



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

(21) **PI0806376-1 A2**

(22) Data de Depósito: 16/01/2008  
(43) Data da Publicação: 13/09/2011  
(RPI 2123)



(51) *Int.Cl.:*  
A23L 1/216

**(54) Título:** MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS PROCESSADOS TERMICAMENTE E PARA A REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASPARAGINA EM UM PRODUTO ALIMENTÍCIO

**(30) Prioridade Unionista:** 18/01/2007 US 11/624.476

**(73) Titular(es):** Frito-Lay North America, Inc.

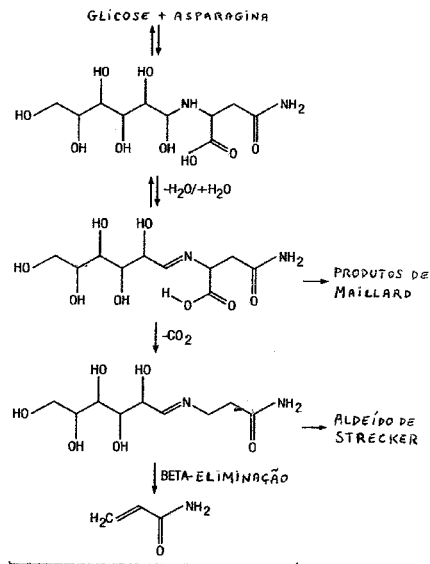
**(72) Inventor(es):** Frito-Lay North America, Inc.

**(74) Procurador(es):** LUCIANA ESTHER DE ARRUDA

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2008051188 de 16/01/2008

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/089251de 24/07/2008

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS PROCESSADOS TERMICAMENTE E PARA A REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASPARAGINA EM UM PRODUTO ALIMENTÍCIO. Paredes celulares apresentando asparagina são enfraquecidas por meio de um ou mais mecanismos para o enfraquecimento celular com a finalidade de permitir a penetração de um ou mais agentes redutores de acrilamida nas paredes celulares antes do cozimento com o objetivo de reduzir a formação de acrilamida. Os métodos revelados no presente documento são especialmente aplicáveis a produtos alimentícios fatiados tais como batatas fatiadas. De forma alternativa, o mecanismo pode ser aplicado a alimentos não-fatiados tais como grãos de cacau e grãos de café torrados. Os mecanismos para o enfraquecimento celular podem incluir energia em microondas, energia ultra-sônica, diferenciais de pressão pulsados ou constantes, uma enzima para enfraquecimento celular e limão.



**“MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS PROCESSADOS TERMICAMENTE E PARA A REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASPARAGINA EM UM PRODUTO ALIMENTÍCIO”.**

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

5

**ESCOPO TÉCNICO:**

A presente invenção está relacionada a um método para a redução da quantidade de acrilamida em alimentos processados termicamente e permite a fabricação de alimentos apresentando níveis significativamente reduzidos de acrilamida. A invenção mais está especificamente relacionada a: a) enfraquecimento da parede celular de um alimento apresentando asparagina e b) o uso de diversos agentes redutores de acrilamida para penetrar a parede celular enfraquecida.

10

**DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA:**

O produto químico acrilamida vem sendo utilizado desde muito tempo atrás em sua forma polimérica em aplicações industriais para o tratamento de água, recuperação de óleos refinados, fabricação de papel, floculantes, espessantes, processamento de minérios e tecidos que não precisam ser passados. A acrilamida participa como um sólido branco e cristalino, é inodora e é também altamente solúvel em água (2155 g/L a 30 °C). os sinônimos da acrilamida incluem 2-propenamida, etileno carboxamida, amida de ácido acrílico, amida de vinila e amida de ácido propenóico. A acrilamida apresenta uma massa molecular de 71,08, um ponto de fusão de 84,5 °C e um ponto de ebulição de 125 °C a uma pressão de 25 mmHg.

20

Em tempos recentes, uma ampla variedade de alimentos apresentaram resultados positivos quando testados para detectar a presença de monômero de acrilamida. Em especial, a acrilamida foi encontrada fundamentalmente em produtos alimentícios de carboidrato que foram aquecidos ou processados sob temperaturas elevadas. Exemplos de alimentos que apresentaram resultados de ensaio positivos para acrilamida incluem café, cereais, biscoitos, petiscos de batata, bolachas, batatas fritas à francesa, pães e bisnagas, e carnes empanadas fritas. Em geral, teores relativamente baixos de acrilamida foram encontrados em alimentos aquecidos ricos em proteína, enquanto teores relativamente elevados de acrilamida foram encontrados em alimentos ricos em carboidratos, comparados a níveis não-detectáveis em alimentos não-aquecidos e alimentos cozidos. Os níveis relatados de acrilamida encontrados em vários alimentos processados de maneira similar incluem uma faixa de 330 – 2,300 (µg/kg) em petiscos de batata, uma faixa de 300 - 1100 (µg/kg)

30

em batatas fritas à francesa, uma faixa de 120 - 180 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em petiscos de milho e níveis variando desde não detectáveis até 1400 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em vários cereais matinais.

5 Acredita-se atualmente que a acrilamida seja formada a partir da presença de aminoácidos e açúcares redutores. Por exemplo, acredita-se que uma reação entre asparagina livre, um aminoácido normalmente encontrado em vegetais crus, e açúcares redutores livres sejam responsáveis pela maior parte da acrilamida encontrada em produtos alimentícios fritos. A asparagina é responsável por aproximadamente 40% do total de aminoácidos livres encontrados em batatas cruas, aproximadamente 18% do total de aminoácidos livres encontrados em centeio de alto teor protéico, e aproximadamente 14% do total de aminoácidos livres encontrados no trigo.

10 A formação de acrilamida a partir de aminoácidos diferentes da asparagina é possível, porém ainda não foi confirmada com qualquer grau de certeza. Por exemplo, uma certa quantidade de formação de acrilamida foi relatada no ensaio de glutamina, metionina, cisteína e ácido aspártico como precursores. Estas descobertas são entretanto difíceis de confirmar, devido ao potencial de presença de impurezas de asparagina na matéria-prima de aminoácidos. A despeito disso, a asparagina foi identificada como sendo o aminoácido precursor mais responsável pela formação de acrilamida.

15 Visto que a presença de acrilamida nos alimentos é um fenômeno descoberto recentemente, o seu mecanismo de formação exato ainda não foi confirmado. Entretanto, acredita-se atualmente que a rota mais provável para a formação de acrilamida envolve uma reação de Maillard. A reação de Maillard tem sido reconhecida desde muito tempo na química alimentícia como sendo uma das reações químicas mais importantes no processamento de alimentos e pode afetar o sabor, a cor e o valor nutricional dos alimentos. A reação de Maillard requer calor, umidade, açúcares redutores e aminoácidos.

20 A reação de Maillard envolve uma série de reações complexas com um grande número de intermediários, mas pode em geral ser descrita como envolvendo três etapas. A primeira etapa de uma reação de Maillard envolve a combinação de um grupo de amina livre (oriundo de aminoácidos livres e/ou proteínas) com um açúcar redutor (tal como a glicose) para formar Produtos de rearranjo de Amadori ou Heyns. A segunda etapa envolve a degradação dos produtos de rearranjo de Amadori ou Heyns via diferentes rotas alternativas envolvendo deoxiosonas, fissão ou degradação de Strecker. Uma complexa série de reações - incluindo desidratação, eliminação, conversão em ciclo, fissão e fragmentação - resulta em um complexo de elementos intermediários de sabor e

componentes de sabor. A terceira etapa de uma reação de Maillard é caracterizada pela formação de polímeros e co-polímeros nitrogenosos marrons. Utilizando uma reação de Maillard como a rota provável para a formação de acrilamida, a **Figura 1** ilustra uma simplificação das rotas suspeitas para a formação de acrilamida iniciando com asparagina e glicose.

5                    Ainda não foi determinado se a acrilamida apresenta efeitos nocivos aos seres humanos, mas a sua presença nos produtos alimentícios, especialmente em níveis elevados, é indesejável. Conforme observado anteriormente, concentrações relativamente elevadas de acrilamida são encontradas em produtos alimentícios que foram aquecidos ou processados termicamente. A redução da quantidade de acrilamida nos referidos produtos alimentícios poderia ser realizada através da  
10 redução ou eliminação dos compostos precursores que formam a acrilamida, inibindo a formação de acrilamida durante o processamento do alimento, degradando ou fazendo reagir o monômero de acrilamida uma vez formado no alimento, ou removendo a acrilamida do produto antes de seu consumo. Por motivos facilmente compreensíveis, cada produto alimentício apresenta desafios específicos para a realização de qualquer uma das opções elencadas acima. Por exemplo, os  
15 alimentos que são fatiados e cozidos sob a forma de peças coerentes podem não ser facilmente misturáveis com diversos aditivos sem que para isso se destrua fisicamente as estruturas celulares que conferem aos produtos alimentícios as suas características distintivas quando cozidos. Outras necessidades de processamento para produtos alimentícios específicos podem de maneira similar fazer com que as estratégias para a redução do teor de acrilamida se tornem incompatíveis ou  
20 extremamente difíceis.

                    A título de exemplo, a **Figura 2** ilustra métodos bem conhecidos no estado da técnica para a fabricação de petiscos de batata fritos a partir de matéria-prima de batatas cruas. As batatas cruas, que contêm cerca de 80% ou mais de água em massa, inicialmente procedem à uma etapa de descascagem 21. Depois que as cascas já foram retiradas das batatas cruas, as batatas são  
25 transportadas até uma etapa de fatiamento 22. A espessura de cada fatia de batata na etapa de fatiamento 22 depende da espessura desejada para o produto final. Um exemplo pertencente ao estado da técnica envolve o fatiamento das batatas com cerca de 0,053 polegadas (1,35 cm) de espessura. Estas fatias são então transportadas até uma etapa de lavagem 23, na qual o amido superficial de cada fatia é removido com a ajuda de água. As fatias de batata lavadas são então  
30 transportadas até uma etapa de cozimento 24. Esta etapa de cozimento 24 tipicamente envolve a fritura das fatias em uma fritadeira contínua a uma temperatura de, por exemplo, 177 °C por um

intervalo de tempo de aproximadamente 2,5 minutos. A etapa de cozimento geralmente reduz o nível de umidade do petisco para menos de 2% em massa. Por exemplo, um típico petisco de batata frito sai da fritadeira com aproximadamente 1,4% de umidade em massa. Os petiscos de batata cozidos são então transportados até uma etapa de adição de tempero 25, onde os temperos são aplicados em um tambor rotativo. Finalmente, os petiscos temperados procedem até uma etapa de embalagem 26. Esta etapa de embalagem 26 usualmente envolve a alimentação dos petiscos temperados a um ou mais dispositivos de pesagem que então direcionam os petiscos para uma ou mais máquinas verticais de moldagem, preenchimento e vedação para a embalagem dos petiscos dentro de uma embalagem flexível. Uma vez embalado, o produto segue para a distribuição e é comprado por um consumidor.

Ajustes secundários em algumas das etapas de processamento dos petiscos de batata descritas acima podem resultar em alterações significativas das características do produto final. Por exemplo, um prolongamento do tempo de permanência das fatias dentro da água na etapa de lavagem 23 pode resultar no lixiviamento de compostos das fatias que proporcionam ao produto final o seu sabor, cor e textura de batata. Tempos de permanência ou temperaturas de aquecimento aumentadas na etapa de cozimento 24 podem resultar em um aumento dos níveis de douramento de Maillard no petisco, assim como um teor de umidade mais baixo. Se for desejável incorporar ingredientes nas fatias de batata antes da fritura, pode se tornar necessário estabelecer mecanismos que proporcionem a absorção dos ingredientes adicionados nas porções interiores das fatias sem romper a estrutura celular do petisco ou lixiviar compostos benéficos da fatia.

Novamente a título de exemplo de produtos alimentícios aquecidos que representam desafios específicos para a redução dos níveis de acrilamida nos produtos finais, os petiscos também podem ser feitos de uma massa. O termo “petisco fabricado” significa um petisco alimentício que utiliza como seu ingrediente inicial algo que não seja o material inicial de amido original e inalterado. Por exemplo, petiscos fabricados incluem petiscos fabricados de batata que usam um produto de batata desidratada como matéria prima e petiscos de milho que usam uma farinha de massa como sua matéria prima. Observa-se aqui o fato de que o produto de batata desidratada pode ser farinha de batata, flocos de batata, grânulos de batata ou outras formas sob as quais se apresentam as batatas desidratadas. Quando qualquer um destes termos é utilizado no contexto do presente pedido de patente, deve ser entendido que todas estas variações estão incluídas. Apenas a título de exemplo, e sem limitações, exemplos de "alimentos fabricados" aos quais se pode acrescentar um agente redutor de acrilamida incluem petiscos de tortilha, petiscos de milho, petiscos

de batata feitos a partir de flocos de batata e/ou batatas frescas amassadas, petiscos multi-grão, inflados de milho, inflados de trigo, inflados de arroz, bolachas, pães (tais como pão de centeio, trigo, aveia, batata, de farinha branca, de trigo integral e misturada), roscas moles e duras, doces, biscoitos, torradas, tortilhas de milho, tortilhas de farinha, pão tipo pita, croissants, massa de torta, 5 sonhos, *brownies*, bolos, *bagels*, rosquinhas recheadas, cereais, petiscos extrudados, produtos de granola, farinhas, farinha de milho, masa, flocos de batata, polenta, misturas de bater e produtos de massa, massas refrigeradas e congeladas, alimentos reconstituídos, alimentos processados e congelados, crosta de empanamento de carnes e vegetais, *hash browns*, batatas amassadas, crepes, panquecas, *waffles*, massa de pizza, manteiga de amendoim, alimentos contendo castanhas moídas e processadas, geléias, recheios, frutas esmagadas, vegetais esmagados, bebidas alcoólicas tais como 10 cervejas e cervejas inglesas, cacau, pó de cacau, chocolate, chocolate quente, queijo, alimentos para animais tais como ração para cães e gatos, e quaisquer outros produtos alimentícios para humanos ou animais que sejam submetidos a laminação ou extrusão ou que sejam feitos de uma massa ou mistura de ingredientes. O uso do termo "alimentos fabricados" no contexto do presente documento inclui 15 petiscos fabricados conforme anteriormente definidos. O uso do termo "produtos alimentícios" no contexto do presente documento inclui todos os petiscos fabricados e alimentos fabricados conforme anteriormente definidos.

Voltando a fazer referência à **Figura 2**, um petisco de batata fabricado não requer a etapa de descascagem 21, a etapa de fatiamento 22 ou a etapa de lavagem 23. Ao invés disso, os petiscos 20 fabricados de batata se iniciam com, por exemplo, flocos de batata, que são misturados com água e outros ingredientes secundários para formar uma massa. Esta massa é então laminada e cortada antes de proceder-se a uma etapa de cozimento. A etapa de cozimento pode envolver fritura ou cozimento. Os petiscos então procedem para uma etapa de adição de tempero e uma etapa de embalagem. A 25 mistura da massa de batata geralmente torna fácil a adição de outros ingredientes, tal como é o caso com a maioria, se não todos, os alimentos fabricados.

Em contraste, a adição de tais ingredientes a um produto alimentício cru, tal como fatias de batata, requer que se ofereça um mecanismo para permitir a penetração dos ingredientes na estrutura celular do produto. No entanto, a adição de quaisquer ingredientes na etapa de mistura precisa ser executada com a devida consideração do fato de que os ingredientes podem afetar 30 negativamente a laminação, extrusão ou outras características de processamento da massa assim como as características do petisco final.

Seria desejável o desenvolvimento de um ou mais métodos para a redução do nível de acrilamida no produto final de alimentos aquecidos ou processados termicamente. Idealmente, um processo como este deveria reduzir substancialmente ou eliminar a acrilamida no produto final sem afetar negativamente a qualidade e as características do produto final. Além disso, o método deveria ser fácil de implementar e, preferencialmente, acrescentar pouco ou nenhum custo ao processo como um todo.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proposta envolve a redução da acrilamida em produtos alimentícios. Em um aspecto, esta redução de acrilamida no alimento é obtida por meio do enfraquecimento da parede celular de um alimento de base vegetal e estabelecimento do contato entre a asparagina, um precursor da acrilamida, dentro da parede celular com um agente redutor de asparagina para favorecer a destruição do precursor de acrilamida. Por exemplo, asparaginase, uma enzima que hidrolisa a asparagina, é utilizada para penetrar uma parede celular enfraquecida por meio de energia ultra-sônica. A asparaginase também pode ser usada em combinação com diversos aminoácidos, cátions polivalentes e tióis livres para a redução de acrilamida. O enfraquecimento da parede celular e estabelecimento de contato entre a parede celular e o agente redutor de asparagina pode ser feito em sequência ou simultaneamente. Além disso, mecanismos para o enfraquecimento celular podem ser utilizados isoladamente ou em combinação. Por exemplo, a parede celular pode ser enfraquecida por meio de energia em microondas seguida por aplicação de um diferencial de pressão. As características e vantagens acima assim como características e vantagens adicionais da presente invenção ficarão aparentes a partir da descrição detalhada por escrito apresentada a seguir.

## BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Os aspectos inovadores que se acredita serem característicos da presente invenção estão indicados no quadro reivindicatório apenso. A invenção propriamente dita, no entanto, assim como um modo de uso preferencial, objetivos e vantagens adicionais da mesma, serão entendidos da melhor forma possível por meio de referência à descrição detalhada a seguir de incorporações ilustrativas quando lida em conjunto com as figuras em anexo, nas quais:

A **Figura 1** ilustra uma simplificação de supostas vias para a formação de acrilamida iniciando-se com asparagina e glicose.

A **Figura 2** ilustra métodos bem conhecidos no estado da técnica para a fabricação de petiscos de batata fritos a partir de uma matéria-prima de batatas cruas.

As **Figuras 3A e 3B** ilustram métodos para a fabricação de um alimento de petisco fabricado de acordo com duas incorporações separadas da presente invenção.

A **Figura 4** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados numa série de ensaios nos quais se adicionou cisteína e lisina.

5 A **Figura 5** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em uma série de ensaios nos quais  $\text{CaCl}_2$  foi combinado com ácido fosfórico ou ácido cítrico.

A **Figura 6** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em uma série de ensaios nos quais  $\text{CaCl}_2$  e ácido fosfórico foram adicionados a flocos de batata apresentando vários níveis de açúcares redutores.

10 A **Figura 7** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em uma série de ensaios nos quais  $\text{CaCl}_2$  e ácido fosfórico foram adicionados a flocos de batata.

A **Figura 8** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em uma série de ensaios nos quais  $\text{CaCl}_2$  e ácido cítrico foram adicionados à mistura para petiscos de milho.

15 A **Figura 9** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em petiscos de batata fabricados com cisteína, cloreto de cálcio e ácido fosfórico ou ácido cítrico.

A **Figura 10** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em petiscos de batata quando cloreto de cálcio e ácido fosfórico são adicionados seja na etapa de fabricação dos flocos ou na etapa de fabricação dos petiscos.

20 A **Figura 11** ilustra graficamente o efeito da asparaginase e do tamponamento sobre o nível de acrilamida em petiscos de batata.

A **Figura 12** ilustra graficamente os níveis de acrilamida encontrados em petiscos de batata fritos em óleo contendo alecrim.

A **Figura 13** ilustra graficamente o efeito de uma adição de um agente oxidante ou um agente redutor a um agente redutor de acrilamida apresentando um tiol livre.

25 A **Figura 14** ilustra graficamente o efeito sobre os níveis de acrilamida de cátions polivalentes que reduzem o pH.

A **Figura 15** ilustra graficamente o efeito sobre o pH de cloreto de cálcio ou cloreto de sódio adicionados a uma solução 0,5 M de fosfato e uma solução-tampão 0,5 M de acetato.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

A formação de acrilamida nos alimentos processados termicamente requer uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio. Considera-se a hipótese de que o carbono seja proporcionado por

uma fonte de carboidrato e o nitrogênio seja proporcionado por uma fonte de proteína ou por uma fonte de aminoácido. Muitos ingredientes alimentícios de origem vegetal tais como arroz, trigo, milho, cevada, soja, batata e aveias contêm asparagina e são fundamentalmente carboidratos apresentando componentes aminoácidos secundários. Tipicamente, os referidos ingredientes alimentícios apresentam um pequeno conjunto de aminoácidos, que contém outros aminoácidos além da asparagina.

Denomina-se “processado termicamente” àquele alimento ou ingrediente alimentício no qual os componentes do alimento, tais como uma mistura de ingredientes alimentícios, são aquecidos até uma temperatura de pelo menos 80 °C. Preferencialmente o processamento térmico do alimento ou ingredientes alimentícios ocorre sob temperaturas entre cerca de 100 °C e 205 °C. O ingrediente alimentício pode ser processado separadamente sob temperaturas elevadas antes da formação do produto alimentício final. Um exemplo de ingrediente alimentício processado termicamente são os flocos de batata, que são formados a partir de batatas cruas em um processo que expõe a batata à temperaturas elevadas da ordem de 170 °C. (Os termos “flocos de batata”, “grânulos de batata” e “farinha de batata” são utilizados de forma intercambiável ao longo do presente documento, e têm por função designar qualquer produto desidratado a base de batata.) Exemplos de outros ingredientes alimentícios processado termicamente incluem aveias processadas, arroz parbolizado e seco, produtos de soja cozidos, massa de milho, grãos de café torrados e grãos de cacau torrados. De forma alternativa, ingredientes alimentícios crus podem ser usados no preparo do alimento final no qual a produção do produto alimentício final inclui uma etapa de aquecimento térmico. Um exemplo de processamento de matéria prima no qual o produto alimentício final resulta de uma etapa de aquecimento térmico é a manufatura de petiscos de batata a partir de fatias de batata cruas por meio da etapa de fritura sob uma temperatura de cerca de 100 °C a cerca de 205 °C ou a produção de batatas fritas à francesa fritas sob temperaturas similares. Conforme descrito no presente documento, os alimentos processados termicamente incluem, a título de exemplo e sem limitação, todos os alimentos anteriormente listados como exemplos de petiscos fabricados e alimentos fabricados, assim como batatas fritas à francesa, inhame frito, outros tubérculos ou materiais de raiz, vegetais cozidos incluindo aspargos, cebolas e tomates cozidos, grãos de café, grãos de cacau, carnes cozidas, frutas e vegetais desidratados, ração animal processada termicamente, tabaco, chá, castanhas torradas ou cozidas, grãos de soja, melão, molhos tais como molho de churrasco, petiscos de banana da terra, petiscos de maçã, bananas fritas e outras frutas

cozidas.

De acordo com a presente invenção, no entanto, descobriu-se que ocorre uma significativa formação de acrilamida quando o aminoácido asparagina é aquecido em presença de um açúcar redutor. O aquecimento de outros aminoácidos tais como lisina e alanina em presença de um açúcar redutor tal como glicose não conduz à formação de acrilamida. No entanto, surpreendentemente, a adição de outros aminoácidos à mistura asparagina-açúcar pode aumentar ou reduzir a quantidade de acrilamida formada.

Tendo estabelecido a rápida formação de acrilamida quando a asparagina é aquecida em presença de um açúcar redutor, a redução de acrilamida nos alimentos processados termicamente pode ser alcançada através da inativação da asparagina. Por “inativação” entende-se a remoção da asparagina do alimento ou tornar a asparagina não-reativa ao longo da rota de formação de acrilamida por meio da conversão ou ligação a um outro produto químico que interfere com a formação de acrilamida a partir da asparagina.

#### I. EFEITO DA CISTEÍNA, LISINA, GLUTAMINA E GLICINA NA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA

Visto que a asparagina reage com a glicose para formar acrilamida, o aumento da concentração dos outros aminoácidos livres pode afetar a reação entre a asparagina e a glicose e reduzir a formação de acrilamida. Para este experimento, uma solução de asparagina (0,176 %) e glicose (0,4%) foi preparada em uma solução-tampão de fosfato de sódio com pH 7,0. Quatro outros aminoácidos, glicina (GLI), lisina (LIS), glutamina (GLN), e cisteína (CIS) foram adicionados na mesma concentração que a glicose numa base molar. O projeto experimental foi completamente fatorial sem replicação de maneira que todas as possíveis combinações de aminoácidos adicionados fossem ensaiadas. As soluções foram aquecidas a 120 °C durante 40 minutos antes de se medir a acrilamida. A Tabela 1 abaixo ilustra as concentrações e os resultados.

Ordem	Glicose %	ASN %	GLI %	LIS %	GLN %	CIS %	Acrilamida ppb
1	0,4	0,176	0	0	0	0	1679
2	0,4	0,176	0	0	0	0,269	4
3	0,4	0,176	0	0	0,324	0	5378
4	0,4	0,176	0	0	0,324	0,269	7
5	0,4	0,176	0	0,325	0	0	170
6	0,4	0,176	0	0,325	0	0,269	7
7	0,4	0,176	0	0,325	0,324	0	1517

8	0,4	0,176	0	0,325	0,324	0,269	7
9	0,4	0,176	0,167	0	0	0	213
10	0,4	0,176	0,167	0	0	0,269	6
11	0,4	0,176	0,167	0	0,324	0	2033
12	0,4	0,176	0,167	0	0,324	0,269	4
13	0,4	0,176	0,167	0,325	0	0	161
14	0,4	0,176	0,167	0,325	0	0,269	4
15	0,4	0,176	0,167	0,325	0,324	0	127
16	0,4	0,176	0,167	0,325	0,324	0,269	26

TABELA 1: Efeito da Cisteína, Lisina, Glutamina e Glicina sobre a Formação de Acrilamida

Conforme ilustrado pela Tabela acima, glicose e asparagina sem qualquer outro aminoácido formaram 1679 ppb de acrilamida. Os aminoácidos adicionados apresentaram três tipos de efeito.

1) A cisteína praticamente eliminou a formação de acrilamida. Todos os tratamentos com cisteína apresentaram menos de 25 ppb de acrilamida (uma redução de 98%).

2) A lisina e a glicina reduziram a formação de acrilamida, porém não tanto quanto a cisteína. Todos os tratamentos com lisina e/ou glicina porém sem glutamina e cisteína apresentaram menos de 220 ppb de acrilamida (uma redução de 85%).

3) Surpreendentemente, a glutamina aumentou a formação de acrilamida para 5378 ppb (um aumento de 200%). A glutamina mais a cisteína não formaram acrilamida. A adição de glicina e lisina à glutamina reduziu a formação de acrilamida.

Estes ensaios demonstram a eficácia da cisteína, lisina e glicina na redução da formação de acrilamida. No entanto, os resultados da glutamina demonstram que nem todos os aminoácidos são eficazes na redução da formação de acrilamida. A combinação de cisteína, lisina ou glicina com um aminoácido que isoladamente pode acelerar a formação de acrilamida (tal como a glutamina) pode de forma similar reduzir a formação de acrilamida.

## II. Efeito da Cisteína, Lisina, Glutamina e Metionina sob Diferentes Concentrações e Temperaturas

Conforme relatado acima, a cisteína e a lisina reduziram a acrilamida quando adicionadas na mesma concentração que a glicose. Um experimento subsequente foi projetado para responder às seguintes questões:

1) Qual é o efeito de concentrações mais baixas de cisteína, lisina, glutamina e metionina sobre a formação de acrilamida?

2) Os efeitos de cisteína e lisina adicionadas são os mesmos quando a solução é aquecida sob uma temperatura de 120 °C e sob uma temperatura de 150 °C?

Uma solução de asparagina (0,176 %) e glicose (0,4%) foi preparada com uma solução-tampão de fosfato de sódio com pH 7,0. Duas concentrações de aminoácido (cisteína (CIS), lisina (LIS), glutamina (GLN) ou metionina (MET) ) foram adicionadas. As duas concentrações apresentavam 0,2 e 1,0 moles de aminoácido por mol de glicose. Na metade dos ensaios, dois ml das soluções foram aquecidos numa temperatura de 120 °C durante 40 minutos; na outra metade, dois ml foram aquecidos numa temperatura de 150 °C durante 15 minutos. Após o aquecimento, a acrilamida foi medida por GC-MS, sendo os resultados apresentados na Tabela 2. O controle era uma solução de asparagina e glicose sem um aminoácido adicionado.

