



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613785-7 A2**

(22) Data de Depósito: 13/06/2006  
(43) Data da Publicação: 01/02/2011  
(RPI 2091)



(51) *Int.Cl.:*  
A23L 1/0522  
A23L 1/29

(54) Título: **PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CÉLULAS VEGETAIS INTACTAS CONTENDO AMIDO E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO**

(57) Resumo: PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CÉLULAS VEGETAIS INTACTAS CONTENDO AMIDO E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO. A presente invenção refere-se a produtos alimentícios contendo contêm amido que possuem propriedades de liberação de energia controlada, em que pelo menos 25% em peso do amido está contido dentro das células vegetais intactas.

(30) Prioridade Unionista: 08/07/2005 EP 05076574.2

(73) Titular(es): Unilever N.V.

(72) Inventor(es): HendrikusTheodorus Wilhelmus Maria van der Hijden, Henricus Petrus Ferdinand Peters, Nikolaos Mavroudis

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005691 de 13/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/006383de 18/01/2007

**PI0613785-7**

**“PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO, PROCESSO PARA A  
PREPARAÇÃO DE CÉLULAS VEGETAIS INTACTAS CONTENDO AMIDO E  
PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE  
CONTÉM AMIDO”**

5

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a produtos alimentícios. Em particular, ela se refere a um produto alimentício contendo amido que possui propriedades de liberação de energia controlada ou retardada e a um processo para a preparação de tal produto.

10

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

De acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde, a melhor dieta para manter a saúde compreende pelo menos 55% da energia total de uma variedade de fontes de carboidratos. Os cereais com alto teor de amido fornecem a fonte principal de carboidratos ao redor do mundo. Muitos outros produtos alimentícios compreendem o amido, tal como o pão, macarrão e batatas.

O amido é um homopolímero de glicose. Ele consiste em moléculas de amilose essencialmente lineares e moléculas de amilopectina altamente ramificadas. O amido pode ser rapidamente convertido em glicose no trato intestinal. Então, a glicose entra na corrente sangüínea e fornece energia ao corpo. Nos humanos, a degradação do amido é iniciada pela ação de  $\alpha$ -amilases na saliva. A digestão das moléculas de amido remanescentes é continuada pela ação de  $\alpha$ -amilases pancreáticas. Em geral, a amilase pancreática é mais importante para a digestão porque geralmente a comida não permanece na boca tempo o suficiente para ser totalmente digerida pela amilase salivar. Os produtos principais da digestão do amido pela  $\alpha$ -amilase humana são os di- e os oligossacarídeos. A hidrólise final destes produtos é realizada pelas enzimas de degradação do oligossacarídeo amiloglicosidase

(glican 1,4- $\alpha$ -glicosidase) e isomaltase (oligo 1,6-glicosidase) na borda em escova.

Entretanto, há uma evidência crescente de que a alta ingestão de produtos alimentícios que leva a uma resposta de glicemia elevada (glicose sangüínea) possui um efeito deletério na diabetes do tipo 2 e de doenças cardiovasculares. Alimentos dietéticos que levam a uma resposta glicêmica baixa parecem ser úteis na administração da síndrome metabólica e da hiperlipemia. A diminuição dos níveis de colesterol também foi observada em sujeitos saudáveis e também há indicações de melhoras na atividade fibrinolítica.

As diferenças no perfil de glicose pós-prandial pode também ser de significância fisiológica para a saciedade e a manutenção do peso. Entretanto, os dados com relação à capacidade de saciedade em relação às características glicêmicas não são consistentes.

Muito menos informação está presente com relação ao impacto potencial do nível glicêmico pós-prandial na função cognitiva e no desempenho mental. Existem alguns estudos para dar suporte a uma relação entre a disponibilidade da glicose e as mudanças no humor e/ou na função mental ('energia', 'agilidade', 'concentração', 'irritabilidade reduzida', 'fadiga reduzida', 'vitalidade'). A curva de glicose sangüínea ótima ainda tem que ser definida.

O conceito de 'energia' é utilizado amplamente na indústria alimentícia. Entretanto, a maior parte da 'energia' reivindicada não é substanciada cientificamente e a tecnologia base é predominantemente genérica. Além disso, o conceito é muito mais restrito aos cereais e aos biscoitos. Para outras aplicações em que o teor de água é maior e o calor é aplicado no processo de produção, esta abordagem não irá funcionar. Por exemplo, quando os grânulos de amido são aquecidos em presença de água, ocorre a gelatinização, que cede as moléculas de amido totalmente acessíveis às enzimas digestivas, resultando no amido

rapidamente digerível. Dependendo do processo, parte do amido pode se tornar amido indigerível sem o valor nutricional.

É portanto um objeto da presente invenção fornecer um produto alimentício que contém amido que possui propriedades de liberação de energia controlada e que supera uma ou mais das desvantagens mencionadas acima. De modo surpreendente, foi descoberto agora que o objeto mencionado acima pode ser obtido pelo produto alimentício que contém amido de acordo com a presente invenção, em que pelo menos 25%, de preferência, pelo menos 40%, de maior preferência, pelo menos 60% em peso do amido está contido dentro das células vegetais intactas.

