

(11) Número de Publicação: **PT 1362517 E**

(51) Classificação Internacional:
A23L 1/522 (2006.01) **A23L 1/09** (2006.01)
C08B 30/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.05.14	(73) Titular(es): NATIONAL STARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION 1000 UNIQEMA BOULEVARD, NEW CASTLE DELAWARE 19720 US
(30) Prioridade(s): 2002.05.14 US 145302	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.11.19	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.04.11 021/2007	(72) Inventor(es): YONG-CHENG SHI US XIAOYUAN CUI US ANNE M. BIRKETT US MICHAEL G.THATCHER US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PRODUTO DE AMIDO DIGERÍVEL LENTAMENTE.**

(57) Resumo:
PRODUTO DE AMIDO DIGERÍVEL LENTAMENTE.

RESUMO

"PRODUTO DE AMIDO DIGERÍVEL LENTAMENTE"

Esta patente diz respeito a um amido digerível lentamente, preparado pela desramificação de amidos com baixos níveis de amilose, particularmente pela isoamilase. Tais amidos digeríveis lentamente são úteis em produtos comestíveis, incluindo suplementos nutricionais.

DESCRIÇÃO**"PRODUTO DE AMIDO DIGERÍVEL LENTAMENTE"**

A presente invenção relaciona-se com um produto de amido digerível lentamente, preparado pela desramificação enzimática de amidos com baixos níveis de amilose e possibilitando que as cadeias lineares curtas resultantes cristalizem numa forma altamente cristalina.

O amido é uma fonte primordial de energia na dieta americana típica. Os amidos refinados são majoritariamente ingeridos cozinhados, e nesta forma têm geralmente um elevado Índice Glicémico, sendo rápida e substancialmente digeridos. Alguns amidos refinados resistem à hidrólise enzimática no intestino delgado, de maneira que o amido não é substancialmente quebrado antes de atingir o intestino grosso onde é utilizado por microrganismos residentes (amido resistente).

A Patente dos Estados Unidos US-A-5 409 726 divulga uma composição de amido, um produto alimentar compreendendo a referida composição de amido e um processo para se obter a referida composição de amido, que envolve a desramificação de um amido de milho ceroso. As características do processo deste documento são um amido de milho ceroso 100% desramificado, uma entalpia de 26 - 28 J/g, uma

temperatura do ponto de fusão acima de 75 °C, a utilização de isoamilase e um passo de cristalização.

Tem sido reconhecida a necessidade de um amido digerível lentamente, que proveja o consumidor com glucose durante de um período de tempo extenso. Tal amido digerível lentamente será dessa forma útil tanto para aplicações alimentares como para aplicações em fármacos.

Tal amido digerível lentamente será um excelente hidrato de carbono para utilização em alimentos, incluindo alimentos medicinais e suplementos dietéticos, para indivíduos tanto diabéticos como pré-diabéticos. Tal amido digerível lentamente poderá também ser útil para indivíduos saudáveis desejando moderar a sua resposta à glucose ou obter uma libertação prolongada de energia por via da ingestão de alimentos.

A literatura de investigação indica um papel na saúde para os amidos digeríveis lentamente, como um resultado da libertação de glucose ao longo de um período de tempo extenso. A investigação sugere que os benefícios relacionados com a saúde podem incluir uma saciedade aumentada durante períodos de tempo mais longos (isto é, para utilização no controlo do peso), uma libertação prolongada de energia (isto é, para melhorar o rendimento atlético incluindo o treino), e melhorias na manutenção da atenção e da memória.

Tais amidos digeríveis lentamente poderão também ser úteis como fármacos, por exemplo para reduzir o risco de desenvolvimento da diabetes. Além disso, os amidos digeríveis lentamente poderão ser úteis no tratamento da hiperglicemia, da resistência à insulina, da hiperinsulinemia, dislipidemia, e da disfibrinólise. Poderá também ser útil para tratar a obesidade.

Surpreendentemente, foi agora descoberto que um amido digerível lentamente pode ser preparado pela desramificação enzimática de amidos contendo baixos níveis de amilose.

A presente invenção está direccionada para uma composição de amido preparada a partir de um amido convertido com baixos níveis de amilose compreendendo α -glucanos de cadeia linear cristalinos caracterizado por:

- a) pelo menos 20% de amido digerível lentamente;
- b) menos do que 60% de amido digerível rapidamente;
- c) uma temperatura do ponto de fusão, T_p conforme o determinado por DSC, de pelo menos 70 °C; e
- d) uma entalpia, ΔH conforme o determinado por DSC, de pelo menos 25 J/g,

em que a composição está desramificada em pelo menos 90%,

e) em que pelo menos 50% é digerida dentro de duas horas conforme o determinado segundo Englyst, et al., Eur. J. Clin. Nutr. 46, pág. 33-50 (1992); e

em que o amido com baixos níveis de amilose compreende não mais do que 10% em peso de amilose, o amido rapidamente digerível compreende um amido ou porções dele que são digeridas dentro de vinte minutos de digestão, e o amido digerível lentamente compreende um amido ou uma fracção dele que não é nem amido digerível rapidamente nem amido resistente.