Aminoácido/ Temperatura	Nível de acrilamida				
	Controle	Aminoácido @ Conc. 0,2	Percentual de Controle	Aminoácido @ Conc. 1,0	Percentual de Controle
(a) LIS-120 °C	1332 ppb	1109 ppb	83%	280 ppb	21%
CIS-120 °C	1332 ppb	316 ppb	24%	34 ppb	3%
LIS-150 °C	3127 ppb	1683 ppb	54%	536 ppb	17%
CIS-150 °C	3127 ppb	1146 ppb	37%	351 ppb	11%
GLN-120 °C	1953 ppb	4126 ppb	211%	6795 ppb	348%
MET-120 °C	1953 ppb	1978 ppb	101%	1132 ppb	58%
GLN-150 °C	3866 ppb	7223 ppb	187%	9516 ppb	246%
MET-150 °C	3866 ppb	3885 ppb	100%	3024 ppb	78%

TABELA 2: Efeito da Temperatura e da Concentração de Aminoácidos sobre o Nível de Acrilamida

Nos ensaios com cisteína e lisina, um controle formou 1332 ppb de acrilamida após 40 minutos sob uma temperatura de 120 °C, e 3127 ppb de acrilamida após 15 minutos sob uma temperatura de 150 °C. A cisteína e a lisina reduziram a formação de acrilamida sob uma temperatura de 120 °C e 150 °C, sendo a redução de acrilamida essencialmente proporcional à concentração de cisteína ou lisina adicionada.

Nos ensaios com glutamina e metionina, um controle formou 1953 ppb de acrilamida após 40 minutos sob uma temperatura de 120 °C e um controle formou 3866 ppb de acrilamida após 15 minutos sob uma temperatura de 150 °C. A glutamina aumentou a formação de acrilamida sob uma temperatura de 120 °C e 150 °C. A metionina a 0,2 mole/mole de glicose não afetou a formação de acrilamida. A metionina a 1,0 mole/mole de glicose reduziu a formação de acrilamida em menos

de cinquenta por cento.

### III. EFEITO DE DEZENOVE AMINOÁCIDOS SOBRE A FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA NUMA SOLUÇÃO DE GLICOSE E ASPARAGINA

O efeito de quatro aminoácidos (lisina, cisteína, metionina e glutamina) sobre a formação de acrilamida foi descrito acima. Quinze aminoácidos adicionais foram ensaiados. Uma solução de asparagina (0,176 %) e glicose (0,4%) foi preparada em uma solução-tampão de fosfato de sódio com pH 7,0. Os quinze aminoácidos foram adicionados sob a mesma concentração que a glicose numa base molar. O controle continha uma solução de asparagina e glicose sem qualquer outro aminoácido. As soluções foram aquecidas sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos antes da medição da acrilamida por GC-MS. Os resultados estão apresentados na Tabela 3 abaixo.

Aminoácido	Acrilamida Formada	
	ppb	% de Controle
Controle	959	100
Histidina	215	22
Alanina	478	50
Metionina	517	54
Ácido Glutâmico	517	54
Ácido Aspártico	529	55
Prolina	647	67
Fenilalanina	648	68
Valina	691	72
Arginina	752	78
Triptofano	1059	111
Treonina	1064	111
Tirosina	1091	114
Leucina	1256	131
Serina	1296	135
Isoleucina	1441	150

TABELA 3: Efeito de Outros Aminoácidos Sobre a Formação de Acrilamida

Conforme observado na Tabela acima, nenhum dos quinze aminoácidos adicionais foi tão eficaz quanto a cisteína, lisina ou glicina na redução da formação de acrilamida. Nove dos aminoácidos adicionais reduziram a acrilamida para um nível entre 22-78% de controle, ao passo em que seis aminoácidos aumentaram a acrilamida para um nível entre 111–150 % de controle.

A Tabela 4 abaixo resume os resultados para todos os aminoácidos, listando os aminoácidos na ordem de acordo com a sua respectiva eficácia. A cisteína, lisina e glicina demonstraram ser eficazes inibidores, com a quantidade de acrilamida formada sendo menos de 15%

daquela formada no controle. Os próximos nove aminoácidos demonstraram ser inibidores menos eficazes, apresentando uma formação total de acrilamida entre 22-78% daquela formada no controle. Os sete aminoácidos seguintes aumentaram a acrilamida. A glutamina causou o maior aumento da acrilamida, apresentando 320% de controle.

Aminoácido	Acrilamida produzida como um % do Controle
Controle	100 %
Cisteína	0 %
Lisina	10 %
Glicina	13 %
Histidina	22 %
Alanina	50 %
Metionina	54 %
Ácido Glutâmico	54 %
Ácido Aspártico	55 %
Prolina	67 %
Fenilalanina	68 %
Valina	72 %
Arginina	78 %
Triptofano	111 %
Treonina	111 %
Tirosina	114 %
Leucina	131 %
Serina	135 %
Isoleucina	150 %
Glutamina	320 %

Tabela 4: Formação de Acrilamida em Presença dos 19 Aminoácidos

#### IV. Flocos de Batata com 750 ppm de L-Cisteína Adicionada

Flocos de batata de ensaio foram fabricados com 750 ppm (partes por milhão) de L-cisteína adicionada. Os flocos de batata de controle não continham L-cisteína adicionada. Três gramas de flocos de batata foram pesados em um frasco de vidro. Após serem tampados hermeticamente, os frascos foram aquecidos durante 15 minutos ou 40 minutos sob uma temperatura de 120 °C. A acrilamida foi medida por GC-MS em partes por bilhão (ppb).

Flocos de batata	Acrilamida (ppb) 15 Min sob uma temperatura de 120 °C	Redução de acrilamida 15 Min	Acrilamida (ppb) 40 Min sob uma temperatura de 120 °C	Redução de acrilamida 40 Min
(b) Controle	1662	--	9465	--
Cisteína a 750 ppm	653	60%	7529	20%

TABELA 5: Redução de Acrilamida ao Longo do Tempo com Cisteína

#### V. PETISCOS FABRICADOS DE BATATA COZIDOS

Dado os resultados acima, desenvolveram-se incorporações preferenciais da invenção nas quais cisteína ou lisina era adicionada à fórmula para um alimento de petisco fabricado, neste caso petiscos fabricados de batata cozidos. O processo para a fabricação deste produto se encontra ilustrado na **Figura 3A**. Numa etapa de preparo da massa 30, flocos de batata, água e outros ingredientes são combinados para formar uma massa. (Os termos “flocos de batata,” “grânulos de batata” e “farinha de batata” são utilizados de maneira intercambiável no presente documento e todos eles têm por intenção abranger todas as preparações em flocos secos ou pó, independentemente do tamanho da partícula.) Numa etapa de laminação 31, a massa é passada por um laminador, que achata a massa, e é então cortada em pedaços discretos. Numa etapa de cozimento 32, os pedaços cortados são cozidos até atingir uma coloração e teor de água especificados. Os petiscos resultantes são então temperados numa etapa de adição de tempero 33 e colocados dentro de pacotes numa etapa de embalagem 34.

Uma primeira incorporação da invenção é demonstrada através do uso do processo conforme descrito acima. Para ilustrar esta incorporação, é feita uma comparação entre um controle e lotes de ensaio aos quais foi adicionada qualquer uma de três concentrações de cisteína ou uma concentração de lisina.

Ingrediente	Controle	Cisteína #1	Cisteína #2	Cisteína #3	Lisina
Flocos de batata & amido modificado (g)	5496	5496	5496	5496	5496
Açúcar (g)	300	300	300	300	300
Óleo (g)	90	90	90	90	90
Agentes de fermentação (g)	54	54	54	54	54
Emulsificante (g)	60	60	60	60	60

L-Cisteína (dissolvida em água) <sup>1</sup> (g)	0	1,8	4,2	8,4	0	
Mono-hidroclorato de L-Lisina (g)	0	0	0	0	42	
Peso Seco Total (g)	6000	6001,8	6004,2	6008,4	6042	
Água (ml)	3947	3947	3947	3947	3947	
Medições Após o Cozimento dos Petiscos						
H <sub>2</sub> O, %	2,21	1,73 %	2,28 %	2,57 %	2,68 %	
Óleo, %	1,99	2,15 %	2,05 %	2,12 %	1,94 %	
Acrilamida (ppb)	1030	620	166	104	456	
Cloração	L	72,34	76,53	79,02	78,36	73,2
	A	1,99	-1,14	-2,02	-2,14	1,94
	B	20,31	25,52	23,2	23,0	25,77

TABELA 6: Efeito da Lisina e Diversos Níveis de Cisteína Sobre o Nível de Acrilamida

Em todos os lotes, os ingredientes secos foram inicialmente misturados entre si, e então o óleo foi adicionado a cada uma das misturas secas e misturado. A cisteína ou lisina foi dissolvida na água antes da adição à massa. O nível de umidade da massa antes da laminação era de 40% a 45% em massa. A massa foi laminada para produzir uma espessura de entre 0,020 e 0,030 polegadas (0,508 cm e 0,762 cm), cortada em pedaços do tamanho de petiscos e cozida.

Após o cozimento, efetuou-se o ensaio para detectar a umidade, teor de óleo e cloração de acordo com a escala Hunter L-A-B. Amostras foram ensaiadas para obter níveis de acrilamida no produto acabado. A Tabela 6 acima ilustra os resultados destas análises.

Nos petiscos de controle, o nível de acrilamida após o cozimento final era de 1030 ppb. Tanto a adição de cisteína, em todos os níveis ensaiados, quanto a de lisina reduziram significativamente o nível final de acrilamida. A **Figura 4** ilustra os níveis resultantes de acrilamida em formato gráfico. Neste desenho, o nível de acrilamida detectado em cada amostra está ilustrado por uma barra sombreada 402. Cada barra apresenta um rótulo listando o ensaio apropriado imediatamente abaixo e está calibrada para a escala de acrilamida na parte esquerda do desenho. Também se ilustra para cada ensaio o nível de umidade do petisco produzido, visto como um único ponto 404. Os valores para estes pontos 404 estão calibrados para a escala para percentual de umidade ilustrada na parte direita do desenho. Uma linha 406 conecta os pontos individuais 404 para assegurar maior visibilidade. Em vista do acentuado efeito apresentado por uma umidade mais baixa sobre o nível de acrilamida, é importante observar um nível de umidade com o objetivo de avaliar adequadamente a atividade de qualquer agentes redutores de acrilamida. Conforme empregado no

<sup>1</sup> Espera-se que o D- isômero ou uma mistura racêmica de ambos os isômeros D- e L- dos aminoácidos sejam igualmente eficazes, embora o isômero L- provavelmente seja a melhor fonte e também a de custo mais baixo.

presente documento, um agente redutor de acrilamida é um aditivo que reduz o teor de acrilamida no produto final de um alimento processado termicamente quando comparado ao mesmo produto final no qual o agente não foi adicionado.

5 A adição de cisteína ou lisina à massa reduz significativamente o nível de acrilamida presente no produto acabado. As amostras de cisteína demonstram que o nível de acrilamida é reduzido numa proporção essencialmente direta da quantidade de cisteína adicionada. Deve ser dada consideração, no entanto, aos efeitos colaterais sobre as características (tais como cloração, sabor e textura) do produto final gerados pela adição de um aminoácido ao processo de fabricação.

10 Ensaio adicionais também foram realizados, utilizando cisteína, lisina e combinações de cada um dos dois aminoácidos adicionados com CaCl<sub>2</sub>. Estes ensaios utilizaram o mesmo procedimento já descrito para os ensaios acima, porém utilizaram flocos de batata apresentando níveis variados de açúcares redutores e quantidades variadas de aminoácidos e CaCl<sub>2</sub> adicionados. Na Tabela 7 abaixo, o lote 1 de flocos de batata apresentava 0,81% de açúcares redutores (esta porção da Tabela reproduz os resultados oriundos do ensaio ilustrado acima), o lote 2 apresentava 15 1,0% e o lote 3 apresentava 1,8% de açúcares redutores.

Açúcar redutor %	CaCl <sub>2</sub> % em Massa do Peso Seco Total	Cisteína ppm do Peso Seco Total	Lisina % do Peso Seco Total	H <sub>2</sub> O % produto acabado em Massa	Valor de Coloração de Acabamento	Acrilamida ppb
0,81	0	0	0	2,21	72,34	1030
0,81	0	300	0	1,73	76,53	620
0,81	0	700	0	2,28	79,02	166
0,81	0	1398	0	2,57	78,36	104
0,81	0	0	0,685	2,68	73,20	456
1,0	0	0	0	1,71	72,68	599
1,0	0	0	0	1,63	74,44	1880
1,0	0	0	0	1,69	71,26	1640
1,0	0	0	0	1,99	71,37	1020
1,0	0	700	0	2,05	75,81	317
1,0	0,646	0	0,685	1,74	73,99	179
1,8	0	0	0	1,80	73,35	464
1,8	0	0	0	1,61	72,12	1060
1,8	0	700	0	1,99	75,27	290
1,8	0	1398	0	1,96	75,87	188
1,8	0	0	0,685	1,90	76,17	105

1,8	0,646	0	0,685	2,14	75,87	47
1,8	0,646	700	0	1,83	77,23	148

TABELA 7: Efeito da Variação da Concentração de Cisteína, Lisina, Açúcares Redutores

Conforme ilustrado pelos dados nesta Tabela, a adição seja de cisteína ou lisina proporciona significativa melhoria no nível de acrilamida em cada nível de açúcares redutores ensaiado. A combinação de lisina com cloreto de cálcio proporcionou uma eliminação quase total da acrilamida produzida, a despeito do fato de que este ensaio foi efetuado com o mais elevado nível de açúcares redutores.

#### VI. ENSAIOS EM PETISCOS DE BATATA FRITOS FATIADOS

Um resultado similar pode ser obtido com petiscos de batata feitos a partir de fatias de batata. No entanto, o aminoácido desejado não pode ser simplesmente misturado com as fatias de batata, tal como nas incorporações ilustradas acima, visto que isso iria destruir a integridade das fatias. Em uma incorporação, as fatias de batata são imersas numa solução aquosa contendo o aminoácido aditivo desejado durante um período de tempo suficiente para permitir que o aminoácido migre para dentro da estrutura celular das fatias de batata. Isto pode ser feito, por exemplo, durante a etapa de lavagem 23 ilustrada na **Figura 2**.

A TABELA 8 abaixo ilustra o resultado da adição de um percentual em massa de cisteína ao tratamento de lavagem que foi descrito na etapa 23 da **Figura 2** acima. Todas as lavagens foram efetuadas em temperatura ambiente pelo período de tempo indicado; os tratamentos de controle não apresentavam nada adicionado à água. Os petiscos foram fritos em óleo de semente de algodão sob uma temperatura de 178 °C pelo período de tempo indicado.

	Tempo de fritura (segundos)	% em Massa de H <sub>2</sub> O Acabado	% em Massa de Óleo Acabado	Acrilamida Acabado
Controle - 2-3 min de lavagem	140	1,32 %	42,75 %	323 ppb
1 % cisteína - 15 min de lavagem	140	,86 %	45,02 %	239 ppb
(c) Controle - 2-3 min de lavagem	110	1,72 %	40,87 %	278 ppb
Controle - 15 min de lavagem	110	1,68 %	41,02 %	231 ppb
1% Cisteína - 15 min de lavagem	110	1,41 %	44,02 %	67 ppb

TABELA 8: Efeito de Cisteína na Água de Lavagem de Fatias de Batata Sobre a Acrilamida

Conforme ilustrado nesta Tabela, a imersão das fatias de batata de 0,053 polegadas (1,35

cm) de espessura durante 15 minutos numa solução aquosa contendo uma concentração de um por cento em massa de cisteína é suficiente para reduzir o nível de acrilamida do produto final da ordem de 100-200 ppb.

Demonstrou-se também a invenção adicionando-se cisteína à massa de milho (ou masa) para petiscos de tortilha. L-cisteína dissolvida foi adicionada ao milho cozido durante o processo de moagem tal que a cisteína fosse distribuída de maneira uniforme dentro da massa produzida durante a moagem. A adição de 600 ppm de L-cisteína reduziu a acrilamida de 190 ppb no produto de controle para 75 ppb no produto tratado com L-cisteína.

Qualquer número de aminoácidos pode ser usado com a invenção revelada no presente documento, desde que sejam feitos ajustes para compensar os efeitos colaterais dos ingredientes adicionais, tais como alterações na cloração, sabor e textura do alimento. Embora todos os exemplos ilustrados utilizem  $\alpha$ -aminoácidos (onde o grupo  $-NH_2$  está ligado ao átomo de carbono alfa), os Depositantes prevêem que outros isômeros, tais como  $\beta$ - ou  $\gamma$ -aminoácidos também podem ser usados, embora  $\beta$ - e  $\gamma$ -aminoácidos não sejam normalmente utilizados como aditivos em produtos alimentícios. A incorporação preferencial desta invenção utiliza cisteína, lisina e/ou glicina. No entanto outros aminoácidos, tais como histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina e arginina podem também ser usados. Tais aminoácidos, e em particular a cisteína, lisina e glicina, são relativamente baratos e usados comumente como aditivos alimentícios em determinados alimentos. Estes aminoácidos preferenciais podem ser usados isoladamente ou em combinação com o objetivo de reduzir a quantidade de acrilamida no produto alimentício final. Além disso, o aminoácido pode ser adicionado a um produto alimentício antes do aquecimento seja por meio de adição do aminoácido disponível comercialmente ao material inicial do produto alimentício ou da adição de um outro ingrediente alimentício que contém um elevado nível de concentração do aminoácido livre. Por exemplo, a caseína contém lisina livre e a gelatina contém glicina livre. Assim sendo, quando os Depositantes indicam que um aminoácido é adicionado a uma formulação alimentícia, deverá ser entendido que o aminoácido pode ser adicionado como um aminoácido disponível comercialmente ou como um alimento apresentando uma concentração de aminoácido(s) livre(s) que é maior do que o nível de ocorrência natural de asparagina no alimento.

A quantidade de aminoácido que deveria ser adicionada ao alimento com o objetivo de reduzir os níveis de acrilamida para um nível aceitável pode ser expressa de diversas maneiras. Com

o objetivo de tornar o produto comercialmente aceitável, a quantidade de aminoácido adicionado deveria ser suficiente para reduzir o nível final de produção de acrilamida em pelo menos vinte por cento (20%) quando comparado com um produto que não é tratado desta maneira. Mais preferencialmente, o nível de produção de acrilamida deveria ser reduzido de uma quantidade na faixa de trinta e cinco a noventa e cinco por cento (35-95%). Ainda mais preferencialmente, o nível de produção de acrilamida deveria ser reduzido de uma quantidade na faixa de cinquenta a noventa e cinco por cento (50-95%). Numa incorporação preferencial utilizando cisteína, determinou-se que a adição de pelo menos 100 ppm pode ser eficaz na redução da acrilamida. No entanto, uma faixa preferencial de adição de cisteína fica entre 100 ppm e 10,000 ppm, com a faixa mais preferencial na quantidade de cerca de 1,000 ppm. Em incorporações preferenciais utilizando outros aminoácidos eficazes, tais como lisina e glicina, determinou-se que uma proporção molar do aminoácido adicionado ao açúcar redutor presente no produto de pelo menos 0,1 mole de aminoácido para um mole de açúcares redutores (0,1:1) é eficaz na redução da formação de acrilamida. Mais preferencialmente a proporção molar de aminoácido adicionado aos açúcares redutores deveria estar entre 0,1:1 e 2:1, com uma faixa mais preferencial de cerca de 1:1.

Os mecanismos através dos quais os aminoácidos selecionados reduzem a quantidade de acrilamida encontrada não são conhecidos atualmente. Possíveis mecanismos incluem competição por reagentes e diluição do precursor, que irá criar menos acrilamida, e um mecanismo de reação com a acrilamida para degenerá-la.” Possíveis mecanismos incluem (1) inibição da reação de Maillard, (2) consumo de glicose e outros açúcares redutores, e (3) reação com acrilamida. A cisteína, com um grupo tiol livre, atua como um inibidor da reação de Maillard. Como acredita-se que a acrilamida seja formada a partir da asparagina por meio de uma reação de Maillard, a cisteína deveria reduzir a taxa de uma reação de Maillard e a formação de acrilamida. A Lisina e a glicina reagem rapidamente com a glicose e outros açúcares redutores. Se a glicose for consumida pela lisina e pela glicina, haverá menos glicose para reagir com a asparagina para formar acrilamida. O grupo amino de aminoácidos pode reagir com a ligação dupla da acrilamida, uma adição de Michael. O tiol livre de cisteína também pode reagir com a ligação dupla da acrilamida.

Deve ser compreendido que alterações adversas nas características do produto final, tais como alterações na cloração, sabor e textura, poderiam ser causadas pela adição de um aminoácido. Estas alterações nas características do produto de acordo com esta invenção podem ser compensadas através de vários outros meios. Por exemplo, características de cloração em petiscos de batata podem

ser ajustadas através do controle da quantidade de açúcares no produto inicial. Algumas características de sabor podem ser alteradas por meio de adição de diversos agentes saporificantes ao produto final. A textura física do produto pode ser ajustada, por exemplo, por meio de adição de agentes de fermentação ou diversos emulsificantes.

## VII. EFEITO DE CÁTIOS BI- E TRIVALENTES SOBRE A FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA

Uma outra incorporação da invenção envolve a redução da produção de acrilamida por meio da adição de um cátion bivalente ou trivalente à fórmula para um petisco alimentar antes do cozimento ou processamento térmico daquele petisco alimentar. Os químicos deverão entender o fato de que os cátions não existem isoladamente, sendo no entanto encontrados em presença de um ânion apresentando a mesma valência. Embora se faça aqui referência ao sal contendo o cátion bivalente ou trivalente, acredita-se que seja o cátion presente no sal que proporciona uma redução na formação de acrilamida por meio da redução da solubilidade da asparagina em água. Estes cátions são também designados no presente documento como um cátion com uma valência de pelo menos dois. É interessante observar que cátions de uma única valência não são de fato eficazes em uso com a presente invenção. Ao escolher um composto apropriado contendo o cátion apresentando uma valência de pelo menos dois em combinação com um ânion, os fatores relevantes são a solubilidade em água, segurança alimentar e menor grau de alteração das características daquele alimento em particular. Combinações de vários sais podem ser utilizadas, mesmo considerando-se que estes sejam aqui discutidos apenas como sais individuais.

Os químicos falam da valência de um átomo como numa medida de sua capacidade para se combinar com outros elementos. Especificamente, um átomo bivalente apresenta a capacidade de formar duas ligações iônicas com outros átomos, enquanto que um átomo trivalente pode formar três ligações iônicas com outros átomos. Um cátion é um íon com carga positiva, ou seja, um átomo que perdeu um ou mais elétrons, terminando com uma carga positiva. Um cátion bivalente ou trivalente, então, é um íon com carga positiva que apresenta disponibilidade para duas ou três ligações iônicas, respectivamente.

Sistemas modelo simples podem ser usados para ensaiar os efeitos de cátions bivalentes ou trivalentes sobre a formação de acrilamida. O aquecimento de asparagina e glicose em proporções molares de 1:1 pode gerar acrilamida. Comparações quantitativas de teor de acrilamida com e sem um sal adicionado oferecem uma medida da capacidade do sal para promover ou inibir a formação de acrilamida. Dois métodos para preparo da amostragem e aquecimento foram utilizados. Um

método envolveu a mistura dos componentes secos, a adição de uma quantidade igual de água e o aquecimento dentro de um frasco com tampa não-hermética. Os reagentes ficaram concentrados durante o aquecimento pois a maior parte da água escapou, reproduzindo as condições de cozimento. Xaropes espessos ou alcatroados podem resultar nestas condições, complicando a recuperação da acrilamida. Estes ensaios estão ilustrados nos Exemplos 1 e 2 abaixo.

Um segundo método utilizando vasos sob pressão permitiu um maior controle dos experimentos. Soluções dos componentes saporificantes foram combinadas e aquecidas sob pressão. Os componentes do ensaio podem ser adicionados nas concentrações encontradas nos alimentos, e as soluções-tampão podem reproduzir o pH de alimentos comuns. Nestes ensaios, nenhuma água escapou, simplificando a recuperação da acrilamida, conforme ilustrado no Exemplo 3 abaixo.

#### **VIII. CÁTIOS BIVALENTES E TRIVALENTES REDUZEM A ACRILAMIDA, CÁTIOS MONOVALENTES NÃO**

Como Exemplo 1, um frasco de vidro de 20 ml (mililitro) contendo monoidrato de L-asparagina (0,15 g, 1 milimol), glicose (0,2 g, 1 milimol) e água (0,4 ml) foi coberto com folha de papel de alumínio e aquecido dentro de um forno de cromatografia gasosa (GC) programado para aquecer desde 40 °C até 220 °C num passo de 20°/minuto, parando por dois minutos sob uma temperatura de 220 °C, e resfriando desde 220 °C até 40 °C num passo de 20°/min. O resíduo foi extraído com água e analisado quanto ao teor de acrilamida utilizando cromatografia gasosa - espectroscopia de massa (GC-MS). A análise detectou aproximadamente 10,000 ppb (partes/bilhão) de acrilamida. Dois frascos adicionais contendo monoidrato de L-asparagina (0,13 g, 1 milimol), glicose (0,2 g, 1 milimol), cloreto de cálcio anidro (0,1 g, 1 milimol) e água (0,4 ml) foram aquecidos e analisados. A análise detectou 7 e 30 ppb de acrilamida, indicando assim uma redução de mais de noventa e nove por cento.

Tendo em vista o resultado surpreendente de que os sais de cálcio reduzem fortemente a formação de acrilamida, procedeu-se a uma seleção adicional de sais e identificou-se que cátions bivalentes e trivalentes (magnésio, alumínio) produzem um efeito similar. Observa-se que experimentos similares com cátions monovalentes, por exemplo 0,1/0,2 g de bicarbonato de sódio e carbonato de amônia (como carbamato de amônia e bicarbonato de amônia) aumentaram a formação de acrilamida, conforme observado na Tabela 9 abaixo.

Sal	Micromoles de Sal	Micromoles de Acrilamida Após o aquecimento, ppb
Nenhum (controle)	0	9857
Bicarbonato de sódio	1200	13419
Carbonato de amônia	1250	22027
Carbonato de amônia	2500	47897

TABELA 9

### IX. CLORETO DE CÁLCIO E CLORETO DE MAGNÉSIO

Como Exemplo 2 procedeu-se a um ensaio similar àquele que foi descrito acima, porém ao invés de utilizar cloreto de cálcio anidro, utilizaram-se duas diluições diferentes de cloreto de cálcio e cloreto de magnésio. Frascos contendo monidrato de L-asparagina (0,15 g, 1 milimol) e glicose (0,2 g, 1 milimol) foram misturados com um dos seguintes:

água (controle) 0,5 ml,

0,5 ml de solução de cloreto de cálcio (0,5 milimol) a 10%,

0,05 ml de solução de cloreto de cálcio (0,05 milimol) a 10% mais 0,45 ml de água,

0,5 ml de solução de cloreto de magnésio (0,5 milimol) a 10%, ou

0,05 ml de solução de cloreto de magnésio (0,05 milimol) a 10% mais 0,45 ml de água.

Amostras duplicadas foram aquecidas e analisadas conforme descrito no Exemplo 1.

Calculou-se a média dos resultados e apresentou-se o resumo dos mesmos na Tabela 10 abaixo:

ID do Sal	Quantidade Adicionada em Micromoles	Acrilamida Formada em Micromoles	Redução de Acrilamida
Nenhum (controle)	0	408	0
Cloreto de cálcio	450	293	27%
Cloreto de cálcio	45	864	Nenhuma
Cloreto de magnésio	495	191	53%
Cloreto de magnésio	50	2225	Nenhuma

TABELA 10: Efeito de Cloreto de Cálcio e Cloreto de Magnésio Sobre a Acrilamida

### X. Efeitos do pH e do Tamponamento

Conforme mencionado acima, este ensaio, Exemplo 3, não envolveu a perda de água do recipiente, mas foi feito sob pressão. Frascos contendo 2 ml de solução-mãe tamponada (asparagina 15 mM, glicose 15 mM, fosfato ou acetato 500 mM) e 0,1 ml de solução salina (1000 mM) foram aquecidos numa bomba de Parr colocada dentro de um forno de cromatografia gasosa programado

para aquecer desde 40 até 150 °C num passo de 20°/minuto e manter estável numa temperatura de 150 °C durante 2 minutos. A bomba foi removida do forno e resfriada durante 10 minutos. O conteúdo foi extraído com água e analisado quanto ao teor de acrilamida seguindo o método GC-MS. Para cada combinação de pH e solução de tamponamento, analisou-se uma solução de controle sem a adição do sal, assim como com os três diferentes sais. Calculou-se a média dos resultados dos ensaios feitos em duplicado e o resumo foi apresentado na Tabela 11 abaixo:

(d) Sal com Cátion bivalente ou trivalente	pH	(e) Solução-tampão usada		Mcg de Acrilamida		Redução de Acrilamida
		(f)	Sal adicionado	Controle		
Cloreto de cálcio	5,5	Acetato		337	550	19%
Cloreto de cálcio	7,0	Acetato		990	1205	18%
Cloreto de cálcio	5,5	Fosfato		154	300	49%
Cloreto de cálcio	7,0	Fosfato		762	855	11%
Cloreto de magnésio	5,5	Acetato		380	550	16%
Cloreto de magnésio	7,0	Acetato		830	1205	31%
Cloreto de magnésio	5,5	Fosfato		198	300	34%
Cloreto de magnésio	7,0	Fosfato		773	855	10%
Sulfato de alumínio potássio	5,5	Acetato		205	550	31%
Sulfato de alumínio potássio	7,0	Acetato		453	1205	62%
Sulfato de alumínio potássio	5,5	Fosfato		64	300	79%
Sulfato de alumínio potássio	7,0	Fosfato		787	855	8%

TABELA 11: Efeito do pH e da Solução-tampão Sobre Cátions Bivalentes/Trivalentes na Redução de Acrilamida

Dentre os três sais utilizados, as maiores reduções ocorreram com acetato em pH 7 e fosfato em pH 5,5. Apenas pequenas reduções foram observadas com acetato em pH 5,5 e fosfato em pH 7.

