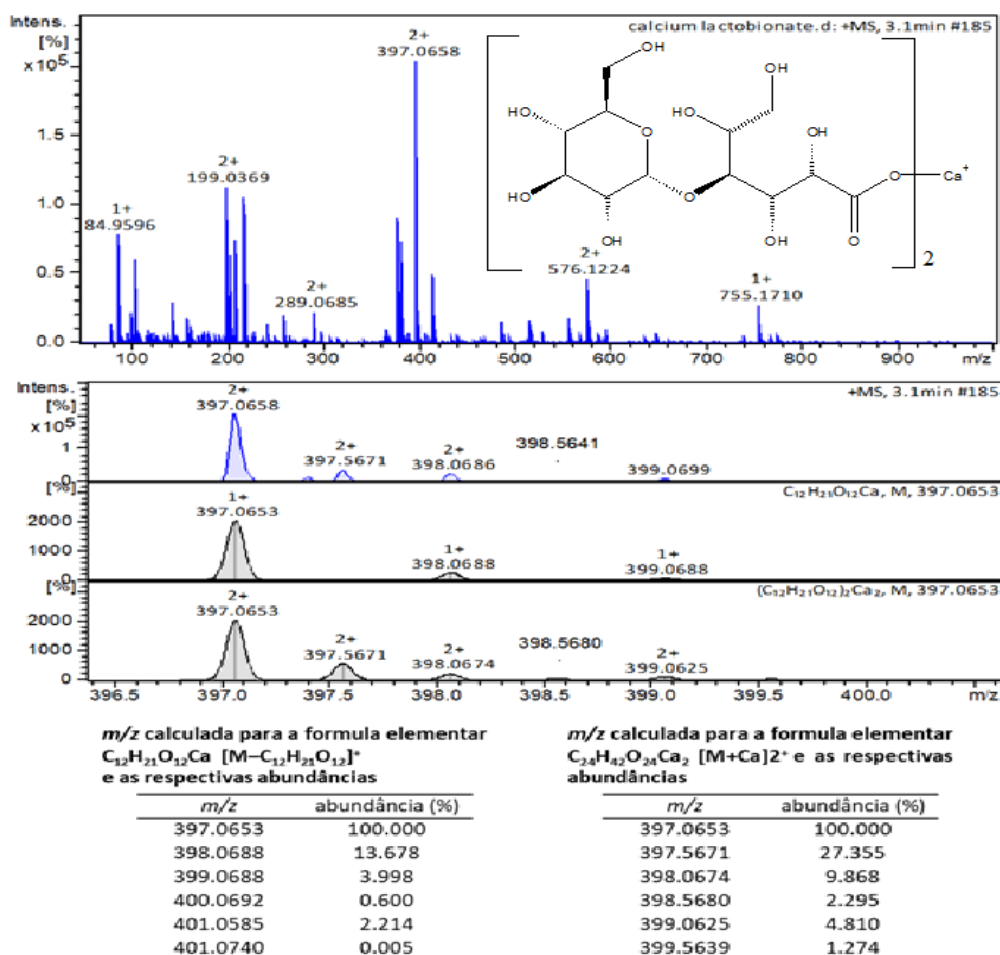


Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRMS-QToF-ESI+) para a amostra de maltobiônato de cálcio (A). Expansão do espectro em m/z 397 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).

Adicionalmente, foram gerados os íons $[M+2H]^{2+}$ em m/z 378,0921, o qual é referente à molécula diprotonada e de fórmula elemental $C_{24}H_{44}O_{24}Ca$, e o íon $[M-C_{12}H_{21}O_{12}+H]^+$ em m/z 199,0369, o qual foi atribuído à perda de uma unidade do ânion maltobionato. Outros íons foram observados no espectro, porém não foram atribuídos.

Da mesma forma como observado nas demais análises no modo negativo, foi também detectada a molécula decationizada $[M-C_{12}H_{21}O_{12}-Ca]^-$ em m/z 357,1078 (Figura 36).

