

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**AMIDOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS EMPREGADOS
NA SUBSTITUIÇÃO DE GORDURA EM ALIMENTOS**

Tese de doutorado

PARECER

MARIA APARECIDA VIEIRA TEIXEIRA
Engenheira de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Maria Aparecida Vieira Teixeira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de agosto de 2002.

PROF. DR. CÉSAR F. CIACCO
Orientador

Campinas, 30 de agosto de 2002.

PROF. DRA. DÉBORA Q. TAVARES
Co-orientadora


Prof. Dr. Cesar Francisco Ciacco
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
T235a
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51348
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 25/10/02
Nº CPD _____

CM00175698-0

BIB ID 265 434

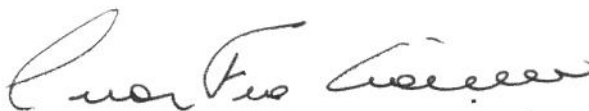
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

T235a Teixeira, Maria Aparecida Vieira
Amidos quimicamente modificados empregados na
substituição de gordura em alimentos / Maria Aparecida Vieira
Teixeira. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

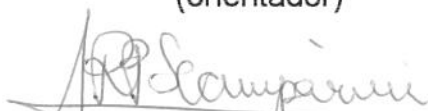
Orientador: César Francisco Ciacco.
Co-orientador: Débora de Queiroz Tavares
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Amido – Modificação química. 2. Gordura. I. Ciacco, César
Francisco. II. Tavares, Débora de Queiroz. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

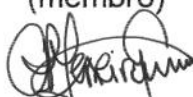
BANCA EXAMINADORA



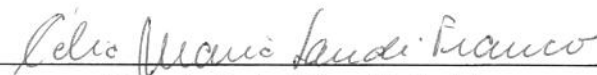
PROF. DR. CÉSAR F. CIACCO
(orientador)



PROF^A. DR^A. ADILMA REGINA PIPPA SCAMPARINI
(membro)



PROF. DR. CARLOS GROSSO
(membro)



PROF^A. DR^A. CÉLIA M. L. FRANCO
(membro)



PROF^A. DR^A. MIEKO KIMURA
(membro)

PROF. DR. RENATO CRUZ
(membro suplente)

PROF^A. DR^A. WALKÍRIA H. VIOTTO
(membro suplente)

CAMPINAS,

DE

DE 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dedico

Ao meu noivo Cleverson
Aos meus pais, Juraci e Terezinha
À minha segunda mãe, Débora
Aos meus irmãos, Patrícia, Paula e Geraldo

AGRADECIMENTOS

À Deus

Ao Cleverson, pelo nosso amor.

À minha família, por tudo.

Aos Professores César F. Ciacco e Débora Q. Tavares, pela orientação, incentivo, confiança e, principalmente, pela amizade.

Aos membros da banca, pelo apoio.

Aos Professores Anita, Celso, Adilma, Helena e aos amigos Luiz Antônio, Lilia, Yara, Susana, José Cândido, Carol, Camila, “Aninhas” (Koon, Lourdes, Maria) e Priscila, pela preciosa ajuda.

À todos os meus amigos, pelo companheirismo, pelo apoio e por acreditarem em mim.

À Corn Products LTDA, pelo fornecimento da matéria prima.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Página

Índice de Tabelas.....	viii
------------------------	------

Índice de Figuras.....	xi
------------------------	----

Resumo.....	xvii
-------------	------

Summary.....	xx
--------------	----

I. INTRODUÇÃO	1
----------------------------	----------

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
--	----------

2.1. SUBSTITUTO DE GORDURA	3
----------------------------------	---

2.2. PROPRIEDADES DOS SUBSTITUTOS À BASE DE CARBOIDRATOS	5
--	---

2.2.1. <i>Uso do Amido como Substituto de Gordura.....</i>	5
--	---

2.3. SUBSTITUIÇÃO DA GORDURA	8
------------------------------------	---

2.4. ANÁLISE DA ESTRUTURA DO SUBSTITUTO DE GORDURA	11
--	----

2.4.1. <i>Espectrofotometria de Infravermelho.....</i>	11
--	----

2.4.2. <i>Ressonância Magnética Nuclear (NMR).....</i>	12
--	----

2.4.3. <i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....</i>	13
--	----

2.4.4. <i>Difração de Raio-X.....</i>	15
---------------------------------------	----

2.4.5. <i>Cromatografia por Exclusão.....</i>	17
---	----

2.4.6. <i>Microscopia.....</i>	18
--------------------------------	----

2.5. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL.....	18
-----------------------------------	----

III. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
-------------------------------------	-----------

3.1. MATÉRIAS-PRIMAS	20
----------------------------	----

3.2. MÉTODOS.....	20
-------------------	----

3.2.1. <i>Síntese dos Substitutos de Gordura: amido hidrolisado, inter cruzado e/ou acetilado</i>	20
---	----

3.2.1.1. EFEITO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NOS AMIDOS (AMIDOS HIDROLIZADOS, INTERCRUZADOS E/OU ACETILADOS) NAS SUAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS	22
--	----

3.2.1.2. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (AMIDOS HIDROLIZADOS, INTERCRUZADOS E/OU ACETILADOS)	26
---	----

3.2.2. <i>Síntese dos Substitutos de Gordura: amido esterificado com ácidos graxos de cadeia linear (ácido láurico e ácido palmítico).....</i>	28
--	----

3.2.2.1. CONFIRMAÇÃO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO.....	31
--	----

3.2.2.2. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS ESTERIFICADOS COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LINEAR.....	32
---	----

3.2.3. <i>Valor Calorífero dos Amidos Substitutos de Gordura Seleccionados em 3.2.1.2 e em 3.2.2.2.</i>	33
---	----

3.2.4. <i>Estudo da Estrutura dos Amidos Substitutos de Gordura Seleccionados em 3.2.1.2. e em 3.2.2.2.</i>	33
---	----

3.2.4.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	33
--	----

3.2.4.2. MICROSCOPIA.....	34
---------------------------	----

3.2.4.3. DIFRACTOGRACTOMETRIA DE RAIO-X.....	34
--	----

3.2.4.4.	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	35
3.2.4.5.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i>	35
3.2.4.6.	ESTRUTURA FINA (CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL).....	36
3.2.5.	<i>Ensaio Nutricional em Ratos com Dietas Contendo os Amidos Substitutos de Gordura</i> <i>Selecionados em 3.2.1.2 e em 3.2.2.2.</i>	37
3.2.6.	<i>Análise Sensorial dos Amidos Substitutos de Gordura Selecionados em 3.2.1.2 e em 3.2.2.2.</i> 40	
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1.	AMIDO PARCIALMENTE HIDROLISADO	41
4.2.	AMIDO PARCIALMENTE HIDROLISADO, INTERCRUZADO E ACETILADO	41
4.2.1.	<i>Estudo do Efeito das Modificações Químicas dos Amidos nas suas Propriedades Tecnológicas</i>	41
4.2.2.	<i>Avaliação das Propriedades Funcionais dos Amidos Quimicamente Modificados (hidrolisados, intercruzados e/ou acetilados)</i>	49
4.3.	AMIDOS ESTERIFICADOS COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LINEAR	55
4.3.1.	<i>Confirmação das Reações de Esterificação</i>	55
4.3.2.	<i>Avaliação das Propriedades Funcionais dos Amidos Esterificados com Ácidos Graxos de Cadeia Linear</i>	61
4.4.	VALOR CALORÍFICO DOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS	63
4.5.	ESTUDO DA ESTRUTURA DOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS	64
4.5.1.	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	64
4.5.2.	<i>Difratometria de Raio-X</i>	67
4.5.3.	<i>Microscopia</i>	72
4.5.4.	<i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	81
4.5.5.	<i>Hidrólise Enzimática in vitro</i>	87
4.5.6.	<i>Análises Cromatográficas em Gel Sephadex G-50</i>	88
4.6.	ENSAIO NUTRICIONAL EM RATOS COM DIETAS CONTENDO OS AMIDOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS	92
4.6.1.	<i>Composição das Dietas</i>	92
4.6.2.	<i>Resultados Fisiológicos</i>	93
4.6.3.	<i>Resultados Histológicos</i>	96
4.7.	ANÁLISE SENSORIAL DOS AMIDOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS	102
V.	CONCLUSÕES	104
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
FINANCIAMENTO		116

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Classificação dos Substitutos de Gordura.....	4
2. Delineamento experimental: estudo do efeito combinado das variáveis independentes, porcentagem de oxicleto do fósforo e porcentagem de anidrido acético usados, nas propriedades dos amidos como substitutos de gordura.....	24
3. Formulação da maionese, com 50% de substituição do óleo.....	28
4. Composição da dieta AIN93 (REEVES et al., 1993).....	38
5. Força e adesividade da maionese padrão (75% de óleo) e das maioneses fabricadas com os derivados de amido de milho ceroso (W) quimicamente modificados.....	52
6. Força e adesividade da maionese padrão (75% de óleo) e das maioneses fabricadas com os derivados de amido de mandioca (M) quimicamente modificados.....	53
7. Força e adesividade da maionese padrão (75% de óleo) e das maioneses fabricadas com os derivados de amido de milho normal (N) quimicamente modificados.....	54

8. Número de ligações éster/unidade de glicose dos amidos de milho normal e ceroso e amido de mandioca quimicamente modificados.....	60
9. Valor calorífico dos substitutos de gordura.....	63
10. Cristalinidade relativa dos amidos de milho ceroso (W) e de mandioca (M) <i>in natura</i> e dos amidos quimicamente modificados (ML, M8 e W5).....	71
11. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de mandioca e de milho ceroso <i>in natura</i>	82
12. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para o amido de milho ceroso <i>in natura</i> (W) e para o amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com anidrido acético (W5).....	83
13. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para o amido de mandioca <i>in natura</i> (M) e para o amido de mandioca parcialmente hidrolisado, intercruzado e acetilado com anidrido acético (M8).....	85
14. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para o amido de mandioca <i>in natura</i> (M) e para o amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico (ML).....	86