De acordo com a presente invenção, as barreiras celulares vegetais naturais (isto é, a parede celular vegetal) são utilizadas para retardar a hidrólise do amido dentro das celulares vegetais. Em particular, as células de ervilha intactas e as células de bananas, também após o aquecimento, mostraram excelentes propriedades de liberação de energia controlada.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um produto alimentício que contém amido que possui propriedades de liberação de energia controlada, em que pelo menos 25% em peso do amido está contido dentro de células vegetais intactas.

De acordo com um segundo aspecto, é fornecido um processo para a preparação de tal produto alimentício.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a um produto alimentício que contém amido. Pela palavra "amido", entende-se qualquer homopolímero de glicose, incluindo as formas conjugadas com amido de ocorrência natural, tal como amido fosforilado. Os amidos de ocorrência natural contêm moléculas de amilose lineares e moléculas de amilopectina altamente ramificadas.

O produto alimentício da presente invenção possui propriedades de liberação de energia “controlada”. Há agora diversas maneiras de visualizar e quantificar o efeito glicêmico dos alimentos. O conceito de índice glicêmico (GI) foi introduzido para permitir a comparação dos alimentos com base em seu efeito glicêmico. Ele fornece uma comparação padronizada para a resposta de glicose pós-prandial de 2 horas de um carboidrato com aquele do pão branco ou glicose.

Evitar produtos que causam um nível de açúcar sanguíneo elevado imediato irá ajudar a obter uma menor resposta de glicose, mas isto também pode ser acompanhado pelos carboidratos “lentos”. A este respeito, fala-se agora de carboidratos disponíveis rapidamente (RAC) ou carboidratos disponíveis lentamente (SAC) ou, especificamente para amidos e sua digestibilidade, de amidos digeríveis rapidamente (RDS), de amidos digeríveis lentamente (SDS), e de amido resistente (RS). O amido digerível rapidamente, é o amido que é rapidamente hidrolisado, que resulta em altas concentrações de glicose sanguínea, que são mantidas apenas por um curto período de tempo. O SDS é definido como o amido que está propenso a ser digerido completamente no intestino delgado, mas em uma taxa mais lenta, resultando em níveis de glicose sanguínea menores que são mantidas por um tempo mais longo.

O amido resistente é a soma do amido e dos produtos da degradação do amido que não são absorvidos no intestino delgado de pessoas normais. Portanto, o RS atinge o cólon onde ele pode ser fermentado pelos microorganismos presentes e onde ele pode desempenhar um papel na manutenção da saúde digestiva humana.

Os determinantes das excursões de glicose pós-prandial são numerosos e incluem a quantidade e a natureza dos carboidratos ingeridos, a taxa de esvaziamento gástrico, as taxas da digestão de carboidrato intraluminal e da absorção de glicose intestinal, a resposta hormonal entero-pancreática e as mudanças metabólicas pós-absortivas específicas. Destes processos, as taxas de

esvaziamento gástrico e a digestão/ absorção foram as mais importantes. A taxa de digestão é o principal determinante da glicemia no caso de alimentos ricos em amido. As diferenças nas respostas glicêmicas para o amido dietético estão diretamente relacionadas com a taxa de digestão do amido.

5 Conforme indicada acima, a glicose disponível lentamente (SAG) está propensa a ser digerida completamente no intestino delgado, mas em uma taxa mais lenta, resultando em níveis de glicose sanguínea menores que são mantidas por um tempo mais longo. Por outro lado, a glicose disponível rapidamente (RAG) é o carboidrato que é hidrolisado rapidamente, que resulta  
10 nas concentrações de glicose sanguínea elevadas, que são mantidas por apenas um curto período de tempo.

Englyst et al., (Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ, Cummings JH. *Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycaemic response*. American Journal of Clinical Nutrition (1999)  
15 69 : 448-54) utilizou um teste *in vitro* que se correlaciona significativamente com as curvas de glicose *in vivo*. A medida *in vitro* de RAG e SAG poderia prever a resposta glicêmica medida em estudos humanos. Englyst et al., definiu RAG na situação *in vitro* pela quantidade de carboidrato hidrolisado à glicose após 20 minutos (denominado G20). Também, a quantidade hidrolisada foi  
20 medida após 120 minutos (denominado G120). A quantidade hidrolisada durante estes 120 minutos foi considerada como sendo disponível para a absorção no intestino delgado. Qualquer coisa hidrolisada após 120 minutos foi considerada como não disponível para a absorção e considerada resistente. A quantidade de carboidratos hidrolisados entre 20 e 120 minutos (isto é, G120 –  
25 G20) foi definida como SAG. Na situação ideal, gostaria-se de possuir um carboidrato com um G20 muito baixo e um G120 muito alto, resultando em uma elevada diferença entre G20 e G120. Entretanto, muitos esforços na indústria para fazer certos produtos digeríveis lentamente os tornam (parcialmente)

resistentes. Como tal, deseja-se manter G120 o mais próximo possível do máximo teórico (isto é, 100% da quantidade total de carboidrato disponível teoricamente).