#### XI. ELEVAÇÃO DO CLORETO DE CÁLCIO REDUZ A ACRILAMIDA

Segundo os resultados dos sistemas modelo, efetuou-se um ensaio de laboratório em escala reduzida no qual adicionou-se cloreto de cálcio a flocos de batata antes do aquecimento. Três ml de uma solução de cloreto de cálcio 0,4%, 2%, ou 10% foram adicionados a 3 g de flocos de batata. O controle foi 3 g de flocos de batata misturados com 3 ml de água desionizada. Os flocos foram misturados para formar uma pasta relativamente uniforme e então aquecidos dentro de um frasco de vidro fechado hermeticamente sob uma temperatura de 120° C durante 40 min. A

acrilamida após o aquecimento foi medida por meio de GC-MS. Antes do aquecimento, os flocos de batata do controle continham 46 ppb de acrilamida. Os resultados do ensaio estão refletidos na Tabela 12 abaixo.

ID da Mistura	Acrilamida, ppb	Redução de Acrilamida
Controle (água)	2604	Nenhuma
solução de CaCl <sub>2</sub> a 0,4%	1877	28%
solução de CaCl <sub>2</sub> a 2%	338	76%
solução de CaCl <sub>2</sub> a 10%	86	97%

TABELA 12: Efeito da Concentração da Solução de Cloreto de Cálcio Sobre a Redução da

## 5 Acrilamida

Tendo em vista os resultados acima, efetuaram-se ensaios nos quais um sal de cálcio foi adicionado à fórmula para um alimento de petisco fabricado, neste caso petiscos fabricados de batata cozidos. O processo para a fabricação dos petiscos fabricados de batata cozidos consiste das etapas ilustradas na **Figura 3B**. A etapa de preparo da massa 35 combina flocos de batata com água, o par cátion/ânion (que neste caso é cloreto de cálcio) e outros ingredientes secundários, que são minuciosamente misturados para formar uma massa. (Novamente, o termo “flocos de batata” deve ser entendido no contexto do presente documento como abrangendo todas as preparações secas de flocos de batata, grânulos ou pó, independentemente do tamanho de partícula.) Na etapa de laminação/corte 36, a massa é deslocada através de um laminador, que achata a massa, e é então cortada em pedaços individuais. Na etapa de cozimento 37, os pedaços moldados são cozidos até atingir uma cloração e teor de água especificados. Os petiscos resultantes são então temperados na etapa de adição de tempero 38 e embalados na etapa de embalagem 39.

Num primeiro ensaio, dois lotes de petiscos fabricados de batata foram preparados e cozidos de acordo com a receita dada na Tabela 13; sendo que a única diferença entre os lotes é que o lote de ensaio continha cloreto de cálcio. Em ambos os lotes, os ingredientes secos foram primeiramente misturados juntos, então o óleo foi adicionado a cada uma das misturas secas e misturado. O cloreto de cálcio foi dissolvido na água antes de ser adicionado à massa. O nível de umidade da massa antes da laminação era de 40% a 45% em massa. A massa foi laminada para produzir uma espessura de entre 0,020 e 0,030 polegadas (0,051 cm e 0,076 cm), cortada em pedaços do tamanho de um petisco e cozida.

Após o cozimento, efetuou-se um ensaio para medir o teor de umidade, óleo e a cloração de acordo com a escala Hunter L-a-b. As amostras foram ensaiadas para revelar os níveis de acrilamida encontrados no produto acabado. A Tabela 13 abaixo também indica os resultados destas

análises.

Ingrediente	Controle	Ensaio CaCl <sub>2</sub>
Flocos de batata e amido modificado (g)	5496	5496
Açúcar (g)	300	300
Óleo (g)	90	90
Agentes de fermentação (g)	54	54
Emulsificante (g)	60	60
Cloreto de cálcio (dissolvido em água) (g)	0	39
Mistura Seca Total (g)	6000	6039
Água (ml)	3947	3947
Ensaio Efetuados Após o Cozimento dos Petiscos		
H <sub>2</sub> O, %	2,21	2,58
Óleo, %	1,99	2,08
Acrilamida, ppb	1030	160
L	72,34	76,67
A	1,99	-0,67
B	20,31	24,21

TABELA 13: Efeito do CaCl<sub>2</sub> Sobre a Acrilamida nos Petiscos

Conforme indicado por estes resultados, a adição de cloreto de cálcio à massa numa proporção em massa de cloreto de cálcio para os flocos de batata de essencialmente 1 a 125 reduz significativamente o nível de acrilamida presente no produto acabado, reduzindo os níveis finais de acrilamida de 1030 ppb para 160 ppb. Adicionalmente, os percentuais de óleo e água no produto final não aparentam ter sido afetados pela adição de cloreto de cálcio. Observa-se, no entanto, que o CaCl<sub>2</sub> pode causar alterações no sabor, textura e cloração do produto, dependendo da quantidade utilizada.

O nível de cátion bivalente ou trivalente que é adicionado a um alimento para obter a redução de acrilamida pode ser expresso de diversas formas. Com o objetivo de tornar o produto comercialmente aceitável, a quantidade de cátion adicionada deveria ser suficiente para reduzir o nível final de produção de acrilamida em pelo menos vinte por cento (20%). Mais preferencialmente, o nível de produção de acrilamida deveria ser reduzido de uma quantidade na faixa de trinta e cinco a noventa e cinco por cento (35-95%). Ainda mais preferencialmente, o nível de produção de acrilamida deveria ser reduzido de uma quantidade na faixa de cinquenta a noventa e cinco por cento (50-95%). Para expressar isso de uma maneira diferente, a quantidade de cátion bivalente ou trivalente a ser adicionada pode ser dada como uma proporção entre os moles de cátion e os moles de asparagina livre presente no produto alimentício. A proporção dos moles de cátion bivalente ou

trivalente para os moles de asparagina livre deveria ser de pelo menos um para cinco (1:5). Mais preferencialmente, a proporção é de pelo menos um para três (1:3), e ainda mais preferencialmente, um para dois (1:2). Na incorporação atualmente preferencial, a proporção de moles de cátion para moles de asparagina fica entre cerca de 1:2 e 1:1. No caso do magnésio, que apresenta um menor efeito sobre o sabor do produto do que o cálcio, a proporção molar de cátion para asparagina pode ser tão elevada quanto cerca de dois para um (2:1).

Ensaio adicionais foram realizados, utilizando o mesmo procedimento já descrito acima, porém com diferentes lotes de flocos de batata contendo diferente níveis de açúcares redutores e variando-se as quantidades de cloreto de cálcio adicionado. Na Tabela 14 abaixo, os petiscos apresentando 0,8 % de açúcares redutores reproduzem o ensaio descrito acima.

CaCl <sub>2</sub> (g)	Açúcar reductor %	Umidade %	Valor de Cloração L	Acrilamida ppb
0	0,8	2,21	72,34	1030
39	0,8	2,58	76,67	160
0	1,0	1,80	73,35	464
0	1,0	1,61	72,12	1060
17,5	1,0	1,82	74,63	350
39	1,0	2,05	76,95	80
39	1,0	1,98	75,86	192
0	1,8	1,99	71,37	1020
0	1,8	1,71	72,68	599
0	1,8	1,69	71,26	1640
0	1,8	1,63	74,44	1880
39	1,8	1,89	76,59	148
39	1,8	1,82	75,14	275

TABELA 14: Efeito de CaCl<sub>2</sub> ao Longo de Diversos Níveis de Açúcares Redutores & Níveis de Cátion

Conforme observado nesta Tabela, a adição de CaCl<sub>2</sub> reduz de maneira consistente o nível de acrilamida no produto final, mesmo quando a proporção em massa de CaCl<sub>2</sub> adicionado aos flocos de batata é inferior a 1:250.

Qualquer número de sais que forme um cátion bivalente ou trivalente (ou dito de outra maneira, que produz um cátion com a valência de pelo menos dois) pode ser usado com a invenção revelada no presente documento, desde que se façam ajustes para compensar os efeitos colaterais deste ingrediente adicional. O efeito da redução do nível de acrilamida parece decorrer do cátion bivalente ou trivalente, ao invés do ânion com o qual está pareada. Limitações do par cátion/ânion,

que não sejam a valência, estão relacionadas à sua aceitabilidade em alimentos, tais como segurança, solubilidade e seu efeito sobre o sabor, odor, aparência e textura. Por exemplo, a eficácia do cátion pode ser diretamente relacionada à sua solubilidade. Sais altamente solúveis, tais como aqueles sais compreendendo ânions acetato ou cloreto, são os aditivos mais preferenciais. Sais menos solúveis, tais como aqueles sais compreendendo ânions carbonato ou hidróxido podem ser feitos mais solúveis por meio de adição de ácido cítrico ou fosfórico ou por meio da ruptura da estrutura celular do alimento à base de amido. Os cátions sugeridos incluem cálcio, magnésio, alumínio, ferro, cobre e zinco. Sais adequados destes cátions incluem cloreto de cálcio, citrato de cálcio, lactato de cálcio, maleato de cálcio, gluconato de cálcio, fosfato de cálcio, acetato de cálcio, cálcio sódio EDTA, glicerofosfato de cálcio, hidróxido de cálcio, lactobionato de cálcio, óxido de cálcio, propionato de cálcio, carbonato de cálcio, estearol lactato de cálcio, cloreto de magnésio, citrato de magnésio, lactato de magnésio, maleato de magnésio, gluconato de magnésio, fosfato de magnésio, hidróxido de magnésio, carbonato de magnésio, sulfato de magnésio, hexaidrato de cloreto de alumínio, cloreto de alumínio, hidróxido de alumínio, alume de amônia, alume de potássio, alume de sódio, sulfato de alumínio, cloreto férrico, gluconato ferroso, citrato de amônia férrica, pirofosfato férrico, fumarato férrico, lactato ferroso, sulfato ferroso, cloreto de cobre, gluconato de cobre, sulfato de cobre, gluconato de zinco, óxido de zinco e sulfato de zinco. A incorporação atualmente preferencial desta invenção utiliza cloreto de cálcio, embora se acredite que as necessidades sejam contempladas da melhor maneira possível através de uma combinação de sais de um ou mais dentre os cátions apropriados. Diversos sais, tais como sais de cálcio e em particular cloreto de cálcio, são relativamente baratos e normalmente utilizados com certos alimentos. O cloreto de cálcio pode ser usado em combinação com o citrato de cálcio, reduzindo desta maneira o efeito colateral do  $\text{CaCl}_2$  sobre o sabor. Além disso, qualquer número de sais de cálcio pode ser usado em combinação com um ou mais sais de magnésio. Aqueles versados na técnica irão compreender que a formulação específica dos sais requerida pode ser ajustada dependendo do produto alimentício em questão e das características desejadas para o produto final.

Deve ser compreendido o fato de que alterações nas características do produto final, tais como alterações da cloração, sabor e consistência podem ser ajustadas por diversos meios. Por exemplo, as características de cloração em petiscos de batata podem ser ajustadas através do controle da quantidade de açúcares no produto inicial. Algumas características de sabor podem ser alteradas por meio de adição de vários agentes saporificantes ao produto final. A textura física do produto

pode ser ajustada, por exemplo, por meio da adição de agentes de fermentação ou vários emulsificantes.

## XII. COMBINAÇÕES DE AGENTES NA FABRICAÇÃO DA MASSA

5 Nas incorporações da invenção conforme detalhadas acima, o enfoque se concentrou na redução de acrilamida causada por um único agente, tal como um cátion bivalente ou trivalente ou um dentre diversos aminoácidos, para reduzir a quantidade de acrilamida encontrada em petiscos cozidos. Outras incorporações da invenção envolvem a combinação de vários agentes, tais como a combinação de cloreto de cálcio com outros agentes para prover uma significativa redução de acrilamida sem alterar notavelmente o sabor dos petiscos.

## XIII. COMBINAÇÕES DE CLORETO DE CÁLCIO, ÁCIDO CÍTRICO E ÁCIDO FOSFÓRICO

10 Os inventores descobriram que os íons de cálcio reduzem com maior eficácia o teor de acrilamida sob um pH ácido. No ensaio ilustrado abaixo, a adição de cloreto de cálcio em presença de um ácido foi estudada e comparada com uma amostra contendo apenas o ácido.

Ingrediente	Controle (g)	Ácido fosfórico	Ácido fosfórico & CaCl <sub>2</sub>	Ácido cítrico & CaCl <sub>2</sub>
Flocos de batata/ amido modificado (g)	5490	5490	5490	5490
Açúcar	360	360	360	360
Óleo	90	90	90	90
Ácido cítrico				30
Ácido fosfórico		30	30	
CaCl <sub>2</sub>			30	30
Bicarbonato de sódio & monofosfato de cálcio	54			
Emulsificante (g)	60	60	60	60
Mistura seca total (g)	6000	6000	6000	6000
Água (ml)	3950	3950	3950	3950
Umidade %	2,16	2,34	2,07	1,60
Cloração	L	67,69	71,39	73,27
	A	5,13	3,24	0,95
	B	26,51	26,91	26,24
Acrilamida (ppb)	1191	322	84	83

TABELA 15: Efeito da Combinação de CaCl<sub>2</sub> com Ácido fosfórico ou Ácido cítrico Sobre

15 a Acrilamida

Conforme observado na Tabela 15 acima, a adição de ácido fosfórico apenas reduziu a formação de acrilamida em 73% ao passo em que a adição de  $\text{CaCl}_2$  e um ácido reduzir o nível de acrilamida em 93%. A **Figura 5** ilustra estes resultados em formato gráfico. Nesta figura, o nível de acrilamida 502 do controle é notavelmente elevado (1191), porém se reduz significativamente quando o ácido fosfórico apenas é adicionado e fica ainda mais reduzido quando o cloreto de cálcio e um ácido são adicionados. Ao mesmo tempo, os níveis de umidade 504 dos vários petiscos permaneceram dentro da mesma faixa, embora tenha sido ligeiramente mais baixo nos petiscos com agentes adicionados. Assim, ficou demonstrado que o cloreto de cálcio e um ácido podem reduzir a acrilamida de maneira eficaz.

Ensaio 10 adicionais foram executados utilizando cloreto de cálcio e ácido fosfórico como aditivos em uma massa de batata. Três diferentes níveis de cloreto de cálcio foram utilizados, correspondendo a 0%, 0,45% e 0,90% em massa dos flocos de batata. Estes foram combinados com três diferentes níveis de ácido fosfórico, correspondendo a 0%, 0,05% ou 0,1% dos flocos. Adicionalmente, foram ensaiados três níveis de açúcar redutor, correspondendo a 0,2%, 1,07% e 2,07%, embora nem todas as combinações destes níveis estejam representadas. Cada ensaio foi misturado na forma de uma massa, moldado e cozido para formar petiscos de batata. A temperatura de fritura do óleo, o tempo de fritura e a espessura da lâmina foram mantidos constantes a 350 F, durante 16 segundos e 0,64 mm respectivamente. Para maior clareza, os resultados estão apresentados em três tabelas separadas (16A, 16B, e 16C) com cada tabela ilustrando os resultados para um dos níveis de açúcar nos flocos de batata. Adicionalmente, os ensaios foram arranjados de maneira tal que os controles, sem cloreto de cálcio ou ácido fosfórico, figurassem na margem esquerda das tabelas. Dentro da Tabela, cada nível de cloreto de cálcio (CC) está agrupado junto, seguido por variações no ácido fosfórico (PA).

Célula	Cntrl (16)	No CC ↓PA (5)	↓CC No PA (7)	↓CC ↑PA (4)	↑CC ↓PA (8)	
(g) CaCl <sub>2</sub> %	---	---	0,45	0,45	0,90	
Ácido fosfórico%	---	0,05	---	0,10	0,05	
Umidade	2,36	2,36	2,30	2,30	2,42	
Óleo	22,83	21,77	23,60	22,20	23,75	
(h) Cloração	L	69,42	74,39	75,00	75,07	74,39
	A	2,69	0,10	-0,02	-0,13	0,10
	B	28,00	27,99	27,80	27,64	27,99
Acrilamida	171	131	41	46	40	

TABELA 16A: EFEITO DE CaCl<sub>2</sub>/Ácido fosfórico Sobre o Nível de acrilamida – 0,2% de

### Açúcares Redutores

No mais baixo dos níveis de açúcares redutores neste ensaio, podemos observar que os níveis de acrilamida produzida se encontram normalmente na faixa mais baixa, tal como seria de se esperar. Neste nível de açúcares, o cloreto de cálcio apenas reduziu o nível de acrilamida para menos de ¼ do controle, com pouco benefício adicional alcançado através da adição de ácido fosfórico. Na faixa intermediária dos açúcares redutores, ilustrada na Tabela a seguir, a combinação de cloreto de cálcio reduz o nível de acrilamida de 367 ppb no controle para 69 ppb na célula 12. Embora parte desta redução possa ser atribuída ao teor ligeiramente mais elevado de umidade da célula 12 (2,77 versus 2,66 para o controle), suporte adicional está representado pela significativa redução na acrilamida mesmo quando os níveis de cloreto de cálcio e ácido fosfórico são reduzidos à metade. Isto é ilustrado na célula 6, que apresenta uma significativa redução na acrilamida e no teor de umidade mais baixo do que o do controle.

Célula	Cntrl (15)	No CC ↑PA (3)	↓CC ↓PA (2a)	↓CC ↓PA (2b)	↓CC ↓PA (6)	↓CC ↓PA (13)	↑CC 0 PA (9)	↑CC ↑PA (12)	
CaCl <sub>2</sub>	---	---	0,45	0,45	0,45	0,45	0,90	0,90	
Ácido fosfórico%	---	0,10	0,05	0,05	0,05	0,05	---	0,10	
Umidade	2,66	2,59	3,16	2,74	2,61	2,56	2,81	2,77	
Óleo	23,72	24,24	25,24	22,58	23,48	25,12	23,99	24,71	
(i) Cloração	L	69,45	67,69	72,23	70,44	70,58	72,06	72,64	73,59
	A	2,73	4,63	0,54	2,32	2,59	2,03	0,84	0,47
	B	28,00	28,54	26,51	27,55	27,79	27,64	27,05	26,82
Acrilamida	367	451	96	170	192	207	39	69	

TABELA 16B: EFEITO DE CaCl<sub>2</sub>/Ácido fosfórico Sobre o Nível de acrilamida – 1,07% de

## Açúcares Redutores

Célula		No CC ↓PA (11)	↓CC No PA (1a)	↓CC No PA (1b)	↓CC No PA (1c)	↓CC ↑PA (10)	↑CC ↓PA (14)
CaCl <sub>2</sub> %		---	0,45	0,45	0,45	0,45	0,90
Ácido fosfórico%		0,05	---	---	---	0,10	0,05
Umidade		2,47	2,68	2,60	3,19	2,80	3,18
Óleo		24,70	25,07	24,48	22,81	24,19	23,25
(j) Cloração	L	61,84	62,32	63,86	69,42	69,11	72,61
	A	8,10	5,18	6,70	3,00	3,78	1,28
	B	28,32	26,27	28,00	27,66	27,70	26,78
Acrilamida		667	431	360	112	150	51

TABELA 16C: EFEITO DE CaCl<sub>2</sub>/Ácido fosfórico Sobre o Nível de acrilamida – 2,07% de

## Açúcares Redutores

Conforme pode ser visto a partir destas três Tabelas, os níveis de cloreto de cálcio e ácido fosfórico necessários para reduzir o nível de acrilamida aumentam na medida em que o nível de açúcares redutores aumenta, tal como seria de se esperar. A **Figura 6** mostra um gráfico correspondendo às três Tabelas acima, com as barras 602 indicando o nível de acrilamida e os pontos 604 indicando o nível de umidade. Os resultados estão novamente agrupados pelo nível de açúcar redutor disponível a partir da batata; dentro de cada grupo existe um movimento geral para baixo quando primeiramente um e em seguida diversos agentes redutores de acrilamida são usados para reduzir o nível de acrilamida.

Vários dias depois, um outro ensaio com o mesmo protocolo anteriormente utilizado para as três Tabelas acima foi conduzido utilizando apenas os flocos de batata com 1,07% de açúcares redutores com os mesmos três níveis de cloreto de cálcio e com quatro níveis de ácido fosfórico (0, 0,025%, 0,05% e 0,10%). Os resultados se encontram ilustrados abaixo na Tabela 17. A **Figura 7** ilustra de forma gráfica os resultados para a Tabela, com os níveis de acrilamida expressos como barras 702 e calibrados para as marcações na margem esquerda enquanto que o percentual de umidade está expresso na forma de pontos 704 e calibrado para as marcações na margem direita da figura. Na medida em que aumenta a quantidade de cloreto de cálcio, por exemplo movendo-se da esquerda para a direita ao longo de toda a Tabela, o teor de acrilamida diminui. De forma similar, para cada nível de cloreto de cálcio, por exemplo movendo-se da esquerda para a direita dentro de um mesmo nível de cloreto de cálcio, o nível de acrilamida também geralmente diminui.

Célula	Cntrl (1)	No CC ↓PA (4)	No CC ↑PA (7)	↓CC ↓PA (3)	↓CC ↓PA (6)	↑CC ↓PA (8)	↑CC ↓PA (2)	↑CC ↑PA (5)	
CaCl <sub>2</sub>	---	---	---	0,45	0,45	0,90	0,90	0,90	
Ácido fosfórico%	---	0,050	0,100	0,050	0,050	0,025	0,050	0,100	
Umidade	2,68	2,52	2,38	2,29	2,55	2,45	2,78	2,61	
Óleo	23,74	22,57	22,13	24,33	23,84	22,54	24,11	22,73	
(k) Cloração	L	65,97	64,67	64,55	65,18	66,82	68,36	70,23	68,75
	A	4,75	5,23	5,53	5,06	4,09	3,17	2,19	2,92
	B	27,70	27,83	27,94	27,79	27,64	27,17	26,28	27,06
Acrilamida	454	435	344	188	77	233	80	66	

TABELA 17: Efeito de CaCl<sub>2</sub> / Ácido fosfórico Sobre o Nível de Acrilamida – 1,07% de

Açúcares Redutores

#### XIV. CLORETO DE CÁLCIO/ÁCIDO CÍTRICO COM CISTEÍNA

Em alguns dos ensaios anteriores com petiscos de milho realizados pelos inventores, a quantidade de cloreto de cálcio e de ácido fosfórico necessária para trazer o nível de acrilamida até um nível desejado resultou em sabores discutíveis. O ensaio a seguir foi projetado para revelar se a adição de cisteína à massa de batata – visto que a cisteína provou reduzir os níveis de acrilamida nos – permitiria que os níveis de cloreto de cálcio e ácido fossem reduzidos para níveis de sabor aceitáveis e ao mesmo tempo manter baixo o nível de acrilamida. Neste ensaio, os três agentes foram adicionados à massa (massa) numa proporção de (i) Ca/Cl<sub>2</sub> a 0,106%, ácido cítrico a 0,084% e L. cisteína a 0,005% em um primeiro experimento; (ii) Ca/Cl<sub>2</sub> a 0,106% e ácido cítrico a 0,084%, porém sem cisteína em um segundo experimento, e Ca/Cl<sub>2</sub> a 0,053%, ácido cítrico a 0,042% com L. cisteína a 0,005% como um terceiro experimento. Cada experimento foi realizado em duplicado e feito novamente, com ambos os resultados ilustrados abaixo. A massa apresenta cerca de 50% de umidade, assim sendo as concentrações seriam de aproximadamente o dobro se traduzíssemos estas proporções para sólidos apenas. Adicionalmente, em cada ensaio, parte da produção foi temperada com uma adição de tempero de queijo nacho a cerca de 10% da massa do petisco básico. Os resultados deste ensaio se encontram ilustrados na Tabela 18 abaixo. Nesta Tabela, para cada categoria de petisco, por exemplo, petisco simples, controle, os resultados da primeira rodada do experimento estão apresentados na linha acrilamida #1; os resultados da segunda rodada do experimento estão apresentados na linha acrilamida #2, e a média dos dois está indicada como média de acrilamida. Apenas um nível de umidade foi tomado, no primeiro experimento; cujo valor está ilustrado.

Célula	Petisco simples				Petisco nacho			
	Cntrl	↑CC ↑Cítric 0 CIS	↑CC ↑Cítric CIS	↓CC ↓Cítric CIS	Cntrl	↑CC ↑Cítric 0 CIS	↑CC ↑Cítric CIS	↓CC ↓Cítric CIS
CaCl <sub>2</sub> (%)		0,106	0,106	0,053		0,106	0,106	0,053
Ácido cítrico (%)		0,084	0,084	0,042		0,084	0,084	0,042
Cisteína (%)			0,005	0,005			0,005	0,005
Acrilamida #1 ppb	163	154	70	171	90	55	62	77
Acrilamida #2 ppb	102	113	74	103	71	53	50	76
Acrilamida média ppb	132,5	133,5	72	137	80,5	54	56	76,5
(l) Umidade %	1,07	0,91	1,07	0,95	1,26	1,49	1,23	1,25

TABELA 18: Efeito de Cisteína com CaCl<sub>2</sub> / Ácido cítrico Sobre o Nível de Acrilamida em Petiscos de Milho

Quando combinada com 0,106% CaCl<sub>2</sub> e 0,084% ácido cítrico, a adição de cisteína reduz a produção de acrilamida para aproximadamente a metade. Nos petiscos temperados com saporificante de nacho, o cloreto de cálcio e ácido cítrico apenas reduziram a produção de acrilamida de 80,5 para 54 ppb, embora neste conjunto de ensaios, a adição de cisteína não tenha parecido proporcionar uma redução adicional da acrilamida.

A **Figura 8** apresenta de forma gráfica os mesmos dados que a Tabela acima. Para cada tipo de petisco com o qual se realiza o experimento (por exemplo, petisco simples, controle), duas barras 802 ilustram os resultados para a acrilamida. O resultado de acrilamida 802a de acordo com o primeiro experimento está ilustrado na margem esquerda para cada tipo de petisco, com o resultado de acrilamida 802b para o segundo experimento ilustrado na margem direita. Ambos os resultados de acrilamida estão calibrados para as marcações na margem esquerda do gráfico. O nível de umidade único está ilustrado como um ponto 804 sobrejacente ao gráfico da acrilamida e está calibrado para as marcações na margem direita do gráfico.

Depois de completado o ensaio acima, os petiscos fabricados de batata foram ensaiados de maneira similar, utilizando flocos de batata contendo dois diferentes níveis de açúcares redutores. Para traduzir as concentrações usadas no ensaio do petisco de milho para os petiscos fabricados de batata, a soma dos flocos de batata, amido de batata, emulsificantes e açúcar adicionado foram consideradas como os sólidos. As quantidades de CaCl<sub>2</sub>, ácido cítrico e cisteína foram ajustadas para

gerar a mesma concentração que nos petiscos de milho em uma base sólida. Neste ensaio, no entanto, quando níveis de cloreto de cálcio e ácido cítrico mais elevados foram utilizados, um nível mais elevado de cisteína também foi usado. Adicionalmente, efetuou-se uma comparação na porção mais baixa de açúcar redutor do ensaio, para o uso de cloreto de cálcio em combinação com ácido fosfórico, com e sem cisteína. Os resultados estão ilustrados na Tabela 19.

É possível visualizar a partir destes resultados que nos flocos de batata com 1,25% de açúcares redutores, a combinação de cloreto de cálcio, ácido cítrico e cisteína no primeiro nível acima reduziu a formação de acrilamida de 1290 ppb para 594 ppb, menos de metade do valor para o controle. A utilização dos níveis mais elevados da combinação de agentes reduziu a formação de acrilamida para 306 ppb, menos de metade da quantidade do controle.

A utilização dos mesmos flocos de batata, ácido fosfórico e cloreto de cálcio apenas reduziu a formação de acrilamida desde os mesmos 1290 para 366 ppb, ao passo em que uma pequena quantidade de cisteína adicionada ao ácido fosfórico e cloreto de cálcio reduziu a acrilamida ainda mais, para 188 ppb.

Finalmente, nos flocos de batata apresentando 2% de açúcares redutores, a adição de cloreto de cálcio, ácido cítrico e cisteína reduziu a formação de acrilamida de 1420 para 665 ppb, menos da metade.