15. Perfil de eluição do amido de milho ceroso (W) e de mandioca (M) <i>in natura</i> e dos amidos substitutos de gordura: M8, W5 e ML.....	90
16. Composição centesimal das dietas utilizadas por cada grupo.....	93
17. Taxa de colesterol, HDL e triglicerídeos nos soros dos ratos sacrificados ao 16º dia de ensaio.....	95
18. Porcentagem de aceitação das maioneses fabricadas com os amidos substitutos de gordura (M8, W5 e ML) e da maionese padrão.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estrutura dos monômeros de glicose com a numeração dos carbonos constituintes.....	12
2. Propriedades de pasta do amido de milho normal <i>in natura</i> e do amido de milho normal parcialmente hidrolisado, inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 4% de anidrido acético (amido de milho normal ensaio 9 ou N9).....	43
3. Propriedades de pasta dos amidos de mandioca parcialmente hidrolisados, inter cruzados com 0,05% de POCl_3 e acetilados com 8% de anidrido acético (ensaio 8, M8) e dos amidos de mandioca parcialmente hidrolisados e inter cruzados com 0,05% de POCl_3 (ensaio 7, M7).....	44
4. Propriedades de pasta do amido de milho ceroso hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético (ensaio 5, W5) e do amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 (ensaio 7, W7).....	45
5. Variação da força do gel em função das variáveis % de oxiclreto de fósforo e % de anidrido acético.....	48

6. Variação da quebra de viscosidade em função das variáveis % de oxicleto de fósforo e % de anidrido acético.....	49
7. Espectro de absorção infravermelho do amido de mandioca esterificado com ácido láurico purificado.....	57
8. Espectro de absorção infravermelho do amido de mandioca <i>in natura</i>	57
9. Espectro de absorção infravermelho do produto resultante da tentativa de esterificação do amido de mandioca com ácido palmítico (MP).....	58
10. Resultados das análises no texturômetro das maioneses fabricadas com os amidos de mandioca, de milho ceroso e de milho normal parcialmente hidrolisados e esterificados com ácido láurico (ML, WL e NL, respectivamente) e da maionese padrão (sem substituição do óleo).....	62
11. Espectro de carbono do amido de mandioca <i>in natura</i>	65
12. Espectro de carbono do amido de mandioca esterificado com ácido láurico.....	66
13. Difractogramas de raio-X dos amidos de milho normal, ceroso e amido de mandioca.....	67
14. Difractogramas de raio-X do amido de mandioca <i>in natura</i> (M) e do amido de mandioca modificado (M8).....	68

15. Difractogramas de raio-X do amido de milho ceroso <i>in natura</i> (W) e do amido de milho ceroso modificado (W5).....	69
16. Difractogramas de raio-X dos amidos de mandioca, de milho ceroso e de milho normal parcialmente hidrolisados e esterificados com ácido láurico (ML, WL e NL, respectivamente).....	70
17. Microscopia ótica dos amidos de mandioca e de milho ceroso <i>in natura</i> , sob luz polarizada (a) e sob luz sem interferências (b).....	73
18. Microscopia ótica dos amidos de mandioca e de milho parcialmente hidrolisados com ácido clorídrico, sob luz polarizada (a) e sob luz sem interferências (b).....	74
19. Microscopia ótica dos amidos de mandioca e de milho ceroso selecionados como os melhores substituto de gordura (M8, W5, ML), sob luz polarizada (a) e sob luz sem interferências (b).....	75
20. Micrografias do amido de milho ceroso <i>in natura</i> observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).....	77
21. Micrografias do amido de mandioca <i>in natura</i> observado em SEM (aumento de 5000X e 1500X, no detalhe).....	78

22. Micrografias do amido de milho ceroso após hidrólise ácida observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).....	78
23. Micrografias do amido de mandioca após hidrólise ácida observado em SEM (aumento 5000X e 1500 vezes, no detalhe).....	79
24. Micrografias do amido de milho ceroso, parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico e acetilado com anidrido acético (W5) observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).....	79
25. Micrografias do amido de mandioca parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico, intercruzado com oxiclureto de fósforo e acetilado com anidrido acético (M8) observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).....	80
26. Micrografias do amido de mandioca parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico e esterificado com ácido láurico (ML) observado em SEM (aumento de 5000X, e 1500X, no detalhe).....	80
27. Resultados das análises calorimétricas (DSC) dos amidos de mandioca e milho ceroso <i>in natura</i>	82

28. Resultados das análises calorimétricas (DSC) do amidos de milho ceroso <i>in natura</i> (W) e do amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com anidrido acético (W5).....	84
29. Resultados das análises calorimétricas (DSC) do amido de mandioca <i>in natura</i> (M) e do amido de mandioca parcialmente hidrolisado, intercruzado e acetilado com anidrido acético (M8).....	85
30. Resultados das análises calorimétricas (DSC) dos amidos de mandioca <i>in natura</i> (M) e do amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico (ML).....	87
31. Quantidade de açúcar redutor presente em cada tubo após a reação de hidrólise enzimática <i>in vitro</i>	88
32. Perfil de eluição das frações de amidos de mandioca: M (<i>in natura</i>), e dos substitutos de gordura (M8 e ML).....	89
33. Perfil de eluição das frações de amidos de milho ceroso: W (<i>in natura</i>), e do substituto de gordura (W5).....	90
34. Ingesta (g) das dietas controle (C) e modificadas (M8, W5 e ML).....	94
35. Curva ponderal dos Grupos C, M8, W5, e ML.....	94
36. Micrografia do jejuno de rato do Grupo Controle ao fim do ensaio (aumento 180X).....	97
37. Micrografia de enterócitos de rato do Grupo Controle (aumento 6000X).....	98

38. Micrografia do íleo de rato do Grupo Controle ao fim do ensaio (aumento 180X).....	98
39. Micrografia do fígado de rato do Grupo Controle (aumento 180X).....	99
40. Micrografia do jejuno de rato alimentado com dieta experimental contendo amido de mandioca do grupo M8 (aumento 180X).....	99
41. Micrografia do íleo de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca modificado do grupo M8 (aumento 180X).....	100
42. Micrografia do jejuno de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo ML (aumento 180X).....	100
43. Micrografia da porção terminal de vilosidades do íleo de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo ML (aumento 180X).....	101
44. Micrografia dos hepatócitos de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo ML (aumento 1000X).....	101
45. Micrografia das vilosidades de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo W5 (aumento 180X).....	102

RESUMO

Em decorrência da preocupação de se reduzir o consumo de gordura, sem alterar a qualidade e as características sensoriais do produto, tem-se procurado desenvolver substitutos que imitem as propriedades organolépticas e funcionais da gordura. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes modificações químicas (hidrólise ácida, acetilação, intercruzamento, esterificação com ácidos graxos de cadeia linear), na estrutura, nas características físico-químicas e nas propriedades funcionais, sensoriais e nutricionais de amidos de milho normal e ceroso e amido de mandioca, quando utilizados como substitutos da gordura.

Inicialmente, foi realizado um delineamento experimental para verificar o efeito das modificações químicas, hidrólise ácida, acetilação e/ou ligações cruzadas, nas propriedades tecnológicas dos amidos (formação do gel, termorreversibilidade, quebra da viscosidade, retrogradação e força do gel dos derivados de amido). A seguir foi avaliado o efeito destas modificações no amido quando usado como substituto da gordura na maionese. Os resultados mostraram que as modificações químicas, hidrólise ácida, formação de ligações cruzadas e introdução de grupo acetil, alteraram as propriedades tecnológicas dos amidos. Entretanto, a maneira como os amidos modificados se comportaram durante a gelatinização e resfriamento dependeu do tipo de amido e da extensão de intercruzamento e/ou acetilação. De acordo com análises da textura das maioneses, foram selecionados dois derivados de amidos que substituíram a

gordura de modo mais eficiente: amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético e amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético.

Na segunda fase do projeto, vários métodos para a esterificação do amido parcialmente hidrolisado com ácidos graxos de cadeia linear (ácido láurico e palmítico) foram testados: esterificação com anidrido ou cloreto do ácido em presença de piridina; esterificação com os próprios ácidos em presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC), variando-se o solvente (dimetilsulfóxido ou formamida). Definiu-se pela esterificação em presença de DCC e dimetilsulfóxido. Não foi possível a esterificação dos amidos com o ácido palmítico, possivelmente devido a impedimentos estéricos. Após as modificações químicas, os amidos parcialmente hidrolisados e esterificados com o ácido láurico foram usados, com sucesso, na substituição de 50% do óleo da maionese. Entretanto, a maionese fabricada com amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico apresentou melhor textura.

Na terceira etapa, foram obtidas informações sobre as características físico-químicas e a estrutura dos três amidos substitutos de gordura selecionados (amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético, amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético e amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico), através dos seguintes métodos: análise calorimétrica diferencial de varredura, microscopia eletrônica de

varredura, microscopia ótica, difração de raio-x, cromatografia de permeação em gel, espectrofotometria de infravermelho e ressonância magnética nuclear.

À seguir, foi realizado um ensaio com ratos Wistar/Uni jovens (21 dias) com três dietas experimentais que tiveram 90% do lipídeo substituído pelos substitutos de gordura selecionados. O grupo controle recebeu a mesma dieta porém sem substituição, ou seja, contendo 7% de óleo de soja. O ensaio monitorou as variáveis: consumo, crescimento ponderal, metabolismo lipídico no soro sanguíneo e histologia do jejuno e íleo. As três dietas experimentais demonstraram, em relação à dieta controle (contendo 7% de óleo de soja), que a substituição da gordura não teve efeito sobre as quatro variáveis estudadas ou seja, os três produtos substitutos de gordura não demonstraram interferência, e sequer toxicidade, sobre o crescimento e metabolismo de ratos jovens.

De acordo com a análise sensorial, o derivado que melhor substituiu a gordura foi do amido de mandioca parcialmente hidrolisado, intercruzado e acetilado. A maionese fabricada com este substituto recebeu um nível de aceitação maior que as fabricadas com os outros substitutos de gordura, não diferindo da maionese padrão (75% de óleo), em termos globais da aparência. Entretanto, de acordo com os provadores houve diferença em termos de textura, sugerindo que um único substituto não é suficiente para reproduzir a variedade de atributos associados à gordura.