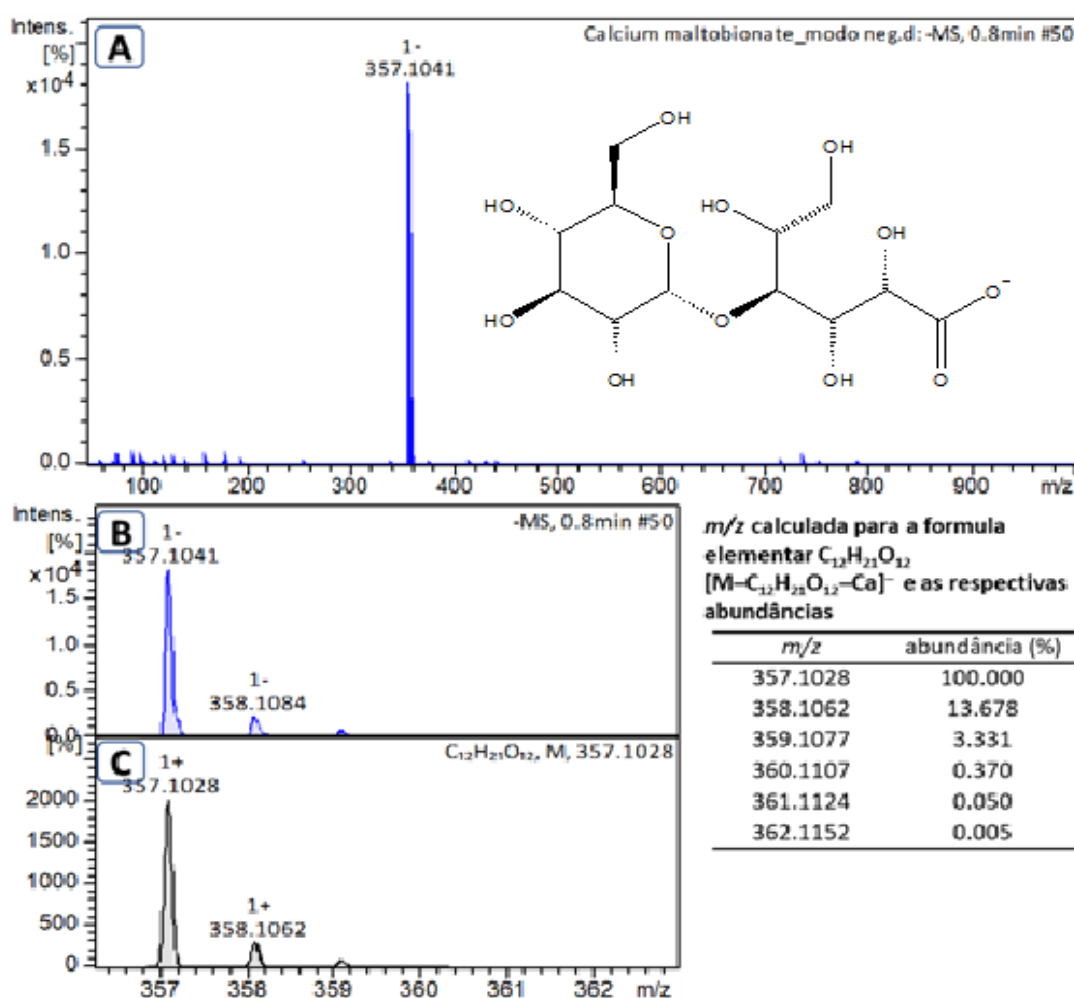


Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRMS-QToF-ESI-) para a amostra de maltobionato de cálcio (A). Expansão do espectro em m/z 357 evidenciando a distribuição isotópica para o íon gerado (B), e o espectro simulado (C).

Na Tabela 25, são apresentados todos os íons gerados pelas análises de HRMS-QToF-ESI tanto no modo positivo quanto negativo, e que foram utilizados para caracterizar o ácido maltobiônico e os sais de sódio e cálcio obtidos no presente trabalho.

Tabela 25 - Análises de espectrometria de massas de alta resolução para o ácido maltobiônico e os respectivos sais de sódio e cálcio.^a

Molécula	Massa acurada (<i>m/z</i>)	Fórmula elementar atribuída (íon gerado)	Massa monoisotópica calculada (<i>u</i>) ^b	Erro experimental
Ácido maltobiônico				
C₁₂H₂₂O₁₂	381,0998	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂ Na [M+Na] ⁺	381,1003	-1,31
	357,1037	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ [M-H] ⁻	357,1028	2,52
Maltobionato de sódio				
C₁₂H₂₁O₁₂Na	381,0999	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂ Na [M+H] ⁺	381,1003	-1,05
	357,1036	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ [M-Na] ⁻	357,1028	2,24
Maltobionato de cálcio				
C₂₄H₄₂O₂₄Ca	397,0658	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ Ca [M-C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂] ⁺ e	397,0653	1,25
	378,0921	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₄ Ca ₂ [M+Ca] ²⁺ C ₂₄ H ₄₄ O ₂₄ Ca [M+2H] ²⁺	378,0919	0,53
	199,0369	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂ Ca [M-C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ +H] ⁺	199,0363	3,01
	357,1041	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ [M-C ₁₂ H ₂₁ O ₁₂ -Ca] ⁻	357,1028	6,64
Sorbitol	205,0679	C ₆ H ₁₄ O ₆ Na [M+Na] ⁺	205,0682	-1,46
C₆H₁₄O₆				

^a íons gerados por ionização por “electrospray” no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-).