Os amidos digeríveis lentamente proporcionam uma libertação prolongada de energia com um baixo Índice Glicémico.

Como especificado acima, o termo amido digerível rapidamente tem a intenção de designar um amido ou porções dele que são digeridas dentro de vinte minutos de digestão.

Como especificado acima, o termo amido resistente tem a intenção de designar um amido, ou a fracção dele, que não é digerido no intestino delgado, conforme descrito por Englyst et al, 1992 (Englyst et al, European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46, S33-S50).

Como especificado acima, o termo amido digerível lentamente tem a intenção de designar um amido, ou a fracção dele, que não é nem amido digerível rapidamente nem amido resistente, conforme descrito por Englyst et al, 1992 (Englyst et al, European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46, S33-S50).

Como aqui se utiliza, o termo amilose de cadeia curta refere-se a polímeros de cadeia linear contendo de 5 a 65 unidades de glucose anidra ligadas através de ligações alfa-1,4-D-glucosido.

Amido totalmente ou completamente desramificado, como aqui se utiliza, tem a intenção de significar que o tal compreende teoricamente 100%, em peso, de amilose de cadeia curta e, na prática, que o tal está tão altamente desramificado que uma actividade enzimática adicional não produz uma alteração mensurável na percentagem de amilose de cadeia curta.

O Índice Glicémico, como aqui se utiliza, tem a intenção de designar a área incremental abaixo da curva de resposta à glucose sanguínea de uma porção de hidratos de carbono de 50 g de um alimento de teste expressa como a percentagem da resposta à mesma quantidade de hidrato de carbono a partir de um alimento padrão tomado pelo mesmo sujeito. Tipicamente, o hidrato de carbono está numa base disponível e são utilizados tanto o pão branco como a glucose como alimento padrão. Veja-se Carbohydrates in

human nutrition, FAO Food and Nutrition Paper 66, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Roma, 14-18 de Abril de 1997.

Como definido acima, a presente invenção está direccionada para uma composição de amido preparada a partir de um amido convertido com baixos níveis de amilose compreendendo α -glucanos de cadeia linear cristalinos caracterizados por:

- a) pelo menos 20% de amido digerível lentamente;
 - b) menos do que 60% de amido digerível rapidamente;
 - c) uma temperatura do ponto de fusão, T_p conforme o determinado por DSC, de pelo menos 70 °C; e
 - d) uma entalpia, ΔH conforme o determinado por DSC, de pelo menos 25 J/g,
- em que a composição está desramificada em pelo menos 90%,
- e) em que pelo menos 50% está digerida dentro de duas horas conforme o determinado segundo Englyst, et al., Eur. J. Clin. Nutr. 46, pág. 33-50 (1992); e

em que o amido com baixos níveis de amilose

compreende não mais do que 10% em peso de amilose, o amido rapidamente digerível compreende um amido ou porções dele que são digeridas dentro de vinte minutos de digestão, e o amido digerível lentamente compreende um amido ou uma fracção dele que não é nem amido digerível rapidamente nem amido resistente.

Desta forma, a invenção diz respeito a um produto de amido digerível lentamente preparado pela desramificação enzimática de amidos com baixos níveis de amilose e possibilitando que as cadeias lineares curtas resultantes cristalizem numa forma altamente cristalina. Os amidos digeríveis lentamente proporcionam uma libertação prolongada de energia com um baixo Índice Glicémico.

Amido, como aqui se utiliza, tem a intenção de incluir todos os amidos derivados a partir de qualquer fonte natural, qualquer uma das quais pode ser apropriada para utilização nesta invenção. Um amido natural, como aqui se utiliza, é um amido como se encontra na natureza. Também apropriados são os amidos derivados a partir de uma planta obtida por técnicas padronizadas de reprodução, incluindo o cruzamento, a translocação, a inversão, a transformação ou qualquer outro método de engenharia genética ou cromossômica para incluir variações deles. Adicionalmente, os amidos derivados a partir de uma planta cultivada a partir de mutações artificiais e de variações da composição genérica acima, que possam ser produzidas por métodos padronizados conhecidos de reprodução com mutação, são também apropriados nesta invenção.

As fontes típicas para os amidos são os cereais, os tubérculos, as raízes, os legumes e os frutos. A fonte natural pode ser uma variedade de milho ceroso, ervilhas, batatas, batata-doce, bananas, cevada, trigo, arroz, aveia, sagu, amaranto, tapioca, araruta, cana, e sorgo particularmente o milho, a batata, a tapioca, e o arroz. Como aqui se utiliza, o termo "ceroso" ou "com baixos níveis de amilose" tem a intenção de incluir um amido contendo não mais de 10% em peso de amilose. Particularmente apropriados na invenção são aqueles amidos que contêm não mais do que 5% em peso de amilose.

O amido é desramificado enzimaticamente utilizando técnicas conhecidas na arte. As enzimas apropriadas são a isoamilase e outras endo-alfa-1,6-D-glucano hidrolases que são capazes de alcançar o grau desejado de desramificação.

A quantidade de enzima utilizada está dependente da fonte enzimática e da actividade e do material base utilizado. Tipicamente, a enzima é utilizada numa quantidade de desde 0,05% a 2,0%, particularmente de 0,2% a 0,5%, em peso do amido.