Célula	Açúcares Redutores Médios (1,25%)					Açúcares Redutores Elevados (2%)	
	Cntrl (1B)	↓CC ↓Citric ↓CISt (2)	↑CC ↑Citric ↑CISt (3)	CC FosA 0CISt (4)	CC FosA CISt (4A)	Cntrl (6)	↓CC ↓Citric ↓CISt (7)
Cloreto de cálcio		10,2	20,4	36	36		10,2
Ácido cítrico		8	16				8
Ácido fosfórico				4	4		
Cisteína		0,48	0,96		0,48		0,48
Acrilamida ppb	1290	594	306	366	188	1420	665
Umidade %	1,82	2,06	2,12	2,06	2,33	2,28	2,23
Cloração	L	56,84	65,47	69,29	66,88	73,09	61,06
	A	10,20	6,42	4,07	4,42	1,55	9,03
	B	27,53	28,40	28,17	28,10	27,07	28,07

TABELA 19: Efeito da Cisteína com CaCl<sub>2</sub> / Ácido Sobre o Nível de Acrilamida em Petiscos de Batata

A **Figura 9** demonstra de maneira gráfica os resultados deste experimento. Os resultados são apresentados agrupados primeiramente pelo nível de açúcares redutores, então pela quantidade de agentes redutores de acrilamida adicionada. Tal como nos gráficos anteriores, barras 902 representando o nível de acrilamida foram calibradas de acordo com as marcações na margem esquerda do gráfico, ao passo em que os pontos 904 representando o nível de umidade foram calibrados de acordo com as marcações na margem direita do gráfico.

Os experimentos acima demonstraram que o agentes redutores de acrilamida não precisa ser utilizado separadamente, mas pode ser combinado para proporcionar um benefício adicional. Este benefício adicional pode ser usado para alcançar níveis cada vez mais baixos de acrilamida nos alimentos ou para alcançar um baixo nível de acrilamida sem produzir mudanças significativas no sabor e textura destes alimentos. Embora as incorporações específicas ilustradas tenham revelado cloreto de cálcio combinado com ácido cítrico ou ácido fosfórico e estes com cisteína, aqueles versados na técnica irão perceber que as combinações poderiam usar outros sais de cálcio, os sais de outros cátions bivalentes ou trivalentes, outros ácidos de padrão alimentício e quaisquer dos outros aminoácidos que demonstraram reduzir a acrilamida em um produto alimentício acabado. Adicionalmente, embora isto tenha sido demonstrado em petiscos de batata e petiscos de milho, aqueles versados na técnica deverão compreender o fato de que o mesmo uso de combinações de agentes pode ser utilizado em outros produtos alimentícios fabricados que estejam sujeitos à formação de acrilamida, tais como biscoitos, bolachas, etc.

#### **XV. AGENTES PARA REDUZIR ACRILAMIDA ADICIONADOS NA FABRICAÇÃO DE FLOCOS DE BATATA**

Demonstrou-se que a adição de cloreto de cálcio e um ácido reduz a acrilamida em alimentos de petisco fritos e cozidos formulados com flocos de batata. Acredita-se que a presença de um ácido gere este efeito através da redução do pH. Não se sabe se o cloreto de cálcio interfere com a perda do grupo carboxila ou a subsequente perda do grupo amina a partir da asparagina livre para formar acrilamida. A perda do grupo amina parece requerer temperaturas elevadas, o que geralmente ocorre mais próximo do final da desidratação do petisco. Acredita-se que a perda do grupo carboxila ocorra sob temperaturas mais baixas em presença de água.

Os flocos de batata podem ser feitos seja com diversos tipos de aparatos para cozimento com água e vapor (convencional) ou apenas com um aparato para cozimento com vapor (que lixivia menos das superfícies expostas da batata). As batatas cozidas são então amassadas e secadas num

tambor. A análise dos flocos revelou níveis muito baixos de acrilamida nos flocos (menos de 100 ppb), embora os produtos feitos a partir destes flocos possam alcançar níveis muito mais elevados de acrilamida.

5 Apresentou-se a teoria de que se a redução do pH da massa com ácido ou a adição de cloreto de cálcio à massa interfere com a perda do grupo carboxila, então a introdução destes aditivos durante o processo de fabricação dos flocos poderia seja (a) reduzir a perda de carboxila e assim reduzir a taxa de perda de amina durante a desidratação do petisco alimentar ou (b) independentemente de qual seja o mecanismo, assegurar que o aditivo de intervenção fique bem distribuído dentro da massa que é desidratada até formar o petisco alimentar. A primeira hipótese, caso de fato seja válida, acarretaria um efeito provavelmente mais intenso sobre a acrilamida do que a segunda hipótese.

10 Um outro possível aditivo para reduzir a formação de acrilamida em produtos alimentícios fabricados é a asparaginase. É sabido que a asparaginase decompõe a asparagina em ácido aspártico e amônia. O processo de fabricação de flocos através do cozimento e amassamento das batatas (um ingrediente alimentício) rompe as paredes celulares e proporciona uma oportunidade para que a asparaginase trabalhe. Numa incorporação preferencial, a asparaginase é adicionada ao ingrediente alimentício em uma forma pura como asparaginase de padrão alimentício seja na forma de um pó ou em uma solução aquosa. A asparaginase pode ser combinada com outros agentes redutores de acrilamida discutidos no presente documento, tais como aminoácidos e cátions bi- e trivalentes.

20 Os inventores conceberam os conjuntos de experimentos a seguir para estudar a eficácia de vários agentes adicionados durante a produção dos flocos de batata na redução do nível de acrilamida em produtos feitos com os flocos de batata.

#### 25 **XVI. CLORETO DE CÁLCIO E ÁCIDO FOSFÓRICO USADOS NA FABRICAÇÃO DE FLOCOS DE BATATA**

Esta série de ensaios foi projetada para avaliar a redução no nível de acrilamida quando se adiciona  $\text{CaCl}_2$  e/ou ácido fosfórico durante a fabricação dos flocos de batata. Os ensaios também contemplam a possibilidade de estes aditivos terem o mesmo efeito que têm quando são adicionados em um momento posterior durante a fabricação da massa.

30 Para este ensaio, as batatas compreendiam 20% de sólidos e 1% de açúcar redutor. As batatas foram cozidas durante 16 minutos e amassadas com ingredientes adicionados. Todos os lotes

receberam 13,7 mg de um emulsificante e 0,4 mg de ácido cítrico. Quatro dos seis lotes tiveram ácido fosfórico adicionado em um de dois níveis (0,2% e 0,4% de sólidos de batata) e três dos quatro lotes receberam  $\text{CaCl}_2$  em um de dois níveis (0,45% e 0,90% da massa de sólidos de batata). Depois que as batatas estavam secas e moídas em flocos de um determinado tamanho, diversas medições foram efetuadas e cada lote foi convertido em massa. A massa utilizou 4629 mg de flocos de batata e amido de batata, 56 mg de emulsificante, 162 ml de sacarose líquida e 2300 ml de água. Adicionalmente, dos dois lotes que não receberam ácido fosfórico ou  $\text{CaCl}_2$  durante a fabricação dos flocos, ambos receberam estes aditivos em determinados níveis quando a massa foi feita. A massa foi laminada numa espessura de 0,64 mm, cortada em pedaços e frita sob uma temperatura de 350 °F durante 20 segundos. A Tabela 20 abaixo ilustra os resultados destes ensaios para estes vários lotes.

Lote	0 Ca ↓fos (C) nos flocos	↓Ca ↓fos (B) nos flocos	↓Ca ↓fos (F) na massa	↑Ca ↓fos (A) nos flocos	↑Ca ↓fos (D) na massa	↑Ca ↑fos (E) nos flocos
Adicionado aos Flocos						
Massa (mg) Cloreto de cálcio	0	24,7	0	49,4	0	49,4
Massa (mg) Ácido fosfórico	11,0	11,0	0	11,0	0	21,9
Ensaio com Flocos Secos						
Umidade (%)	6,3	6,5	4,5	6,8	6,2	7,7
Índice de absorção de água (WAI) (%)	8,2	8,3	9,2	8,2	8,1	8,1
Retido na malha 20	1,5	1,8	2,0	1,0	1,7	1,6
Retido na malha 40	26,6	30,9	32,3	27,2	28,3	24,4
Retido na malha 60	35,3	37,1	36,1	38,4	37,5	35,3
Retido na malha 80	14,6	13,2	12,0	14,5	14,4	16,0
Retido na malha 100	5,7	4,8	4,5	5,4	5,4	6,5
Retido na malha 200	11,5	8,8	8,6	10,1	9,3	12,1
Passado através da malha 200	4,7	3,3	4,5	3,4	3,3	4,0
Adicionado à Massa						
Diidrato de Cloreto de cálcio	0	0	23,7	0	47,4	0
Ácido fosfórico	0	0	14,4	0	7,9	0
Resultados dos Ensaio nos Petiscos						
Umidade	1,87	2,04	2,04	2,07	1,97	2,05
(m) Óleo	23,53	23,82	25,12	23,76	24,44	24,98
Cloração – L	54,63	62,58	67,28	66,89	69,48	66,87
Cloração – A	13,63	9,23	6,99	6,27	5,61	7,21
Cloração – B	27,32	28,59	29,54	28,85	29,26	29,37
Acrilamida	1286	344	252	129	191	141

TABELA 20: Efeito de  $\text{CaCl}_2$  / Ácido fosfórico Adicionado aos Flocos ou à Massa Sobre

o Nível de Acrilamida

Conforme observado nos resultados acima e no gráfico anexo da **Figura 10**, o nível de acrilamida foi o maior no Ensaio C quando adicionou-se apenas ácido fosfórico ao preparo dos flocos e foi o menor quando cloreto de cálcio e ácido fosfórico foram usados em combinação.

5

#### **XVII. ASPARAGINASE USADA NA FABRICAÇÃO DE FLOCOS DE BATATA**

A asparaginase é uma enzima que decompõe a asparagina em ácido aspártico e amônia. Como o ácido aspártico não forma acrilamida, os inventores intuíram que um tratamento com asparaginase deveria reduzir a formação de acrilamida quando os flocos de batata são aquecidos.

10

O ensaio a seguir foi executado. Dois gramas de flocos de batata padrão foram misturados com 35 ml de água em uma panela de secagem metálica. A panela foi tampada e aquecida até uma temperatura de 100 °C durante 60 minutos. Após o resfriamento, adicionaram-se 250 unidades de asparaginase em 5 ml de água, uma quantidade de asparaginase tal que era significativamente maior do que a quantidade requerida de acordo com os cálculos. As enzimas são vendidas segundo as suas unidades de atividade. Uma unidade de atividade está definida da maneira descrita a seguir: Uma unidade irá liberar 1,0  $\mu$ mole de amônia a partir de L-asparagina por minuto num pH 8,6 sob uma temperatura de 37° C. Para o controle, misturou-se flocos de batata e 5 ml de água sem enzima. Os flocos de batata com asparaginase foram mantidos em temperatura ambiente durante 1 hora. Após o tratamento com a enzima, a pasta de flocos de batata foi secada sob uma temperatura de 60 °C de um dia para o outro. As panelas contendo flocos de batata secos foram tampadas e aquecidas sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. O teor de acrilamida foi medido com o auxílio de um cromatógrafo de gás e espectrometria de massa de um derivado bromatado. Os flocos de controle continham 11,036 ppb de acrilamida, ao passo em que os flocos tratados com asparaginase continham 117 ppb de acrilamida, uma redução de mais de 98%.

15

20

25

Depois deste primeiro ensaio, investigou-se se era necessário cozinhar os flocos de batata e a água antes de adicionar asparaginase para que as enzimas fossem eficazes. Para testar isto, levou-se a cabo o seguinte experimento:

30

Flocos de batata foram previamente tratados de uma dentre quatro maneiras. Em cada um dos quatro grupos, 2 gramas de flocos de batata foram misturados com 35 mililitros de água. No grupo de tratamento prévio de controle (a), os flocos de batata e água foram misturados para formar uma pasta. No grupo (b), os flocos de batata foram homogeneizados com 25 ml de água dentro de um Bio Homogenizador M 133/1281-0 em alta velocidade e misturados com adição de 10 ml de

água desionizada. No grupo (c), os flocos de batata e água foram misturados, cobertos e aquecidos sob uma temperatura de 60 °C durante 60 minutos. No grupo (d), os flocos de batata e água foram misturados, cobertos e aquecidos sob uma temperatura de 100 °C durante 60 minutos. Para cada grupo de tratamento prévio (a), (b), (c), e (d), os flocos foram divididos, com metade do grupo de tratamento prévio sendo tratado com asparaginase enquanto que a outra metade servia como controle, sem qualquer adição de asparaginase.

Uma solução de asparaginase foi preparada por meio de dissolução de 1000 unidades em 40 mililitros de água desionizada. A asparaginase era oriunda de *Erwinia chrysanthemi*, Sigma A-2925 EC 3,5,1,1. Cinco mililitros de solução de asparaginase (5ml) foram adicionados a cada uma das pastas de flocos de batata de ensaio (a), (b), (c), e (d). Cinco mililitros de água desionizada foram adicionados à pasta de flocos de batata de controle (a). todas as pastas foram deixadas em temperatura ambiente durante uma hora, com todos os ensaios sendo executados em duplicado. As panelas destampadas contendo as pastas de flocos de batata foram deixadas de um dia para o outro para secar sob uma temperatura de 60 °C. Depois de tampadas as panelas, os flocos de batata foram aquecidos sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. O teor de acrilamida foi medido por meio de cromatografia gasosa, espectroscopia de massa de derivado bromatado.

Conforme ilustrado na Tabela 21 abaixo, o tratamento com asparaginase reduziu a formação de acrilamida em mais de 98% para todos os tratamentos prévios. Nem a homogenização nem o aquecimento dos flocos de batata antes da adição da enzima aumentaram a eficácia da asparaginase. Nos flocos de batata, a asparagina fica acessível à asparaginase sem tratamentos que gerem danos adicionais à estrutura celular. De forma notável, a quantidade de asparaginase usada para tratar os flocos de batata apresentava um grande excesso. Se os flocos de batata contêm 1% de asparagina, a adição de 125 unidades de asparaginase a 2 gramas de flocos de batata durante 1 hora corresponde a um excesso de enzima de aproximadamente 50-vezes o necessário.

Tratamento prévio	Acrilamida ppb		Acrilamida como % de Controle
	Controle – Sem Asparaginase	Ensaio – Asparaginase	
(a) Sem tratamento prévio	12512	107	0,9
(b) Homogenização	12216	126	1,0
(c) Aquecido sob uma temperatura de 60 °C	12879	105	0,8
(d) Aquecido sob uma temperatura de 100 °C	12696	166	1,3

TABELA 21: Efeito dos Tratamentos Prévios de Flocos de Batata Sobre a Eficácia da Asparagina

Um outro conjunto de ensaios foi projetado para avaliar se a adição de asparaginase durante a produção de flocos de batata proporciona uma redução de acrilamida no produto cozido feito a partir dos flocos e se o tamponamento das batatas amassadas usado para levar os flocos a um pH preferencial para a atividade enzimática (por exemplo, pH = 8,6) aumentaria a eficácia da asparaginase. O tamponamento foi efetuado com uma solução de hidróxido de sódio, feita com quatro gramas de hidróxido de sódio adicionados a um litro de água para formar uma solução de um décimo molar.

Dois lotes de flocos de batata foram estabelecidos como controles, um tamponado e outro não-tamponado. A asparaginase foi adicionada a dois lotes adicionais de flocos de batata; novamente um foi tamponado enquanto que o outro não foi. A asparaginase foi obtida da empresa Sigma Chemical e foi misturada com água numa proporção de 8 partes de água para 1 parte de enzima. Para os dois lotes nos quais se adicionou a asparaginase, a pasta foi mantida durante 40 minutos após a adição da enzima, em um recipiente tampado para minimizar a desidratação e mantida sob uma temperatura de aproximadamente 36 °C. A pasta foi então processada em um tambor de secagem para produzir os flocos. Os flocos de batata foram usados para fazer uma massa de batata de acordo com os protocolos anteriormente descritos, com os resultados ilustrados na Tabela 22 abaixo.

Medição	Controle Não-tamponado	Asparaginase Não-tamponada	Controle Tamponado	Asparaginase Tamponada
(n) Umidade	1,56	1,53	1,68	1,61
Óleo	22,74	23,12	21,77	21,13
Cloração – L	61,24	60,70	57,24	57,35
Cloração – A	6,57	9,30	5,04	7,52
Cloração – B	28,95	28,29	27,12	27,41
Acrilamida ppb	768	54	1199	111

TABELA 22: Efeito da Asparaginase e do Tamponamento Sobre o Nível de Acrilamida em Petiscos de Batata

Conforme ilustrado na Tabela 22, a adição de asparaginase sem a solução-tampão reduziu a produção de acrilamida nos petiscos acabados de 768 para 54 ppb, uma redução de 93%. O uso de uma solução-tampão aparentemente não teve o efeito desejado sobre a formação de acrilamida; ao invés disso o uso da solução tamponada permitiu que uma quantidade maior de acrilamida se formasse tanto no experimento de controle quanto no experimento com a asparaginase. Mesmo assim, a asparaginase reduziu o nível de acrilamida de 1199 para 111, uma redução de 91%. A **Figura 11** ilustra os resultados oriundos da Tabela 22 de uma maneira gráfica. Tal como nas figuras anteriores, as barras 1102 representam o nível de acrilamida para cada experimento, calibrado de acordo com as marcações na margem esquerda do gráfico, enquanto que os pontos 1104 representam o nível de umidade nos petiscos a, calibrado de acordo com as marcações na margem direita do gráfico.

Efetuararam-se também ensaios com as amostras para verificar a presença de asparagina livre e determinar se a enzima estava ativa. Os resultados estão ilustrados abaixo na Tabela 23.

	Controle Não-tamponado	Asparaginase Não-tamponada	Controle Tamponado	Asparaginase Tamponada
(o) Asparagina livre	1,71	0,061	2,55	0,027
Frutose	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Glicose	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Sucrose	0,798	0,828	0,720	0,322

TABELA 23: Ensaio para Asparagina Livre em Flocos Tratados com Enzima

No grupo não-tamponado, a adição de asparaginase reduziu a asparagina livre de 1,71 para 0,061, uma redução de 96,5%. No grupo tamponado, a adição de asparaginase reduziu a asparagina livre de 2,55 para 0,027, uma redução de 98,9%.

Finalmente, flocos de amostra oriundos de cada grupo foram avaliados em um sistema modelo. Neste sistema modelo, uma pequena quantidade de flocos oriundos de cada amostra foi misturada com água para formar uma solução com aproximadamente 50% de flocos para água. Esta solução foi aquecida em um tubo de ensaio durante 40 minutos sob uma temperatura de 120 °C. A amostra foi então analisada quanto à formação de acrilamida, com os resultados ilustrados na Tabela 24. Resultados duplicados para cada categoria são apresentados lado a lado. No sistema modelo, a adição de asparaginase aos flocos não-tamponados reduziu o teor de acrilamida de uma média de 993,5 ppb para 83 ppb, uma redução de 91,7%. A adição de asparaginase aos flocos tamponados reduziu o teor de acrilamida de uma média de 889,5 ppb para uma média de 64,5, uma redução de 92,7%.

Acrilamida ppb	Controle Não-tamponado		Asparaginase Não-tamponada		Controle Tamponado		Asparaginase Tamponada	
		1019	968	84	82	960	819	70

TABELA 24: Efeito da Asparaginase Sobre o Teor de Acrilamida no Sistema Modelo

### XVIII. Extrato de Alecrim Adicionado ao Óleo de Fritura

Em um ensaio separado, examinou-se o efeito da adição de extrato de alecrim ao óleo de fritura para petiscos fabricados de batata. Neste ensaio, petiscos de batata fabricados de maneiras idênticas foram fritos em óleo que não continha qualquer aditivo (controle) e comparativamente em óleo que continha extrato de alecrim adicionado em um de quatro diferentes níveis: 500, 750, 1.000, ou 1.500 partes por milhão. A Tabela 25 abaixo indica os resultados deste ensaio.

Nível de Alecrim ppm	0	0	500	750	1,000	1,500
Umidade %		2,58			2,64	2,6
Acrilamida ppb	1210	1057	840	775	1211	1608

TABELA 25: Efeito do Alecrim Sobre a Acrilamida

O nível médio de acrilamida nos petiscos de controle foi de 1133,5 ppb. A adição de 500 partes por milhão de alecrim ao óleo de fritura reduziu o teor de acrilamida para 840, uma redução de 26%, ao passo em que o aumento do teor de alecrim para 750 partes por milhão reduziu a formação de acrilamida ainda mais, para 775, uma redução de 31,6%. No entanto, o aumento do teor de alecrim para 1000 partes por milhão não apresentou efeito e o aumento do teor de alecrim para 1500 partes por milhão provocou um aumento na formação de acrilamida para 1608 partes por milhão, um aumento de 41.9%.

A Figura 12 demonstra os resultados do experimento com o alecrim de maneira gráfica.

Tal como nos exemplos anteriores, as barras 1202 indicam o nível de acrilamida e estão calibradas para as divisões na margem esquerda do gráfico, ao passo em que os pontos 1204 indicam a quantidade de umidade nos petiscos e estão calibradas para as divisões na margem direita do gráfico.

Os resultados de ensaio revelados acrescentaram ao conhecimento sobre os agentes reductores de acrilamida que podem ser utilizados em alimentos fabricados processados termicamente. Ficou demonstrado que cátions bivalentes e trivalentes, a enzima asparaginase e aminoácidos são eficazes para reduzir a incidência de acrilamida em alimentos fabricados processados termicamente. Estes agentes podem ser utilizados individualmente, mas também podem ser usados em combinação uns com os outros ou com ácidos que ampliam a sua eficácia. A combinação de agentes pode ser utilizada para reduzir ainda mais a incidência de acrilamida em alimentos processados termicamente em relação àquela alcançável por meio de agentes isolados ou as combinações podem ser utilizadas para alcançar um baixo nível de acrilamida sem gerar alterações indevidas no sabor e na textura do produto alimentício. Os ensaios revelaram que a asparaginase é um eficaz agente redutor do teor de acrilamida em alimentos fabricados. Também ficou demonstrado que estes agentes podem ser eficazes não apenas quando adicionados à massa para o alimento fabricado, mas também quando adicionados aos produtos intermediários, tais como flocos de batata secos ou outros produtos de batata secos, durante a sua fabricação. O benefício gerado pelos agentes adicionados aos produtos intermediários pode ser tão expressivo quanto aquele obtido quando os agentes são adicionados à massa.

#### **XIX. EFEITO DO AGENTE REDUTOR DE ACRILAMIDA APRESENTANDO UM TIOL LIVRE SOBRE A FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA**

Uma outra incorporação da presente invenção envolve a redução da produção de acrilamida por meio da adição de um agente redutor com um composto de tiol livre à uma massa de petisco alimentar antes do cozimento ou processamento térmico. Conforme empregado no presente documento, um composto de tiol livre é um agente redutor de acrilamida apresentando um tiol livre. Conforme discutido anteriormente, acredita-se que o tiol livre de cisteína pode reagir com a ligação dupla de carbono da acrilamida e agir como um inibidor de uma reação de Maillard.

Efetou-se um ensaio para confirmar que o tiol livre é provavelmente o responsável pela redução de acrilamida. Cinco compostos de tiol livre foram preparados numa base equimolar, cada composto apresentando uma concentração de 6,48 milimoles por litro numa solução-tampão de fosfato de sódio 0,5 molar apresentando um pH de 7,0 com asparagina a 0,4% (30,3 milimolar) e

glicose a 0,8% (44,4 milimolar). Uma amostra de controle que não apresentava quaisquer compostos de tiol livre também foi preparada. As seis soluções foram cada uma aquecida sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. As soluções foram então medidas quanto às concentrações de acrilamida. Os resultados estão ilustrados na Tabela 26 abaixo:

Composto	Acrilamida (ppb)	Como % de Controle
Controle (Sem Tiol livre)	4146	100
Cisteína ("L-Cisteína")	1128	27
N-Acetil-L-Cisteína	1231	30
N-Acetil-Cisteamina	1204	29
Glutathiona Reduzida	1153	28
Bi-tiotreitol	1462	35

5 TABELA 26: Efeito de Compostos de Tiol Livre Sobre a Redução de Acrilamida por meio de Decomposição

O experimento acima confirma que é de fato o grupo tiol livre que reduz o teor de acrilamida. O grupo de amina livre da cisteína não contribui para a redução da acrilamida porque a N-acetil-L-cisteína apresentando um grupo amina bloqueado é aproximadamente tão eficaz quanto a cisteína. O grupo carboxila da cisteína não contribui para a redução da acrilamida porque a N-acetil-Cisteamina, que não apresenta um grupo carboxila é aproximadamente tão eficaz quanto a cisteína na redução do teor de acrilamida. A glutathiona, um tripeptídeo com cisteína na posição central, foi equivalente à cisteína. Embora o ditiotreitól apresente dois grupos tiol, a acrilamida com ditiotreitól foi similar aos compostos com um grupo tiol. Os dois grupos tiol no ditiotreitól podem reagir para formar dissulfetos tal que o ditiotreitól foi menos eficaz numa base molar equivalente do que os outros compostos contendo tiol.

15 A realização de ensaios, conforme exemplificado pela Tabela 26 acima, demonstrou que a redução de acrilamida é essencialmente proporcional à concentração de tióis livres adicionados, tais como a cisteína. No entanto, os efeitos colaterais sobre as características tais como a cloração, o sabor e a textura do produto final resultantes da adição de um composto de tiol livre tal como a cisteína precisam ser considerados. Elevados níveis de cisteína, por exemplo, podem conferir sub-componentes indesejáveis ao sabor do produto final. Portanto, aditivos que podem aumentar ou magnificar a eficácia de um composto de tiol livre, tais como a cisteína, são desejáveis porque tais aditivos podem permitir o mesmo nível de redução de acrilamida com uma menor concentração de um composto de tiol. Descobriu-se que quando um agente redutor é adicionado a um composto de tiol livre tal como a cisteína, a redução de acrilamida é aumentada. É sabido da química de oxi-

redução que os agentes redutores são compostos que funcionam como doadores de elétrons e que os agentes oxidantes funcionam como receptores de elétrons.

#### **XX. EFEITO DA CISTEÍNA + AGENTE REDUTOR SOBRE A DECOMPOSIÇÃO DA ACRILAMIDA**

5            Sistemas modelo simples podem ser usados para ensaiar a eficácia aumentada de compostos de tiol livre com a adição de um agente redutor. Uma solução de amostra de controle compreendendo um tiol livre (1,114 milimolar de cisteína) e acrilamida (0,0352 milimolar) foi preparada numa solução-tampão 0,5 molar de fosfato de sódio apresentando um pH de 7,0. A solução foi aquecida sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. A recuperação da acrilamida adicionada foi de 21%. Portanto, a proporção de redução de acrilamida para a amostra de controle sem qualquer agente redutor foi de 79%. Embora a proporção molar de cisteína para acrilamida tenha sido de mais de 30, nem toda a acrilamida reagiu com cisteína.

10            Um ensaio foi então efetuado com compostos de tiol livre e um agente redutor. Uma solução compreendendo 135 ppm de um composto de tiol livre (1,114 milimolar de cisteína), 2500 ppb de acrilamida (0,0352 milimolares) e cerca de 305 ppm de agente redutor (1,35 milimolar de diidrato de cloreto de estanho) foi preparada numa solução-tampão 0,5 molar de fosfato de sódio apresentando um pH de 7,0. Após aquecimento sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos, a recuperação de acrilamida adicionada foi medida como sendo de menos de 4%. Portanto, a proporção de redução de acrilamida com a amostra contendo um agente redutor foi de mais de 96%,  
15            17% adicionais sobre o tiol livre isoladamente, ou amostra de controle.

#### **XXI. EFEITO DA CISTEÍNA + AGENTE OXIDANTE SOBRE A DECOMPOSIÇÃO DA ACRILAMIDA**

20            Um ensaio foi então efetuado com a adição de um agente oxidante ao invés de um agente redutor. Uma solução de 135 ppm de um tiol livre (1,114 milimolar de cisteína), 2500 ppb de acrilamida (0,0352 milimolares) e 235 ppm de um agente oxidante (1,35 milimolares de ácido dehidroascórbico) foi preparada numa solução-tampão 0,5 molar de fosfato de sódio apresentando um pH de 7,0. Após aquecimento sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos, a recuperação de acrilamida adicionada foi medida como sendo de cerca de 27%. Portanto, a proporção de redução de acrilamida com a amostra contendo um agente oxidante foi de cerca de 73%, que é menos do que  
25            a redução obtida pela amostra de controle de cisteína. Assim sendo, a decomposição de acrilamida piorou com a adição do agente oxidante.  
30

Ensaio adicionais foram conduzidos com outros agentes oxidantes e redutores com uma solução de acrilamida apresentando cerca de 2500 ng/ml, ou 2500 ppb de acrilamida. Os resultados estão indicados na Tabela 27 abaixo.