^b unidade de massa atômica unificada

A confirmação estrutural do maltobionato de cálcio foi alcançada pela análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono (RMN de ¹³C). No espectro de RMN de ¹H, obtido em D₂O (Figura 37), foi observado o sinal com deslocamento químico (δ) de 5,12 ppm. Este sinal que se apresenta na forma de um duplete com uma constante de acoplamento *J* = 3,9 Hz e integral relativa para um

hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio anomérico da porção α -glicosídica. O sinal em 4,11 ppm, o qual apresenta-se como um multipletto, e integral relativa para um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio ligado diretamente ao carbono que participa da ligação glicosídica na porção do ácido aldônico. Os outros sinais estão apresentados na forma de multipletos na região compreendida entre 3,96 e 3,42 ppm. Estes sinais apresentam uma integral relativa a 11 hidrogênios.

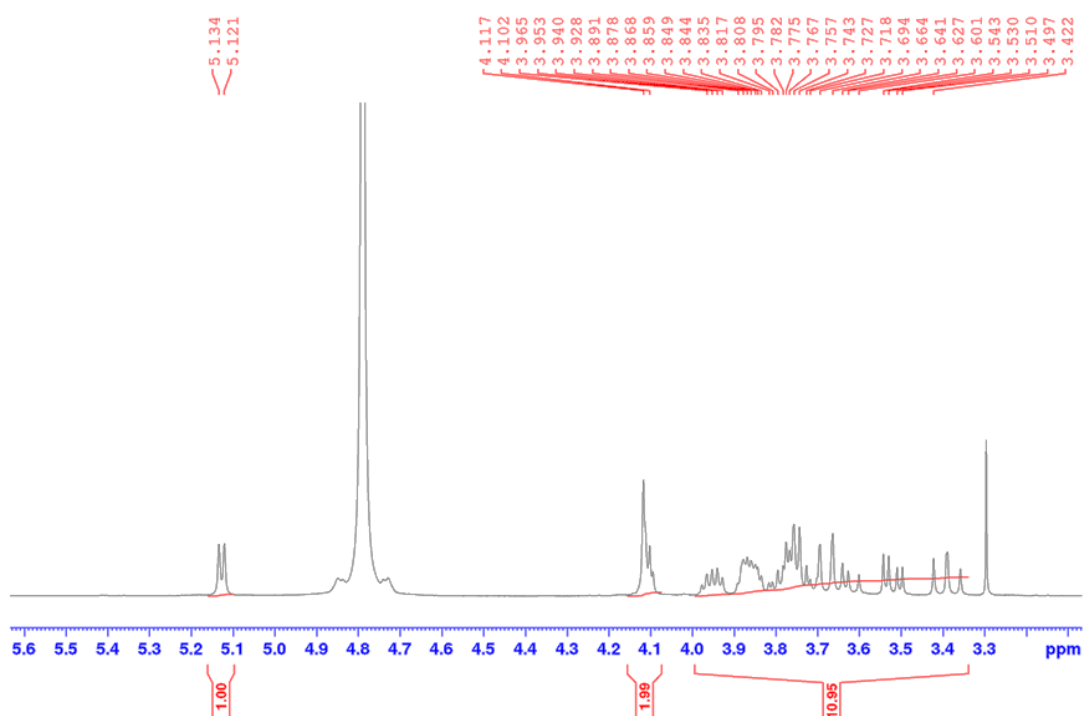


Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 300 MHz) do maltobionato de cálcio.

No espectro de RMN de ^{13}C , também obtido em D_2O (Figura 38), foi possível observar 12 sinais esperados. O sinal observado em 178,44 ppm foi atribuído ao carbono carbonílico. O sinal apresentado em 100,32 ppm foi atribuído ao carbono anomérico da porção glicosídica e os demais sinais estão compreendidos entre 60 e 82 ppm.