SUMMARY

Demands for fat replacements have been increasing as many health disorders, due to excessive fat-intake, are recognized. Fat substitutes based on starch have been used, with functional characteristics similar to fat but with a lower caloric value. The objective of this work was to study the effect of chemical modifications (acid hydrolysis, cross-linking and acetylation reactions and esterification with linear chain carboxylic acids) on the structure, physico-chemical characteristics, functional and nutritional properties and sensory attributes of normal corn, waxy corn and cassava starches. It was examined the potential application of these modified starches as fat-replacing agents in O/W emulsions such as mayonnaise.

First, the effect of interaction of cross-linking and acetylation reactions on hydrolyzed starches was studied with a experimental design in accordance with the response surface methodology. Five dependent variables (responses) were monitored: gel formation, thermoreversibility test, gel strength, pasting properties of the gel (viscosity and retrogradation). Then, it was studied the functional properties of these modified starches as fat replacer in mayonnaise. Results have shown that the physico-chemical characteristics of these modified starches were depended on factors, such as starch type, degree of substitution and type of substituent group. Analyzing the texture of the mayonnaise, it was selected two modified starches that best substituted fat: hydrolyzed cassava starch cross-linked with 0.05% of

phosphorus oxychloride and acetylated with 8% of acetic anhydride and hydrolyzed waxy corn starch acetylated with 4% of acetic anhydride.

In a second phase it was tested different methods of starch esterification. Among all, it was chosen esterification with carboxylic acids in dicyclohexylcarbodiimide and dimethylsulfoxid. Hydrolyzed cassava starch esterified with lauric acid gave the best result as a fat substitute.

The best fat substitutes were then characterized according to their pasting and thermal transition properties, x-ray diffraction patterns, and their structure. These modified starches were also submitted to a biological assay with rats and to a sensory evaluation.

The *in vivo* studies showed a normal metabolism and no toxicity to organism in all rats fed with diets containing fat substitutes.

According to the sensory analyses, the acid-hydrolyzed cross-linked acetylated cassava starch was the best fat substitute. Although, the results have shown that the use of only one substitute is not sufficient to replace all the sensory attributes of fat.

I. INTRODUÇÃO

Organizações ligadas à saúde nos Estados Unidos, como a "American Heart Association" e a "Surgeon General" e outras organizações ligadas recomendam que apenas 30% das calorias ingeridas pelo homem sejam provenientes da gordura, sendo que deste total, apenas 10% de gorduras saturadas (GIESE, 1996). Em estudo realizado nas cidades de Campinas, Rio de Janeiro, Goiânia, Ouro Preto e Curitiba no ano de 1996/1997, GALEAZZI et al. (1997) observaram que embora a proporção de consumo de gordura ficasse ao redor ou abaixo de 30% do consumo de energia, há um consumo desproporcional de gordura saturada e de colesterol.

A ingesta de uma dieta rica em gordura está associada com o aumento da obesidade e com as alterações decorrentes desta. Estudos clínicos e experimentais fornecem evidências da relação entre consumo de gordura saturada, e alta taxa de colesterol sangüíneo e doenças coronárias (GIESE, 1996; EASTMAN, 1994).

A gordura, entretanto, é um nutriente indispensável e nos alimentos desempenha ainda um papel funcional e sensorial: é responsável pela estabilidade, palatabilidade, "flavor", textura, estrutura, brilho, aroma, cremosidade e sensação de saciedade (GIESE, 1996).

Em decorrência da preocupação de se reduzir o consumo de gorduras, sem alterar a qualidade e as características sensoriais do produto, tem-se procurado

desenvolver substitutos que imitem as propriedades organolépticas e funcionais da gordura (GIESE,1996). A maioria dos ingredientes que promovem a substituição parcial ou total da gordura nos alimentos pode ser classificada em três principais categorias: substitutos à base de proteínas, substitutos à base gorduras (compostos sintéticos) e substitutos à base de carboidratos. De acordo com EASTMAN (1994), os derivados de vários tipos de amido têm-se mostrado os mais promissores substitutos de gordura. Segundo GIESE (1996) os amidos podem sofrer várias modificações com a finalidade de serem usados como substitutos de gordura: hidrólises ácidas e/ou enzimáticas ou modificações químicas, incluindo ligações cruzadas e substituições.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes modificações químicas (hidrólise ácida, acetilação, intercruzamento, esterificação com ácidos graxos de cadeia linear) na estrutura, nas características físico-químicas e nas propriedades funcionais, sensoriais e nutricionais de amidos de milho normal e ceroso e amido de mandioca, quando utilizados como substitutos da gordura.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SUBSTITUTO DE GORDURA

Segundo CÂNDIDO & CAMPOS (1996), com base nas orientações do Calorie Control Council de Atlanta, Estados Unidos (1993), o substituto de gordura ideal deve ser um composto de reconhecida segurança para a saúde e que apresente todas as propriedades funcionais e organolépticas das gorduras com significativamente menos caloria. Para o conselho, as propriedades mais importantes das gorduras são: estabilidade térmica, emulsificação e aeração, lubricidade, além de contribuírem com sabor, cor e a capacidade de espalhar.

A maioria dos ingredientes que promovem a substituição parcial ou total da gordura nos alimentos pode ser classificada em três principais categorias: substitutos à base de proteínas, substitutos à base gorduras (compostos sintéticos) e substitutos à base de carboidratos (Tabela 1).

O uso de cada um destes substitutos dependerá do tipo de alimento, do nível de substituição e da quantidade inicial de gordura (ANON, 1990). De acordo com EASTMAN (1994), os derivados de amido de vários tipos têm-se mostrado os mais promissores substitutos de gordura.

Tabela 1: Classificação dos Substitutos de Gordura

Relacionados aos lipídeos	Relacionados às proteínas	Relacionados aos carboidratos
• Caprenina • Ésteres de ácidos graxos com sacarose • Mono e diésteres de propilenoglicol • Ésteres de ácidos policarboxílicos • Malonato de dialquil dihexadecil • Glicerol propoxilado esterificado • Ésteres de políglicerol • Éteres • Polímeros de silicone • Óleo de jojoba • Triacilgliceróis de cadeia média • Triacilgliceróis estruturados • Sorbestrin	• Proteína microparticulada • Proteínas modificadas texturizadas • Proteínas derivadas do leite • Proteínas da soja • Gelatina	• Polidextrose • Amidos: amido microcristalino, amidos modificados e maltodextrinas • Pectinas • Inulina • Goma carragena; locusta; guar; arábica; konjac; xantana; gelana • Celulose; derivados de celulose

Fonte: CÂNDIDO & CAMPOS (1996).

2.2. PROPRIEDADES DOS SUBSTITUTOS À BASE DE CARBOIDRATOS

Os substitutos à base de carboidratos são derivados de cereais, grãos e plantas. Estes compostos podem incluir tanto complexos formados por carboidratos digeríveis pelos humanos quanto complexos não digeríveis (GLICKSMAN, 1991).

Os produtos relacionados aos carboidratos atuam como substitutos de gordura por estabilizarem grandes quantidades de água em uma estrutura de gel cujos resultados em termos de propriedades lubrificantes e de fluxo são semelhantes às dos lipídeos. Muitos dos substitutos baseados em carboidratos são compostos macromoleculares, que originam géis poliméricos que, além de reter água, atuam conferindo corpo ao alimento. Como e quando a água será liberada na cavidade oral dependerá do tipo específico do substituto e da interação com outros ingredientes. A forma de ligação com a água determinará, também a textura e aparência do alimento (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996).

2.2.1. Uso do Amido como Substituto de Gordura

Segundo EASTMAN (1994) e GIESE (1996), derivados de amidos podem sofrer várias modificações com a finalidade de serem usados como substitutos de gordura. Os amidos podem ser modificados de modo a melhorar sua estabilidade a frio, melhorar suas características de pasta e/ou textura do gel, obter

características de emulsificante, através da adição de grupos hidrofóbicos (ALEXANDER, 1995).

As alterações podem ser feitas através de modificações químicas (hidrólises ácidas e/ou enzimáticas, ligações cruzadas, esterificações, oxidações, etc.), modificações físicas (gelatinização), e/ou modificações genéticas (amido de milho ceroso, amido com alto teor de amilose) (BeMILLER, 1997). Em processos onde são necessários altas concentrações de amido, porém com uma viscosidade compatível com o processamento, o tamanho molecular do amido pode ser reduzido por tratamentos ácidos ou oxidativos e, então, estabilizados com derivatizações como a acetilação, por exemplo. De acordo com CÂNDIDO & CAMPOS (1996), entre os principais tipos de amidos modificados utilizados como substitutos de gordura estão: fosfato de diamido, fosfato de diamido fosfatado, fosfato de diamido acetilado, e adipato de amido acetilado.

Quando amidos são hidrolisados por ácidos, ocorre uma desintegração dos grânulos e formação de partículas menores com pesos moleculares intermediários (PM entre 10^3 a 10^6), as quais são capazes de associarem-se e formarem gel, quando dispersas em água (ALEXANDER, 1995, GIESE, 1996). As partículas que formam o gel possuem uma grande área superficial e um certo grau de imobilização de água responsável pela reprodução da sensação na boca, inclusive textura, semelhante à da gordura (PSZCOLA, 1991).

De acordo com EASTMAN (1994), os resíduos decorrentes da hidrólise do amido tendem a associar-se e formar microcristais. São essas associações,

formadas por resíduos lineares de amilose e amilopectina que, aparentemente, possibilitam ao hidrolisado apresentar propriedades semelhantes às das gorduras.

HARRIS & DAY (1993) estudaram a estrutura e as propriedades funcionais de um substituto de gordura produzido à partir de amido submetido à hidrólise ácida. Estes autores observaram que o amido modificado era composto de estruturas cristalinas formadas por amilodextrinas ramificadas com tamanho de 1 μ m. Segundo estes pesquisadores, a imobilização da água na superfície desses microcristais possibilita a formação de uma fase contínua que confere a sensação de cremosidade das gorduras em alimentos.