Na presente invenção, definimos “liberação de energia controlada” como a liberação de carboidratos representada por uma hidrólise *in vitro* (curva), onde G120 e G20 é significativamente maior do que em um controle apropriado que contém a mesma quantidade de carboidrato disponível, enquanto G120 é o mais alto possível, isto é, pelo menos 50, 65, 80 ou mesmo 90% do máximo teórico.

Ao variar as quantidades relativas e pela combinação dos carboidratos digeríveis rapidamente (isto é, amido) e dos carboidratos com as propriedades mencionadas acima, as propriedades de liberação de energia em um produto alimentício podem ser controladas.

De acordo com a presente invenção, as barreiras celulares vegetais naturais (isto é, a parede celular vegetal) podem ser utilizadas para controlar a hidrólise de amido dentro das células vegetais. Na seguinte Tabela 1, alguns exemplos são dados de células vegetais que contêm quantidades suficientes de amido durante algumas de suas fases de desenvolvimento, isto é, pelo menos cerca de 5% em peso, tal que eles podem ser utilizados na presente invenção.

**TABELA 1**

<b>Raiz/ tubérculo</b>
Mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> )
Batatas ( <i>Solanun tuberosum</i> )
Pastinaca ( <i>Pastinaca sativa</i> )
Inhame ( <i>Dioscorea spp</i> )
Tannia ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> )

<b>Sementes</b>
(a) Grãos
Milho ( <i>Zea mays</i> )
Trigo durum ( <i>Triticum durum</i> )
Trigo branco duro ( <i>Triticum aestivum</i> )
Fagópiro ( <i>Fagopyrum esculentum Moench</i> )
Aveia ( <i>Avena sativa</i> )
Arroz selvagem ( <i>Zizania spp</i> )
Arroz integral ( <i>Oryza sativa L.</i> )
<b>(b) Nozes</b>
Nozes brasileira ( <i>Bertholletia excelsa</i> )
Castanha chinesa ( <i>Casteanea mollissima</i> )
Caju ( <i>Anacardium occidentale</i> )
Castanha japonesa ( <i>Casteanea crenata</i> )
Noz manteiga ( <i>Juglans cinerea</i> )
Nozes Ginkgo ( <i>Ginkgo biloba</i> )
Pistache ( <i>Pistacia vera</i> )
Bolota ( <i>Quercus spp</i> )
Fruto da faia ( <i>Beechnut</i> ) ( <i>Fagus spp</i> )
<b>(c) Legumes</b>
Feijão-de-lima ( <i>Phaseolus lunatus</i> )
Feijão comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
Feijão rajado ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
Feijão branco ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
Feijão amarelo ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )

Feijão fava ( <i>Vicia faba</i> )
Feijão alado ( <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> )
Feijão de porco ( <i>Dolichos purpureus</i> )
Grão-de-bico ( <i>Cicer arietinum</i> )
Jicama ( <i>Pachyrhizus spp</i> )
Feijão fradinho ( <i>Vigna unguiculata</i> )
Feijão cavalinho ( <i>Vigna unguiculata cylindrica</i> )
Lentilha ( <i>Lens culinaris</i> )
Feijão de corda ( <i>Vigna unguiculata sesquipedalis</i> )
Feijão da china ( <i>Vigna radiata</i> )
Feijão mungo ( <i>Vigna mungo</i> )
Soja ( <i>Glycine max</i> )
Ervilha verde ( <i>Pisum sativus</i> )
<b>Frutas</b>
Banana ( <i>Musa paradisiaca</i> )
Banana da terra ( <i>Musa X paradisiaca</i> )
(não maduro) Tâmara ( <i>Phoenix dactylifera</i> )
(não maduro) Durião ( <i>Durio zibehinus</i> )
(não maduro) Manga ( <i>Mangifera indica</i> )
(não maduro) Figos ( <i>Ficus carica</i> )

Dois tipos de células foram descobertos como sendo de uso particular na presente invenção, isto é, as células de ervilha e as células de bananas.

As células vegetais intactas ou os agregados de células vegetais intactas podem ser preparados a partir de plantas completas ou suas partes

5 por um processo em que a adesão da célula é reduzida, tal que as células

individuais ou os pequenos agregados de células são formados. Os agregados de células vegetais são pequenos agrupamentos ou cachos de células vegetais, que podem ser de 200  $\mu\text{m}$  até 5 minutos de diâmetro.

O processo de preparação de células vegetais intactas envolve, em geral, uma etapa de absorção ou uma etapa de homogeneização, uma etapa de aquecimento e uma etapa de peneiração, opcionalmente, seguida por uma etapa de secagem por aspersão. Os meios aquosos adequados para a redução da adesão celular pela preparação por absorção incluem:

- 10 (a) 0,1 M, 0,5 M e 1 M de soluções de EDTA,
- (b) 0,04, 0,05, 0,08 e 0,2 g de  $\text{NaHCO}_3$ / g de soluções,
- (c) Água, soluções de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,
- (d) 0,05 – 0,5 M citratos,
- (e) 0,05 – 0,5 M de fosfato.

15 Outros agentes que poderiam resultar na separação celular são enzimas apropriadas, tais como pectinases, pectato e pectina-liase.