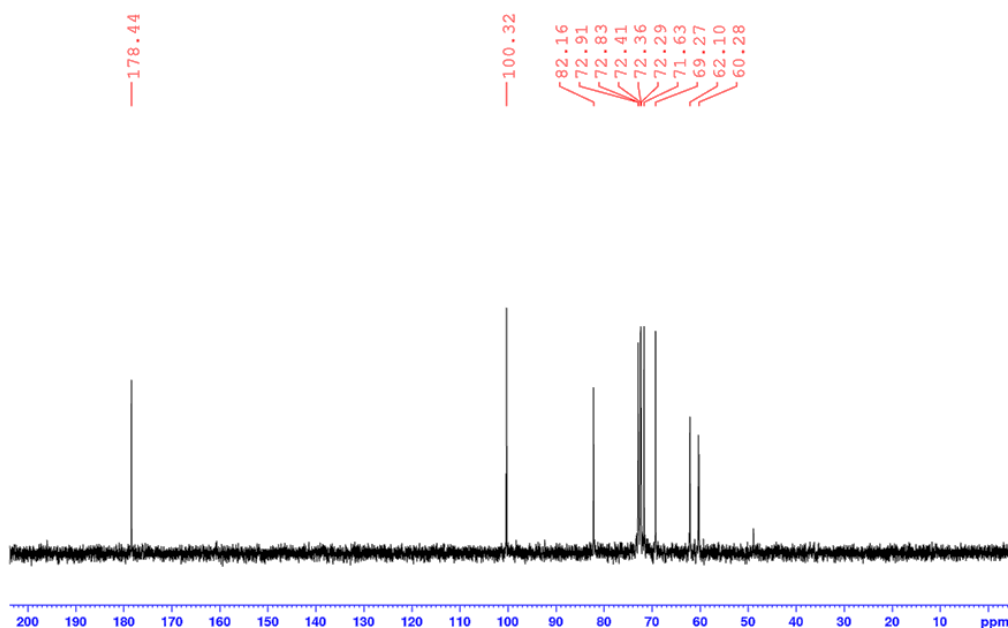


Figura 38 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 75 MHz) do maltobionato de cálcio.

No espectro foram observados todos os 12 sinais referentes aos 24 carbonos presentes na molécula.

A partir da caracterização estrutural utilizando os equipamentos de EM e RMN, foi possível comprovar a formação do ácido maltobiônico e seus sais obtidos por síntese catalítica utilizando o complexo GFOR/GL de *Z. mobilis*. Os demais resultados referentes à caracterização do ácido maltobiônico diferem das simulações reportadas em banco de dados, sendo importante ressaltar que os valores aqui apresentados foram resultantes de procedimentos experimentais. Os dados expostos neste capítulo trazem grande contribuição, tendo em vista as escassas informações na literatura sobre as características do ácido maltobiônico e seus sais (maltobionatos), proporcionando, ainda, o avanço de estudos relacionados à aplicação destes compostos na indústria especializada.

5 CONCLUSÕES

As conclusões apresentadas neste capítulo são referentes à produção, purificação e à caracterização do ácido maltobiônico e seus sais de cálcio e de sódio, obtidos por conversão enzimática de maltose purificada ou xarope de maltose.

Na avaliação dos parâmetros de processo na bioconversão de xarope de maltose em ácido maltobiônico, é demonstrada a influência da concentração de substratos, da temperatura e do pH sobre a formação dos produtos, sendo que os melhores resultados são obtidos na concentração de 700 mmol/L de xarope de maltose, a 39 °C e pH controlado em 6,4.

O aumento da concentração de substratos – maltose purificada – na reação de bioconversão também se mostra promissora, uma vez que com a utilização de 1000 mmol/L de maltose purificada são obtidos resultados superiores quando comparados aos reportados anteriormente na literatura. Cabe ressaltar que ambos, maltobionato de cálcio e de sódio, podem ser obtidos via ação do complexo enzimático GFOR/GL, com rendimentos superiores a 95%. Outro aspecto importante é a formação associada de sorbitol quando utilizado o complexo enzimático GFOR/GL, que, embora não avaliado especificamente neste trabalho, tem reconhecidas aplicações industriais.

O grau de pureza dos sais obtidos na etapa de bioconversão - superior a 98% - é obtido ao final de três precipitações utilizando metanol ou etanol como solvente e realizado a 22 ± 2 °C. A eficiência da recuperação para o solvente metanol e os sais de cálcio são superiores (80%) quando comparados à eficiência do uso de etanol e dos sais de sódio (70%).