Freqüentemente, a estrutura do amido é reforçada com a aplicação de ligações cruzadas de modo a melhorar a resistência ao cisalhamento durante o processamento e a textura do produto. De acordo com JAROWENKO (1989), amidos com ligações cruzadas são mais resistentes a baixos pH e ao cisalhamento, perdendo porém, a claridade e a capacidade de retenção de água (aumento da sinerese) durante o envelhecimento. Segundo WURZBURG (1964), quando ocorre a formação de ligações cruzadas, as pontes de hidrogênio responsáveis pela integridade dos grânulos são reforçadas pelas ligações químicas. Quando grânulos de amidos nativos são aquecidos na presença de água quente, as pontes de hidrogênio são enfraquecidas e a viscosidade aumenta até um máximo. Mantendo-se o aquecimento, as ligações se rompem, os grânulos colapsam e desintegram, e a viscosidade cai. Quando os amidos são intercruzados os grânulos incham, uma vez que as pontes de hidrogênio são

enfraquecidas, entretanto, após a ruptura, as ligações cruzadas podem promover suficiente integridade ao grânulo, de modo a prevenir a perda da viscosidade.

De acordo com JAROWENKO (2000), a introdução de grupos acetil aumenta a estabilidade a frio das dispersões coloidais de amido. No caso de substitutos de gordura, além de melhorar a estabilidade, a introdução destes grupos hidrofóbicos ajudariam na formação da emulsão.

Através de reação com o óxido de propileno, o amido pode ser modificado (amido hidroxipropilado) de modo a obter uma maior estabilidade a frio, uma maior claridade, além de uma melhor textura da pasta, podendo ser usado como substituto de gordura.

Segundo BeMILLER (1997), a esterificação de amidos com ácidos graxos de cadeia linear conferem ao derivado características hidrofóbicas e propriedades emulsificantes.

2.3. SUBSTITUIÇÃO DA GORDURA

YACKEL & COX (1992) sugerem que as propriedades dos substitutos de gordura são decorrentes de associações da água com as partículas dos carboidratos. Logo, o substituto ideal teria que possuir uma estrutura cuja superfície tivesse fortes interações com a água de modo a propiciar a sensação que é identificada na cavidade oral com a reologia da gordura.

Segundo GIESE (1996) os amidos substitutos de gordura funcionam melhor em sistemas com alta umidade tais como maionese, molhos para saladas, espalhantes com baixo teor de gordura e em emulsões cárneas. Os amidos modificados também podem ser utilizados em produtos de panificação, como bolos; entretanto não são recomendados para sistemas com baixo teor de umidade como "cookies" e "crackers".

Emulsões óleo-água como maionese, por exemplo, compreendem uma fase dispersa contendo substâncias graxas tais como óleos vegetais e um ou mais agentes emulsificantes; além de uma fase aquosa contínua, contendo os acidificantes, adoçantes, estabilizantes/espessantes, conservantes, flavorizantes e sal.

Dependendo do produto, a quantidade da fase dispersa pode variar: maioneses comercialmente disponíveis possuem um conteúdo de óleo ou gordura na faixa de 50-80% (POULSEN et al., 1994). Em molhos também existe uma proporção razoavelmente alta de óleo disperso em água.

O alto teor de gordura presente nestes tipos de produtos faz com que se torne desejável, do ponto de vista nutricional, desenvolver um produto com teor de gordura significativamente reduzido.

De acordo com SCHOENBERG (1990), uma alta viscosidade, resultante do empacotamento dos glóbulos de gordura da fase dispersa é uma qualidade desejável na maionese porque produz um alto nível de estabilidade. Quando produtos formados por emulsões com quantidades reduzidas de gordura e maior

quantidade da fase aquosa são produzidos, maior quantidade de agentes espessantes/estabilizantes, principalmente na forma de misturas de amidos modificados e gomas vegetais são necessários para obter as características inerentes ao produto. A quantidade de tais agentes dependerá do conteúdo de gordura e da viscosidade desejada (POULSEN, 1994).

Muitas vezes, um único substituto não é suficiente para reproduzir a variedade de atributos associados à gordura nos alimentos (YACKEL & COX, 1992; ALEXANDER, 1995). Os substitutos de gordura a base de carboidratos além de afetarem a viscosidade, podem inibir a difusão de algumas moléculas, mudando a volatilidade dos compostos responsáveis pelo flavor e pelo aroma (KILARA, 2000).

Segundo GLICKSMAN (1991) apud CÂNDIDO & CAMPOS (1996), o sistema para substituição de gorduras deve ser composto de três ingredientes: um agente espessante para controle de fluxo e lubricidade; um agente de corpo solúvel para controlar a adsorção/absorção do alimento nos receptores da língua e um agente microparticulado, geralmente insolúvel para proporcionar suavidade (smoothness). Segundo YACKEL & COX (1992), a formulação de produtos com baixo teor de gordura requer a reformulação dos produtos tradicionais, algumas vezes com a adição de um novo ingrediente. O substituto de gordura deve conferir uma ou várias características sensoriais tais como cremosidade e maciez. O corpo, aderência e firmeza do produto podem ser desenvolvidos com a adição de maltodextrinas, xaropes de milho e gomas. Emulsificantes são adicionados para

interagir com os carboidratos e proteínas a fim de modificar a maciez, reduzir a retrogradação e conferir lubrificação. Os flavorizantes são adicionados para substituir o perfil propiciado pelos óleos e gorduras (YACKEL & COX, 1992).

2.4. ANÁLISE DA ESTRUTURA DO SUBSTITUTO DE GORDURA

Para a obtenção de informações sobre a estrutura dos amidos substitutos de gordura podem ser utilizados os seguintes métodos: análise calorimétrica diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura, difração de raio-x, cromatografia de permeação em gel, ressonância magnética nuclear, espectrofotometria de infravermelho.

2.4.1. Espectrofotometria de Infravermelho

A espectrofotometria de infravermelho é útil na medida do grau de substituição (esterificação) dos amidos modificados (PHILLIPS et al. 2001; CHAN et al., 2001). De acordo com SILVERSTEIN et al. (1994), os ésteres possuem duas bandas características de absorção na região do infravermelho, bastante intensas, provenientes das deformações axiais de C=O e C-O. A vibração de deformação axial das ligações C=O ocorre na região entre 1735 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} gerando uma banda intensa para ésteres alifáticos e a vibração de deformação axial das ligações C-O ocorre com frequência próxima a 1240 cm^{-1} , gerando uma banda de intensidade média, para ésteres provenientes de álcoois alifáticos.

Segundo MARCAZZAN et al. (1999), os espectros de amidos, amilose e amilopectina apresentam uma banda característica a 1023 cm^{-1} , devido provavelmente ao estiramento das ligações C-OH, que não têm sua intensidade afetada pela esterificação, podendo ser tomada como padrão interno.

2.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN C^{13}) pode ser utilizada com a finalidade de se verificar em qual carbono dos monômeros de glicose a modificação química dos amidos ocorre preferencialmente (Figura 1). Através deste método pode-se também verificar o grau de substituição destes amidos modificados (PHILLIPS et al., 2001, e CHAN et al., 2001).

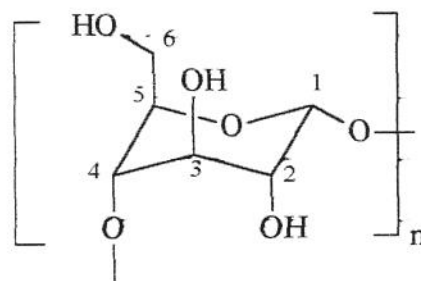


Figura 1: Estrutura dos monômeros de glicose com a numeração dos carbonos constituintes.

Segundo GIDLEY et al. (1995) a ressonância magnética nuclear (NMR) ainda pode ser utilizada para avaliar as características de hélices ordenadas e cadeias não ordenadas, e para estimar o conteúdo de dupla hélice nas amostras de amidos sólidos. Esta mesma técnica pode ser usada para testar se outros compostos, como por exemplo lipídeos estão presentes dentro da hélice simples de amilose.

2.4.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura pode ser usada para verificar as propriedades térmicas das regiões cristalinas e amorfas dos grânulos de amidos (LIM et al., 2001). Quando os grânulos são aquecidos com grandes quantidades de água, a penetração da água nas regiões amorfas e o inchamento destas regiões são limitadas uma vez que as cadeias de carboidratos das regiões amorfas esbarram nas zonas cristalinas. Isto restringe a movimentação das cadeias, dificultando a penetração de água e o inchamento. Em temperaturas suficientemente altas (em torno de 60-70° C, para a maioria dos amidos), os cristais se desestabilizam pela movimentação térmica e pelas forças de inchamento, se rompem ou fundem, com simultânea perda de birrefringência. O calor absorvido (transição endotérmica) pode ser observado através da calorimetria diferencial de varredura (DSC). Quando pequenas quantidades de água estão presentes, as forças de inchamento são muito menos significantes, e

os cristais fundem em temperaturas muito mais altas que a temperatura de gelatinização (DONAVAN et al., 1983).

O tipo de transformações físicas e químicas que ocorre quando os alimentos são aquecidos ou processados é dependente da quantidade de água presente, da temperatura e do tempo de aquecimento. Em temperaturas baixas, as moléculas do amido ficam imóveis, em um estado vítreo. Quando energia térmica é aplicada, a mobilidade molecular aumenta, e elas deslizam-se uma sobre as outras. Neste ponto, o polímero torna-se viscoso, flexível. Esta mudança física reflete o aumento na mobilidade das moléculas e é chamado de transição vítrea, ZELEZNAK & HOSENEY (1987). Segundo EERLINGEN et al. (1993), a cristalização das regiões amorfas do amido só pode ocorrer entre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m) dos cristais. De acordo com estes autores, géis de amidos tipo-B contendo mais do que 27% de água possuem uma T_g de -5°C e uma T_m de 150°C . Ainda, segundo ZELEZNAK & HOSENEY (1987), a presença na moléculas de grupos volumosos, de ligações cruzadas entre as cadeias ou de cristais, diminuem a mobilidade das cadeias, aumentando a T_g . Por outro lado, a presença de grupos laterais flexíveis diminuem a T_g .

De acordo com SIEVERT et. al., (1991), as mudanças de entalpia observadas através da calorimetria diferencial de varredura geralmente são relacionadas a transições do tipo ordem/desordem dos cristais, presentes em extensos arranjos ordenados internos e em regiões de menor ordem cristalina do grânulo. Cristais de amilose e amilopectina possuem temperaturas de fusão

distintas, sendo menor que 100°C para amilopectina e por volta de 150°C para amilose (ELIASSON, 1985; BILIADERES, 1991).