Composto	Concentração (ug/ml)	Concentração milimolar	Recuperação de Acrilamida(ng/ml)	% Recuperação de Acrilamida
Amostra de Controle (Tiol livre Apenas)				
Cisteína	135	1,114	534	21%
Agente redutor + 135 ppm de Cisteína				
Ácido ascórbico (Vitamina C)		11,4		9%
Diidrato de cloreto de estanho	304,6	1,350	68	3%
Sulfito de sódio	170,2	1,350	69	3%
Sódio meta-bissulfito	256,6	1,350	24	1%
Agente oxidante + 135 ppm de Cisteína				
Ácido dehidroascórbico	235	1,350	673	27%
Monidrato de ácido gálico	253,9	1,350	1111	44%
Hidrato de catequina	391,9	1,350	877	35%
Epicatequina	391,9	1,350	827	33%
Hidrato de rutina	824,2	1,350	1306	52%

TABELA 27: Efeito de Agentes Oxidantes e Redutores com Cisteína Sobre a Acrilamida

5 A **Figura 13** ilustra graficamente o efeito teorizado da adição de um agente oxidante ou redutor sobre um agente redutor de acrilamida. Sem limitação por parte da teoria, acredita-se que os agentes redutores 1304 aumentam ou magnificam a eficácia de cisteína mantendo a cisteína na forma reduzida, tiol 1306. Conforme discutido acima, acredita-se que o tiol livre da cisteína reage com a ligação dupla de acrilamida. Um agente oxidante 1302, tal como o ácido dehidroascórbico, 10 provavelmente converte a cisteína tiol 1306 em um dissulfeto de cisteína inativo (cistina) 1308. Numa incorporação da presente invenção, utiliza-se o agente redutor apresentando um potencial de redução padrão ( $E^\circ$ ) de entre cerca de +0,2 e -2,0 volts.

## XXII. EFEITO MAJORADO DO TIOL COM UM AGENTE REDUTOR COM FLOCOS DE BATATA

15 Um ensaio foi levado a cabo para comparar a redução de acrilamida com um tiol livre

com e sem um agente redutor em presença de flocos de batata. Seis frascos foram preparados apresentando 3 gramas de flocos de batata misturados com 3 ml de água desionizada. Cisteína foi adicionada aos frascos em concentrações (ug de cisteína/g de flocos de batata) de 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm e 100 ppm. Caseína, uma potencial fonte de tióis livres, foi adicionada a um frasco no nível de 1%. Cada uma das seis amostras foi aquecida sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. As soluções foram então medidas quanto às concentrações de acrilamida. Os resultados estão ilustrados na Tabela 28 abaixo:

Amostra	Cisteína Adicionada (ppm)	Acrilamida (ppb)	Acrilamida como um % do Controle
Flocos de controle de batata	0	2695	100
Cisteína	800	2220	82
Cisteína	400	2179	81
Cisteína	200	2612	97
Cisteína	100	2832	105
Caseína (1%)		2808	104

TABELA 28: Efeito de Vários Níveis de Concentração Sobre a Redução de Acrilamida sem um Agente Redutor

Os dados novamente confirmam que na medida em que a concentração de cisteína aumenta, a proporção de redução de acrilamida também aumenta. O ensaio acima também indica que 1% de Caseína sem um agente redutor não reduz a acrilamida.

Conforme ilustrado na Tabela 27 acima, o sulfito de sódio (agente redutor) aumentou a eficácia da cisteína na redução do teor de acrilamida adicionada em 18% adicionais sobre o tiol livre, ou amostra de controle. Efetuou-se um ensaio para determinar o efeito de sulfito de sódio sobre a eficácia da cisteína e da caseína na redução dos níveis de acrilamida em flocos de batata. Cinco frascos foram preparados apresentando 3 gramas de flocos de batata misturados com 3 ml de água desionizada. Cisteína foi adicionada a dois frascos numa concentração de 400 ppm (ug de cisteína/g de flocos de batata). Caseína foi adicionada a um frasco no nível de 1%. Sulfito de sódio foi adicionado a 483 ppm (ug de dióxido sulfúrico por g de flocos de batata) ao frasco de caseína e um dos frascos de cisteína. Cada uma das amostras foi aquecida sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. As soluções foram então medidas para revelar as concentrações de acrilamida. Os resultados estão ilustrados na Tabela 29 abaixo:

Tiol	Agente redutor	Acrilamida (ppb)	Acrilamida como % de Controle
0 ppm de Cisteína	--	3567	100

(Controle)			
400 ppm de Cisteína	--	2500	70
--	483 ppm sulfito de sódio	3004	84
400 ppm de cisteína	483 ppm sulfito de sódio	2351	66
1 % de Caseína	483 ppm sulfito de sódio	2632	74

TABELA 29: Efeito de Vários Níveis de Concentração Sobre a Redução de Acrilamida de Flocos de Batata sem um Agente Redutor

A Tabela 28 indica que uma adição de 1% de Caseína falhou em reduzir os níveis de acrilamida em flocos de batata sem um agente redutor. A Tabela 29, no entanto, revela que a adição de um agente redutor (483 ppm de sulfito de sódio) resulta numa redução adicional de 10% da acrilamida em comparação com o sulfito de sódio apenas.

O tiol e o agente redutor foram menos eficazes na redução dos níveis de acrilamida nas amostras de flocos de batata (Tabelas 28 e 29) do que nas soluções de batata não em flocos. Existem diversas razões em potencial para explicar este fenômeno. Por exemplo, a acrilamida foi adicionada às amostras de batata não em flocos, mas teve que ser formada nas amostras de batata em flocos. Assim, a formação de acrilamida foi provavelmente mais importante do que a decomposição. Além disso, as condições não foram otimizadas para flocos de batata. O pH dos flocos de batata não foi ajustado para pH 7, o que aumentaria a reatividade da cisteína com a acrilamida.

Numa incorporação, o composto de tiol livre 1306 foi selecionado do grupo composto por cisteína, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-Cisteamina, glutathiona reduzida, ditiotreitól, caseína e combinações das mesmas. Numa determinada incorporação, o agente redutor 1304 foi selecionado do grupo composto por diidrato de cloreto de estanho, sulfito de sódio, sódio meta-bissulfito, ácido ascórbico, derivados do ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), derivados de sais de ácido ascórbico, ferro, zinco, íons ferrosos e combinações dos mesmos.

Uma vantagem da presente invenção é que a mesma redução de acrilamida pode ser alcançada por meio da utilização de menos tiol livre quando o composto de tiol livre está misturado com um agente redutor. Assim, sub-componentes de sabor indesejáveis podem ser reduzidas ou eliminadas. A redução de acrilamida pode ser alcançada utilizando-se um composto de tiol livre e um agente redutor em qualquer petisco alimentar a base de massa. Um outro benefício da presente invenção é o benefício nutricional inerente associado a alguns agentes redutores. O ácido ascórbico, por exemplo, também é conhecido como vitamina C.

### XXIII. EXEMPLOS ADICIONAIS DE USO DE ASPARAGINASE EM PETISCOS FABRICADOS

Os depositantes discutiram e revelaram anteriormente exemplos do uso da enzima asparaginase com alimentos fabricados como um agente redutor de acrilamida. A seguir apresentam-se exemplos adicionais de tal prática que ilustram a utilidade e flexibilidade desta abordagem.

5 Num primeiro exemplo, milho é cozido até alcançar um nível de umidade de 45%. O milho é moído com a adição de água e, exceto para as amostras de controle, da enzima asparaginase, com o objetivo de trazer o nível de água para 50%. Formou-se uma massa para cada ensaio executado sob as condições detalhadas na coluna “Descrição” abaixo na Tabela 30. Depois disso a massa foi preparada seguindo as condições listadas na coluna “Descrição”, algumas amostras foram retiradas e deixadas consolidar durante 3, 6, ou 9 minutos antes de serem extintas com uma solução de álcool. Esta solução de álcool desativa a enzima asparaginase, estimulando assim um tempo de intervalo para a enzima na massa após a mistura. O tempo de intervalo simulado para cada ensaio executado está refletido na coluna “Tempo de consolidação” da Tabela 30. Depois de extinta, cada amostra é então ensaiada para determinar o nível de asparagina, e os resultados destes ensaios se encontram refletidos na Tabela 30. Depois de executados os ensaios, a massa foi moldada no formato de um petisco, o petisco foi frito até atingir um nível de umidade de 1,1% e o nível de acrilamida presente em cada petisco foi medido. Determinou-se que o nível de acrilamida detectado após a fritura até este nível de umidade corresponde linearmente à quantidade de asparagina medida após cada ensaio conforme anteriormente descrito. A Tabela 30 abaixo apresenta o protocolo para cada ensaio e os resultados.

Ensaio	Tempo de consolidação (mins)	Descrição	Asparagina n-Mole
1		Controle	5,16
2	3	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e temperatura ambiente.	3,65
3	6	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e temperatura ambiente.	2,69
4	9	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e temperatura ambiente.	1,31
5	3	120 unidades de	2.99

		asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e 60 °F.	
6	6	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e 60 °F.	1,65
7	9	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e 60 °F.	0,83
8	3	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e 100 °F.	5,32
9	6	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e 100 °F.	4,88
10	9	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 8,5 e 100 °F.	4,79
11	3	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 6 e temperatura ambiente.	2,61
12	6	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 6 e temperatura ambiente.	0,87
13	9	120 unidades de asparaginase/kg de massa adicionadas a água num pH 6 e temperatura ambiente.	0,46

TABELA 30: Massa de Milho com Asparaginase

A Tabela 30 ilustra os efeitos do pH e da temperatura sobre a eficácia da adição de asparaginase à massa de milho. Conforme ilustrado pela comparação dos Ensaio 11-13 com os Ensaio 2-4, a redução de asparagina é maior num pH de 6 do que num pH de 8,5. Além disso, embora a asparaginase fosse eficaz sob temperaturas mais baixas tais como 60 °F na redução dos níveis de asparagina quando comparada com o controle conforme demonstrado pelos Ensaio 5-7, a redução da asparagina foi mais eficaz em temperaturas mais elevadas, tais como a temperatura ambiente conforme demonstrado pelos Ensaio 2-4. Conforme indicado comparando-se os Ensaio

8-10 com os Ensaios 2-4, a elevação da temperatura para 100 °F enquanto o pH é de 8,5 não aparenta aumentar a redução de asparagina.

Um exemplo similar é ilustrado pela Tabela 31 apresentada abaixo. Inicialmente, milho foi cozido até um nível de umidade de 45%. Este milho foi então moído durante 1 minuto, e durante este tempo a enzima asparaginase foi adicionada numa solução aquosa através de uma bomba de adição de enzima operada em várias frequências. Tal como no ensaio anterior, a massa resultante é extinta em amostras tomadas a 3, 6, e 9 minutos. O nível de asparagina encontrado nas referidas amostras foi então medido. Conforme ilustrado comparando-se os Ensaios 5-7 com os Ensaios 2-4, o impacto da apresentação de uma temperatura elevada pode não ser muito substancial para tempos de permanência baixos conforme indicado pela comparação entre os Ensaios 5 e 2. No entanto, nos tempos de permanência de 6 e 9 minutos, o impacto da apresentação de uma temperatura elevada aumenta a redução da asparagina na massa de milho. Além disso, conforme demonstrado pelos Ensaios 8-16, a operação da bomba de enzima em diversas frequências pode resultar num impacto sobre a redução da asparagina.

Ensaio	Tempo de consolidação (mins)	Descrição	Asparagina n-Mole
1		Controle 38	5,29
2	3	Moagem água a 60 °F, pH 6, 1980 unidades de asparaginase/kg de massa	3,31
3	6	Moagem água a 60 °F, pH 6, 1980 unidades de asparaginase/kg de massa	1,49
4	9	Moagem água a 60 °F, pH 6, 1980 unidades de asparaginase/kg de massa	0,71
5	3	Moagem água a 100 °F, pH 6, 1980 unidades de asparaginase/kg de massa	3,54
6	6	Moagem água a 100 °F, pH 6, 1980 unidades de asparaginase/kg de massa	1,03
7	9	Moagem água a 100 °F, pH 6, 1980 unidades de asparaginase/kg de massa	0,30
8	3	Moagem bomba de enzima 10Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	4,50
9	6	Moagem bomba de enzima	3,40

		10Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	
10	9	Moagem bomba de enzima 10Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	3,30
11	3	Moagem bomba de enzima 30Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	3,11
12	6	Moagem bomba de enzima 30Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	1,29
13	9	Moagem bomba de enzima 30Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	0,73
14	3	Moagem bomba de enzima 60Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	4,08
15	6	Moagem bomba de enzima 60Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	2,01
16	9	Moagem bomba de enzima 60Hz, 1320 unidades de asparaginase/kg de massa	0,81

TABELA 31: Massa de Milho com Asparaginase

Um exemplo similar com um petisco de milho está ilustrado na Tabela 32 apresentada abaixo. Neste ensaio, milho cru é cozido até um nível de umidade de 53%. Aproximadamente 30 lbs (13,61 kg) de milho são então espalhadas numa bandeja e borrifadas com uma solução de água contendo a enzima asparaginase. Este milho borrifado é deixado em repouso por 5 ou 15 minutos (“tempo de repouso”) e então moído durante um minuto. Amostras desta massa são então tomadas e extintas a 3, 6, e 9 minutos conforme descrito anteriormente. O nível de asparagina é então medido para cada amostra.

Ensaio	Descrição	Asparagina n-Mole
1	Controle	5,54
2	15,900 unidades de asparaginase, 5 min de tempo de repouso, 3 min de tempo de extinção	0,68
3	15,900 unidades de asparaginase, 5 min de tempo de repouso, 6 min de tempo de extinção	0,37
4	15,900 unidades de asparaginase, 5 min de tempo de repouso, 9 min de tempo de	0,41

	extinção	
5	15,900 unidades de asparaginase, 15 min de tempo de repouso, 3 min de tempo de extinção	0,45
6	15,900 unidades de asparaginase, 15 min de tempo de repouso, 6 min de tempo de extinção	0,35
7	15,900 unidades de asparaginase, 15 min de tempo de repouso, 9 min de tempo de extinção	0,30
8	80,000 unidades de asparaginase, 5 min de tempo de repouso, 3 min de tempo de extinção	0,36
9	80,000 unidades de asparaginase, 5 min de tempo de repouso, 6 min de tempo de extinção	0,21
10	80,000 unidades de asparaginase, 5 min de tempo de repouso, 9 min de tempo de extinção	0,23
11	80,000 unidades de asparaginase, 15 min de tempo de repouso, 3 min de tempo de extinção	0,53
12	80,000 unidades de asparaginase, 15 min de tempo de repouso, 6 min de tempo de extinção	0,31
13	80,000 unidades de asparaginase, 15 min de tempo de repouso, 9 min de tempo de extinção	0,22

TABELA 32: Massa de Milho com Asparaginase

Os ensaios ilustrados pelas Tabelas 30, 31 e 32 demonstram revelação adicional por parte dos depositantes de que a asparaginase pode ser usada de maneira eficaz em alimentos fabricados através da adição durante a moagem ou moldagem da massa, ou ainda de forma alternativa através do tratamento dos ingredientes alimentícios crus antes da moagem ou moldagem da massa.

#### XXIV. COMBINAÇÕES DE ASPARAGINASE E OUTROS AGENTES REDUTORES DE ACRILAMIDA

Além da utilização da asparaginase como o único meio para reduzir o teor de acrilamida num alimento processado termicamente, a asparaginase também pode ser combinada com outros compostos, tais como cátions bivalentes e trivalentes e diversos aminoácidos, com o intuito de reduzir o teor de acrilamida no produto final. Um exemplo desta abordagem envolve o uso de um

banho de limão compreendendo hidróxido de cálcio (cátion bivalente) de uma fatia de batata combinado com um tratamento da fatia de batata com uma solução de asparaginase .

Neste exemplo, para cada ensaio executado, primeiramente 600 gramas de batatas foram descascadas e fatiadas numa espessura de 0,053 polegadas (1,35 cm). Estas fatias de batata foram então embebidas em 17 litros de água de acordo com os parâmetros de cada ensaio individual. Depois da etapa de banho, as fatias molhadas foram recolhidas e secadas em guardanapos e então ensaiadas para revelar o nível de asparagina. No primeiro ensaio, as fatias foram embebidas durante dois minutos sob uma temperatura de 120 °F. No segundo ensaio, as fatias foram embebidas durante dois minutos sob uma temperatura de 120 °F em presença de 1.000 unidades de enzima asparaginase. No terceiro ensaio, as fatias foram embebidas durante dois minutos sob uma temperatura de 120 °F em uma solução de limão num pH de 9. Num quarto ensaio, as fatias foram embebidas durante dois minutos sob uma temperatura de 120 °F em uma solução de limão num pH de 9 em presença de 100.000 unidades de enzima asparaginase. Os resultados destes ensaios estão indicados na Tabela 33 apresentada abaixo.

Ensaio	Descrição	n-Mole Asparagina
1	Banho em Água	681
2	Água c/Banho de Asparaginase	480
3	Água com Banho de Limão	146
4	Água com Banho de Limão e Asparaginase	106

TABELA 33: Efeito da Combinação de Agentes Redutores Sobre as Fatias de Batata

Conforme pode ser visto a partir da Tabela 33, o uso de asparaginase ou de um banho de limão apenas reduz a quantidade de asparagina encontrada nas fatias de batata e, conseqüentemente, a produção de acrilamida resultante. No entanto, a combinação do uso tanto da asparaginase quanto do limão no banho revelou ser ainda mais eficaz a este respeito. Assim, o limão pode ser usado para hidrolisar a parede celular das fatias de batata e enfraquecer a mesma suficientemente para que uma enzima tal como a asparaginase reaja com a asparagina livre ou para que o limão forme um composto complexo com a asparagina. O teor de asparagina remanescente para a produção de acrilamida pode ser reduzido em ambas as situações. Dados adicionais oriundos de ensaios utilizando limão são apresentados na Tabela 38 abaixo.

Também observou-se um bom efeito de redução do teor de acrilamida em alimentos processados termicamente utilizando a combinação sais de sódio, tais como fosfato de sódio e cloreto de sódio, com o aminoácido Lisina. Deve também ser observado que usar e seguir qualquer

uma das abordagens reveladas individualmente para redução da acrilamida pode resultar em resultados melhorados. Por exemplo, é possível tratar um ingrediente alimentício com um aminoácido seguido por tratamento com asparaginase, ou vice versa, além de utilizar ambos os agentes em combinação durante uma etapa. De forma similar, um ingrediente alimentício pode ser tratado com um cátion multivalente antes, depois ou em conjunto com o tratamento com asparaginase. Conseqüentemente, a formação de acrilamida pode ser reduzida em um alimento processado termicamente através do uso de asparaginase em combinação com pelo menos um outro agente redutor de acrilamida. O referido outro agente redutor de acrilamida pode ser selecionado do grupo composto por aminoácidos livres, cátions apresentando uma valência de pelo menos 2, ácidos de padrão alimentício, bases de padrão alimentício e um composto de tiol livre em combinação com um agente redutor. Tais agentes redutores de acrilamida podem ser mais especificamente aqueles agentes anteriormente revelados no presente documento. Por exemplo, o aminoácido a ser usado pode ser escolhido do grupo composto por cisteína, lisina, glicina, histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina, arginina e misturas dos mesmos. Conseqüentemente, por meio de referência aos grupos de diversos agentes redutores de acrilamida, os depositantes pretendem incorporar nesta nova abordagem todos os compostos individuais anteriormente revelados como sendo parte daqueles grupos, sendo que qualquer um deles pode ser usado em combinação com asparaginase com o intuito de reduzir a formação de acrilamida em alimentos processados termicamente.

## **XXV. EFEITO DO PH**

O exemplo acima utilizando um banho de limão com uma fatia de batata demonstra também o efeito potencial do pH sobre a formação de acrilamida. Estabeleceu-se o fato de que a exposição de um produto alimentício a uma solução com pH alto ou baixo pode resultar na redução da quantidade de formação de acrilamida. Além dos exemplos acima encontrados na Tabela 30 e na Tabela 33, neste exemplo, a redução de acrilamida por meio de um banho de ácido acético fica demonstrada. Num primeiro ensaio, 400 gramas de batatas foram descascadas e fatiadas com uma espessura de 0,053 polegadas (1,35 cm). Estas fatias foram então fritas até que se alcançasse um nível de umidade de 1,1% em massa e analisadas quanto ao teor de acrilamida. Num segundo ensaio, 800 gramas de batatas foram fatiadas de maneira similar e então banhadas em 4,9 litros de água e 75 mililitros de ácido acético glacial em temperatura ambiente durante 60 minutos. Estas fatias foram então removidas, secadas e fritas tal e qual no primeiro ensaio. Um segundo ensaio envolveu o

banho de 800 gramas de fatias de batata em 4,85 litros de água e 150 mililitros de ácido acético glacial em temperatura ambiente durante 60 minutos. Depois disso, as fatias foram novamente removidas, secadas e fritas, sendo então analisadas quanto à formação de acrilamida. Num quarto ensaio, 800 gramas de batatas fatiadas foram banhadas em 4,9 litros de água e 75 mililitros de ácido acético glacial sob uma temperatura de 120 °F durante 15 minutos. Depois disso, as fatias foram removidas, secadas, fritas e analisadas. Finalmente, em um quinto ensaio, 800 gramas de fatias de batata foram banhadas em 4,85 litros de água e 150 mililitros de ácido acético glacial sob uma temperatura de 120 °F durante 60 minutos. Novamente, as fatias foram removidas, secadas, fritas e analisadas. Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 34 abaixo.

Ensaio	Descrição	ASN Mole
1	Controle	203,9
2	4,9 litros de água, 75 ml de ácido acético, 60 min.	179,0
3	4,85 litros de água, 150 ml de ácido acético, 60 min.	120,2
4	4,9 litros de água, 75 ml de ácido acético, 120 °F, 15 min.	96,0
5	4,85 litros de água, 150 ml de ácido acético, 120 °F, 60 min.	62,3

TABELA 34: Efeito do Ácido Acético e da Asparaginase

Os ensaios 2 e 3 na Tabela 34 demonstram que uma quantidade maior de ácido acético resulta numa maior redução da asparagina com todos os demais fatores iguais, mesmo sob temperaturas ambientes. Assim, enquanto a Tabela 30 demonstra que um pH reduzido pode resultar em um nível reduzido de asparagina em produtos alimentícios fabricados, a Tabela 34 demonstra que o banho de fatias de batata numa solução ácida com um pH reduzido pode reduzir significativamente o nível de asparagina, mesmo sem a adição de asparaginase. Além disso, a comparação dos Ensaios 3 e 5 revela que uma temperatura elevada na presença de um ácido pode reduzir significativamente a redução da asparagina em fatias de batata. Além disso, a comparação entre os ensaios 2 e 4 revela que uma temperatura elevada pode resultar numa maior redução de asparagina, mesmo com um tempo de permanência reduzido.

Exemplos tais como aqueles ilustrados na Tabela 33 e na Tabela 34 acima demonstram que a variação do pH para longe do neutro pode afetar a quantidade de acrilamida produzida em um produto que seja exposto a uma solução ácida ou básica antes do processamento. Observou-se um fato similar quando se mediu a formação de acrilamida ao combinar asparagina e glicose em uma

solução-tampão de fosfato de sódio aquecida sob uma temperatura de 150 °C. Quanto mais baixo o pH da solução-tampão de fosfato de sódio, menor a quantidade de acrilamida produzida, particularmente quando o pH é igual ou menor que 5. resultados similares foram observados quanto ao efeito do pH sobre a formação de acrilamida em flocos de batata quando da adição de cloreto de cálcio, ácido fosfórico ou ácido cítrico para reduzir o pH da amostra.

A **Figura 14** ilustra graficamente o efeito sobre os níveis de acrilamida de cátions polivalentes que reduzem o pH. Soluções salinas (3 ml) foram adicionadas a 3 g de flocos de batata em um frasco de vidro. A quantidade de cloreto de cálcio era de 0,0375 g a 3 g de flocos de batata (1,25%). As concentrações dos sais de cálcio e cloreto de magnésio foram ajustadas tal que os mesmos moles de cátion bivalente fossem adicionados aos flocos de batata. Para o cloreto de sódio, os moles de sódio foram dobrados. O pH 1404 das pastas de flocos de batata foram medidos antes que os frascos de vidro fossem fechados e aquecidos sob uma temperatura de 120 °C durante 40 minutos. Mediu-se o teor de Acrilamida 1402 após o aquecimento utilizando GC-MS. A amostra de controle foi de 3 g de flocos de batata com 3 ml de água desionizada.

Conforme ilustrado pela **Figura 14**, cátions polivalentes que reduzem o pH 1404 de uma solução são particularmente eficazes na redução da acrilamida 1402. O efeito dos cátions polivalentes sobre o pH de uma solução está relacionado à solubilidade do par cátion/ânion na solução à qual o par é adicionado. Por exemplo, a **Figura 15** ilustra graficamente o efeito sobre o pH de cloreto de cálcio ou cloreto de sódio sobre uma solução-tampão 0,5 M de fosfato e uma solução-tampão 0,5 M de acetato. Como as formas alcalinas de fosfato de cálcio não são solúveis, a solução se torna mais ácida, conforme indicado pela linha 1502 que reapresenta a redução do pH na medida em que a concentração molar de cloreto de cálcio aumenta. De maneira similar, quando se adicionou cloreto de cálcio à solução-tampão de acetato, a redução no pH foi menor conforme indicado pela linha 1504 porque o acetato de cálcio é solúvel. Quando se adicionou cloreto de sódio à solução-tampão de acetato conforme indicado pela linha 1506 ou à solução-tampão de fosfato conforme indicado pela linha 1508, houve apenas uma pequena redução do pH porque tanto o acetato de sódio quanto o fosfato de sódio são solúveis.

Além disso, a porção ânion do sal de cátion polivalente também é um fator que pode afetar o pH. Ânions fortemente dissociados tais como cloreto apresentam um efeito menor sobre o pH do que ânions pouco dissociados tais como acetato, o qual pode tornar o pH mais alcalino deslocando o equilíbrio da reação abaixo para a direita.



Fazendo novamente referência à **Figura 14**, a Tabela 35 apresentada abaixo mostra o valor pKa do ânion do sal.

Sal Polivalente	Ácido de ânion resultante	pKa do ácido de ânion
Cloreto de cálcio	HCl	0,00
Cloreto de magnésio	HCl	0,00
Gluconato de cálcio	Glucônico	3,60
Acetato de cálcio	Ácido acético	4,76
Citrato de cálcio	Ácido cítrico	6,39

Tabela 35: pKa de Ácidos de Ânion Ilustrados na **Figura 14**.

5 Com base nos dados para sais de cálcio apresentados na **Figura 14** e na Tabela 35 acima, parece que valores maiores de pKa para o ácido de ânion tornam a solução mais alcalina e contrabalançam o efeito do cálcio na redução do pH. Os sais que reduziram o teor de acrilamida de maneira mais significativa, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e gluconato de cálcio apresentavam ânions com valores de pKa inferiores a 4. A adição de citrato de cálcio, com um valor de pKa de ânion de 6,39 resultou em um nível de acrilamida que era mais alto do que o nível em flocos de batata que ocorreu sem sais adicionados, por exemplo, o nível revelado na amostra “água”.  
 10 Conseqüentemente, numa incorporação da presente invenção, um sal redutor de pH é usado para reduzir a acrilamida. Numa determinada incorporação, o sal redutor de pH compreende um pKa de menos de cerca de 6,0. tais sais incluem, embora não estejam limitados a estes, cloreto de cálcio, lactato de cálcio, maleato de cálcio, gluconato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, acetato de cálcio, lactobionato de cálcio, propionato de cálcio, estearol lactato de cálcio, cloreto de magnésio, citrato de magnésio, lactato de magnésio, maleato de magnésio, gluconato de magnésio, fosfato de magnésio, sulfato de magnésio, hexaidrato de cloreto de alumínio, cloreto de alumínio, alume de amônia, alume de potássio, alume de sódio, sulfato de alumínio, cloreto férrico, gluconato ferroso, fumarato férrico, lactato ferroso, sulfato ferroso, cloreto de cobre, gluconato de cobre, sulfato de cobre, gluconato de zinco e sulfato de zinco.

Sal	pKas eficazes
Cloreto de cálcio	0,00
Fosfato de cálcio, monobásico	2,16
Lactato de cálcio	3,08
Estearol lactato de cálcio	3,08
Gluconato de cálcio	3,60
Lactobionato de cálcio	3,60
Acetato de cálcio	4,76

Propionato de cálcio	4,86
Maleato de cálcio	5,11
Cloreto de magnésio	0,00
Sulfato de magnésio	1,98
Cloreto de magnésio	0,00
Sulfato de magnésio	1,98
Fosfato de magnésio, monobásico	2,16
Lactato de magnésio	3,08
Citrato de magnésio	3,14
Maleato de magnésio	3,40
Gluconato de magnésio	3,60
Hexaidrato de cloreto de alumínio	0,00
Cloreto de alumínio	0,00
Alume de amônia	1,98
Alume de potássio	1,98
Alume de sódio	1,98
Sulfato de alumínio	1,98
Gluconato ferroso	3,60
Fumarato férrico	4,44
Cloreto de cobre	0,00
Sulfato de cobre	1,98
Gluconato de cobre	3,60
Sulfato de zinco	1,98
Gluconato de zinco	3,60

TABELA 36. pKas Eficazes de Sais de Cátion Polivalente.