As análises propostas para a caracterização do ácido maltobiônico e seus sais de cálcio e sódio são úteis para comprovar a produção do composto por rota biotecnológica, ressaltando que as informações técnicas disponíveis na literatura referentes ao ácido maltobiônico e sais são restritas.

Os resultados obtidos de produção de ácido maltobiônico, em processo catalisado pelo complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, além do elevado grau de pureza dos compostos devidamente caracterizados neste trabalho, contribuem de forma relevante para o avanço da pesquisa sobre suas aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuação deste trabalho, sugerem-se:

- Avaliação do efeito antioxidante do ácido maltobiônico em alimentos e fármacos.
- Identificação de métodos e/ou procedimentos de conservação e de estocagem do ácido maltobiônico, uma vez que é um composto altamente higroscópico;
- Avaliação da estabilidade do ácido maltobiônico frente à exposição forçada à ambientes de estresse (alto ou baixo pH, alta ou baixa temperatura, agentes oxidantes, etc.)
- Estudo do escalonamento para a indústria do processo de produção de ácidos orgânicos utilizando o sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Society for Testing Materials ASTM E793-06 (2012). **Standard Test Method for Enthalpies of Fusion and Crystallization by Differential Scanning Calorimetry** Annual Book of ASTM Standards. Estados Unidos.

_____ ASTM E794-06 (2012). **Standard Test Method for Melting And Crystallization Temperatures By Thermal Analysis**. Annual Book of ASTM Standards. Estados Unidos.

_____ASTM E968-02 (2014). **Standard Practice for Heat Flow Calibration of Differential Scanning Calorimeters**. Annual Book of ASTM Standards. Estados Unidos.

Antrim, R.L.; Lee, C.P. (2001). High purity maltose process and products. **European Patent Office**. WO/2001/064934.

Armbruster, F.C.; Jacaway, W.A. (1970). Process for making high maltose syrup. **United States Patent**. 3,549,496.

Baldwin, C., Akashe, A., Zeller, A.L. and Marquez-Sanchez, M. (2007). Mineral complexes of lactobionic acid and method of using for mineral fortification of food products. **United States Patent** 0,026,110.

Barcelos, G.S.; Dias, L.C.; Fernandes, P.L.; Fernandes, R.C.R.; Borges, A.C.; Kalks, K.H.M.; Tótola, M.R. (2014). Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage. **Springer Plus Open Journal**. 3:49.

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** p.476, São Carlos, 1996.

Bio-Rad Laboratories Inc. (2018). Chromatography: Aminex HPLC Columns. **Disponível (online)** http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6333.pdf (6 de dezembro)

Bisinella, R.Z.B.; Ribeiro, J.C.B.; Oliveira, C.S.; Colman, T.A.D.; Schnitzler, E.; Masson, M.L. (2017). Some instrumental methods applied in food chemistry to characterize lactulose and lactobionic acid. **Food Chemistry** 220: 295-298.

Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A. (1992). **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Varela. 223p.

Brasil. (2003). **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

Brasil. (2010). **Farmacopeia Brasileira**, volume 2/Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

Brouda, I.; Brenda, L.; Weinkauff, R.; Green, B. (2010). Maltobionic acid, a powerful yet gentle skincare ingredient with multiple benefits to protect skin and reverse the visible signs of aging. **Summer Academy Meeting of the American Academy of Dermatology**. Chicago, IL.

Bruice, P.Y. (2006). **Química Orgânica**, 4ª Ed, v. 1. Prentice Hall.

Budavari, S.; O'Neil, M.J.; Smith, A.; Heckelman, P.E.; Kinneary, J.F. (1996). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12th ed., Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, p.2563.

Canilha, L. (2006). Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. Ano IX. 36: 48-57.

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

Carra, S.; Rodrigues, D.C.; Beraldo, N.M.C.; Forest, P.; Reginatto, C.; Bassani, V.L.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2014). Avaliação da temperatura na produção de ácido

lactobiônico e sorbitol por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. **Anais do XX Congresso de Engenharia Química**. Florianópolis, 2014.

Carra, S.; Rodrigues, D. C.; Beraldo, N. M. C.; Silveira, M. M.; Bassani, V. L.; Malvessi, E. (2015). Reuso de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácido lactobiônico. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Anais**. Fortaleza, 2015.

Chang, R. (1994). **Química**. McGraw-Hill, 5ª edição.

ChemSpider (2019). ChemSpider: Search and share chemistry. **Disponível (online)** <http://www.chemspider.com/> (19/01/2019).

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. (2001). **Organic Chemistry**. Oxford, cap. 4.