Após a absorção por uma série de horas, por exemplo, durante a noite, as células podem separar por um aquecimento brando na temperatura de 50 a 75° C por até 90 minutos. Então, o material vegetal (resfriado ou aquecido) é peneirado seqüencialmente através de uma série de peneiras com uma abertura igual ou maior do que:

- (1) 5 mm
- (2) 2 mm
- (3) 1 mm
- 25 (4) 500  $\mu\text{m}$
- (5) 250  $\mu\text{m}$  de crivo.

Dependendo da necessidade para a separação da célula nos cachos ou agregados específicos, um subconjunto apropriado de peneiras

pode ser utilizado. A separação celular máxima pode ser obtida pela utilização da peneira de menor abertura. Um grau máximo de separação celular reduz a probabilidade das células vegetais intactas serem detectadas no produto alimentício durante o consumo.

5                    Para o propósito da presente invenção, a característica de intacto das células vegetais em uma suspensão pode ser quantificada por duas abordagens:

(a) Utilização de um hemocitômetro: o uso de um hemocitômetro pode ser utilizado para quantificar o número máximo de  
10 células intactas únicas produzidas. Um hemocitômetro consiste em uma lâmina de vidro com uma câmara para a contagem das células em um dado volume. A câmara contém uma área pautada e a contagem foi feita visualmente com o auxílio de um microscópio. O único material celular foi transformado em uma suspensão ao ser diluído a 0,056 g de material/ mL.  
15 Uma gota da suspensão celular foi adicionada ao centro do vidro hemocitômetro. A dispersão das células foi mantida homogênea pela adição de 1 a 4 mg/ mL de goma guar. O número de células em cada quadrante principal foi contado. O número de células por volume foi calculado; sabendo que a profundidade do vidro hemocitômetro é de 1 mm  
20 e que um quadrante principal do hemocitômetro corresponde a uma área de 1 mm<sup>2</sup>. Um microscópio Leica DMRB (Das Mikroskop Research Biologisch) com uma câmara JVC KY55 foi utilizado para obter as imagens. Alguns valores típicos obtidos para as células de ervilhas são mostrados na Tabela 2 abaixo.

25

#### TABELA 2

A contagem celular corresponde a cada condição de tratamento. Todas foram peneiradas seqüencialmente através de peneiras de 1 mm, 450 µm e 250 µm.

Condições de absorção	Tempo da temperatura	Contagem celular (células/mm <sup>3</sup> )
Durante a noite, 0,056 g de NaHCO <sub>3</sub> / mL soln	50° C, 90 minutos	12
Durante a noite, 0,05 g de NaHCO <sub>3</sub> / mL soln	60° C, 90 minutos	31
Durante a noite, 0,05 g de NaHCO <sub>3</sub> / mL soln	70° C, 15 minutos	27
Durante a noite, 0,05 g de NaHCO <sub>3</sub> / mL soln	70° C, 90 minutos	50

(b) Peneiração a úmido: a peneiração a úmido poderia ser utilizada para a obtenção de uma visão geral da porcentagem de células intactas (tanto simples como agregados) *versus* a porcentagem de células rompidas e amido livre. Após a criação das células intactas (tanto simples como agregados) uma dada quantidade (dita 50 g) está sendo suspensa a uma dada quantidade de peneiras. A suspensão é passada através de uma série de peneiras. A seleção das peneiras com as aberturas inferiores é feita com base no diâmetro celular do produto que foi separado da célula. Para o caso das células de ervilhas, uma série de peneiras com aberturas igual ou inferior a 5 mm, 2 mm, 500 µm, 250 µm, 200 µm e 100 µm foram utilizadas. A amostra retida nas peneiras de 100 µm foi coletada e centrifugada a 3.500 g por 3 minutos. O precipitado foi coletado e seu peso foi medido. O peso do precipitado foi expresso como a porcentagem do peso inicial do material vegetal.

A porcentagem de amido contido nas células vegetais intactas (tanto em células simples como em agregados) pode ser calculada utilizando os métodos seguintes.

Uma quantidade de material vegetal é coletada e analisada para o teor de amido (TS). Uma quantidade de pasta de material vegetal é misturada com água. A peneiração a úmido é realizada conforme descrito acima na seção de peneiração a úmido e as frações das células intactas (tanto simples como agregados) são coletadas e seu teor de amido é analisado. Isto irá fornecer a quantidade de amido das células intactas (ICS) que irá resultar em uma liberação retardada de glicose. A porcentagem de amido retido nas células intactas é calculada na base dos valores medidos de ICS e TS.

As células vegetais intactas podem ser armazenadas em uma solução aquosa, mas elas são, de preferência, secas por aspensão para obter um pó seco. Tais pós secos podem ser utilizados de maneira conveniente na preparação de produtos alimentícios completos que contêm amido.

Alguns exemplos de produtos alimentícios que contêm amido de acordo com a presente invenção (mas não limitados a este) são: bebidas/ bebidas exceto a água, produtos de substituição de refeições tais como barras, pós, sopas, sopas secas/ concentrados de sopa em pó, espalháveis (gordura), molho, farinha (integral), sobremesas, temperos, bebidas esportivas, sucos de fruta, lanches, produtos prontos para o consumo e pré-embalados, sorvetes e produtos de refeições secas. As sopas (secas) são especialmente preferidas.