Diferentes alimentos requerem diferentes níveis de pH em diferentes pontos do processo de fabricação de tais alimentos com o objetivo de dar aos alimentos as suas características exclusivas. Por exemplo, roscas moles geralmente requerem um banho cáustico com o objetivo de alcançar um sabor similar ao de uma rosca mole. Conseqüentemente, aqueles versados na técnica precisarão usar os vários niveladores de pH dentro das necessidades para cada um dos alimentos a ser tratados. Conseqüentemente, o uso de ácidos de padrão alimentício e bases de padrão alimentício, tal como estes termos são conhecidos no estado da técnica, constitui uma ferramenta para a redução da acrilamida.

#### 10                    **XXIV. COMBINAÇÕES DE AGENTES REDUTORES DE ACRILAMIDA E RUPTURA CELULAR**

A enzima asparaginase reage com a asparagina e portanto pode ser utilizada para remover seletivamente a asparagina das batatas. Um dos desafios é acessar a asparagina localizada dentro da parede celular da batata sem destruir a integridade estrutural do tubérculo.

15                    Conseqüentemente, muitas incorporações da presente invenção estão direcionadas para o

enfraquecimento da parede celular de um alimento de base vegetal compreendendo asparagina. A parede celular pode ser enfraquecida, de acordo com várias incorporações da presente invenção, através de um ou mais mecanismos para o enfraquecimento celular. Conforme empregado no presente documento, um “mecanismo para o enfraquecimento celular” está definido como qualquer mecanismo físico ou químico que resulta em paredes celulares enfraquecidas ou penetradas e assim aumenta a capacidade de um agente redutor de asparagina ou de acrilamida para penetrar a parede celular podendo ser usado de tal maneira que, por exemplo, a enzima asparaginase possa penetrar as fatias, reduzir o teor de asparagina e conduzir à redução da quantidade de acrilamida num produto alimentício processado termicamente. O enfraquecimento da parede celular facilita a penetração de asparaginase na célula tal que a asparaginase pode inativar a asparagina, um precursor conhecido de acrilamida. Numa determinada incorporação, o enfraquecimento da parede celular ocorre numa temperatura elevada de entre cerca de 100 °F e cerca de 212 °F.

Temperaturas na porção mais elevada da faixa acima podem ser usadas para enfraquecer as paredes celulares em massas usadas para fazer alimentos fabricados. Temperaturas na porção inferior da faixa acima, por exemplo, de cerca de 100 °F até cerca de 150 °F e mais preferencialmente 100 °F até cerca de 120 °F podem ser usadas para enfraquecer as paredes celulares de um alimento integral ou não fabricado tais como uma batata fatiada.

Uma maneira de enfraquecer ou penetrar a parede celular é tratar as fatias de batata com o poder da energia ultra-sônica para enfraquecer a parede celular e ajudar a permitir que a enzima penetre o interior da parede celular. Numa determinada incorporação, a energia ultra-sônica é aplicada durante pelo menos 30 segundos. Numa determinada incorporação, a energia ultra-sônica é aplicada durante entre cerca de 30 segundos e cerca de 60 minutos. Naturalmente, estas faixas são indicadas com finalidade ilustrativa e não limitativa. Quaisquer quantidades sinergicamente eficazes de energia ultra-sônica podem ser aplicadas ao produto alimentício.

Quantidades sinergicamente eficazes são quantidades que alternativamente (a) alcançam um maior percentual de redução de acrilamida ou asparagina do que aquele alcançado em um produto alimentício utilizando qualquer tipo de agente redutor de acrilamida isolado; ou (b) reduzem a concentração de acrilamida ou a concentração de asparagina numa quantidade comparável à de um agente redutor de acrilamida ou agente redutor de asparagina isolados, com menos efeitos colaterais sobre as características (tais como cloração, sabor e textura) do produto final resultante da adição de um agente redutor de acrilamida ou um agente redutor de asparagina no processo de fabricação.

Diversos ensaios foram efetuados para avaliar a relação entre a redução do teor de asparagina em fatias de batata tratadas com energia ultra-sônica sob diversas condições de operação da unidade. Em cada ensaio ultra-sônico 600 gramas de batatas foram descascados e fatiados com uma espessura de cerca de 0,053 polegadas (1,35 cm) e embebidos durante cerca de 40 minutos em cerca de 17 litros de água mantida sob uma temperatura de cerca de 120 °F sob quatro diferentes condições de ensaio. Três fatias de batata provenientes de cada ensaio foram analisadas quanto ao teor de asparagina e, para cada ensaio, a média foi calculada.

Uma amostra de controle, Ensaio 1, consistiu da colocação de cerca de 600 gramas de batatas descascadas fatiadas com cerca de 0,053 polegadas (1,35 cm) em água sob uma temperatura de cerca de 78 °F durante cerca de 2 minutos. Três fatias foram ensaiadas quanto ao teor de asparagina e revelaram uma concentração média de asparagina de cerca de 1.96% em massa. Exceto quando indicado de forma diferente, todas as unidades correspondentes à concentração de asparagina são dadas em percentagem em massa. No Ensaio 2, fatias de batata foram embebidas em água sob uma temperatura de cerca de 120 °F durante cerca de 40 minutos e revelaram uma concentração de asparagina de cerca de 0,77% em massa, uma redução de cerca de 61% comparada ao controle. O Ensaio 3 repetiu o Ensaio 2 e incluiu cerca de 100,000 unidades de asparaginase na água e revelou uma concentração de asparagina de cerca de 0,44% em massa, uma redução de cerca de 78% comparada ao controle. O Ensaio 4 repetiu o Ensaio 3 com energia ultra-sônica em um banho ultra-sônico (obtido comercialmente de Branson Ultrasonics Corp de Danbury, Connecticut) a cerca de 68 kHz aplicado à fatias de batata e revelou uma concentração de asparagina de cerca de 0,10% em massa, uma redução de cerca de 95% do teor de asparagina. O Ensaio 5 repetiu o Ensaio 4 exceto pelo fato de que a energia ultra-sônica foi aplicada às fatias com frequência de cerca de 170 kHz ao invés de cerca de 68 kHz e revelou uma concentração média de asparagina de cerca de 0,11% em massa, uma redução de cerca de 94% do teor de asparagina. Os resultados de ensaio se encontram resumidos na Tabela 36 abaixo.

Ensaio	Tempo no Banho	Solução	Energia Ultra-sônica	% em Massa de Asparagina	Redução
1	2 minutos	água a 78 °F	--	1,96	0%
2	40 minutos	água a 120 °F	--	0,77	61%
3	40 minutos	100,000 unidades de asparaginase a 120 °F	--	0,44	78%
4	40 minutos	100,000 unidades	68 kHz	0,10	95%

		de asparaginase a 120 °F			
5	40 minutos	100,000 unidades de asparaginase a 120 °F	170 kHz	0,11	94%

TABELA 36. SONICAÇÃO DE ANÁLISE COMPARATIVA DE FATIAS DE BATATA EM SOLUÇÃO DE ENZIMA

Os dados na Tabela 36 claramente suportam a teoria de que a aplicação de energia ultrassônica a uma fatia de batata pode reduzir ainda mais a concentração de asparagina. O Ensaio 4 apresentava uma redução de asparagina 22% maior  $([78\%-95\%]/78\%)$  do que o Ensaio 3. Conforme exemplificado pelo Ensaio 2, o banho em água numa temperatura elevada também pode tornar a parede celular mais porosa.

Quanto aos mecanismos físicos, numa incorporação, a parede celular é enfraquecida através da aplicação de um vácuo sobre as fatias. Numa determinada incorporação, as fatias são tratadas com limão e então embebidas numa solução de enzima à vácuo. Sem limitar-se à teoria, acredita-se que a parede celular se expande quando um vácuo é aliviado e neste ponto a enzima pode penetrar a parede celular. O tratamento prévio com limão ou outras intervenções tais como sonicação podem enfraquecer as fatias e sob a ação do vácuo estas fatias tratadas podem enfraquecer ainda mais facilmente.

Numa incorporação, utiliza-se um diferencial de pressão para forçar um agente redutor de acrilamida tal como asparaginase para dentro das batatas. Conforme empregado no presente documento, um diferencial de pressão é definido como uma pressão diferente da pressão atmosférica e o diferencial de pressão pode conferir uma pressão positiva ou uma pressão negativa (vácuo). Por exemplo, as batatas podem ser expostas a um vácuo de 20 a 30 psig em presença de uma solução de asparaginase ou outro agente redutor de acrilamida. Níveis mais elevados aplicação de vácuo incluindo um vácuo puro podem fazer com que as paredes celulares estourem. Sem ficar restrito à teoria, acredita-se que níveis mais reduzidos de aplicação de vácuo podem não expandir suficientemente os espaços intersticiais dentro das células de batata para permitir que um agente redutor de acrilamida penetre na fatia de batata.

Numa incorporação, o diferencial de pressão compreende um diferencial pulsado ou ciclo de pressão positiva ou pressão negativa para criar e aliviar um vácuo um certo número de vezes tal que a parede celular fique sujeita a expansões e contrações múltiplas para enfraquecer ou perfurar

a superfície da célula melhorando assim as chances de penetração da enzima na parede celular. Numa determinada incorporação, o diferencial de pressão é aplicado por pelo menos dois ciclos.

Diversos ensaios foram conduzidos para avaliar a relação entre a redução de asparagina em fatias de batata tratadas com um vácuo sob diversas condições de operação da unidade. Em cada ensaio, 420 gramas de batatas foram descascadas e fatiadas numa espessura de 0,053 polegadas (1,35 cm). Exceto quando indicado, quatro fatias de batata provenientes de cada ensaio foram analisadas quanto ao teor de asparagina e a média para cada ensaio foi apresentada. Cada ensaio utilizou cerca de 210 gramas de fatias de batata e cerca de 7 litros de água. Os ensaios ocorreram em duas temperaturas de água, uma temperatura ambiente de cerca de 75 °F e uma temperatura elevada de cerca de 120 °F. Os tempos de banho foram variados assim como foi variada a adição de asparaginase à solução. Além disso, algumas amostras foram colocadas em uma unidade de infusão à vácuo e mantidas a -20 psi. Uma unidade de infusão à vácuo que pode ser usada é um tambor de vácuo modelo VTS-42 disponibilizado comercialmente por Biro Manufacturing Company de Marblehead, OH. As condições de ensaio e os resultados se encontram resumidos na Tabela abaixo.

Ensaio	Tempo de Banho (min)	Temperatura de Banho (F)	20 psi Vac	7,000 Unidades de Enzima	ASN (mol)	Redução
					média	%
1	6	120			704	--
2	6	120			530	25
3	6	120	x		509	28
4	6	120	x	x	572	19
5	3 x 2	120	x		545	23
6	3 x 2	120	x	x	439	38
7	6	Ambiente			449	36
8	6	Ambiente	x		153	78
9	6	Ambiente	x	x	168	76
10	3 x 2	Ambiente	x		131	81
11	3 x 2	Ambiente	x	x	175	75
12	12	Ambiente			138	80
13	12	Ambiente	x		233	67
14	12	Ambiente	x	x	133	81
15	6 x 2	Ambiente	x		107	85
16	6 x 2	Ambiente	x	x	71	90

15 \*Número médio para três ensaios.

TABELA 37. Efeito de para Avaliar o Impacto do Vácuo / Pulso de Vácuo Sobre as Fatias de Batata

No Ensaio 1, as fatias de batata foram embebidas durante seis minutos sob uma temperatura de 120 °F. No Ensaio 2, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em 14 litros de água apresentando 7000 unidades de enzima. No Ensaio 3, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi na unidade de infusão de vácuo. No Ensaio 4, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos em 14 litros de água sob uma temperatura de 120 °F com 7000 unidades de enzima sob 20 psi de vácuo na unidade de infusão de vácuo. No Ensaio 5, as fatias de batata foram embebidas durante três intervalos separados de dois minutos em 14 litros de água sob uma temperatura de 120 °F sob 20 psi de vácuo. No intervalo entre cada dois intervalos sucessivos de dois minutos, o vácuo foi aliviado e reaplicado. No Ensaio 6, as fatias de batata foram embebidas durante 3 intervalos de dois minutos em 14 litros de água sob uma temperatura de 120 °F com 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. Novamente, entre cada dois intervalos sucessivos, o vácuo foi aliviado e reaplicado. No Ensaio 7, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente. No Ensaio 8, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 9, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos em 14 litros de água sob temperatura ambiente com 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 10, as fatias de batata foram embebidas por 3 intervalos de dois minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi. Novamente, entre cada dois intervalos sucessivos, o vácuo foi aliviado e reaplicado. No Ensaio 11, as fatias de batata foram embebidas por três intervalos de dois minutos em 14 litros de água sob temperatura ambiente com 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. Entre cada dois intervalos sucessivos o vácuo foi aliviado e reaplicado. No Ensaio 12, as fatias de batata foram embebidas durante 12 minutos sob temperatura ambiente. No Ensaio 13, as fatias de batata foram embebidas durante 12 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 14, as fatias de batata foram embebidas durante 12 minutos em 14 litros de água sob temperatura ambiente com 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 15, as fatias de batata foram embebidas por seis intervalos de dois minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi. Entre cada dois intervalos sucessivos o vácuo foi aliviado e reaplicado. No Ensaio 16, as fatias de batata foram embebidas por seis intervalos de dois minutos em 14 litros de água sob temperatura ambiente com 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. Novamente, entre cada dois intervalos sucessivos o vácuo foi aliviado e reaplicado.

Os dados presentes na Tabela 37 claramente suportam a teoria de que a aplicação de um vácuo a uma fatia de batata pode reduzir ainda mais a concentração de asparagina. Por exemplo, o Ensaio 3, que utilizou vácuo, apresentou uma redução de asparagina 12% maior  $([25\%-28\%]/25\%)$  do que o Ensaio 2. De maneira similar, o Ensaio 8 apresentou uma redução mais de 100% maior de asparagina do que o Ensaio 7. Este resultado pode ser exagerado devido a diferenças nos níveis originais de asparagina entre as amostras usadas no ensaio. As batatas usadas para o Ensaio 13, que apresentavam um nível de asparagina mais elevado do que as do Ensaio 12 muito embora o Ensaio 13 tivesse utilizado um vácuo, mais provavelmente apresentavam um nível original de asparagina muito mais elevado do que as batatas usadas no Ensaio 12.

Além disso, conforme indicado pelo Ensaio 6, quando o vácuo é aplicado de uma maneira pulsada, ou quando o vácuo é aliviado, reaplicado e aliviado por três vezes, a redução da asparagina aumenta muito para 38% a partir dos 19% no Ensaio 4 quando a enzima é utilizada na solução. Além disso, ao comparar-se o Ensaio 16 com o Ensaio 14 o uso de um vácuo pulsado resultou em uma redução mais de 10% maior do teor de asparagina  $([81\%-90\%]/81\%)$  e assim fica claro que um vácuo pode ser usado de uma maneira pulsada para reduzir de forma eficaz a quantidade de asparagina em fatias de batata.

Numa incorporação, as fatias de batata podem ser lavadas com outros agentes quelantes adequados, ou agentes que formam complexos com a asparagina tal que a asparagina não esteja mais disponível para a reação da acrilamida.

Diversos ensaios foram realizados para avaliar a relação entre as fatias de batata tratadas com limão sob várias condições de operação da unidade. Os resultados se encontram listados na Tabela 38 abaixo.

Ensaio No.	Condição de Ensaio	ASN (g%)	Redução
		média	%
Ensaio 1	2 min/Temperatura Ambiente	0,93	0
Ensaio 2	6 min/120 °F	0,92	1
Ensaio 3	6min/120 °F/2% de limão	0,51	45
Ensaio 4	6 min/120 °F/2% de limão/Vácuo/Enzima	0,63	33
Ensaio	6 min/120 °F/Enzima/Vácuo	0,54	42

5			
Ensaio 6	6 min/120 °F/2% de limão/Enzima/Vácuo	0,56	39
Ensaio 7	6 min/120 °F/2% de limão/vácuo/Enzima/Enxaguado/Enzima	0,26	72

TABELA 38. Efeito das Condições Operacionais para Avaliar o Impacto do Limão Sobre a Batata

Para cada ensaio, 840 gramas de batatas foram descascadas e fatiadas numa espessura de 0,053 polegadas (1,35 cm) e embebidas em 28 litros de água. No Ensaio 1, as fatias de batata foram embebidas em água durante 2 minutos sob temperatura ambiente. No Ensaio 2, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos em água sob uma temperatura de 120 °F. Variações nos níveis originais de asparagina constituem a provável causa das concentrações de asparagina similares no Ensaio 1 e no Ensaio 2. No Ensaio 3, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos em água sob uma temperatura de 120 °F com uma solução de limão a 2%. No Ensaio 4, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em uma solução de limão a 2% sob um vácuo de 20 psi. As fatias foram então enxaguadas e embebidas durante 10 minutos em 28 litros de água sob uma temperatura de 120 °F com 14,000 unidades de enzima. No Ensaio 5, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em 28 litros de água apresentando 14,000 unidades de enzima sob vácuo a 20 psi. No Ensaio 6, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos em uma solução de limão a 2% sob uma temperatura de 120 °F. As fatias de batata foram então enxaguadas durante 5 minutos e então embebidas durante 10 minutos em 28 litros de água apresentando 14,000 unidades de enzima sob uma temperatura de 120 °F sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 7, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F numa solução de limão a 2% sob um vácuo de 20 psi. As fatias foram enxaguadas durante 5 minutos e embebidas durante 10 minutos em 28 litros de água apresentando 14,000 unidades de enzima sob uma temperatura de 120 °F. Conforme ilustrado pelo Ensaio 3, o banho numa solução de limão a 2% ao invés de um banho com água apenas resulta numa redução do teor de asparagina significativamente maior. O nível de limão revelado acima serve a propósitos de ilustração e não limitação. Numa determinada incorporação, as fatias podem ser embebidas numa solução de limão contendo de 0,1% até cerca de 2% de limão em massa. As concentrações de limão maiores do que 2% em massa podem ser usadas, porém tais níveis podem começar a apresentar um impacto sobre o sabor do produto final.

Uma outra maneira para penetrar a parede celular é pré-aquecer as fatias cruas por meio

de energia em microondas para que a umidade removida do interior das fatias (as microondas preferencialmente removem umidade do interior de um produto ao invés de remove-la da sua superfície) crie vias ou canais que podem ser utilizados para a penetração da enzima quando as fatias tratadas são embebidas em uma solução de enzima. Numa determinada incorporação, uma batata inteira é submetida ao tratamento com microondas para reduzir o teor interno de umidade desde os originais cerca de 80% até cerca de 60%. A perda de umidade desde a porção interna das batatas pode criar canais que podem ser utilizados para que a asparaginase penetre o interior do tubérculo quando as fatias são embebidas numa solução de enzima.

Diversos ensaios foram conduzidos em fatias de batata para analisar o efeito adicional de energia em microondas sobre a redução do teor de asparagina. Em cada ensaio, 420 gramas de batatas foram peladas e fatiadas até atingir uma espessura de 0,053 polegadas (1,35 cm). Exceto quando indicado, quatro fatias de batata oriundas de cada um dos ensaios foram analisadas quanto ao teor de asparagina e a média para cada ensaio foi relatada. Cada ensaio utilizou cerca de 210 gramas de fatias de batata embebidas em cerca de 7 litros de solução. Os ensaios ocorreram em duas temperaturas de solução, uma temperatura ambiente de cerca de 75 °F e uma temperatura elevada de cerca de 120 °F. Os tempos de banho foram variados e também a adição de asparaginase à solução. Além disso, algumas amostras foram colocadas dentro de uma unidade de infusão à vácuo e mantidas sob uma pressão de -20 psi. as condições de ensaio e os respectivos resultados se encontram resumidos na Tabela abaixo.

Ensaio	Condições	ASN	Redução
		(g%) média	%
1*	Banho por 2 min /temperatura ambiente	1,67	0
2	Banho por 6 min / temperatura ambiente	0,56	66
3	Banho por 6 min & ASNase & vácuo de -20 psi / temperatura ambiente	0,64	62
4	10 seg. de microondas/banho por 6 min / temperatura ambiente	0,57	66
5	30 seg. De microondas/banho por 6 min / temperatura ambiente	0,52	69
6	1 min de microondas/banho por 6 min / temperatura ambiente	0,54	68
7	10 seg. De microondas/banho por 6 min & vácuo de -20 psi & ASNase/ temperatura ambiente	0,53	68
8	30 seg. De microondas/banho de 6 min & vácuo de -20 psi	0,53	68

	& ASNase/ temperatura ambiente		
9	1 min de microondas/banho de 6 min & vácuo de -20 psi & ASNase/ temperatura ambiente	0,37	78
10	10 seg. de microondas/banho de 6 min & vácuo de -20 psi & ASNase/120 °F	0,56	66
11	30 seg. De microondas/banho de 6 min & vácuo de -20 psi & ASNase/120 °F	0,42	75
12**	1 min. de microondas/banho de 6 min & vácuo de -20 psi & ASNase/120 °F	0,50	70

\*Número médio para três ensaios.

\*\*Número de um único ensaio.

TABELA 39. Efeito Revelador do Impacto das Microondas/Vácuo Sobre as Fatias

No Ensaio 1, o ensaio de controle, as fatias de batata foram embebidas durante 2 minutos sob temperatura ambiente. No Ensaio 2, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente. No Ensaio 3, as fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos em 14 litros de água sob temperatura ambiente com 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 4, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 10 segundos e então embebidas durante seis minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água. No Ensaio 5, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 30 segundos e embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água. No Ensaio 6, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 1 minuto e então embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água. No Ensaio 7, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 10 segundos e então embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob -20 psi de vácuo com 7000 unidades de enzima. No Ensaio 8, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 30 segundos e então embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi com 7000 unidades de enzima. No Ensaio 9, as fatias de batata foram colocadas num microondas durante 1 minuto. As fatias foram embebidas durante 6 minutos sob temperatura ambiente em 14 litros de água sob um vácuo de 20 psi com 7000 unidades de enzima. No Ensaio 10, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 10 segundos. As fatias de batata foram embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em 14 litros de água apresentando 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 11, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 30 segundos e então embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em 14 litros de água apresentando 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi. No Ensaio 12, as fatias de batata foram submetidas a microondas durante 1 minuto

e então embebidas durante 6 minutos sob uma temperatura de 120 °F em 14 litros de água apresentando 7000 unidades de enzima sob um vácuo de 20 psi.

5 O uso de microondas também pode aumentar o percentual de redução de asparagina nas fatias de batata. Por exemplo, na comparação do Ensaio 2 com os Ensaios de 4 a 6; com todos os demais fatores sendo iguais, parece que o tratamento prévio das fatias de batata com microondas durante 10 segundos apresenta pouco ou nenhum impacto. No entanto, aos 30 segundos de tratamento prévio com microondas, seguidos por um banho de 6 minutos em temperatura ambiente, as fatias de batata apresentaram uma redução de 69% da asparagina, que é melhor do que a redução de 66% alcançada sem o tratamento prévio com microondas.

10 O tratamento prévio com um microondas durante 1 minuto resultou numa redução de 68% da asparagina. Adicionalmente, na comparação do Ensaio 3 com os Ensaios de 7 a 9, o tratamento prévio com microondas resulta em reduções de asparagina significativamente maiores. Por exemplo, referente ao Ensaio 3; para fatias de batata que foram embebidas durante 6 minutos em uma solução de asparaginase em temperatura ambiente sob um vácuo de 20 psi, as fatias  
15 apresentaram uma redução de asparagina de 62%. No entanto, quando as fatias de batata foram previamente tratadas com microondas durante 10 segundos antes dos mesmos tratamentos do Ensaio 3, a redução da asparagina foi de 68% e um tratamento prévio por 1 minuto com microondas resultou numa redução de asparagina de 78% conforme indicado pelo Ensaio 9. Conseqüentemente, o tratamento prévio com microondas pode facilitar a redução de asparagina em fatias de batata.

20 Numa incorporação, as fatias de batata são tornadas 'infiltráveis' tal que grandes moléculas de enzima tais como a asparaginase possam penetrar a estrutura celular e reagir com a asparagina no interior da fatia. Estas vias podem ser criada mecanicamente implementando acessos na superfície (para implementação de acessos de superfície ver 4,889,733 e 4,889,737) das fatias com pequenos orifícios feitos com seringas ou outros auxílios mecânicos.

25 De forma alternativa, numa incorporação, o mecanismo para o enfraquecimento celular compreende uma ou mais enzimas para enfraquecimento celular. As vias na parede celular podem ser criadas por meio de uma enzima, por exemplo celulase ou hemicelulase que ataca a parede celular do grânulo de amido. A parede celular pode ser enfraquecida estabelecendo-se o contato da parede celular com uma ou mais enzimas para enfraquecimento celular incluindo, embora não  
30 limitado a estas, celulase, endoglucanase, endo-1,4-beta-glucanase, carboximetil celulose, endo-1,4-beta-D-glucanase, beta-1,4-glucanase, beta-1,4-endoglucan hidrolase, celudextrinase, avicelase,

xilanase e hemicelulase. Numa determinada incorporação, uma ou mais enzimas para enfraquecimento celular podem ser adicionadas juntas para compor uma solução de enzima para enfraquecimento celular. A solução de enzima para enfraquecimento celular pode então fazer contato com um alimento de base vegetal para enfraquecer as paredes celulares dos alimento de base vegetal. Devido ao enfraquecimento da parede celular com uma enzima enfraquecedora de célula, a penetração da parede celular pela asparaginase se torna mais fácil. Diversos ensaios foram conduzidos em fatias de batata para analisar o efeito adicional de uma enzima que ataca a parede celular na redução da asparagina. Em cada ensaio, 840 gramas de batatas foram descascadas e fatiadas numa espessura de 0,053 polegadas (1,35 cm). Cada ensaio utilizou cerca de 840 gramas de fatias de batata embebidas em cerca de 28 litros de solução. Os ensaios ocorreram numa temperatura elevada de cerca de 120 °F durante um período de banho de 10 minutos. As condições de ensaio e os respectivos resultados se encontram resumidos na Tabela abaixo.

Ensaio	Condição	ASN	Redução
		(nmol/g) média	%
1	Banho de 2 min sob uma temperatura de 120 F	733	0
2	Banho de 10 min sob uma temperatura de 120 F	493	32,7
3	Banho de 10 min sob uma temperatura de 120 F @ pH 4 Ácido cítrico & enxágue por 5 min	277	62,2
4	Banho de 10 min sob uma temperatura de 120 F @ pH 4 Ácido cítrico/0,84 g de VISCOZYME & enxágue por 5 min	434	40,8
5	Banho de 10 min sob uma temperatura de 120 F @ pH 4 Ácido cítrico/0,84 g de VISCOZYME e frequência ultra-sônica de 68 kHz & enxágue por 5 min	185	74,7
6	Banho de 10 min sob uma temperatura de 120 F @ pH 4 Ácido cítrico/0,84 g VISCOZYME e frequência ultra-sônica de 68 kHz & enxágue por 5 min. Banho de 10 min em 14,000 unidades enzima em 28 L de água	33	95,5

TABELA 40. Efeito do Impacto Revelador de uma Enzima Enfraquecedora de Célula Sobre as Fatias.

No Ensaio 1, o ensaio de controle, as fatias de batata foram embebidas em água sob uma temperatura de 120 °F durante 2 minutos. Após o banho, as fatias foram enxaguadas durante 5 minutos e ensaiadas para detectar o teor de asparagina. No Ensaio 2, as fatias de batata foram embebidas durante 10 minutos em água sob uma temperatura de 120 °F. Após o banho, as fatias foram enxaguadas durante 5 minutos e ensaiadas para detectar o teor de asparagina. No Ensaio 3, as fatias de batata foram embebidas durante 10 minutos em 28 litros de água num pH de 4 a partir da

adição de ácido cítrico. Após o banho, as fatias foram enxaguadas durante 5 minutos e ensaiadas para determinar o teor de asparagina. No Ensaio 4, as fatias de batata foram embebidas durante 10 minutos em 28 litros de água apresentando 0,84 gramas de VISCOZYME num pH de 4 a partir da adição de ácido cítrico. VISCOZYME é um coquetel de enzimas apresentando uma série de carboidrases incluindo arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase e xilanase. VISCOZYME é disponibilizado comercialmente pela empresa Novozymes da Dinamarca. Após o banho, as fatias foram enxaguadas durante 5 minutos e ensaiadas para determinação do teor de asparagina. O Ensaio 5 repetiu o Ensaio 4 com energia ultra-sônica em cerca de 68 kHz aplicada às fatias de batata. O Ensaio 6 repetiu o Ensaio 5 seguido pelo banho das fatias de batata em 28 litros de solução apresentando 14,000 unidades de asparaginase durante 10 minutos.