Delagustin, M.G. (2016). Caracterização do ácido lactobiônico e de diferentes lactobionatos produzidos por *Zymomonas mobilis* visando à utilização na área farmacêutica. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, UCS, Caxias do Sul, Brasil.

Delagustin, M.G.; Gonçalves, E.; Carra, S.; Barcellos, T.; Bassani, V.L.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2017). Bioproduction and characterization of sodium, potassium, and calcium lactobionates. **Química Nova**, v. 40. 9: 1003-1008.

Doelle, H.W.; Gumbira-Said, E.; Greenfield, P.F.; Mitchell, D.A. (1993). Operational parameters for packed beds in solid-state cultivation. **Biotechnology Advances**. 11: 599-610.

Duarte, R.A.P. (2012). Sensor óptico de glicose baseado em cristais líquidos. **Dissertação de mestrado**. Mestrado em engenharia de eletrônica e telecomunicações, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Dutta, S.K.; Basu, S.K. (1979). Erythromycin aldobionates. **United States Patent** 4,137,397.

Eduardo, M.P. (2002). Hidrólise enzimática de mandioca e puba para a obtenção de xarope de maltose. 2002. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

European Pharmacopeia (2009). **European Pharmacopoeia**. 6 ed. Strasbourg: Council of Europe.

Fernandes, K; Lima, C.S.; Lopes, F.M. (2010). Técnicas de imobilização de enzimas. **Revista Processos Químicos**. 2: 53-58.

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.

Flores, M.L.; Santos, T.; Aver, D.; Folle, A.B.; Carra, S.; Valduga, E.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2018a). Influence of temperature and pH on the production of maltobionic acid by an enzymatic complex of *Zymomonas mobilis* using maltose syrup as an alternative substrate. XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Anais**. Florianópolis, Santa Catarina. 2018.

Flores, M.L.; Santos, T.; Aver, D.; Carra, S.; Folle, A.B.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2018b). Bioproduction and purification of calcium and sodium maltobionate. XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Anais**. Florianópolis, Santa Catarina, 2018.

Folle, A.B.; Baschera, V.M.; Vivan, L.T.; Carra, S.; Polidoro, T.A.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2018). Assessment of different systems for the production of aldonic acids and sorbitol by calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Bioprocess Biosystems Engineering**. 41: 184-194.

FoodB (2019). FoodB Database. **Disponível (online)** <http://foodb.ca/> (19/01/2019).

Freitas, V.A. (1990). Produção de sorbitol: análise técnico-econômica dos processos eletroquímico e catalítico: proposta de um projeto básico. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1990.

Fuertes, P.M.; Fleche, G.M. (1991). Process for the oxidation of di-, tri-, oligo- and polysaccharides into polyhydroxycarboxylic acids, catalyst used and products thus obtained. **United States Patent** 4,985,553.

Fukami, K.; Kawai, K.; Takeuchi, S.; Harada, Y.; Hagura, Y. (2016). Effect of water content on the glass transition temperature of calcium maltobionate and its application to the characterization of non-Arrhenius viscosity behavior. **Food Biophysics**, 11: 410-416.

Furlan, T.; Natalon, I.L.; Tolomelli, P. (2014). Process for producing maltose from starch. **European Patent Office**. WO/2013/114222.

Garin, D. (2016). Uso do sistema enzimático de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácidos maltobiônico e lactobiônico. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, UCS, Caxias do Sul.

Glattfeld, J.W.E., Hanke, M.T. (1918). The oxidation of maltose in alkaline solution by hydrogen peroxide and by air. The preparation and study of maltobionic acid. **Artigo referente à tese de doutorado do autor, publicado na biblioteca da Universidade de Chicago**, 1918.

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

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

Harris, D.C. (2005). **Análise Química Quantitativa**. 6ª Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro.

Hayakawa, K.; Suehiro, D.; Fukami, K. (2016). Composition for bone-strengthening acceleration. **Japan Patent JP/2016/117752**.

He, M.X.; Wu, B.; Han, Q.; Ruan, Z.Y.; Wang, J.L.; Shui, Z.X.; Dai, L.C.; Zhu, Q.L.; Pan, K.; Tang, X.Y.; Wang, W.G.; Hu, Q.C. (2014). *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**. 7:101.

Isbell, S. H.; Schaffer, R. (1957). Lithium maltobionate and process for making same. **United States Patent 2,779,760**.

Jonas, R.; Silveira, M.M. (2004). Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 118: 321-336.

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 Microbiology** 21:377-397.