Os produtos alimentícios que contêm amido podem ser preparados pela mistura das células vegetais que contêm amido, na forma seca ou nas formas de uma suspensão aquosa, com o restante do produto alimentício.

O produto alimentício que contêm amido pode opcionalmente compreender ainda os ingredientes convencionais, tais como proteínas, gorduras, sais, componentes do sabor, colorantes, emulsificantes, conservantes, agentes acidificantes e similares.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A presente invenção pode ainda ser ilustrada por meio dos seguintes exemplos não limitantes. Nas figuras:

A Figura 1 mostra uma curva de Liberação de Glicose a partir das células de ervilha e das células de ervilha moídas pelo ensaio de glicose padrão. As suspensões foram submetidas a um tratamento de teste prévio a 100° C por 40 minutos (Megazyme D-Glucose HK Assay Kit).

A Figura 2 mostra uma Curva de Liberação de Glicose a partir das células de ervilha e do amido de ervilha *starlite* que foram utilizadas na quantidade de carboidrato hidrolisável total equivalente, pela ação de um ensaio de glicose padrão. As suspensões foram submetidas a um tratamento de teste prévio a 100° C por 40 minutos (Enzytec HK Assay Kit).

A Figura 3 mostra a concentração de Maltose (g/L) com base na absorção de 540 nm das amostras de DNSA tratadas de células de Banana.

15

### **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO**

#### **ALFA-AMILASES COM BASE EM BERNFELD**

(Bernfeld, P., 1955, Amylases,  $\alpha$  e  $\beta$ , *Methods in Enzymology*, vol 1, Academic Press, Nova Iorque, 149-158). Uma suspensão de 1% de amido foi feita em 0,02 M de tampão fosfato de pH 6,9, contendo 0,067 M de NaCl. Em alguns casos, as suspensões foram aquecidas a cerca de 1 minuto a 800 W em um forno microondas. Uma solução a 1% de  $\alpha$ -amilase Biobake foi feita em 0,9% de NaCl. As amostras de amido foram misturadas uma a uma com a solução enzimática e as misturas foram incubadas a 37° C a  $\pm$  100 rpm em uma incubadora de agitação (Innova 4080). As amostras foram tiradas em intervalos de tempo diferentes e analisadas quanto a degradação do amido pelo ensaio colorimétrico descrito abaixo. Os brancos foram preparados com tampão fosfato e as soluções de enzima desnaturadas.

**ALFA AMILASE OU PANCREATINA E AMILOGLICOSIDASE COM BASE EM ENGLYST**

(Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ, Cummings JH. *Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycaemic response*. American Journal of Clinical Nutrition (1999) 69, 448-454).

5 A 10 a 20 mL de amostras de glicose, que variam de 0,5 a 2% (p/v) de amido, foi adicionada 2,5 ou 5 mL de solução de enzima. As amostras de amido foram feitas em 0,1 M de tampão de acetato de sódio de pH 5,2, contendo 0,004 M de CaCl<sub>2</sub> (Englyst et al., 1999). Quando o amido foi aquecido para a ocorrência da gelatinização, as suspensões de amido foram aquecidas  
10 por 5 a 60 minutos a 100° C em um banho de água (Lauda), e resfriadas à temperatura ambiente subsequente.

As soluções de enzima utilizadas para a incubação das amostras de amido continham:

- (1) 3375 unidades/ mL de  $\alpha$ -amilase e 16 unidades/ mL de  
15 amiloglicosidase,  
(2) 3375 unidades/ mL de pancreatina e 16 unidades/ mL de amiloglicosidase.

Todas as soluções de enzimas foram feitas em água. Quando utilizada a pancreatina para as soluções de enzima, 18 gramas de  
20 pancreatina foram dissolvidas em 120 mL de água e suspensas por agitação. Após a centrifugação por 15 minutos a 1.500 g, 90 mL do sobrenadante foi misturado com 10 mL de água. A esta solução, a amiloglicosidase foi adicionada. As incubações foram realizadas em uma incubadora de agitação ou em um banho de agitação (Grant) a 37° C, a  
25 100 – 160 rpm. As amostras foram tiradas após intervalos de tempo diferentes, mas sempre após 20 e 120 minutos de incubação.

As amostras obtidas a partir de ambos os métodos de incubação foram analisadas quanto a degradação do amido por um ensaio colorimétrico

que mede a redução dos grupos finais ou pela quantificação da concentração de glicose.

### **HIDRÓLISE DE AMIDO TOTAL ÁCIDO**

O amido foi suspenso em 0,5 mL de água e hidrolisado em condições  
5 acidas (0,5 mL de HCl a 2M adicionado) a 99° C durante 2 horas para obter a hidrolise do amido total. Após o resfriamento, 0,5 mL de NaOH a 2 M foi adicionado para neutralizar a amostra. A quantidade de amido hidrolisado foi determinada por meio da quantificação de glicose por um teste colorimétrico ou enzimático.