Os parâmetros óptimos para a actividade enzimática variarão dependendo da enzima utilizada. A taxa de degradação da enzima depende de factores conhecidos na arte, incluindo o tipo e a concentração da enzima, a

concentração do substrato, o pH, a temperatura, a presença ou ausência de inibidores, e o grau e tipo de modificação se esta existir. Estes parâmetros podem ser ajustados para otimizar a taxa de digestão do amido base.

O amido é gelatinizado, utilizando técnicas conhecidas na arte, antes da desramificação pela enzima. As técnicas conhecidas na arte incluem aquelas divulgadas por exemplo nas Patentes dos Estados Unidos Números 4 465 702, 5 037 929, 5 131 953, e 5 149 799. Veja-se também o Capítulo XXII - "Production and Use of Pregelatinized Starch", Starch: Chemistry and Technology, Vol. III - Industrial Aspects, R.L. Whistler and E.F. Paschall, Editores, Academic Press, Nova York 1967. O processo de gelatinização desdobra as moléculas de amido da estrutura granular, permitindo dessa forma que a enzima degrade mais facilmente e uniformemente as moléculas de amido.

Geralmente, o tratamento com a enzima é levado a cabo numa suspensão espessa aquosa ou tamponada com um nível de sólidos de amido de 10% a 40%, dependendo do amido base a ser tratado. É particularmente útil na invenção actual um nível de sólidos de desde cerca de 15% a 35 %, mais particularmente útil de 18% a 30%. Em alternativa, o processo pode utilizar uma enzima imobilizada num suporte sólido.

Tipicamente, a digestão enzimática é levada a cabo com o mais elevado conteúdo em sólidos possível sem

que se reduzam as velocidades de reacção de forma a facilitar qualquer secagem subsequente desejada da composição de amido. As velocidades de reacção podem ser reduzidas por altos conteúdos em sólidos, dado que a agitação se torna difícil ou ineficaz e a dispersão do amido se torna mais difícil de manusear.

O pH e a temperatura da suspensão espessa deverão ser ajustados para proporcionarem uma eficaz hidrólise enzimática. Estes parâmetros são dependentes da enzima a ser utilizada e são conhecidos na arte. Em geral, é utilizada uma temperatura de 25 °C a 70 °C, particularmente de 50 °C a 60 °C. Em geral, o pH é ajustado entre 3,0 e 6,0, particularmente de 3,5 a 4,5, utilizando técnicas conhecidas na arte.

A reacção enzimática é continuada até que se obtenha um amido digerível lentamente. Em geral, a reacção enzimática demorará entre 1 a 24 horas, particularmente entre 4 a 12 horas. A duração da reacção é dependente do tipo de amido utilizado, do tipo e da quantidade de enzima utilizada, e dos parâmetros reaccionais de percentagem de sólidos, do pH, e da temperatura.

A quantidade da hidrólise pode ser monitorizada e definida medindo a concentração de grupos redutores que são libertados pela actividade da alfa-1,6-D-glucano hidrolase por métodos bem conhecidos na arte. Podem ser utilizadas outras técnicas tais como a monitorização da alteração na

viscosidade, a reacção com iodo, ou a alteração no peso molecular para definir o ponto final da reacção. Quando o amido estiver completamente desramificado, os valores monitorizados não variarão mais. O amido resultante deverá estar desramificado em pelo menos 90%, particularmente pelo menos 95%, mais particularmente pelo menos 98%, com a máxima particularidade pelo menos 99%. O amido desramificado terá tipicamente menos do que cerca de 0,2%, particularmente menos do que cerca de 0,1%, de ligações alfa-1,6-D-glucosídicas.

Opcionalmente, a enzima pode ser desactivada (desnaturada) por qualquer técnica conhecida na arte tal como a desactivação por calor, por ácido ou por base. Por exemplo, a desactivação por ácido pode ser alcançada ajustando o pH abaixo de 3,0 durante pelo menos 30 minutos ou a desactivação por calor pode ser alcançada aumentando a temperatura até de 80 °C a 90 °C e mantendo-a a esta temperatura durante pelo menos 20 minutos para desactivar completamente a enzima.

O amido pode também ser adicionalmente modificado, tanto antes como depois da hidrólise enzimática. Tal modificação pode ser uma modificação física, por enzima, ou química. A modificação física inclui a modificação por cisalhamento ou por inibição térmica, por exemplo pelo processo descrito na U. S. A - 5 725 676.

A modificação química inclui, sem limitação, a

reticulação, a acetilação e a esterificação orgânica, a hidroxialquilação, a fosforilação e a esterificação inorgânica, as modificações catiónicas, aniónicas, não iónicas, e zwitteriónicas, e a succinação. Tais modificações são conhecidas na arte, por exemplo em Modified Starches: Properties and Uses, Ed. Wurzburg, CRC Press, Inc., Flórida (1986).

Os amidos são convertidos, e há a intenção de incluir amidos fluidificados ou "thin-boiling" preparados por oxidação, por hidrólise ácida, por hidrólise enzimática, por dextrinização por calor e ou por ácido. Estes processos são bem conhecidos na arte.