BILIADERIS (1991) sugeriu que as respostas térmicas do DSC estão diretamente relacionadas com o número de hélices presentes no grânulo de amido, sem considerar sua organização terciária. De acordo com este conceito, hélices com nenhum registro cristalográfico também requerem energia para fusão e, por esta razão, são detectáveis termicamente. Transições endotérmicas de fusão em complexos amorfos amilose-lipídeos e amilose-álcool, por exemplo, já foram observadas em termogramas feitos por DSC.

2.4.4. Difração de Raio-X

A técnica de difração do raio-x detecta as repetições ordenadas regulares das hélices, refletindo a ordem tridimensional dos cristais do amido; através desta classificação pode-se agrupar a maioria dos amidos de acordo com suas propriedades físicas (BARRON et al. 2001; GALLANT et al., 1992). Esta técnica é o melhor método para estimar a cristalinidade; entretanto para efeito de comparação, todas as amostras analisadas precisam conter a mesma quantidade de água. Além disto, a difração de raio-x somente detecta cristais agregados em dupla hélice (COLONNA et al., 1992).

Segundo DAVIS (1994), os grânulos de amido contêm regiões amorfas e cristalinas. As regiões amorfas são constituídas tanto pela amilose, que é quase

completamente amorfa, quanto pela amilopectina, que possui regiões amorfas e regiões altamente ordenadas em estruturas cristalinas. Grânulos nativos de amido possuem uma cristalinidade variando de 15 a 45% (ZOBEL, 1988). Nos amidos, as cadeias moleculares organizadas em estruturas cristalinas se apresentam em três formas ou arranjos: os padrões A, B e C. Geralmente os amidos de cereais, e amidos de mandioca apresentam um padrão tipo A. Amidos de batata, banana, alguns tubérculos, amidos retrogradados, bem como alguns amidos ricos em amilose (amilomaize) apresentam padrão tipo B. Amidos presentes em algumas sementes apresentam padrão tipo C (GALLANT et al., 1992; LII et al., 1982).

Os padrões A e B diferem entre si quanto à forma dos cristais e quanto ao conteúdo de água. Os amidos tipo B são formados em órgãos de plantas oriundas de ambientes com alta umidade e baixa temperatura. Em baixas condições de umidade e altas temperaturas, os amidos tipo B podem ser convertidos irreversivelmente para amidos tipo A, devido à falta de água e à reorganização das duplas hélices. A passagem do padrão A para o B só é possível se os grânulos de amido forem inteiramente destruídos e então recristalizados em um novo sistema que possuirá nível diferente de organização (COLONNA et al., 1992; GALLANT et al., 1992).

Uma vez que a estrutura do padrão A, termodinamicamente mais estável, parece ser mais densa do que o padrão B, seria esperado que o padrão A demonstrasse maior resistência ao ataque enzimático. Entretanto observa-se que os grânulos de amido que apresentam padrão de difração tipo B e C tendem a ser

mais resistentes a amilases pancreáticas (GALLANT et al., 1992; ENGLYST et al., 1992).

Segundo GALLANT et al.(1992) o padrão de difração tipo C pode ser formado pela mistura de grânulos com padrão cristalográfico A e com padrão cristalográfico B; ou ainda, existiria a possibilidade de que coexista, internamente nos grânulos, os dois padrões citados.

Após a gelatinização dos grânulos de amido, um padrão tipo V pode aparecer. Este padrão é devido às frações de amilose que se complexam com ácidos graxos, fosfolipídeos ou outras moléculas polares (ENGLYST et al., 1992).

2.4.5. Cromatografia por Exclusão

Outra técnica que permite a obtenção de dados sobre as características dos derivados de amidos é a cromatografia por exclusão ou permeação em gel. Quando aplicada a uma série homóloga de polímeros com densidade e formas semelhantes, fornecerá dados que permitem determinar a massa molecular e a forma das macromoléculas presentes (COLLINS et al., 1995). Através da cromatografia de permeação em gel, SINGH & ALI (2000) estudaram a ação da hidrólise ácida em vários amidos. RÍOS et al. (1994) usaram a cromatografia de permeação em gel para verificar a pureza de ésteres de sacarose com ácidos graxos.

2.4.6. Microscopia

A microscopia eletrônica tem sido usada para detectar diferenças estruturais, visualizando a heterogeneidade de amidos de fontes distintas. Através de técnicas de microscopia pode-se estudar também a acessibilidade dos grânulos de amidos à reagentes químicos (GRAY & BeMILLER, 2001). Dependendo do tipo de informação requerida, deve-se usar o microscópio de varredura (SEM) ou o de transmissão (TEM).

Muitos autores, dos quais GALLANT et al. (1992 e 1997), têm apresentado as características estruturais de amidos submetidos a amilólises, através do SEM e do TEM, mostrando que a parte cristalina do grânulo é menos digerida que a parte amorfa, assim como sugerindo que a organização interna do cristal apresenta blocos que resistem diferenciadamente ao ataque enzimático.

2.5. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

Os autores que propõem substitutos de gordura geralmente estudam o efeito fisiológico de seus produtos. Se o produto, tecnicamente aprovado, não alterar o metabolismo lipídico de humanos já representa o primeiro passo. Se tiver ação terapêutica, reduzindo o colesterol, por exemplo, despertará interesse. Todavia, para atingir a certeza da interação com o metabolismo lipídico, necessitaria efetuar o estudo em populações onde a epidemiologia do metabolismo lipídico tenha relações bem estabelecidas com a dieta predominante.

As pesquisas de fato vem evoluindo por estes caminhos. A quase quarenta anos atrás, BOOTH & GROS (1963) observaram baixa digestibilidade e disponibilidade calórica de ésteres de amilose com duas ou mais substituições.

Um estudo que comparou a ingesta de uma dieta rica em lipídeos e outra com um substituto de gordura (ésteres de sacarose com ácidos graxos), observou redução do teor de colesterol plasmático em indivíduos que se alimentaram com reduzido teor de gordura (PATTERSON et al., 2000). Menor taxa de colesterol também foi observada em pessoas que se alimentaram com um substituto de gordura à base de aveia hidrolisada (INGLETT et al. 2000). Recentemente demonstrou-se que a ingesta de substitutos de gordura à base de glicerol esterificado com ácidos graxos de cadeia longa e curta não alteraram o metabolismo lipídico de ratos (NONAKA, 1999), indicando a inocuidade metabólica dos substitutos testados.

Em estudo com substitutos de gordura não absorvidos pelo organismo humano (ésteres de sacarose com ácidos graxos), MOSER & McLACHLAN (1999) observaram aumento na eliminação de contaminantes lipofílicos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATÉRIAS-PRIMAS

Foram usados para o desenvolvimento deste trabalho amido de milho normal, amido de milho ceroso e amido de mandioca fornecidos pela Corn Products LTDA.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Síntese dos Substitutos de Gordura: amido hidrolisado, inter cruzado e/ou acetilado

♦ Amido Hidrolisado por Ácido

A hidrólise ácida dos amidos foi realizada de acordo com metodologia e parâmetros estabelecidos por CÔNSOLE & CAMARGO (1998), com pequenas modificações.

Foram preparadas dispersões aquosas contendo 40% (p/p) de amido de milho normal ou de mandioca, ou 30% de amido de milho ceroso. A estas dispersões foi adicionado quantidade suficiente de ácido clorídrico concentrado (P.A.) para atingir uma proporção de 6:1 e 7:1 (p/p) de água em relação ao ácido, para os amidos de milho normal ou de mandioca e amido de milho ceroso, respectivamente. A hidrólise foi realizada em banho maria a 47°C sob agitação mecânica por 6 horas. Após hidrólise, a dispersão foi ajustada a pH $5,50 \pm 0,20$

com NaOH 1N. O amido foi recuperado por centrifugação (2000 rpm/10min), sendo feita uma lavagem com água destilada, seguida de filtração. O amido foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 45°C durante 24 horas. O controle da hidrólise foi feito através da determinação do Equivalente em Dextrose (DE), expresso como a porcentagem de açúcares redutores, no sobrenadante obtido com a centrifugação. Inicialmente, o pH do sobrenadante foi ajustado ($7,5 \pm 0,2$) com NaOH 1N para posterior determinação do teor de açúcares redutores presente (SOMOGY, 1945).

♦ Síntese de amido acetilado com ligação cruzada.

Para a obtenção do amido intercruzado à partir do resíduo da hidrólise ácida foi utilizado o método descrito por WU & SEIB (1990). Dispersões aquosas do amido hidrolisado a 35% (p/v) com pH ajustado para 11,5 foram misturadas com diferentes concentrações de oxicloreto de fósforo, e deixadas sob agitação por 30 minutos a 25°C. Após este período, foi feita uma lavagem com água destilada, seguida de filtração para a recuperação do amido. A seguir foi realizada a secagem do amido em estufa com circulação forçada de ar a 45°C durante 24 horas.

Para obtenção de amido acetilado à partir do amido hidrolisado e intercruzado foi utilizado o método de WURZBURG (1964). A acetilação foi conduzida em dispersão aquosa, a 47% (p/v), contendo diferentes concentrações de anidrido acético (definidas de acordo com o delineamento experimental apresentado no item 3.2.1.1.) com pH de reação ajustado para 8 através da

adição de NaOH (3%). Trinta minutos após a adição de todo o anidrido desejado, o pH foi ajustado para 4,5 com uma solução de ácido clorídrico 0,5N. Foi feita uma lavagem com água destilada, seguida de filtração para a recuperação do amido. A seguir foi realizada a secagem do amido em estufa com circulação forçada de ar a 45°C durante 24 horas.

As diferentes concentrações de oxicleto de fósforo e anidrido acético foram usadas com o intuito de obter derivados com diferentes proporções de ligações cruzadas e grau de acetilação. Estas concentrações foram definidas através de delineamento estatístico considerando os limites máximo de oxicleto e anidrido acético, que resultam em derivados com ligações cruzadas e grau de acetilação permitidos pela legislação. De acordo com JAROWENKO (1989), amidos modificados com até 2,5% de acetil e 0,1% de oxicleto de fósforo são permitidas pelo Food and Drug Administration (FDA). Segundo WU & SEIB (1990), a acetilação de amidos intercruzados com 8% de anidrido acético implica em um grau de substituição de 0,1 ou uma porcentagem de acetil de 2,5.