### **QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO HIDROLISADO**

10

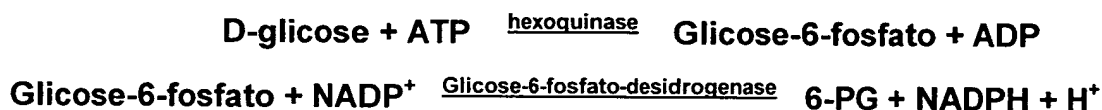
#### **(A) COLORIMÉTRICO**

A redução dos grupos finais foi medida por um método descrito por Bernfeld (1955). Foi dissolvido 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) em 200 mL de NaCl a 2 M e 500 mL de H<sub>2</sub>O. A agitação e o aquecimento da suspensão até 60° C promoveu a dissolução. Após isto, 300 g de sal Rochelle (tetrahidrato tartrato de  
15 sódio potássio) foi adicionado e a solução foi ajustada a 1.000 mL com H<sub>2</sub>O. A solução DNSA foi mantida longe da luz à temperatura ambiente. A 500 µL das amostras a serem analisadas foram adicionadas a 500 µl de solução DNSA e aquecidas por cerca de 5 minutos a 100° C em um termomisturador (Eppendorf Thermomixer comfort). Após isto, os tubos que contêm as misturas foram resfriados  
20 em água de torneira corrente ou em gelo. As soluções foram diluídas adequadamente com H<sub>2</sub>O e as absorvâncias foram medidas a 540 nm (Shimadzu). As concentrações padrão de maltose (que variam de 0 a 5 mg/ mL) foram preparadas em 0,02 M de tampão fosfato pH 6,9, contendo NaCl 0,067 M. A partir das absorvâncias medidas, as concentrações de maltose foram calculadas.

25

#### **(B) TESTE DE GLICOSE ENZIMÁTICA**

A concentração de glicose das amostras foi medida utilizando um kit enzimático (Megazyme D-Glucose HK Assay Kit, disponível pela Enzytec). A medida foi baseada no seguinte princípio:



A reação foi realizada em cadinhos plásticos de 3 mL. A 1 mL de tampão de trietanolamina (TEA) de pH 7,6, contendo cerca de 80 mg de NADP e 190 mg de ATP, foi adicionada 100 µL de amostra ou solução de glicose padrão, seguida por 1,9 mL de H<sub>2</sub>O. À solução branco, foi adicionado 2 mL de H<sub>2</sub>O. As soluções foram misturadas e após cerca de 3 minutos, a absorbância foi medida a 340 nm em relação a água. Então, 20 µL de suspensão de hexoquinase/ glicose-6-fosfato desidrogenase (200 U/ 100 U) em sulfato de amônio foi adicionada às soluções e as soluções foram misturadas. Após 10 a 15 minutos, a absorbância foi medida novamente e as medidas foram repetidas após 2 minutos para conferir se as reações tinham parado. A concentração de glicose das amostras foi calculada com a seguinte fórmula:

$$c = (V \times M_w \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1.000) \text{ [g de glicose/ L de solução de amostra]}$$

$$c = (3.020 \times 180,16 \times \Delta A) / (6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1.000) = 0,8636 \times \Delta A \text{ [g de glicose/ L de solução de amostra].}$$

### EXEMPLOS

#### EXEMPLO 1

#### CÉLULAS DE ERVILHA

As células foram isoladas das ervilhas medulosas secas adquiridas no supermercado local. As interações intercelulares eram enfraquecidas pela imersão durante a noite em NaHCO<sub>3</sub> a 0,2 g/ mL, seguida pelo tratamento a quente a 70° C durante 90 minutos. As células foram então separadas fisicamente por 3 etapas de peneiração subseqüentes (1 mm, 0,5 mm e 0,25 mm respectivamente). Após as etapas de peneiração células de ervilha foram secas por aspersão (LabPlant, SDS20) e armazenadas em forma de pó para ser utilizada na avaliação das propriedades de barreira das células. Para avaliar os efeitos das propriedades da barreira celular, os testes de hidrólise do amido foram aplicados a ambos o pó celular intacto e ao pó celular

fisicamente moído. O pó celular moído foi preparado a partir das células de ervilhas secas após a peneiração através da peneira de 0,075 mm. O material que passou através da peneira foi moído com argamassa e pilão em pó de ervilha moído. Antes do teste de enzima, ambos o pó de célula intacta e moída foram tratados a quente a 100° C por 40 minutos. As células intactas e moídas foram submetidas ao teste de hidrólise com pancreatina e amiloglicosidase (com base em Englyst) e o teor de glicose foi quantificado com o teste de glicose enzimática. A quantidade de amostras das células intactas e moídas no teste de hidrólise foi baseada em uma quantidade igual de amido conforme determinado com o teste de hidrólise do amido total. Os resultados são dados na Figura 1. Está claro que as células de ervilhas intactas fornecem uma hidrólise do amido significativamente menor comparado às células moídas, que mostram que a liberação de energia controlada pode ser obtida por meio das células de ervilhas intactas.

O padrão de hidrólise das células moídas também foi comparado a aquele de um amido de ervilha disponível comercialmente. A Figura 2 mostra que os padrões de hidrólise são quase idênticos, indicando que a integridade da célula é essencial para a liberação de energia controlada. Além disso, a comparação entre as células de ervilhas moídas e o amido de milho cozido resultou nas curvas de hidrólise quase idênticas no teste de hidrólise do amido, indicando que a taxa mais lenta da hidrólise das células vegetais intactas foi devido à integridade celular ao invés de outros constituintes da célula de ervilha.