Qualquer amido de base tendo propriedades apropriadas para utilização na patente pode ser purificado por qualquer método conhecido na arte para se removerem do amido os aromas e cores que são naturais do polissacarídeo ou que foram criados durante o processamento. Estão divulgados processos de purificação apropriados para tratar amidos na família de Patentes representada por EP-A 554 818. As técnicas de lavagem alcalina são também úteis e estão descritas na família de Patentes representada por U.S. - A 4 477 480 e U.S. - A 5 187 272. O amido desramificado pode também ser purificado utilizando este método.

A solução resultante é ajustada tipicamente para o pH desejado de acordo com a sua utilização final

planejada. Em geral, o pH é ajustado para de 3,0 a 6,0, particularmente de 3,5 a 4,5, utilizando técnicas conhecidas na arte. Além disso, qualquer amilose de cadeia curta que precipite da dispersão de amido pode voltar a ser dispersada. Se é desejada a purificação da composição de amido desramificado, as impurezas na mistura reaccional e os subprodutos podem ser removidos por diálise, filtração, centrifugação ou por qualquer outro método conhecido na arte para isolar e concentrar composições de amido. Por exemplo, o amido degradado pode ser lavado utilizando técnicas conhecidas na arte para remover fracções solúveis de baixo peso molecular, tais como oligossacáridos, resultando em amido mais altamente cristalizado.

O amido desramificado é deixado cristalizar por métodos conhecidos na arte, por exemplo deixando o amido repousar e retrogradar. O amido é então recuperado utilizando métodos conhecidos na arte, particularmente por filtração ou por secagem, incluindo a secagem por pulverização, a liofilização, a secagem "flash" ou a secagem ao ar, mais particularmente por filtração ou por secagem "flash". É importante controlar a cristalização, tipicamente controlando a retrogradação e a secagem, de forma a se obter o elevado grau de cristalização essencial para a presente invenção. É ainda importante que o método de secagem e outros processos pós-cristalização não destruam substancialmente os cristais.

O amido resultante está na forma de amilose de

cadeia curta altamente cristalina a partir do amido desramificado e está funcional de uma forma única como amido digerível lentamente. O amido é caracterizado por uma temperatura do ponto de fusão, T_p , conforme o determinado por DSC utilizando o procedimento descrito abaixo, de pelo menos 70 °C, particularmente de pelo menos 80 °C; mais particularmente de pelo menos de 90 °C, e uma entalpia, ΔH , como o determinado por DSC utilizando o procedimento descrito abaixo, de pelo menos 25 J/g, particularmente de pelo menos 30 J/g. Tais valores de DSC são indicativos da natureza altamente cristalina do produto.

O amido desramificado é caracterizado adicionalmente por um Equivalente em Dextrose (DE) de pelo menos 5,0, mais particularmente de pelo menos 6,0. No entanto, pode ser obtido um Equivalente em Dextrose mais baixo (por exemplo um DE de pelo menos 4,0) alterando as condições de processamento, particularmente pela remoção dos produtos da hidrólise com baixo peso molecular. O Equivalente em Dextrose, como aqui se utiliza, tem a intenção de designar o poder redutor do hidrolisado. Cada molécula de amido tem uma terminação redutora; portanto o DE está inversamente relacionado com o peso molecular. O DE da D-glucose anidra está definido como 100 e o DE do amido não hidrolisado é virtualmente de zero.

O amido desramificado resultante é digerível lentamente dado que ele tem uma digestão prolongada, particularmente ao longo de um período de tempo de pelo

menos duas horas, mais particularmente ao longo de um período de tempo de pelo menos quatro horas, ainda assim é digerido significativamente em cerca de 6 horas após a ingestão. Em particular, menos do que 60%, mais particularmente menos do que 50%, com a máxima particularidade menos do que 30%, está digerido nos primeiros vinte minutos a seguir ao seu consumo e pelo menos 20%, particularmente pelo menos 30%, é digerido entre 20 minutos e duas horas a seguir ao seu consumo, como determinado pelo procedimento de digestão descrito abaixo. Adicionalmente, pelo menos 50%, particularmente pelo menos 60%, está digerido dentro de duas horas a seguir ao seu consumo. A digestão do amido continua tipicamente para além de duas horas.

O amido pode ser consumido no seu estado em bruto, mas é consumido tipicamente após processamento sob condições de alta ou baixa humidade. Portanto, a invenção tem a intenção de incluir aqueles amidos que tenham a vantagem de serem digeríveis lentamente no estado em que são consumidos. Tal estado é modelado pelos métodos descritos nos exemplos, abaixo.

Além disso, o resultante amido digerível lentamente não produz um grande aumento rápido dos níveis de glucose sanguínea típico dos amidos com um alto Índice Glicémico, mas em vez disso proporciona um aumento mais moderado acima da linha de referência que é prolongado por um maior período de tempo. É também tolerante ao processamento pois a porção digerível lentamente não diminui

substancialmente após cozimento e/ou outras condições típicas de processamento de alimentos.