Os dados na Tabela 40 claramente suportam a teoria de que a aplicação de uma enzima para enfraquecimento celular em conjunto com asparaginase pode reduzir substancialmente o nível de asparagina numa fatia de batata. Quando se utilizam dispositivos de enfraquecimento celular em conjunto (por exemplo energia ultra-sônica simultaneamente com uma enzima para o enfraquecimento celular conforme ilustrado no Ensaio 5) podem ocorrer reduções ainda maiores do teor de asparagina. O Ensaio 5, por exemplo, apresentou uma redução do teor de asparagina 20 % maior ( $[(62,2\%-74,7\%)/62,2\%]$ ) do que o Ensaio 3. Conforme exemplificado pelo Ensaio 6, a aplicação de uma enzima para enfraquecimento celular em conjunto com energia ultra-sônica pode tornar a parede celular mais porosa tal que a asparaginase possa de maneira eficaz reduzir ainda mais o nível de asparagina remanescente. Por exemplo, o uso posterior de asparaginase no Ensaio 6 resultou numa redução do teor de asparagina 21% maior ( $[(74,7\%-95,5\%)/74,7\%]$ ) do que aquela alcançada no Ensaio 5 que não utilizou asparaginase.

Numa determinada incorporação, bocais ou sondas podem ser inseridos nas batatas para 'bombear' a quantidade necessária de asparaginase para dentro das batatas de uma maneira similar àquela utilizada para marinar frangos inteiros.

Embora a presente invenção tenha sido particularmente ilustrada e descrita com referência a diversas incorporações, deverá ser compreendido por aqueles versados na técnica que várias outras abordagens para o problema da redução do teor de acrilamida em alimentos processados termicamente através do uso de dois ou mais agentes aditivos redutores de acrilamida podem ser escolhidas sem abandonar o espírito e o escopo desta invenção. Por exemplo, embora o processo tenha sido especificamente revelado com respeito fundamentalmente a produtos de batata e

milho, o processo também pode ser usado no processamento de produtos alimentícios fabricados a partir de cevada, trigo, centeio, arroz, aveias, milho miúdo e outros grãos à base de amido, assim como outros alimentos contendo asparagina e um açúcar redutor, tais como batatas doces, cebolas e outros vegetais. Além disso, o processo foi demonstrado em petiscos de batata e petiscos de milho, porém pode ser usado no processamento de muitos outros produtos alimentícios fabricados, tais como outros tipos de petiscos, cereais, biscoitos, bolachas, roscas duras, pães e bisnagas, e também a crosta de empanamento para carnes empanadas. A invenção dos Depositantes é aplicável a todos os "petiscos fabricados," "alimentos fabricados" e "alimentos processados termicamente," no contexto em que estes termos foram definidos e explicados no presente documento, que contêm asparagina.

## REIVINDICAÇÕES:

**1. MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS PROCESSADOS TERMICAMENTE** caracterizado por compreender as seguintes etapas:

5 (a) provisão de um alimento de base vegetal apresentando paredes celulares que contém asparagina dentro das referidas paredes celulares;

(b) enfraquecimento das referidas paredes celulares por meio da colocação em contato das paredes celulares com um ou mais mecanismos para o enfraquecimento celular para criar paredes celulares enfraquecidas; onde o referido mecanismo de enfraquecimento celular é selecionado do grupo composto por aplicação de uma quantidade sinergicamente eficaz de energia ultra-sônica ao referido alimento de base vegetal, aplicação de uma quantidade eficaz de energia de microondas ao referido alimento de base vegetal, aplicação de um diferencial de pressão ao referido alimento de base vegetal, banho do referido alimento de base vegetal em uma solução de limão, e banho do referido alimento de base vegetal em uma solução de enzima enfraquecedora de célula;

15 (c) colocação em contato das referidas paredes celulares enfraquecidas com pelo menos um agente redutor de acrilamida;

(d) aquecimento do referido alimento para formar um alimento processado termicamente.

20 **2. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o referido alimento de base vegetal compreende adicionalmente fatias de alimento.

**3. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais alimentos à base de plantas selecionado do grupo composto por arroz, trigo, milho, cevada, soja, aveias, grãos de café torrados e grãos de cacau torrados.

**4. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o alimento de base vegetal compreende batata.

**5. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento das paredes celulares na etapa (b) compreende a aplicação de quantidades de energia ultra-sônica sinergicamente eficazes ao referido alimento de base vegetal.

**6. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido alimento de base vegetal na etapa (a) compreende um alimento de base vegetal fatiado, e onde as etapas adicionais (b) e (c) ocorrem simultaneamente.

7. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

8. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

9. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende adicionalmente um ou mais sais redutores de pH.

10. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende adicionalmente pelo menos um sal redutor de pH onde o referido sal compreende adicionalmente um ácido de ânion apresentando um valor de pKa onde o referido valor de pKa é de menos do que cerca de 6.

11. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais sais selecionados do grupo composto por cloreto de cálcio, lactato de cálcio, maleato de cálcio, gluconato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, acetato de cálcio, lactobionato de cálcio, propionato de cálcio, estearol lactato de cálcio, cloreto de magnésio, citrato de magnésio, lactato de magnésio, maleato de magnésio, gluconato de magnésio, fosfato de magnésio, sulfato de magnésio, hexaidrato de cloreto de alumínio, cloreto de alumínio, alume de amônia, alume de potássio, alume de sódio, sulfato de alumínio, cloreto férrico, gluconato ferroso, fumarato férrico, lactato ferroso, sulfato ferroso, cloreto de cobre, gluconato de cobre, sulfato de cobre, gluconato de zinco e sulfato de zinco.

12. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais aminoácidos livres selecionados do grupo composto por lisina, glicina, histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina e arginina.

13. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende cisteína.

14. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais compostos de tiol livre selecionado do grupo composto por N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reduzida, bi-tiotreitól e caseína.

15. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 14 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais agentes redutores selecionados do grupo composto por

5 diidrato de cloreto de estanho, sulfito de sódio, sódio meta-bissulfito, ácido ascórbico, derivados do ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbito), sais de derivados do ácido ascórbico, ferro, zinco, íons ferrosos.

**16. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento da etapa (b) compreende adicionalmente o banho do referido alimento de base vegetal numa solução apresentando uma temperatura elevada de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F.

**17. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento da etapa (b) compreende a aplicação de energia em microondas em quantidades eficazes ao referido alimento de base vegetal.

**18. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que a referida energia em microondas é aplicada durante pelo menos 30 segundos.

**19. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido alimento de base vegetal da etapa (a) compreende um alimento de base vegetal fatiado, e onde as etapas adicionais (b) e (c) ocorrem simultaneamente.

**20. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 19 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

**21. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento da etapa (b) compreende adicionalmente um diferencial de pressão.

**22. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

5 **23. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma etapa de banho após a aplicação da referida energia em microondas na etapa (b).

**24. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende adicionalmente um ou mais sais redutores de pH.

**25. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende adicionalmente pelo menos um sal redutor de pH onde o referido sal compreende adicionalmente um ácido de ânion apresentando um valor de pKa onde o referido valor de pKa é de menos do que cerca de 6.

26. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais sais selecionados do grupo composto por cloreto de cálcio, lactato de cálcio, maleato de cálcio, gluconato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, acetato de cálcio, lactobionato de cálcio, propionato de cálcio, estearol lactato de cálcio, cloreto de magnésio, citrato de magnésio, lactato de magnésio, maleato de magnésio, gluconato de magnésio, fosfato de magnésio, sulfato de magnésio, hexaidrato de cloreto de alumínio, cloreto de alumínio, alume de amônia, alume de potássio, alume de sódio, sulfato de alumínio, cloreto férrico, gluconato ferroso, fumarato férrico, lactato ferroso, sulfato ferroso, cloreto de cobre, gluconato de cobre, sulfato de cobre, gluconato de zinco, e sulfato de zinco.

27. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais aminoácidos livres selecionados do grupo composto por lisina, glicina, histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina e arginina.

28. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende cisteína.

29. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais compostos de tiol livre selecionados do grupo composto por N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reduzida, bi-tiotreitol e caseína.

30. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 29 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais agentes redutores selecionados do grupo composto por diidrato de cloreto de estanho, sulfito de sódio, sódio meta-bissulfito, ácido ascórbico, derivados do ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), sais de derivados do ácido ascórbico, ferro, zinco, íons ferrosos.

31. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento da etapa (b) compreende adicionalmente o banho do referido alimento de base vegetal numa solução apresentando uma temperatura elevada de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F.

32. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento da etapa (b) compreende a aplicação de um diferencial de pressão ao referido alimento de base vegetal.

33. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido diferencial de pressão é aplicado durante pelo menos 10 segundos.

34. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido diferencial de pressão compreende adicionalmente um diferencial pulsado.

35. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido alimento de base vegetal da etapa (a) compreende um alimento de base vegetal fatiado, e onde as etapas adicionais (b) e (c) ocorrem simultaneamente.

36. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 35 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

37. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

38. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente uma etapa de banho após a aplicação do referido diferencial de pressão na etapa (b).

39. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende adicionalmente um ou mais sais redutores de pH.

40. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende adicionalmente pelo menos um sal redutor de pH onde o referido sal compreende adicionalmente um ácido de ânion apresentando um valor de pKa onde o referido valor de pKa é de menos do que cerca de 6.

41. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais sais selecionados do grupo composto por cloreto de cálcio, lactato de cálcio, maleato de cálcio, gluconato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, acetato de cálcio, lactobionato de cálcio, propionato de cálcio, estearol lactato de cálcio, cloreto de magnésio, citrato de magnésio, lactato de magnésio, maleato de magnésio, gluconato de magnésio, fosfato de magnésio, sulfato de magnésio, hexaidrato de cloreto de alumínio, cloreto de alumínio, alume de amônia, alume de potássio, alume de sódio, sulfato de alumínio, cloreto férrico, gluconato ferroso, fumarato férrico, lactato ferroso, sulfato ferroso, cloreto de cobre, gluconato de cobre, sulfato de cobre, gluconato de zinco, e sulfato de zinco.

42. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o

referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais aminoácidos livres selecionados do grupo composto por lisina, glicina, histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina e arginina.

**43. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende cisteína.

**44. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais compostos de tiol livre selecionado do grupo composto por N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutathione reduzida, bi-tiotreitol e caseína.

**45. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais agentes redutores selecionado do grupo composto por diidrato de cloreto de estanho, sulfito de sódio, sódio meta-bissulfito, ácido ascórbico, derivados do ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbito), sais de derivados do ácido ascórbico, ferro, zinco e íons ferrosos.

**46. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 32 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento da etapa (b) compreende adicionalmente o banho do referido alimento de base vegetal numa solução apresentando uma temperatura elevada de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F.

**47. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento de paredes celulares da etapa (b) compreende o banho do referido alimento de base vegetal numa solução de limão.

**48. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que a referida solução de limão compreende entre cerca de 0,1% e cerca de 2% de limão em massa.

**49. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o referido banho ocorre durante pelo menos 30 segundos.

**50. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o referido banho ocorre durante entre cerca de 30 segundos e cerca de 5 minutos.

**51. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o referido alimento de base vegetal da etapa (a) compreende um alimento de base vegetal fatiado, e onde as etapas adicionais (b) e (c) ocorrem simultaneamente.

**52. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 51 caracterizado pelo fato de que o agente

reductor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

**53. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o agente reductor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

**54. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o referido agente reductor de acrilamida compreende um ou mais aminoácidos livres selecionados do grupo composto por lisina, glicina, histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina e arginina.

**55. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o referido agente reductor de acrilamida compreende cisteína.

**56. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que o referido agente reductor de acrilamida compreende um ou mais compostos de tiol livre selecionados do grupo composto por N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reduzida, bi-tiotreitol e caseína.

**57. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 56 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais agentes redutores selecionados do grupo composto por diidrato de cloreto de estanho, sulfito de sódio, sódio meta-bissulfito, ácido ascórbico, derivados do ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), sais de derivados do ácido ascórbico, ferro, zinco e íons ferrosos.

**58. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 47 caracterizado pelo fato de que a referida solução de limão compreende uma temperatura elevada de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F.

**59. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento das paredes celulares da etapa (b) compreende o banho do referido alimento de base vegetal numa solução de enzima para enfraquecimento celular.

**60. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que a referida solução de enzima para enfraquecimento celular compreende uma ou mais enzimas para enfraquecimento celular selecionadas do grupo composto por celulase, endoglucanase, endo-1,4-beta-glucanase, carboximetil celulose, endo-1,4-beta-D-glucanase, beta-1,4-glucanase, beta-1,4-endoglucan hidrolase, celudextrinase, avicelase, xilanase e hemicelulase.

**61. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o referido banho ocorre durante pelo menos 30 segundos.

62. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o referido banho ocorre durante entre cerca de 30 segundos e cerca de 5 minutos.

63. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o referido alimento de base vegetal da etapa (a) compreende um alimento de base vegetal fatiado, e onde as etapas adicionais (b) e (c) ocorrem simultaneamente.

64. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 63 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

65. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o agente redutor de acrilamida da etapa (c) compreende asparaginase.

66. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais aminoácidos livres selecionados do grupo composto por lisina, glicina, histidina, alanina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina e arginina.

67. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende cisteína.

68. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que o referido agente redutor de acrilamida compreende um ou mais compostos de tiol livre selecionados do grupo composto por N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reduzida, bi-tiotreitol e caseína.

69. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 68 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais agentes redutores selecionados do grupo composto por diidrato de cloreto de estanho, sulfito de sódio, sódio meta-bissulfito, ácido ascórbico, derivados do ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), sais de derivados do ácido ascórbico, ferro, zinco e íons ferrosos.

70. **MÉTODO** de acordo com a reivindicação 59 caracterizado pelo fato de que a referida solução de limão compreende uma temperatura elevada de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F.

71. **MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASPARAGINA EM UM PRODUTO ALIMENTÍCIO**, sendo o referido método caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

(a) enfraquecimento da parede celular de um alimento à base de amido contendo

5 asparagina; onde a referida etapa de enfraquecimento é selecionada do grupo composto por banho do referido alimento à base de amido numa solução sob uma temperatura de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F, aplicação de uma quantidade eficaz de energia ultra-sônica ao alimento à base de amido, aplicação de uma quantidade eficaz de energia de microondas ao referido alimento à base de amido e aplicação de um diferencial de pressão pulsado ao referido alimento à base de amido;

10 (b) adição de um primeiro agente redutor de asparagina ao referido alimento à base de amido para formar uma mistura.

**72. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que a referida etapa de enfraquecimento compreende o banho do referido alimento à base de amido em uma solução sob uma temperatura de entre cerca de 100 °F e cerca de 150 °F.

**73. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que a referida solução compreende limão.

**74. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que a referida etapa de enfraquecimento compreende a aplicação de uma quantidade eficaz de energia ultra-sônica de saída ao referido alimento à base de amido.

**75. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que a referida etapa de enfraquecimento compreende a aplicação de uma quantidade eficaz de energia em microondas ao referido alimento à base de amido.

**76. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que a referida etapa de enfraquecimento compreende um diferencial de pressão.

**77. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 76 caracterizado pelo fato de que o referido diferencial de pressão compreende um diferencial pulsado.

**78. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que o referido primeiro agente redutor de asparagina compreende asparaginase.

**79. MÉTODO** de acordo com a reivindicação 71 caracterizado pelo fato de que o referido enfraquecimento de paredes celulares da etapa (b) compreende um ou mais mecanismos para o enfraquecimento celular selecionado do grupo composto por energia ultra-sônica, energia em microondas, uma ou mais enzimas para enfraquecimento celular, um diferencial de pressão e um  
5 diferencial de pressão pulsado.

1/9

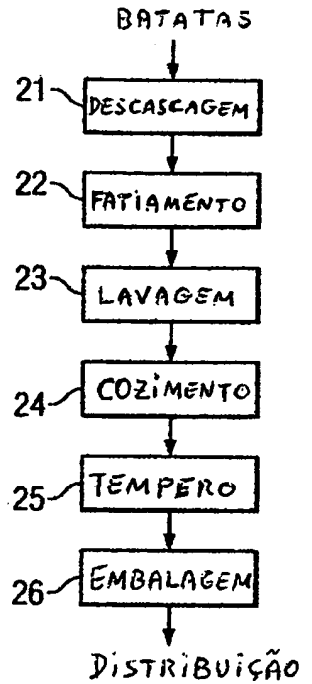


FIG. 2  
(ESTADO DA TÉCNICA)

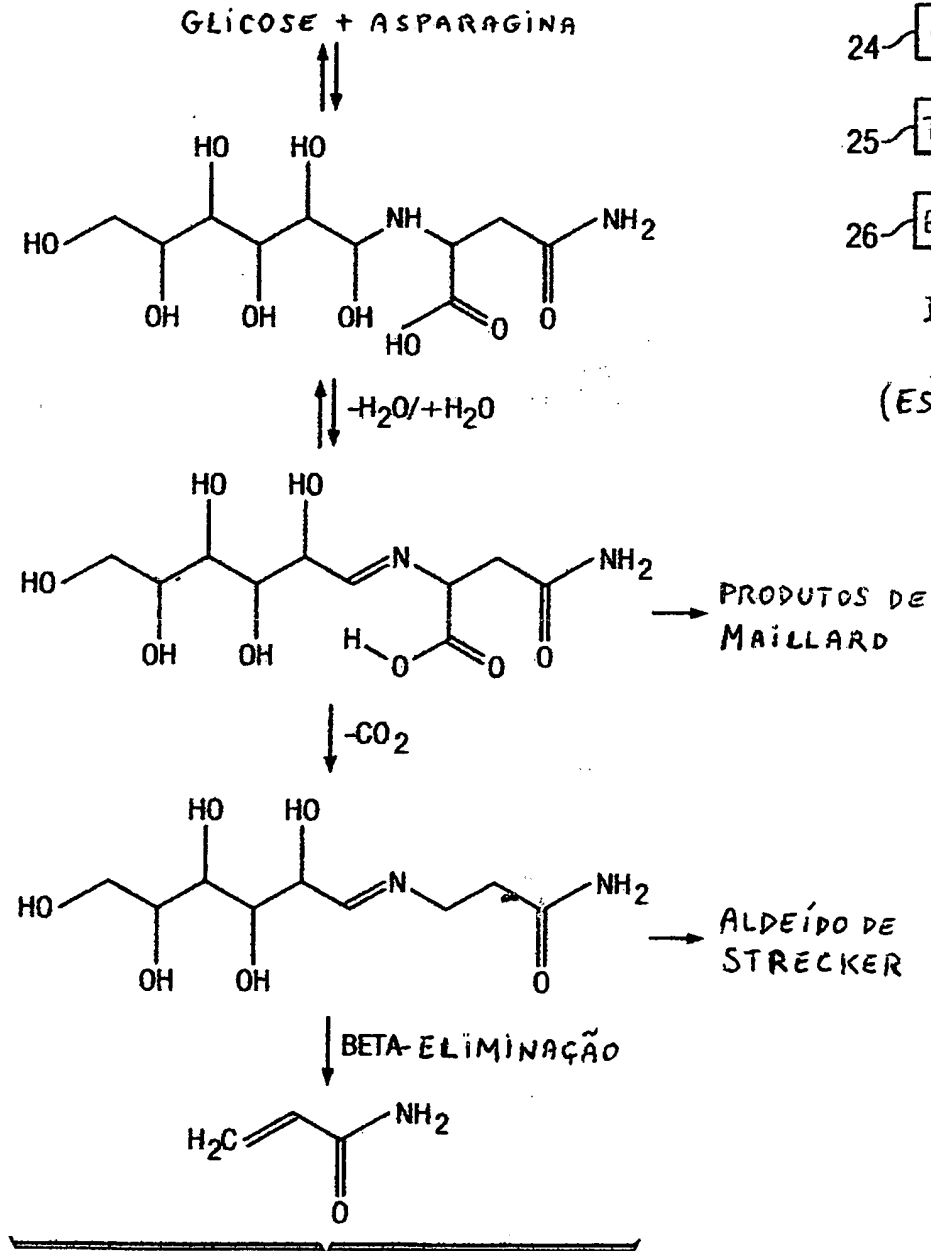


FIG. 1

FIG. 3A

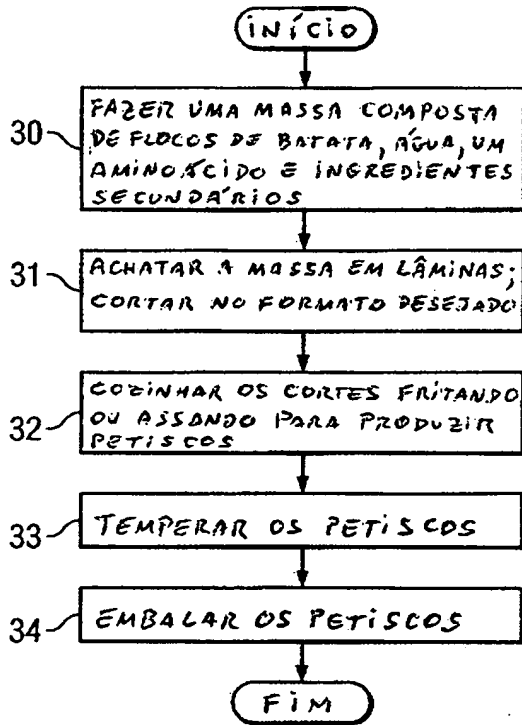
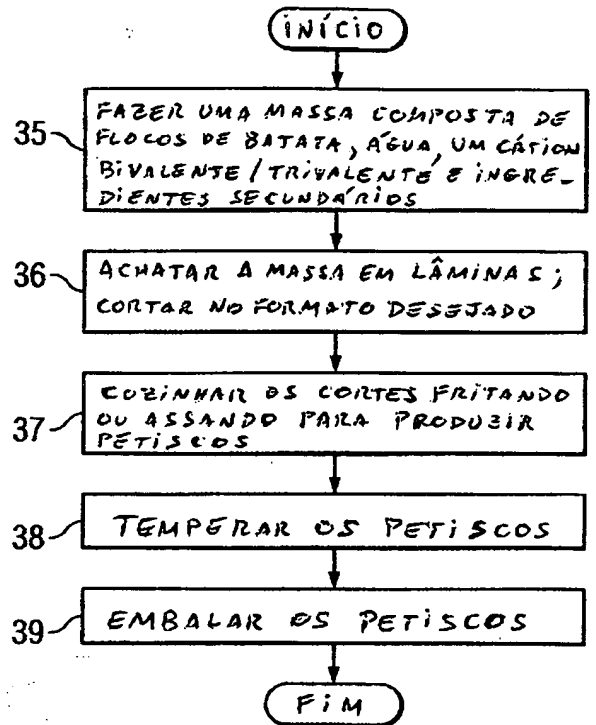


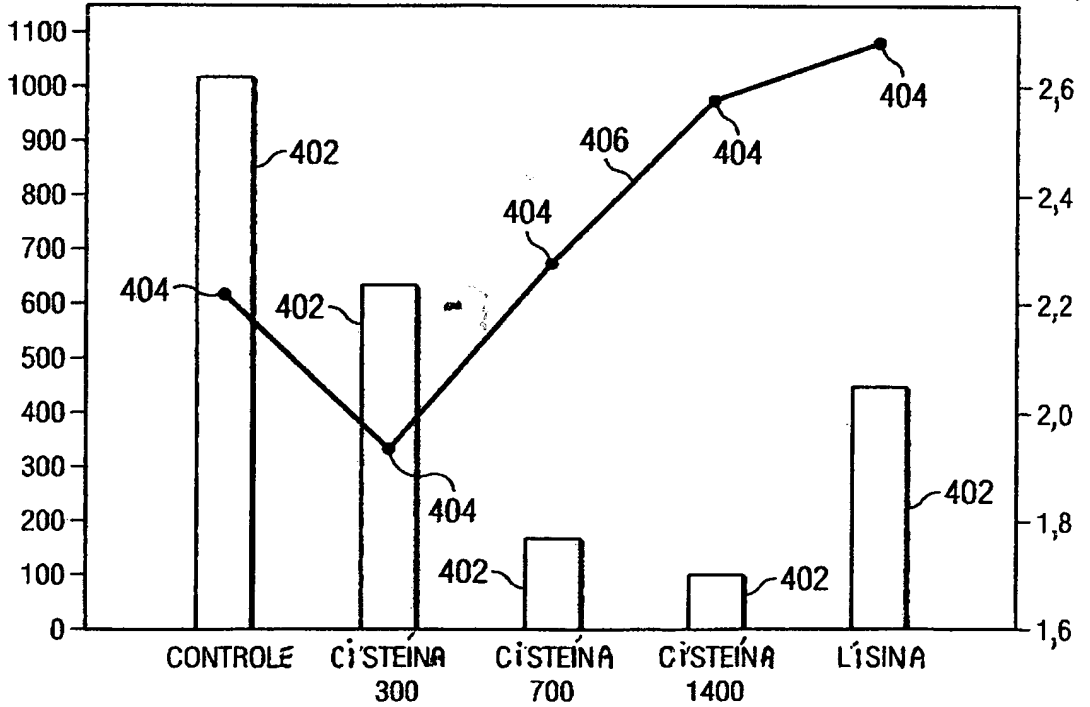
FIG. 3B

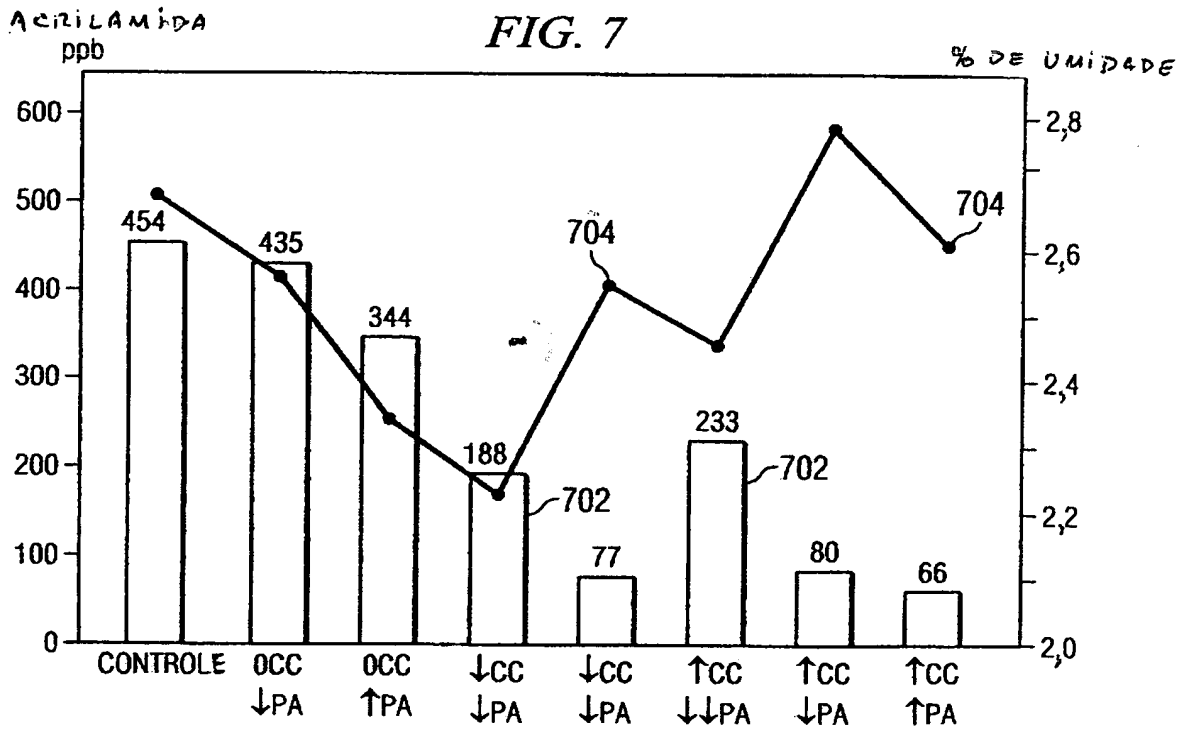
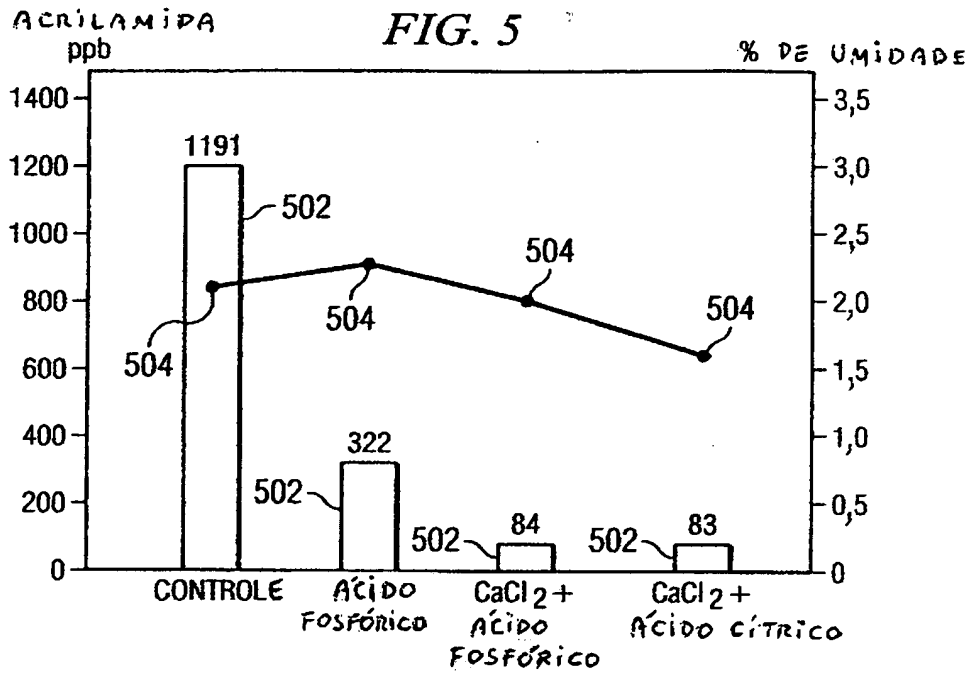