## EXEMPLO 2

### HIDRÓLISE DO AMIDO DA BANANA

As células de banana foram isoladas de uma maneira similar. Para esta finalidade, a banana não madura (banana-da-terra) foi descascada e cortada em pequenas fatias. As fatias foram imersas durante a noite em tampão de ácido cítrico contendo ácido ascórbico a 1% e EDTA a 0,185% (p/p)

e misturadas em um misturador de cozinha. A calda resultante foi peneirada através de peneiras de 0,5 e 0,25 mm e gaze de algodão. O filtrado foi armazenado a frio durante a noite e as células foram secas em um forno. As células foram suspensas em 0,2 M de fosfato e aquecidas a 97° C durante 10 minutos. Após o resfriamento, a taxa de hidrólise do amido de banana foi determinada com o teste de Bernfeld. Para comparação, a mesma quantidade (conforme determinado pelo teste de análise de amido total) do amido de milho cozido também foi hidrolisada no teste Bernfeld.

Após uma etapa de tratamento, foi obtida uma hidrólise lenta do amido de banana como comparado ao amido de milho, indicando que a liberação de energia controlada pode ser obtida por meios das células de banana intactas. Os resultados são mostrados na Figura 3.

### REIVINDICAÇÕES

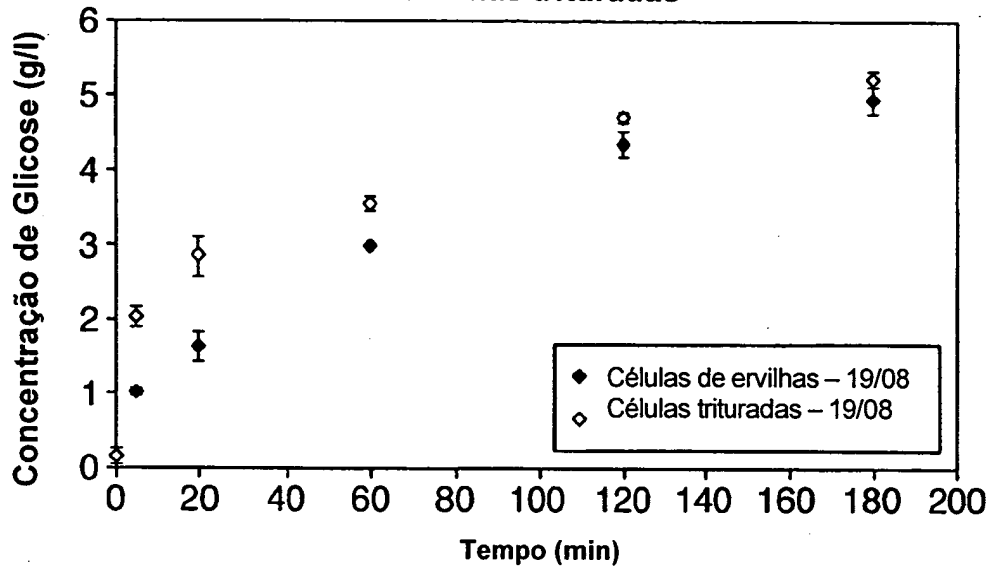
1. PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO, que possui propriedades de liberação de energia controlada, em que pelo menos 25% em peso do amido está contido dentro de células vegetais intactas.
- 5 2. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos 40% em peso do amido está contido dentro de células vegetais intactas.
3. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos 60% em peso do amido está contido dentro de células  
10 vegetais intactas.
4. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 3, em que as células vegetais intactas ocorrem na forma de agregados de células vegetais que possuem um diâmetro inferior a 5 mm.
5. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação  
15 4, em que os agregados das células vegetais possuem um diâmetro inferior a 1 mm, de preferência, inferior a 0,5 mm.
6. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, em que no máximo 80% do amido está presente na forma gelatinizada.
- 20 7. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 6, em que as células vegetais são selecionadas a partir do grupo que consiste em raízes/ tubérculos, sementes (grãos, nozes ou legumes) ou frutas.
8. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das  
25 reivindicações de 1 a 7, em que as células vegetais são células de ervilha ou células de banana.
9. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 8, que possui um teor de umidade elevado.

10. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 9, na forma de um produto líquido selecionado a partir do grupo que consiste em molhos, sopas e bebidas.

5 11. PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CÉLULAS VEGETAIS INTACTAS CONTENDO AMIDO, a partir de plantas completas ou suas partes, que compreende uma etapa de absorção ou uma etapa de homogeneização, uma etapa de aquecimento e uma etapa de peneiração, opcionalmente, seguida por uma etapa de secagem por aspensão