Mahan, B. H; Myers, R. J. (1997). **Química: um curso universitário**. 4. ed. São Paulo: E. Blucher.

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*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49: 139-144.

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

Malvessi, E.; Carra, S.; Silveira, M.M.; Ayub, M.A.Z. (2010). Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose

oxidoreductase/glucono- δ -lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, 51: 1-6.

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*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 40:1–10.

Medeiros, M.; Strenel, D. (2009). Determinação de maltose em xarope produzido com resíduos de arroz como fonte de amido. **Trabalho de Conclusão de Curso Engenharia Química**. Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão.

Meiberg, J.B.M.; Bruinenberg, P.M.; Sloots, B. (1990). A process for the fermentative oxidation of reducing disaccharides. **European Patent Office** 384534B1.

Mirescu, A.; Prube, U. (2007). A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, 70: 644-652.

Miyake, T.; Sato, Y. (1975). Process for producing aldonic acids and starch sugars containing aldonic acids. **United States Patent** 3,862,005.

Modena, M.A.; Reggiolo, D.B.; Modena, A.L.S.; Di Reno, E.M.C. (2013). New low molecular complexes between iron and maltobionic acid, use therefore for intramuscular or subcutaneous administration in the treatment of anemic states, and new pharmaceutical compositions adapted for these uses. **United States Patent**. 0,079,298.

Neostrata Company. (2010). **Technical Information Bulletin: Maltobionic Acid**. Inc., 307 College Road East, Princeton, New Jersey, USA.

Nielsen, P.M. (2008). Method to produce maltobionate. **European Patent Office** RU/2010/107240. Russia.

Nigam, P.; Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**. 9:770-778.

Pathare, B.; Tambe, V.; Patil, V. (2014). A review on various analytical methods used in determination of dissociation constant. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 8: 26-34.

Paiva, J.; Ferreira, A.J.; Fiolhais, C. (2015) **Novo 10Q**, Texto Editores, 1ª edição, Lisboa.

Pedruzzi, I.; Malvessi, E.; Mata, G.V.; 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. **Journal of Chromatography A**. 1145:128-132.

Pedruzzi, I.; 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 and Microbial Technology**. 49: 183-191.

Peretti, F.A. (2006). Avaliação de técnica de eletrodialise para a separação de ácido lactobiônico produzido por via rota biotecnológica. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, UCS, Caxias do Sul.

Pezzotti, F.; Therisod, M. (2006). Enzymatic synthesis of aldonic acids. **Carbohydrate Research**, 13:2290-2292.

Rowe, R.C.; Sheskey, P.J.; Quinn, M.E. (2009). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**; 6ª edição. Pharmaceutical press Publisher. Reino Unido/EUA.

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. **Biotechnology Letters**. 19:1205-1208.

Sena, L.; Luiz, J.; Andrade, P.; Brito, G.; Lima, A.A.M.; Lobo, I.F. (2014). Excipientes farmacêuticos e seus riscos à saúde: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**. 5:25-34.

Silveira, M.M.; Jonas, R. (2002). The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59:400-408.

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 0700421-4, Brasil.

Simões, T.S.; Queirós, M.A.; Simões, M.O. (2015). **Há Química Entre Nós**, Porto Editora, 1ª edição, Porto.

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

Stoll, A.; Burckhardt, E. (1938). Manufacture of water-soluble calcium compounds. **United States Patent** 2,134,456.

Vargas, G.B.; Polidoro, T.A. (2015). Desenvolvimento de sistema de controle de pH utilizando álcali pulverizado para processos enzimáticos de produção de ácidos orgânicos. **XXVII Salão de Iniciação Científica**, UFRGS.

Vaniski, R.; Corti, D.; Drunkler, D.A. (2017). Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**. 1:156-184.

Viikari, L. (1986). By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Critical Reviews in Biotechnology**. 7:237-261.

Viikari, L. (1988). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Critical Reviews in Biotechnology**. 7: 237-261.

Vogel, A.I. (1981). *Química Analítica Qualitativa*. 5ª edição. p. 39-43. Editora Mestre Jou. São Paulo.

Yongping, T.; Zheng, Z.; Liang, Z.; Lihong, C. (1987). Technological process of preparing high content of maltose from rice. **Patente de invenção**. CN 86102356. China.

Yu, R.; Van Scott, E. (2001). Oligosaccharide aldonic acids and their topical use. **European Patent Office** WO/2001/001932.

Vujcic, Z.; Miloradovic, Z.; Milovanovic, A.; Bozic, N. (2011). Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. **Food Chem.** 126:236–240.