O amido pode ser utilizado numa variedade de produtos comestíveis incluindo, mas não limitados a: cereais, barras, pizzas, massas, acompanhamentos, incluindo molhos de acompanhamento e acompanhamentos líquidos; enchimentos de tartes, incluindo enchimentos de frutos e natas; molhos para temperos, incluindo molhos brancos e molhos de uso diário tais como molhos de queijo; molho de carne; xaropes ligeiros; pudins; cremes de leite e ovos; iogurtes; natas ácidas; bebidas, incluindo bebidas de uso diário; cremes glacées; artigos cozidos no forno, incluindo biscoitos estaladiços, pães, pãezinhos doces, donuts, biscoitos, bolinhos, bases para tartes, e bolos; condimentos, artigos de confeitaria e gomas, e sopas.

Os produtos comestíveis também têm a intenção de incluir alimentos nutricionais e bebidas, incluindo suplementos dietéticos, produtos para diabéticos, produtos para a libertação prolongada de energia tais como bebidas para desportistas, barras nutricionais e barras energéticas.

O presente amido pode ser adicionado em qualquer quantidade desejada ou necessária para se obter a funcionalidade da composição. Em geral, o amido pode ser adicionado numa quantidade de desde 0,01% a 100%, particularmente desde 1% a 50%, em peso da composição. O

amido pode ser adicionado ao alimento ou bebida da mesma forma como qualquer outro amido, tipicamente misturando-o directamente no produto ou adicionando-o na forma de uma solução coloidal.

As seguintes formas de realização são apresentadas para exemplificar adicionalmente a presente invenção e não deverão ser encaradas como limitantes em qualquer aspecto.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são apresentados para esclarecer e explicar adicionalmente a presente invenção e não deverão ser encarados como limitantes em qualquer aspecto. Todas as percentagens utilizadas estão numa base de peso/peso.

Foram utilizados os seguintes procedimentos de teste ao longo dos exemplos:

Calorimetria diferencial de varrimento - As determinações por calorimetria diferencial de varrimento foram realizadas com um Perkin-Elmer DSC-7 (Norwalk, CT, U.S.A.). O instrumento foi calibrado com índio. Foram preparadas amostras de aproximadamente 10 mg de amido a uma razão amido:água de 1:3 e foram aquecidas a 10 °C/min de 5 °C até 160 °C. Foi utilizada uma tina de aço inoxidável vazia como referência.

Comprimento da cadeia e linearidade - As amostras de amido desramificado foram analisadas utilizando RMN para determinar o comprimento de cadeia médio e as proporções entre as ligações alfa-1,4 e alfa-1,6. As amostras para RMN foram preparadas suspendendo 5-6 mg do amido em 2,5 mL de D₂O/TSP (trimetilsilil-propionato de sódio) e cozendo as suspensões sob pressão durante aproximadamente 1 hora. As soluções límpidas resultantes foram transferidas para tubos para RMN de 5 mm e mantidas quentes num banho de vapor até serem obtidos os espectros de RMN. Este procedimento para a manipulação das amostras assegurou que o material de amido cristalino permanecesse em solução. Os espectros de RMN de prótons foram obtidos a 90 °C com um espectrómetro Bruker DPX-400 a 400 MHz.

Os desvios químicos atribuídos (em relação ao TSP a 90 °C) para as ressonâncias com interesse foram como se segue. As ligações alfa-1,4 a meio da cadeia tinham um desvio químico de 5,38 ppm, as alfa-1,6 a meio da cadeia (pontos de ramificação) de 4,96 ppm, a forma alfa dos grupos terminais redutores de 5,23 ppm, e a forma beta dos grupos terminais redutores de 4,65 ppm.

O comprimento de cadeia médio das amostras de amido foi calculado a partir da razão entre as ressonâncias dos grupos terminais redutores e do meio da cadeia. As percentagens de ligações alfa-1,6 (pontos de ramificação) foram calculadas a partir da quantidade de ligações alfa-1,6 em relação às ligações alfa-1,4.

Equivalente em Dextrose (DE) - Para as determinações do DE durante o processamento, foi utilizado o Método de Titulação Volumétrica de Fehling. Um balão de Erlenmeyer de 500 mL foi enxaguado com água desionizada (D.I.). Foram-lhe então adicionados 50 mL de D.I.. Seguiu-se a adição de 5 mL de cada uma das soluções de Fehling A e B, e duas gotas de azul de metileno com dois fragmentos de porcelana porosa para a regulação da ebulição. Após a determinação dos sólidos de reacção utilizando um refractómetro, foi preparada uma solução de amido contendo 2-4 por cento de sólidos de amido utilizando água D.I. diluindo a solução reaccional num copo. Antes de se prosseguir para o passo seguinte, verificaram-se os sólidos com um refractómetro para se ter a certeza de que a solução estava preparada correctamente. O copo com a solução de amido foi pesado e foi registado o seu peso. Foram adicionadas 15 gramas da solução de amido ao balão de Erlenmeyer com a solução de Fehling preparada. Após terem fervido sob agitação durante 2 minutos numa placa de aquecimento, surgiu normalmente uma coloração azulada. Foi adicionada gradualmente solução de amido do copo utilizando uma pipeta até que a coloração azulada desaparecesse e se formasse uma avermelhada distintiva de óxido cuproso. A solução de amido foi agitada continuamente com uma pipeta de plástico para se manter a solução uniforme. Quando se alcançou o ponto final avermelhado, o copo contendo a solução de amido foi pesado de novo para se determinar o peso de amido consumido. O cálculo do D. E. pode ser observado a partir da equação seguinte:

$$D.E. = \frac{[\text{Factor de Fehling} \times 100]}{[(\text{gramas necessárias de solução de amido}) \times (\text{conc. da solução de amido})]}$$