3.2.1.1. EFEITO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NOS AMIDOS (AMIDOS HIDROLIZADOS, INTERCRUZADOS E/OU ACETILADOS) NAS SUAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS

Este estudo foi realizado de acordo com um delineamento experimental do tipo composto rotacional central, com dois níveis e três pontos centrais. Foi estudado o efeito combinado das variáveis independentes (porcentagem de

oxicloreto de fósforo e porcentagem de anidrido acético usados) nas propriedades do amido como substituto de gordura. Foram testados os modelos linear e quadrático (NETO et al., 1995).

A Tabela 2 ilustra, para efeito demonstrativo, o delineamento experimental, sendo os limites mínimos de oxicloreto de fósforo e de anidrido acético adicionados iguais a zero e o limite máximo, 0,1% e 8%, respectivamente.

A avaliação do efeito combinado dessas variáveis nos amidos substitutos de gordura foi feita através do teste de formação do gel, da termorreversibilidade do gel, quebra da viscosidade à quente, retrogradação e da dureza/força do gel.

Tabela 2: Delineamento experimental: estudo do efeito combinado das variáveis independentes, porcentagem de oxicleto de fósforo e porcentagem de anidrido acético usados, nas propriedades dos amidos como substitutos de gordura.

Ensaio	Variáveis	
	X ₁	X ₂
1	0,0146	1,170
2	0,085	1,170
3	0,0146	6,828
4	0,085	6,828
5	0,000	4,000
6	0,100	4,000
7	0,050	0,000
8	0,050	8,000
9 (c)	0,050	4,000
10 (c)	0,050	4,000
11 (c)	0,050	4,000

X₁= % de oxicleto de fósforo adicionado; X₂= porcentagem de anidrido acético adicionada.

As propriedades de pasta (quebra da viscosidade e retrogradação) foram determinadas através do Rapid Visco Analyser (RVA), com auxílio do programa "Thermocline for windows", segundo método descrito no manual do fabricante. As medidas no RVA foram feitas utilizando-se 12 g de amido suspensos em 25,0 ml de água (para os amidos sem modificação foram utilizados 2,5g em 25,0 ml de água). A mistura foi agitada a 960 rpm por 10 segundos e a 160 rpm durante o restante do teste. A curva de temperatura seguiu o seguinte perfil:

Tempo	Temperatura
(minutos)	(°C)
00:00	50
01:00	50
04:45	95
07:15	95
11:00	50

Tempo total: 13:00 minutos.

Os parâmetros medidos foram:

- Quebra: valor máximo de viscosidade atingida durante ou logo após a etapa de aquecimento menos a viscosidade final a 95°C, em RVU;
- Retrogradação: viscosidade final à 50 °C menos a viscosidade final a 95°C.

As dispersões de amido submetidas ao ciclo de aquecimento e resfriamento do RVA foram utilizadas para avaliação da formação do gel, termorreversibilidade e força do gel.

Após o ciclo do RVA as pastas formadas foram resfriadas à temperatura ambiente e a seguir resfriadas à 5°C durante aproximadamente 18 horas. Após este período, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente e, então, a formação do gel foi observada visualmente. A força do gel (g), força necessária para se obter uma dada deformação, foi medida no texturômetro TA-TXT2 (probe de alumínio com 25mm de diâmetro, velocidade pré-teste, teste e pós-teste 1 mm/s, distância 12,0 mm).

Para medir a termorreversibilidade, o gel foi fundido e deixado resfriar a temperatura ambiente, a seguir, foi refrigerado a 5°C durante 18h. Após este período foi observado visualmente a formação de gel (CÔNSOLE & CAMARGO, 1998).

3.2.1.2. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (AMIDOS HIDROLISADOS, INTERCRUZADOS E/OU ACETILADOS)

Com o objetivo de se estabelecer um sistema onde fosse possível avaliar as propriedades funcionais dos derivados de amidos quimicamente modificados obtidos de acordo com o delineamento experimental (item 3.2.1.1.), estudou-se o efeito da adição destes na substituição de 50% da gordura da maionese. A

avaliação do efeito das modificações químicas foi feita através de análises de textura: dureza/força da emulsão, definida como o pico durante o ciclo de compressão – “primeira mordida”; e adesividade, definida como a força-área negativa da primeira mordida, representando o trabalho necessário para puxar o probe da amostra. A força/dureza do gel (g) e adesividade (gs) foram medidas no texturômetro (TA-TX2), probe de alumínio com 25mm de diâmetro, velocidade pré-teste, teste e pós-teste 1 mm/s, distância 12,0 mm.

◆ Preparo da Maionese

A maionese foi preparada seguindo a formulação básica apresentada na Tabela 3. Inicialmente, o amido foi gelificado com a água presente na formulação. Após seu resfriamento, o gel foi adicionado à mistura contendo a sacarose, o sal, o vinagre, a gema e a clara. O sistema foi homogeneizado com auxílio de um agitador mecânico (Agitador Fisatom) durante 3 min à 1820 rpm. O óleo foi adicionado lentamente. Uma amostra de maionese com 75% de óleo, e sem a presença de amido, foi utilizada como padrão. As propriedades da maionese (força de penetração e adesividade) foram avaliadas no texturômetro TA-TX2 (probe de alumínio com 25mm de diâmetro, velocidade pré-teste, teste e pós-teste 1 mm/s, distância 12,0 mm). Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste de Tukey. Através deste teste definiu-se quais amostras foram significativamente iguais ($p < 0,05$) à amostra padrão:

Tabela 3: Formulação da maionese, com 50% de substituição do óleo.

Ingrediente	Formulação (%)
Sacarose	1,5
NaCl	1,5
Gema de ovo	3,5
Clara de ovo	3,5
Vinagre	4
Amido modificado*	4,2
Água*	44,3
Óleo*	37,5

* Na formulação da maionese padrão, não houve adição de amido, e o teor de água e óleo foram: 11 % e 75%, respectivamente.

3.2.2. Síntese dos Substitutos de Gordura: amido esterificado com ácidos graxos de cadeia linear (ácido láurico e ácido palmítico)

Inicialmente, os amidos foram hidrolisados com ácido clorídrico, de acordo com o método descrito em 3.2.1. Em seguida, testou-se várias metodologias de esterificação, a saber:

♦ Método 1 (piridina e cloreto do ácido).

Neste método foi avaliado a síntese do éster do ácido graxo à partir do cloreto do ácido (cloreto do ácido palmítico/láurico).

O cloreto do ácido foi preparado à partir da metodologia descrita por RALSTON & SELBY (1939): uma mistura de 2 moles de ácido graxo (láurico ou palmítico) e 2,4 moles cloreto de tionila foi deixada em refluxo por um período de 18 horas, sob agitação constante. O excesso de cloreto de tionila foi, então, removido por destilação.

Para a obtenção do amido esterificado foi utilizado o método descrito por WHISTLER (1945), com algumas modificações. Os ésteres foram preparados tratando-se uma parte de amido hidrolisado, em uma mistura de 4 partes de benzeno e 1,8 partes de piridina, com 6 partes do cloreto do ácido e 4 partes de benzeno por 5 horas à 80°C.

♦ Método 2 (piridina e anidrido do ácido).

O preparo do amido esterificado também foi avaliado através da reação do amido com anidrido palmítico/láurico. Para o preparo do anidrido do ácido, utilizou-se o método de WALLACE & COPENHAVER (1941). Inicialmente foi realizada a purificação do anidrido acético através de uma destilação fracionada (PAQUETTE, 1995). O ácido palmítico/láurico foi, então, refluxado por oito horas em um frasco contendo três equivalentes de anidrido acético. A purificação do anidrido

resultante foi feita através de uma destilação simples, com finalidade de separá-lo do ácido e anidrido acético remanescentes, que teoricamente apresentam ponto de ebulição em 118°C e 138°C. A purificação do anidrido palmítico/láurico também foi avaliada através da cristalização deste composto pela adição de álcool etílico ou éter de petróleo, com abaixamento de temperatura. Testou-se também a purificação através de destilação em aparelho de Kugelrohr (Aldrich Kugelrohr Drive).

Para a obtenção do amido hidrolisado esterificado foi utilizado o método descrito por WOLFF et al. (1951). Em um balão, para cada 2,5ml de piridina, foram misturados 48mg de amido previamente hidrolisado e 770mg do anidrido do ácido. Este material foi deixado em refluxo por 4 dias. O material foi então lavado com etanol absoluto e filtrado.

♦ Método 3 (dicicloexilcarbodiimida, DCC).

Para a obtenção do amido esterificado foi utilizado o método descrito por PANEK & SPARKS (1990), com algumas modificações. Em um balão, foram colocados para reagir, a 0°C; 229,2 mg de dicicloexilcarbodiimida (DCC); 284,9 mg de ácido palmítico ou 278,1 mg de ácido láurico; 93,0 mg de dimetilaminopiridina (DMAP), dissolvida em 100ml de diclorometano. Após 5 minutos, adicionou-se 100,0 mg de amido previamente hidrolisado, dissolvido em 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). O material foi deixado por 24 horas sob agitação mecânica e à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com adição de

água e o material foi purificado através de lavagens com clorofórmio:etanol (50:50) seguidas de centrifugações (4500 rpm, por 10 min).

3.2.2.1. CONFIRMAÇÃO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

Os derivados obtidos foram analisados através de experimentos no espectrofotometro de infravermelho (aparelho Bomem – Série MB).

As amostras foram secas em dissecador à vácuo, misturadas em brometo de potássio desidratado (1:99 mg/mg, respectivamente), prensadas em prensa normal em pastilhas de aproximadamente 2µm de espessura e analisadas.

Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}), com 16 varreduras, velocidade de aquisição de 20 varreduras/min e resolução de 4 cm^{-1} .

♦ Determinação do Grau de Esterificação

O conteúdo de grupos carboxílicos introduzidos nos amidos pela esterificação com ácido graxo foi determinado através da metodologia descrita por MARCAZZAN et al. (1999). Foi feita uma curva de calibração no espectrofotometro de infravermelho, onde se variou o número de ligações éster/unidade de glicose. Para isto, foram feitas pastilhas com quantidades conhecidas de laureato de etila, obtido segundo o método de VOGEL (1978), e de amido.