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

Zanin, G. M.; Moraes, F. F. (2004). Enzimas imobilizadas. In: Said, S. e Pietro, R.C.L.R. (Ed.) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Legis Summa .35-85.

ANEXO 1 – Ficha técnica do xarope de maltose



MOR-SWEET® 1557

Solução aquosa com alto teor de maltose, transparente, concentrada de açúcares e de sabor ligeiramente doce, produzida através da hidrólise do amido.

Especificações:**Físico-Químicas:**

	Min.	Máx.
Condutividade, µmhos (30% D.S.)	-	1100
Cor da Solução x 100	-	5,00
Substância Seca, %	81,0	83,0
pH	4,5	5,5
SO ₂ , ppm	-	100,0

Microbiológicas:

	m	M
Contagem Total de Bactérias, ufc/g (n=5, c=2)	100	1000
Fungos e Leveduras, ufc/g (n=5, c=1)	100	1000
Coliformes Totais /g	Ausente-	
Coliformes Fecais /g	Ausente-	
E. coli /g	Ausente-	
Clostrídio sulfito redutor, /2g	Ausente-	
Salmonella /25g	Ausente-	
Staphylococcus aureus, /5g	Ausente-	

n: número de unidades amostrais escolhidas separada e independentemente;

c: número tolerável de amostras com resultados entre m e M;

m: nível de organismos em teste aceitável e tolerável no produto;

M: a máxima concentração de organismos em teste aceitável. Valores acima de M em qualquer unidade amostral são inaceitáveis.

Informações sensoriais:

Aspecto	A	-
Cor	Levemente amarelado	-
Sabor	A	-

Composição aproximada em açúcares (% B.Seca):

Dextrose	-	12
Maltose	42	-
Maltotriose	10	-
Outros açúcares	23	28

Informações nutricionais/100g *VT:

Carboidrato, g	82,0
Fibra Alimentar, g	< 1
Gorduras Totais, g	0,0
Proteínas, g	<1,0
Sódio, mg	42,0
Valor Calórico, kcal	328

*VT - Valores Típicos ou de referência. Não constituem especificação do produto.

Principais aplicações:

Alimentos processados, Balas duras, Balas mastigáveis, Biscoitos, Cervejas, Chocolates/Recheios para bombom, Coberturas, Produtos cárneos, Pães/Misturas para pães, Sorvetes

Funcionalidade:**Produtos Cárneos:**

- Diminui a oxidação da oximioglobina, evitando o escurecimento da carne e reduzindo a adição de nitratos.

- Ameniza o ressecamento do produto.

- Diminui o tempo de cura, aumentando o rendimento do processo.

Sorvetes:

- Protege contra variações bruscas de temperatura.

- Promove viscosidade.

- Controla o dulçor.

- Controla a estabilidade da emulsão, propiciando maciez.

Cerveja:

- Funciona como adjunto no processo de fermentação para produção de cervejas em substituição de grãos e malte.

Embalagem - Vida útil:

A granel: 60 dias

Balde plástico 25, 28, 30 kg: 180 dias

Container de papelão 1000, 1200 kg: 180 dias

Tambor de aço tampa removível 280 kg: 180 dias

Tambor de plástico tampa fixa 280 kg: 365 dias

Armazenagem:

Armazenar sobre pallets, em local coberto, seco e ventilado.

Informações Regulatórias:

AUP: 159/05

Certificado Kosher

Certificado Halal

MS: Dispensado de registro (Res. RDC nº27, 06/08/10-ANVISA)

Decreto 55.871 26/03/65-ANVISA

Resolução RDC nº14, 28/03/2014 - ANVISA

Resolução RDC nº12, 02/01/01-ANVISA

17/05/2016

Novembro, 2012

As informações aqui contidas são de título meramente indicativo das possibilidades técnicas de utilização do produto, não aplicando garantia de resultado e não dispensando o usuário da verificação de eventuais limitações técnicas de uso em condições ou finalidades específicas. A Ingredion Incorporated e as empresas do seu grupo reservam-se o direito de modificar as especificações do produto.

As marca e o logotipo aqui referidos são marcas registradas do grupo INGREDION e utilizadas pela Ingredion Brasil Ing. Ind. Ltda. Todos os direitos reservados. Copyright 2012

Ingredion Brasil Ing. Ind. Ltda.
Av. do Café, 277 - 2º andar
04311-000 - São Paulo - SP

t: 0300 7895800 / 55 11 5070-7835
e: sac.br@ingredion.com

www.ingredion.com