Digestão simulada - (**Englyst et al, European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46, S33-S50**) - Foram trituradas/móidas amostras de comida como se fossem mastigadas. Foram peneiradas amostras de amido em pó até uma dimensão das partículas de 250 micron ou menos. Foi pesada uma amostra de 500-600 mg \pm 0,1 mg e adicionada ao tubo com a amostra. Foram adicionados a cada tubo 10 mL de uma solução de pepsina (0,5%), goma de guar (0,5%), e HCl (0,05 M).

Foram preparados tubos padrão com branco e com glucose. O branco era de 20 mL de um tampão contendo acetato de sódio a 0,25 M e cloreto de cálcio a 0,02%. Os padrões de glucose foram preparados misturando 10 mL de tampão de acetato de sódio (descrito acima) e 10 mL de uma solução de glucose a 50 mg/mL. Os padrões foram preparados em duplicado.

A mistura enzimática foi preparada adicionando 18 g de pancreatina porcina (Sigma P-7545) a 120 mL de água desionizada, misturando bem, e depois centrifugando a 3000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e foram adicionadas 48 mg de invertase seca (Sigma I-4505) e 0,5 mL de AMG 400 (Novo Nordisk).

Os tubos com as amostras foram pré-incubados a 37 °C durante 30 min, depois foram removidos do banho e

foram-lhe adicionados 10 mL de tampão de acetato de sódio juntamente com bolas/berlindes de vidro (para ajudar a desagregação física da amostra durante a agitação).

Foram adicionados 5 mL da mistura enzimática às amostras, ao branco, e aos padrões. Os tubos foram sacudidos horizontalmente num banho de água a 37 °C a aproximadamente 180 sacudidelas/min. O tempo "zero" representa a primeira adição de mistura enzimática ao primeiro tubo.

Após 20 e 120 minutos, foram removidas alíquotas de 0,5 mL das amostras em incubação e colocaram-se num tubo separado de 20 mL de etanol a 66% (para parar a reacção). Após 1 hora, foi centrifugada uma alíquota a 3000 g durante 10 minutos.

A concentração de glucose em cada tubo foi medida utilizando o método da glucose oxidase/peroxidase (Megazyme *Glucose Assay Procedure* GLC9/96). Este é um procedimento colorimétrico. A HPLC pode também ser utilizada para detectar a glucose como está divulgado na literatura antecedente utilizando esta experiência.

O grau de digestão do amido foi determinado calculando a concentração de glucose em relação a padrões de glucose, utilizando um factor de conversão de 0,9. Os resultados estão apresentados como a "percentagem de amido digerido" (numa base de peso seco) após 20 e 120 minutos. O

SDS (amido digerível lentamente) é o valor a 120 minutos menos o valor a 20 minutos.

Cada lote de amostras de análise incluiu uma amostra de referência de amido de milho não cozinhado. A gama aceite dos valores da percentagem de digestão para o amido de milho foi de:

Amostra	s20	s120	SDS
Amido de milho ¹	17,5 ± 2,5	80 ± 5	<i>aprox. 62,5</i>
¹ Amido Melogel®, disponível comercialmente a partir de National Starch and Chemical Company, Bridgewater, NJ, U.S.A.			

Modelos cozinhados - Foram utilizados dois modelos gerais para simular processos alimentares comerciais: alta humidade; e baixa humidade. O modelo de alimentos com alta humidade utilizou amido em água com 20% de sólidos, cozinhado num banho de vapor a 90 °C durante 5 minutos. Este cozinhado foi então congelado num banho de gelo seco/acetona, liofilizado, triturado, e testado em relação à digestão. O modelo de alimentos com baixa humidade utilizou amido em água com 50% de sólidos, e o cozimento da massa num forno a 190 °C durante aproximadamente 20 minutos. A amostra foi então triturada e peneirada para uma dimensão das partículas de 250 micron ou menos.

Exemplo 1 - Preparação do Amido Cristalino Utilizando Isoamilase para o Estudo de Digestão Sem Cozedura.

A. Foram postos em suspensão espessa 4 kg de

amido de milho ceroso em 10,8 litros de água e o pH foi ajustado para 4,0 utilizando água:ácido clorídrico a 3:1. O amido foi cozinhado por jacto a pleno vapor a 154,4-157,2 °C (310-315 °F), e a uma contra-pressão de $5,52 \times 10^5$ Pa (80 psi) para cozinhar completamente o amido. Foram adicionados 0,2% de isoamilase (disponível comercialmente a partir de Hayashibara Inc., Japão), com base no peso do amido, após o amido cozido ter arrefecido até 55 °C. A reacção de desramificação foi parada quando o D.E. (Equivalente em Dextrose) da amostra atingiu 6,0. Neste ponto, foi ajustado o pH para 2,0 durante 30 minutos a 55 °C para desnaturar a enzima. A solução de amido foi então arrefecida até à temperatura ambiente após o pH ter sido reajustado para 6,0, e deixou-se cristalizar de um dia para o outro (16 horas) à temperatura ambiente. O produto cristalizado foi recuperado por secagem por nebulização com uma temperatura de injeção de 210 °C e uma temperatura de saída de 116 °C.