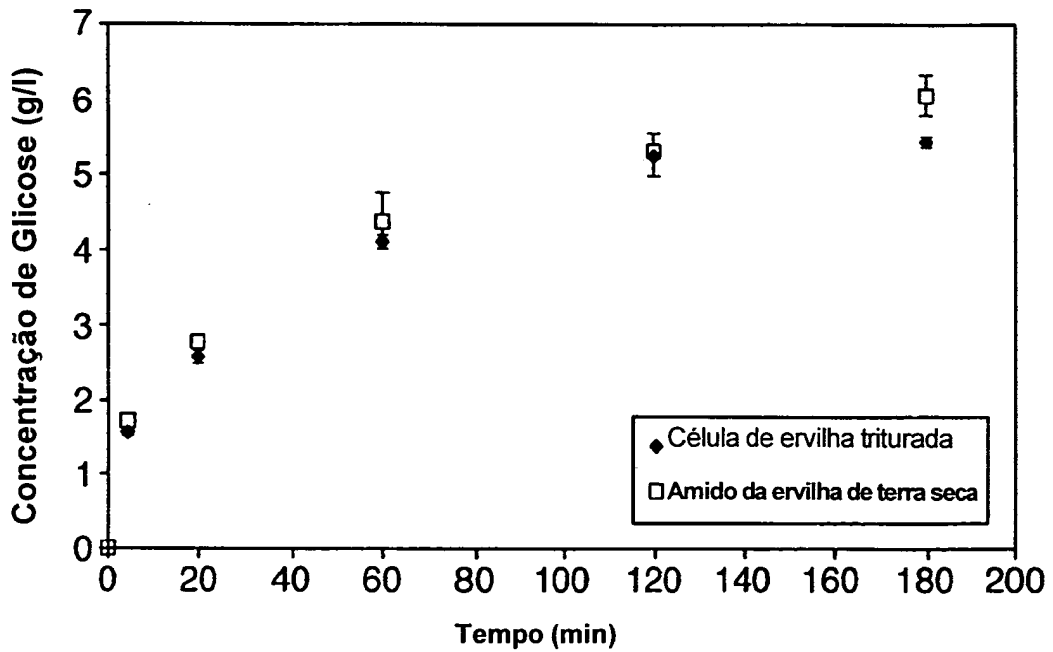
10 12. PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO, de acordo com as reivindicações de 1 a 10, que compreende a etapa de adição das células vegetais contendo amido intacto ao produto alimentício.

Teste de Glicose Padrão  
Células de ervilhas intactas contra células de  
ervilhas trituradas

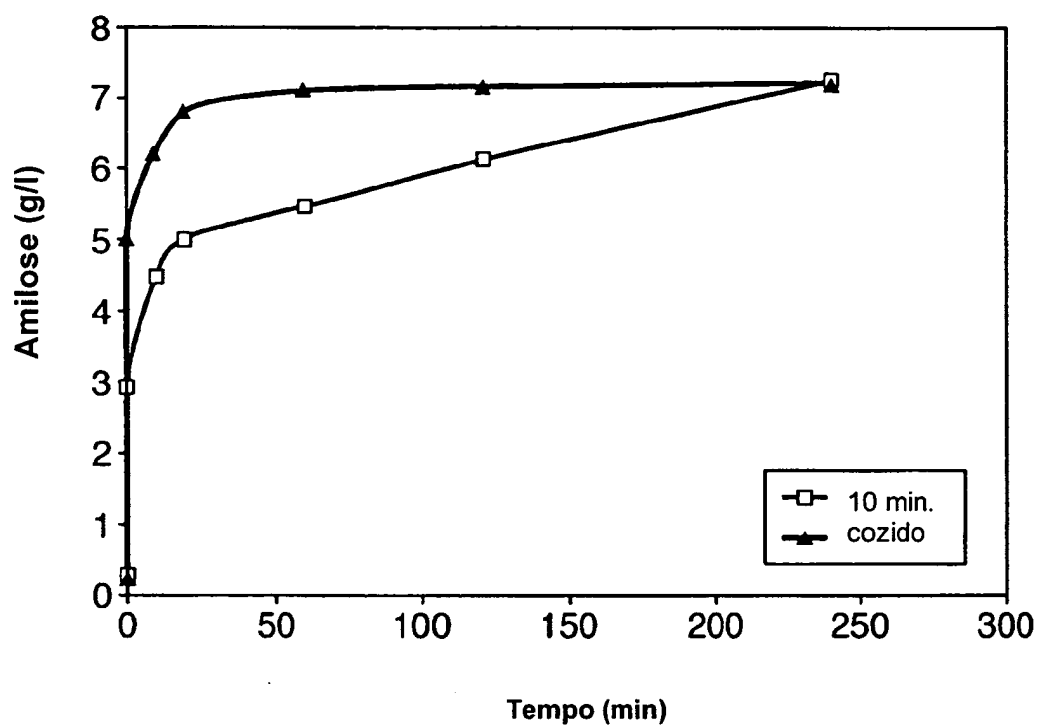


**Fig. 1**

Teste de glicose padrão  
Células de ervilhas trituradas contra células de  
ervilhas



**Fig. 2**

**Fig. 3**

**RESUMO****“PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE CONTÉM AMIDO, PROCESSO PARA A  
PREPARAÇÃO DE CÉLULAS VEGETAIS INTACTAS CONTENDO AMIDO E  
PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO QUE  
CONTÉM AMIDO”**

5

A presente invenção refere-se a produtos alimentícios contendo contêm amido que possuem propriedades de liberação de energia controlada, em que pelo menos 25% em peso do amido está contido dentro das células vegetais intactas.