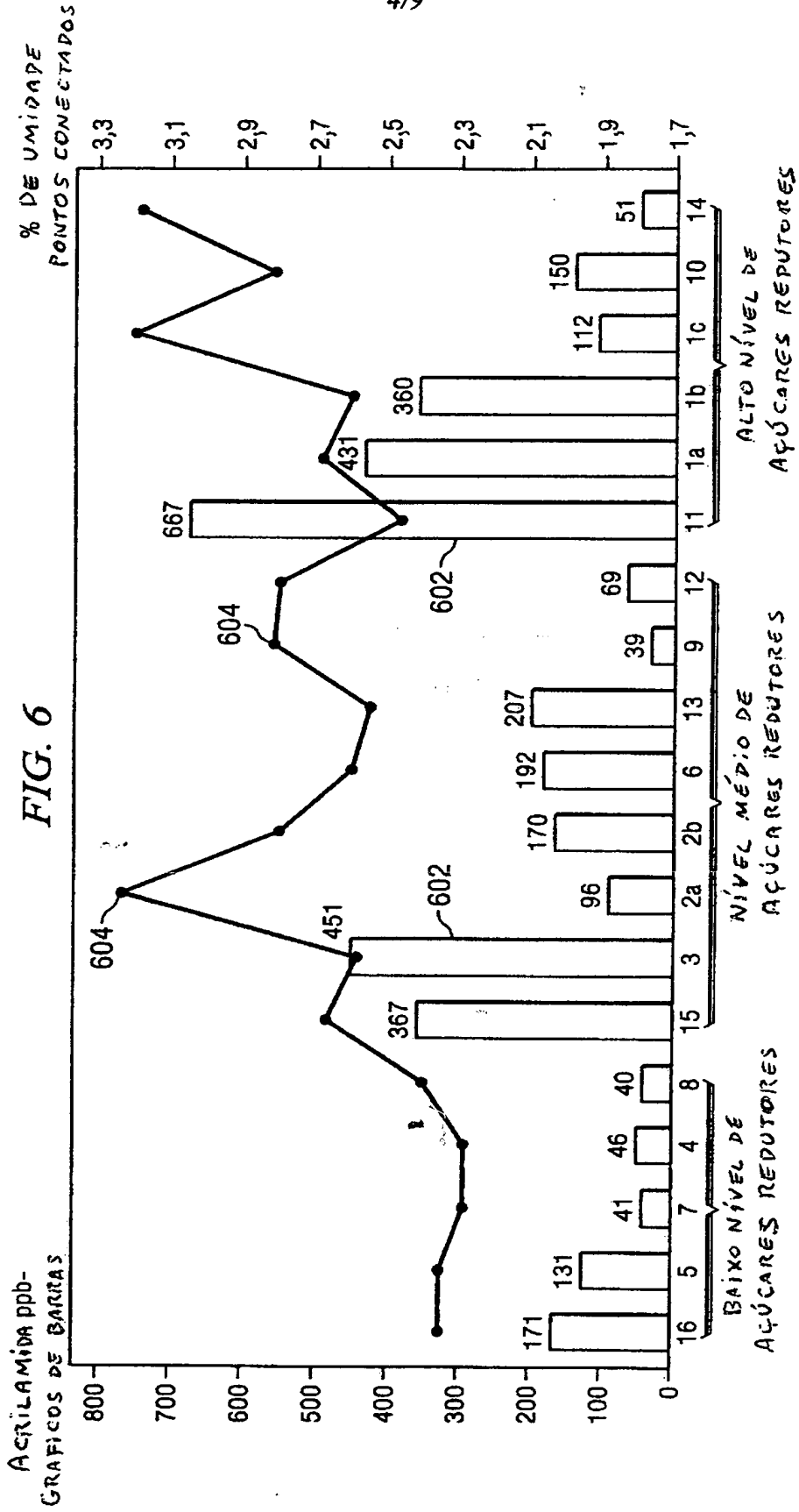
ACRILAMIDA  
ppb.

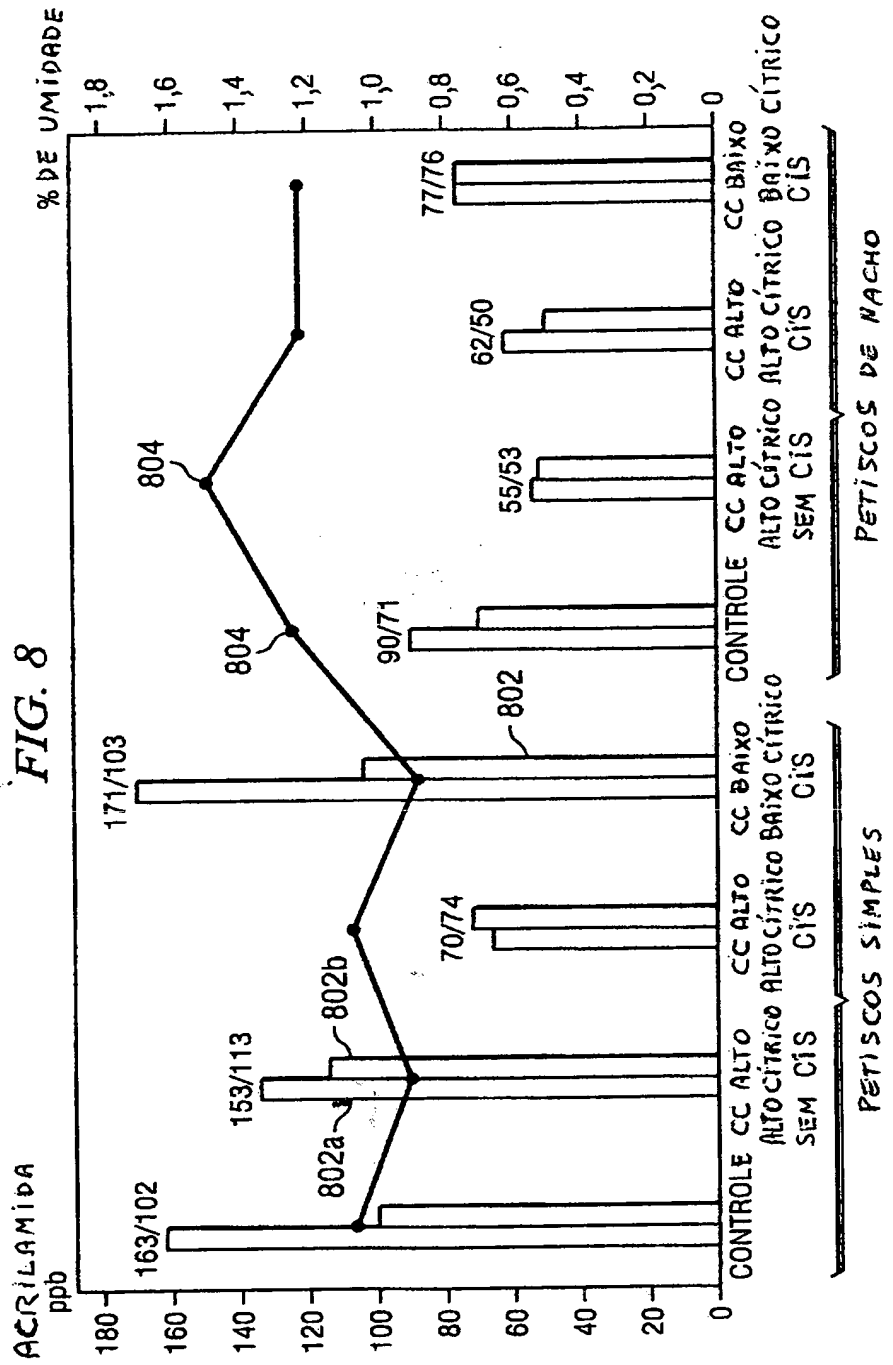
FIG. 4

% DE UMIDADE







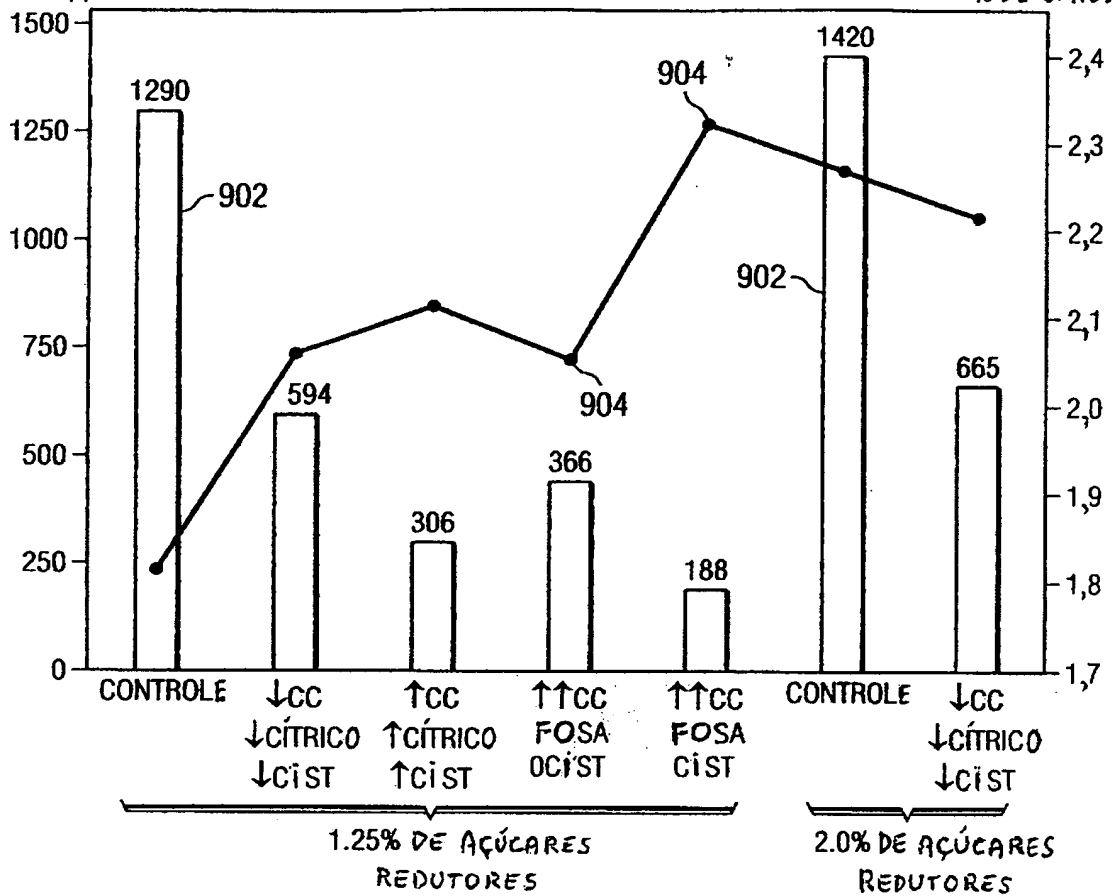


ACRILAMIDA  
ppb

6/9

FIG. 9

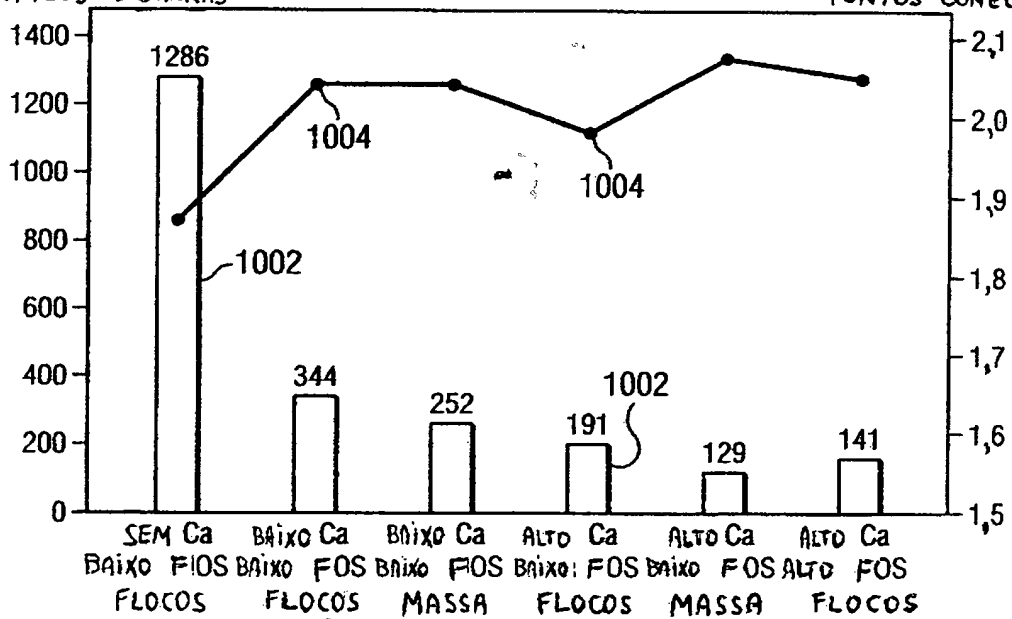
% DE UMIDADE

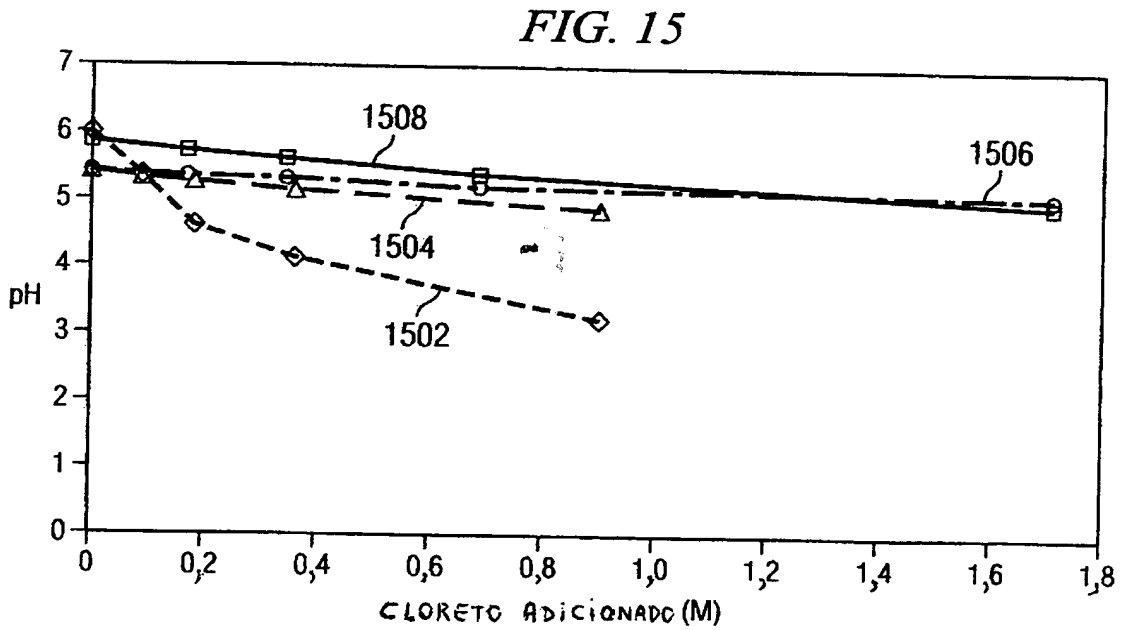
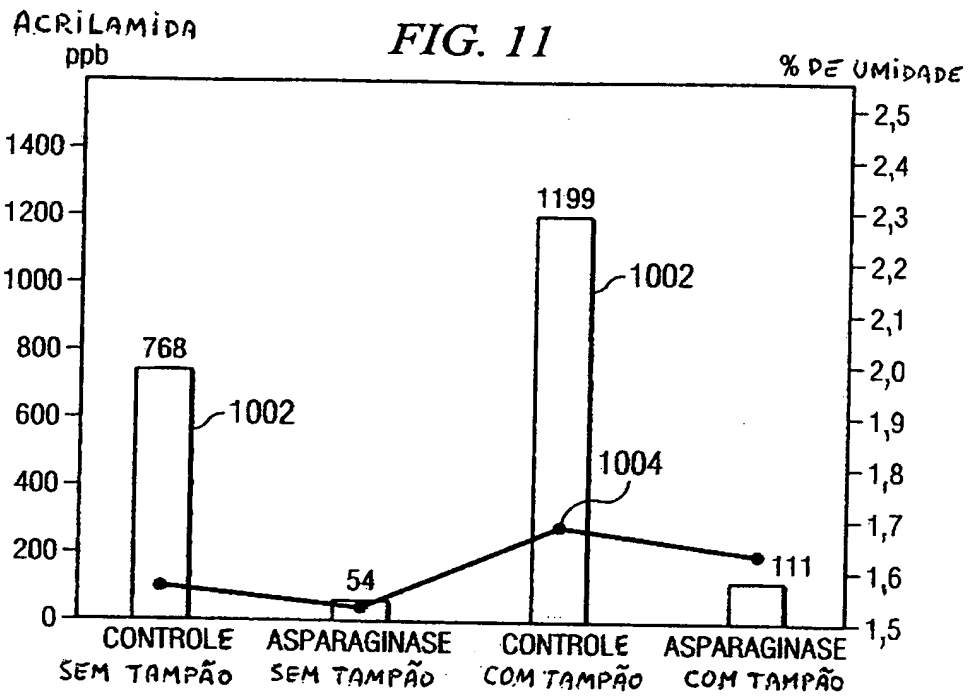


ACRILAMIDA ppb-  
GRÁFICOS DE BARRAS

FIG. 10

% DE UMIDADE  
PONTOS CONECTADOS





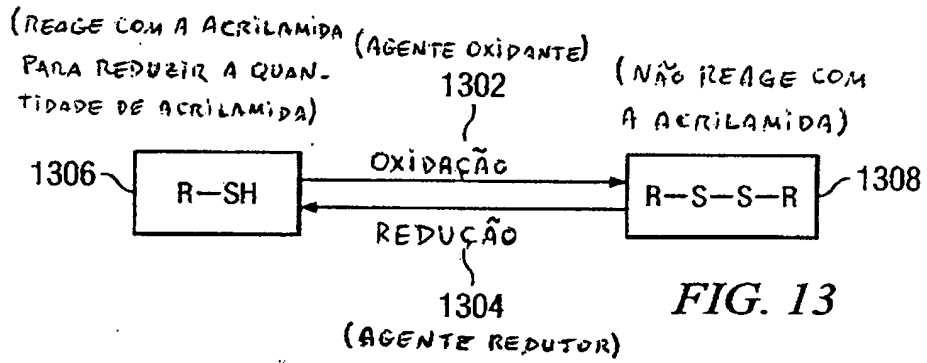
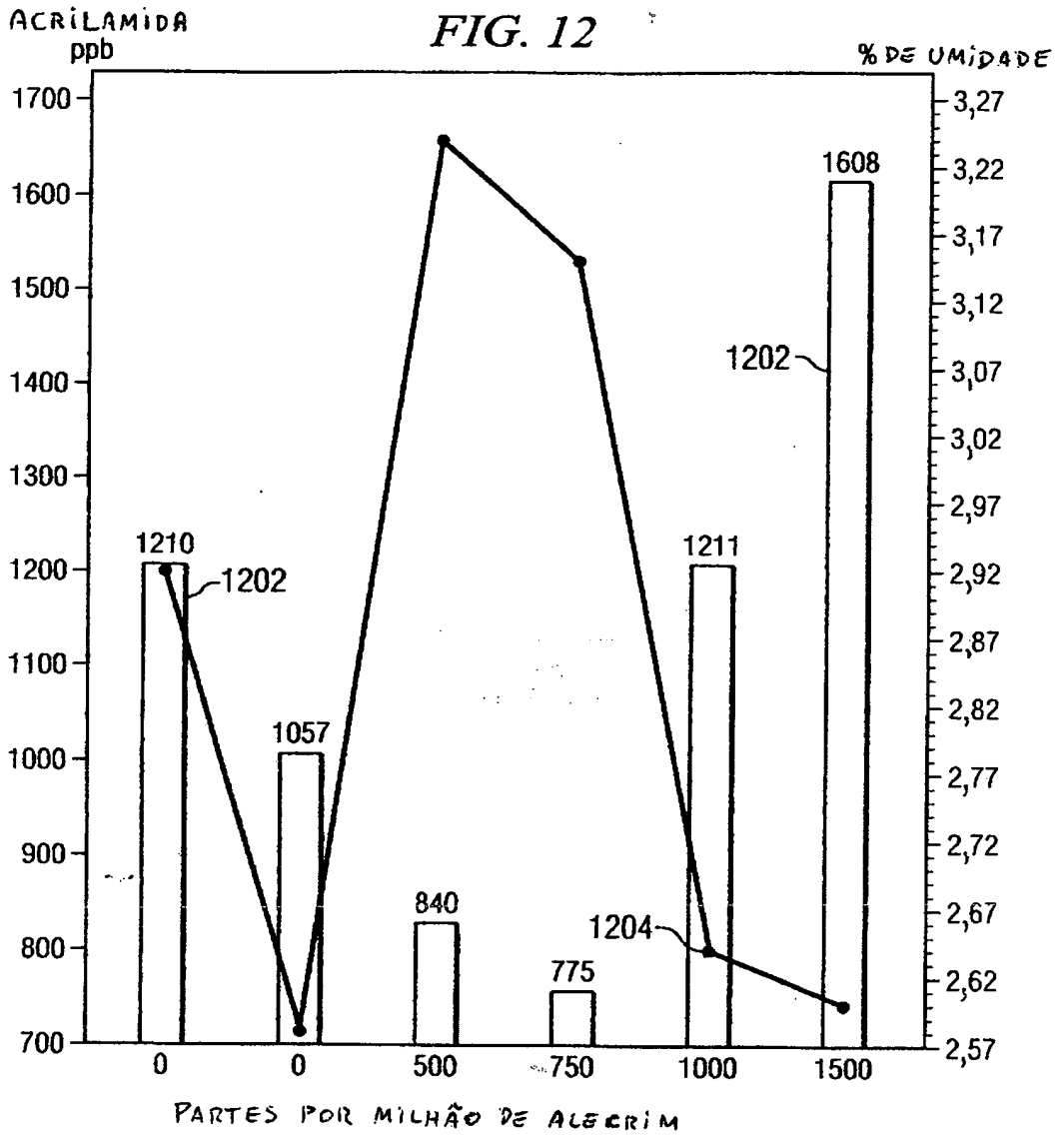
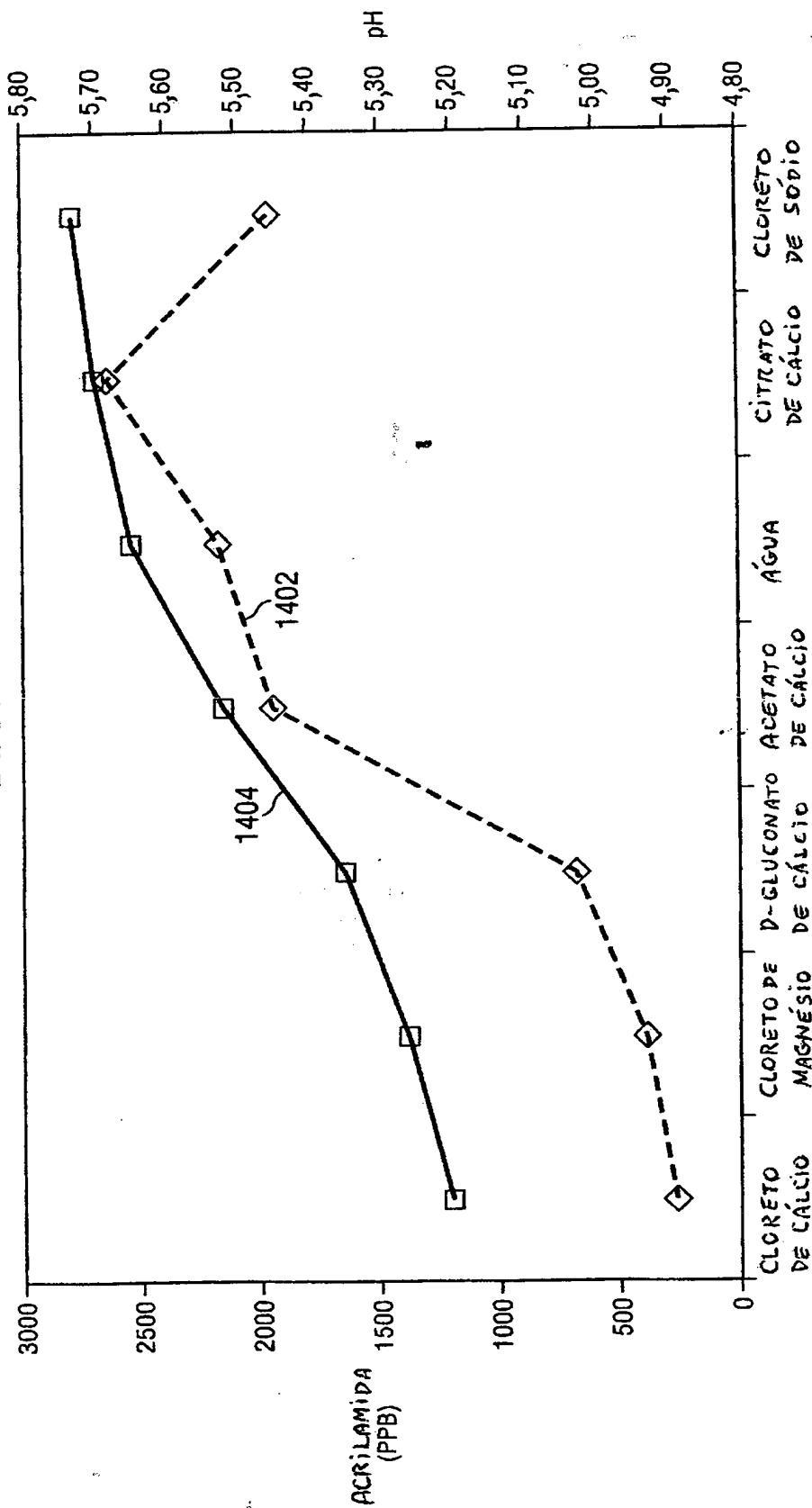


FIG. 14



120806376-1

**“MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS PROCESSADOS TERMICAMENTE E PARA A REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASPARAGINA EM UM PRODUTO ALIMENTÍCIO”.**

**RESUMO**

5 Paredes celulares apresentando asparagina são enfraquecidas por meio de um ou mais mecanismos para o enfraquecimento celular com a finalidade de permitir a penetração de um ou mais agentes redutores de acrilamida nas paredes celulares antes do cozimento com o objetivo de reduzir a formação de acrilamida. Os métodos revelados no presente documento são especialmente aplicáveis a produtos alimentícios fatiados tais como batatas fatiadas. De forma alternativa, o mecanismo pode ser aplicado a alimentos não-fatiados tais como grãos de cacau e grãos de café 10 torrados. Os mecanismos para o enfraquecimento celular podem incluir energia em microondas, energia ultra-sônica, diferenciais de pressão pulsados ou constantes, uma enzima para enfraquecimento celular e limão.