B. Colocaram-se em suspensão espessa 227 kg (500 lbs) de amido de milho ceroso convertido por ácido em 680 kg (1500 lbs) de água e o pH foi ajustado para 4,0 utilizando água:ácido clorídrico a 3:1. O amido foi cozido em banho de vapor. Foram adicionados 0,2% de enzima isoamilase sob agitação constante após a temperatura do amido cozido estar mantida a 55 °C.

Após a reacção ter prosseguido durante 8 horas, a enzima foi desnaturada baixando o pH para 2,0 a 55 °C

durante 30 minutos. A solução de amido foi então arrefecida até à temperatura ambiente após o pH ter sido reajustado para 6,0, e deixou-se cristalizar à temperatura ambiente até que o filtrado solúvel tenha nivelado. O produto cristalizado foi desumidificado e sujeito a secagem "flash". O amido desramificado resultante tinha um Equivalente em Dextrose de 7,0.

C. O método do Exemplo 1A foi repetido com a excepção de que o amido de base era de milho ceroso convertido por ácido e a reacção prosseguiu de um dia para o outro (16 horas). Após a cristalização, o produto foi secado por nebulização com uma temperatura de injeção de 210 °C e uma temperatura de saída de 116 °C.

D. O método do Exemplo 1A foi repetido com a excepção de que a reacção de desramificação foi parada quando o D.E. da amostra atingiu 5,3. Neste ponto, o pH foi ajustado para 2,0 durante 30 minutos a 55 °C para desnaturar a enzima. A solução de amido foi então arrefecida até à temperatura ambiente após o pH ter sido reajustado para 6,0, e deixou-se cristalizar de um dia para o outro à temperatura ambiente. O produto cristalizado foi filtrado e secado ao ar.

Os resultados da DSC e da digestão bem como os conteúdos em SDS para as amostras no Exemplo 1 estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Resultados da DSC e da digestão.

Amostra	20 min	120 min	SDS	DSC			
				T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _C (°C)	ΔH (J/g)
1A	49,6	73,2	23,6	44,6	80,6	95,7	28,3
1B	22,7	48,6	25,9	47,2	96,2	127,7	32,0
1C	42,4	65,0	22,6	47,3	76,1	93,4	25,9
1D	25,0	50,3	25,3	53,8	77,0	89,9	28,3

As amostras continham todas mais do que 20% de SDS.

Exemplo 2 - Preparação de Amostras Desramificadas pela Isoamilase e Cristalizadas para o Estudo de Digestão com Cozedura.

A. Foram postos em suspensão espessa 4 kg de amido de milho ceroso em 12 litros de água. A amostra foi cozida por jacto e arrefecida até 55 °C e o pH foi ajustado para 4,0 pela adição de água:HCl a 3:1. Neste ponto, foi-lhe adicionado 0,2% de isoamilase com base no peso do amido para iniciar a reacção de desramificação. Após 5 horas de reacção, o pH da amostra foi elevado para 6,0 utilizando 3% de NaOH e aqueceu-se até 85 °C durante 20 minutos para destruir a enzima. A amostra foi então arrefecida até à temperatura ambiente e cristalizada de um dia para o outro a esta temperatura. A amostra foi recuperada por filtração e secada ao ar. O amido

desramificado resultante tinha um Equivalente em Dextrose de 6,7.

B. O método do Exemplo 2A foi repetido com a excepção de que a amostra foi arrefecida até 40 °C e cristalizada a 40 °C de um dia para o outro.

Os estudos de digestão das amostras 2A e 2B no Exemplo 2 e das amostras 1C e 1D no Exemplo 1 foram conduzidos a seguir à sujeição dos amidos aos modelos de cozedura quer de alta humidade (HM) quer de baixa humidade (LM). O Quadro 2 resume os resultados da digestão bem como os conteúdos em SDS calculados para estas amostras. Estão também indicados os resultados da DSC para amostras em bruto.

Quadro 2. Resultados da digestão para as amostras cozidas e da DSC do material em bruto.

Amostra	Cozedura	20 min	120 min	SDS	DSC			
					T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _C (°C)	ΔH (J/g)
2A	HM	31,0	65,0	34,0	55,8	87,1	99,7	33,2
2B	HM	36,0	65,0	29,0	82,9	112,1	129,4	35,0
1C	LM	39,8	69,2	29,4	47,3	76,1	93,4	25,9
1D	LM	31,1	66,7	35,6	53,8	77,0	89,9	28,3

Todas as amostras neste exemplo demonstraram um conteúdo em SDS superior a 20%.

Exemplo 3 - Produto Alimentar Contendo Amido Desramificado.