Os espectros foram adquiridos na região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}), com 16 varreduras, velocidade de aquisição de 20 varreduras/min, e resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.2.2. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS ESTERIFICADOS COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LINEAR.

Com o objetivo de se estabelecer um sistema onde fosse possível avaliar as propriedades funcionais dos derivados de amidos obtidos, estudou-se o efeito da adição de amido hidrolisado e esterificado na substituição de 50% da gordura da maionese.

♦ Preparo da Maionese

A maionese foi preparada segundo a metodologia e formulação descrita em 3.2.1.2. Entretanto, uma vez que os amidos esterificados com ácidos graxos de cadeia linear não gelificam, optou-se pelo uso de 2,6% de amido *in natura* e de 1,6% de amido esterificado, sendo que somente o amido *in natura* foi aquecido com a água presente na formulação. O amido substituto de gordura (amido parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido graxo de cadeia linear) foi adicionado juntamente com a sacarose, o sal, o vinagre, a gema e a clara.

A avaliação do efeito da substituição da gordura, foi feita através de análises de textura, de acordo com a metodologia descrita em 3.2.1.2.

3.2.3. Valor Calorífero dos Amidos Substitutos de Gordura Seleccionados em 3.2.1.2 e em 3.2.2.2.

Quantidades conhecidas de amidos substitutos de gordura seleccionados foram queimadas em uma bomba calorimétrica Parr modelo 1261. O valor calorífero foi definido como a quantidade de calor liberada, em unidade de massa, quando queimada com oxigênio em recipiente hermético com volume constante.

3.2.4. Estudo da Estrutura dos Amidos Substitutos de Gordura Seleccionados em 3.2.1.2. e em 3.2.2.2.

3.2.4.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os experimentos (Ressonância Magnética Nuclear de C^{13}) foram realizados em Aparelho Brucker AC300 – 500MHz a 60°C com tempo de aquisição por pulsos de 0,885 s. Foram testados três tipos de solventes: dimetilsulfóxido, piridina e clorofórmio deuterados. As amostras foram dissolvidas em 0,6 ml do solvente, transferidas para os respectivos tubos de ressonância e deixadas sob rotação, adquirindo sinal por 12 horas.

Os dados obtidos foram convertidos, através da Transformação de Fourier, em espectros de RMN C^{13} com janela espectral de 200 ppm.

3.2.4.2. MICROSCOPIA

As técnicas empregadas para microscopia ótica e eletrônica de varredura foram as de rotina, não exigindo preparações especiais. Amostras de amido foram observadas *in natura* ao fotomicroscópio ótico, sob luz transmitida ou polarizada: pequena quantidade foi colocada sobre lâmina histológica e misturada com glicerol e água (1:1) ou apenas glicerol, com a finalidade de diminuir a refração da luz em torno dos grânulos, além de imobiliza-los gradualmente.

Para detalhamento da superfície do grânulo, as amostras foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura. As amostras de amido, após desidratação à vácuo, foram montadas sob suporte metálico. Para conferir condutividade ao amido, as amostras foram recobertas com ouro em metalizador à vácuo e observadas ao Microscópio de Varredura sob 10 a 15 kv de aceleração. As imagens foram registradas sobre filme e também digitalizadas e arquivadas em CD (compact disc).

3.2.4.3. DIFRACTOGRACOMETRIA DE RAIO-X

O padrão de difração de Raio-x foi obtido utilizando-se um difratômetro de Raio-x URD 6 Carl Zeiss, Radiação de Cu linha K, 40 Kv e 30mA, sendo a velocidade de varredura de 0,1° a cada 5s, sob ângulos (2θ) variando de 5-50°.

A cristalinidade relativa dos amidos, expressa em dm^2 , foi obtida calculando-se a área entre os picos principais e uma linha base (SAHAI & JACKSON, 1996).

3.2.4.4. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os termogramas de DSC foram feitos num aparelho Universal V2.3 da TA Instruments. Amostras de amido (2mg, peso seco) foram pesadas em panelinhas, às quais foram adicionados 6 μl de água. As capsulas foram fechadas hermeticamente e deixadas em repouso por 2 horas a temperatura ambiente antes da análise de DSC. As amostras foram aquecidas de 25 a 200°C, a uma taxa de 5°C/min. A entalpia de transição (ΔH), as temperaturas iniciais (T_0) e temperatura do pico (T_p), foram calculadas pelo computador do sistema.

3.2.4.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO*

Os amidos foram hidrolisados *in vitro* segundo metodologia descrita por ABURTO et al. (1999), com algumas modificações. A uma solução contendo 10ml de tampão fosfato (0,05M) com 0,02% de azida, foram adicionados 100mg de amido (os amidos substitutos de gordura selecionados e os amidos de milho ceroso e de mandioca *in natura*, para efeito de comparação) e 500 unidades de α -amilase. Os tubos foram incubados a 38°C por 72 horas. Após este período foram adicionados 10 ml de tampão contendo 40mg de lipase. Após 72 horas, a mistura

foi aquecida à ebulição por 15 minutos para a inativação das enzimas. O teor de açúcares redutores foi determinado através do método de SOMOGY (1945).

Reservou-se uma alíquota de cada tubo para as análises cromatográficas.

3.2.4.6. ESTRUTURA FINA (CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL)

As soluções de amido hidrolisadas com α -amilase e lipase obtidas conforme metodologia descrita em 3.2.4.5., foram cromatografadas em coluna de gel Sephadex G-5Q (90 cm x 3 cm). A eluição foi realizada em fluxo descendente, usando tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,0, contendo 0,02% de azida de sódio para prevenir crescimento microbiano.

Alíquotas de 2 ml de amostra, após a ação enzimática, foram injetadas no cromatógrafo (Pharmacia) com a utilização de uma bomba que permitiu um fluxo constante de 1,5 ml/min. Foram coletados 4 ml de amostra por tubo.

Em todas as frações coletadas, determinou-se o teor de açúcar total, através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e o teor de açúcar redutor, através do método de SOMOGY (1945), de modo a se obter o grau de polimerização (DP), que foi calculado como sendo a razão entre carboidratos totais/carboidratos redutores das frações à vários volumes de eluição.

As amostras coletadas foram expressas como mg de glicose por 100 mg de polissacarídeo recuperado versus o volume de eluição. Assim, esses padrões

puderam ser comparados, uma vez que cada um correspondeu à 100 mg de polissacarídeo.

3.2.5. Ensaio Nutricional em Ratos com Dietas Contendo os Amidos Substitutos de Gordura Selecionados em 3.2.1.2 e em 3.2.2.2.

Nos dois dias que antecederam ao ensaio, vinte e oito ratos Wistar/Uni recém - desmamados (21 dias), foram alimentados com ração comercial (fase de adaptação). Os animais foram então divididos aleatoriamente em quatro grupos com sete ratos cada, e alimentados durante 16 dias, *ad libitum*, com a respectiva dieta. A constituição e denominação dos grupos foi a seguinte:

- Grupo C (grupo controle): constituído por ratos que receberam dieta AIN93 (Tabela 4).
- Grupo M8: constituído por ratos que receberam dieta AIN93, onde 90% do óleo foi substituído pelo substituto de gordura selecionado, amido de mandioca parcialmente hidrolisado, intercruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético (ensaio 8, M8).
- Grupo W5: os ratos receberam dieta AIN93, onde 90% do óleo foi substituído pelo substituto de gordura selecionado, amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético (ensaio 5, W5).

- Grupo ML: os ratos receberam dieta AIN93, onde 90% do óleo foi substituído pelo substituto de gordura selecionado, amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico.

Tabela 4: Composição da dieta AIN93 (REEVES et al., 1993).

Composto	Quantidade (g/Kg)
amido de milho	397,5
Caseína	200,0
amido de milho dextrinizado	132,0
Açúcar	100,0
óleo de soja	70,0*
Fibra	50,0
mix-vitamínico (AIN-93G)	10,0
mix-mineral (AIN-93G)	35,0
L-cystina	3,0
Bitartarato de colina	2,5
tert-butylhidroquinona	0,014

* Nos grupos M8, W5 e ML 90% do óleo foi substituído pelos amidos substitutos de gordura.

A composição centesimal (umidade, proteína, cinza) das dietas foram verificadas segundo métodos da AACC (1969) N° 44-15A, N° 46-20 e N° 8-17, para determinação do teor de umidade, proteína e cinza, respectivamente. O teor de gordura foi determinado pelo método de BLIGH & DYER (1959). O teor de carboidrato foi determinado por diferença.

O valor calórico total (VCT) das dietas foi calculado levando-se em conta a quantidade de lipídeo, proteína e carboidrato presente em cada dieta.

Água e ração eram administradas a cada dois dias e a quantidade de dieta ingerida e os ratos eram pesados.

Ao décimo sexto dia de experimento os animais foram sacrificados.

Nos os quatro grupos foram realizadas as seguintes análises: os jejunos, íleos, pequena porção dos fígados foram coletados, fixados e preparados para análise ao microscópio eletrônico de varredura (SEM); o sangue e fígado foram congelados para análise do colesterol, HDL e triglicerídeos. As análises de colesterol, HDL e triglicerídeos no sangue e do fígado foram feitas através de reações enzimáticas (kits da LABORLAB).

As amostras do jejuno, íleo e fígado foram fixadas em 4% de paraformaldeído para processamento de rotina e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (SEM) segundo técnicas de BEHMER et al (1976) e SESSO (1998).

3.2.6. Análise Sensorial dos Amidos Substitutos de Gordura Selecionados em 3.2.1.2 e em 3.2.2.2.

Para a avaliação sensorial dos amidos substitutos de gordura, foram comparadas maioneses com 75% de óleo (padrão) e maioneses fabricadas com 50% de substituição da gordura, preparadas de acordo com as metodologias descritas em 3.2.1.2. e 3.2.2.2. Inicialmente, foi feito um Teste de Aceitação: a um grupo de 40 provadores, que receberam aleatoriamente uma amostra de cada vez, devidamente codificada, foi solicitado a avaliação de quanto ele gostou ou desgostou da amostra em termos globais (aparência) de acordo com uma escala hedônica que variava entre desgostei muitíssimo e gostei muitíssimo. Os resultados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de tukey (5% de significância).