Foram preparados bolinhos estaladiços utilizando as seguintes formulações e métodos.

<u>Ingrediente</u>	<u>Amostra 3A</u> <u>Quant. (% p/p)</u>	<u>Amostra 3B</u> <u>Quant. (% p/p)</u>	<u>Amostra 3C</u> <u>Quant. (% p/p)</u>
Farinha p/ bolos	45,3	14,4	14,4
Amido Exemplo 1D	0,0	0,0	39,0
Amido de milho ceroso	0,0	39,0	0,0
Açúcar	12,0	3,9	3,9
Bicarbonato de sódio	0,71	0,71	0,71
Fosfato de cálcio	0,71	0,71	0,71
Sal	0,44	0,44	0,44
Farinha de cevada maltada	0,57	0,57	0,57
Gordura	6,56	6,56	6,56
Xarope de milho com elevada frutose	1,7	1,7	1,7
Bicarbonato de amónio	1,11	1,11	1,11
Água	30,6	30,6	30,6

Os ingredientes secos foram misturados conjuntamente durante um minuto. A gordura, o xarope de milho e a água foram então adicionados e a mistura foi batida até se obter uma massa. A massa foi estendida com um rolo e

cortada na forma de bolinhos quadrados de aproximadamente 50,8 mm (2 polegadas) com 6,35 mm (0,25 polegadas) de espessura. Os bolinhos foram cozidos no forno durante 15 minutos a 204,4 °C (400 °F).

Os bolinhos foram triturados como se fossem mastigados e testados em relação à digestibilidade. Os resultados estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3.

<u>Amostra</u>	<u>20 min</u>	<u>120 min</u>	<u>SDS</u>
3A	77,0	91,3	14,3
3B	72,5	89,0	16,5
3C	49,6	75,5	25,9

Como pode ser observado no Quadro 3, os bolinhos cozidos no forno com o amido digerível lentamente mantiveram tal digestibilidade lenta.

Lisboa, 12 de Junho de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de amido preparada a partir de um amido convertido com baixo nível de amilose compreendendo α -glucanos de cadeia linear cristalinos caracterizado por:

- a) pelo menos 20% de amido digerível lentamente;
 - b) menos do que 60% de amido digerível rapidamente;
 - c) uma temperatura do ponto de fusão, T_p conforme o determinado por DSC, de pelo menos 70 °C; e
 - d) uma entalpia, ΔH conforme o determinado por DSC, de pelo menos 25 J/g,
- em que a composição está desramificada em pelo menos 90%,
- e) em que pelo menos 50% é digerida dentro de duas horas conforme o determinado segundo Englyst, et al., Eur. J. Clin. Nutr. 46, pág. 33-50 (1992); e

em que o amido com baixo nível de amilose compreende não mais do que 10% em peso de amilose, o amido rapidamente digerível compreende um amido ou porções dele que são digeridas dentro de vinte minutos de digestão, e o

amido digerível lentamente compreende um amido ou uma fracção dele que é amido digerível rapidamente ou amido resistente.

2. Composição de amido da Reivindicação 1, em que pelo menos 60% é digerido dentro de duas horas, conforme o determinado segundo Englyst, et al., Eur. J. Clin. Nutr. 46, pág. 33-50 (1992).

3. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-2, em que a composição de amido é preparada a partir de um amido com baixo nível de amilose seleccionado a partir do grupo consistindo de milho, batata, mandioca, e arroz.

4. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-3, em que a temperatura do ponto de fusão é de pelo menos 80 °C.

5. Composição de amido da Reivindicação 4, em que a temperatura do ponto de fusão é de pelo menos 90 °C.

6. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-5, em que a entalpia é de pelo menos 30 J/g.

7. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-6, caracterizada por pelo menos 30% de amido digerível lentamente.

8. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-7 consistindo essencialmente de α -glucanos de cadeia linear cristalinos.

9. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-8, em que a composição tem um Equivalente em Dextrose de pelo menos 4,0.

10. Composição de amido da Reivindicação 9, em que a composição tem um Equivalente em Dextrose de pelo menos 5,0.

11. Composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-10, em que o amido está desramificado em pelo menos 95%.

12. Composição de amido da Reivindicação 11, em que o amido está desramificado em pelo menos 98%.

13. Processo de preparação da composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-12 compreendendo:

a) desramificar um amido convertido com baixo nível de amilose, em que o amido é desramificado em pelo menos 90%;

b) possibilitar que o amido desramificado cristalice; e

c) secar o amido desramificado altamente cristalizado.

14. Processo da Reivindicação 13, em que a composição de amido é desramificada utilizando isoamilase.

15. Processo da Reivindicação 13 ou 14, em que a composição de amido é completamente desramificada.

16. Processo da Reivindicação 13 ou 14, em que o amido é desramificado em pelo menos 95%.

17. Processo da Reivindicação 13 ou 14, em que o amido é desramificado em pelo menos 98%.

18. Produto comestível compreendendo a composição de amido de qualquer uma das Reivindicações 1-12.

19. Produto da Reivindicação 18, em que o produto é um alimento nutricional.

Lisboa, 12 de Junho de 2007