Em uma segunda etapa, foi feito o Teste de Diferença do Controle: cada provador recebeu a maionese padrão (especificada com a letra P) e as demais amostras codificadas. A cada provador, foi solicitado avaliar as amostras (cor e textura), comparando-as com a maionese padrão. Os resultados foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de média Dunnett (5% de significância), onde comparou-se a maionese padrão com todas as outras amostras. A escala utilizada para comparação variava entre “nenhuma diferença em relação ao padrão” a “extremamente diferente do padrão”.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AMIDO PARCIALMENTE HIDROLISADO

Todos os amidos substitutos de gordura foram sintetizados à partir do amido parcialmente hidrolisado. A hidrólise ácida foi realizada de modo a obter um equivalente em dextrose (DE) entre 2 e 5.

4.2. AMIDO PARCIALMENTE HIDROLISADO, INTERCRUZADO E ACETILADO

4.2.1. Estudo do Efeito das Modificações Químicas dos Amidos nas suas Propriedades Tecnológicas

As modificações químicas, hidrólise ácida, formação de ligações cruzadas e introdução de grupo acetil, alteraram as propriedades tecnológicas dos amidos (formação do gel, termorreversibilidade do gel, quebra da viscosidade, retrogradação e dureza/força do gel). O comportamento dos amidos modificados durante a gelatinização dependeu do tipo de amido e da extensão de intercruzamento e/ou acetilação, entretanto, todas as modificações permitiram a formação de géis termorreversíveis.

A Figura 2 mostra, por exemplo, a diferença nas propriedades de pasta do amido de milho normal *in natura* e do amido de milho normal hidrolisado, intercruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 4% de anidrido acético (amido

de milho normal ensaio 9 ou N9). Ao comparar os dois amidos observa-se que: a hidrólise ácida foi eficaz na redução da viscosidade a quente, a introdução de ligações cruzadas diminuiu a quebra e a introdução do grupo acetil dificultou a retrogradação, como esperado. A hidrólise causa a ruptura das moléculas dos amidos, diminuindo-lhes o tamanho, enfraquecendo os grânulos, rompendo a estrutura granular, com consequente solubilização de seus componentes. Como resultado, a viscosidade do sol produzido é reduzida, permitindo a utilização de dispersões com maiores concentrações de amido do que as conseguidas com amidos *in natura* (WURZBURG, 1964). De acordo com WURZBURG (1964), quando ocorre a formação de ligações cruzadas, as pontes de hidrogênio responsáveis pela integridade dos grânulos são reforçadas pelas ligações químicas. Segundo JAROWENKO (1989), a introdução de grupos acetil aumenta a estabilidade a frio das dispersões coloidais de amido.

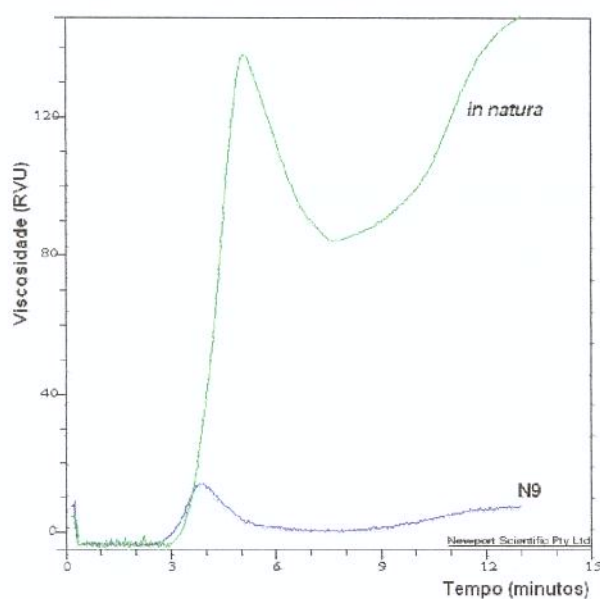


Figura 2: Propriedades de pasta do amido de milho normal *in natura* e do amido de milho normal parcialmente hidrolisado, inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 4% de anidrido acético (amido de milho normal ensaio 9 ou N9).

As Figuras 3 e 4 mostram as alterações nas propriedades de pasta dos amidos de mandioca e de milho ceroso, respectivamente, relacionadas com algumas das modificações químicas realizadas. Ao se comparar o amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilados com 8% de anidrido acético (ensaio 8, M8) com outro hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 (ensaio 7, M7) observa-se uma menor taxa de retrogradação no amido acetilado, indicando uma maior estabilidade a frio (Figura 3). De modo geral, os amidos *in natura* apresentam instabilidade durante o

armazenamento a frio, podendo ocorrer sinereses. A introdução de grupos acetil podem melhorar a estabilidade, além de reduzir a temperatura de gelatinização (JAROWENKO, 1989). Ao se comparar os amidos obtidos nos ensaios M7 e M8 verifica-se que, com a acetilação, a resistência estrutural do amido previamente hidrolisado e inter cruzado diminui, favorecendo assim a quebra da viscosidade.

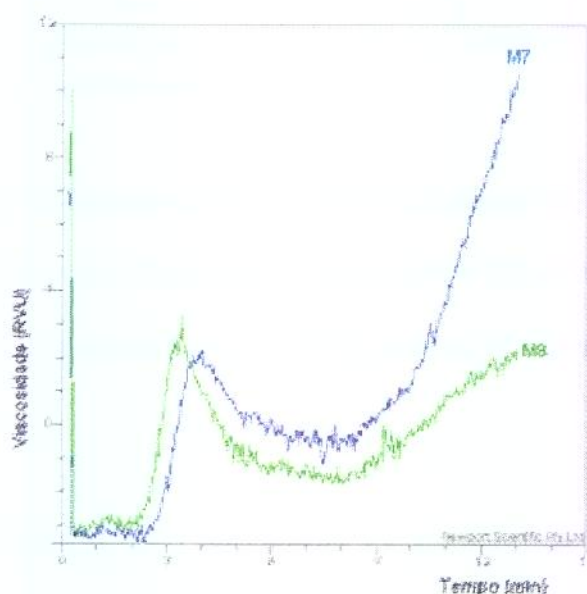


Figura 3: Propriedades de pasta do amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético (ensaio 8, M8) e do amido de mandioca parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 (ensaio 7, M7)

Comparando um amido de milho ceroso hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético (ensaio 5, W5) com outro parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 (ensaio 7, W7), nota-se que a presença das ligações cruzadas provocaram maior resistência ao trabalho mecânico e, conseqüentemente, menor quebra de viscosidade. Já a presença do grupo acetil reduziu a retrogradação (Figura 4).

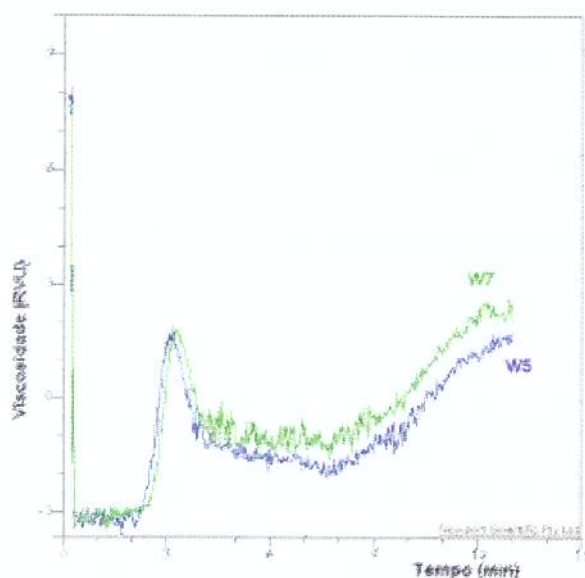


Figura 4: Propriedades de pasta do amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético (ensaio 5, W5) e do amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 (ensaio 7, W7)

Com relação à obtenção de modelos capazes de descrever o efeito combinado das variáveis independentes (porcentagem de oxicleto de fósforo e porcentagem de anidrido acético usados) nas propriedades do amido como substituto de gordura, o amido de mandioca foi o que obteve melhores resultados: através do delineamento experimental realizado com os amidos de mandioca, foi obtido um modelo estatisticamente significativo (90% de confiança), preditivo, porém com alguma falta de ajuste, para a variável resposta força do gel. A equação obtida para a variação na força do gel, obtida de acordo com os coeficientes de regressão foi:

$$\text{Força do gel} = 3863,9^* - 53209,3X + 715823,8X^2 - 159,6Y^* - 16,2Y^2 - 1757,5XY$$

Onde: X= % de oxicleto de fósforo adicionado e Y= % anidrido acético;

* variáveis estatisticamente significativas, a 90% de confiança.

Pela análise da estimativa dos efeitos das variáveis, observou-se que tanto a porcentagem de oxicleto de fósforo quanto a % de anidrido acético adicionadas, foram variáveis significativas, dentro da faixa de variação estudada, na força do gel. A Figura 5 ilustra a variação da força do gel em função das variáveis % de oxicleto de fósforo e % de anidrido acético. Observou-se uma tendência à diminuição da força do gel com o aumento da porcentagem de anidrido acético. Este resultado está de acordo com os encontrados na literatura

(JAROWENKO, 1989) e confirmam a influência da introdução do grupo acetil na estabilização da pasta a frio.

Um outro modelo, estatisticamente significativo (90% de confiança), preditivo, porém com alguma falta de ajuste, foi obtido para a variável resposta quebra de viscosidade (Figura 6). A equação abaixo descreve a variação na quebra de viscosidade em função das porcentagens de anidrido acético e oxicloreto de fósforo adicionados:

$$\text{Quebra} = 67,13^* - 225,48X^* + 2964,59X^{2*} - 1,09Y + 0,25Y^{2*} - 17,47XY^*$$

Onde: X= % de oxicloreto de fósforo adicionado e Y= % anidrido acético;

* estatisticamente significativa, a 90% de confiança.

Derivando-se esta equação em função da concentração de oxicloreto de fósforo, observa-se que a menor quebra de viscosidade ocorreu em X=0,04%.

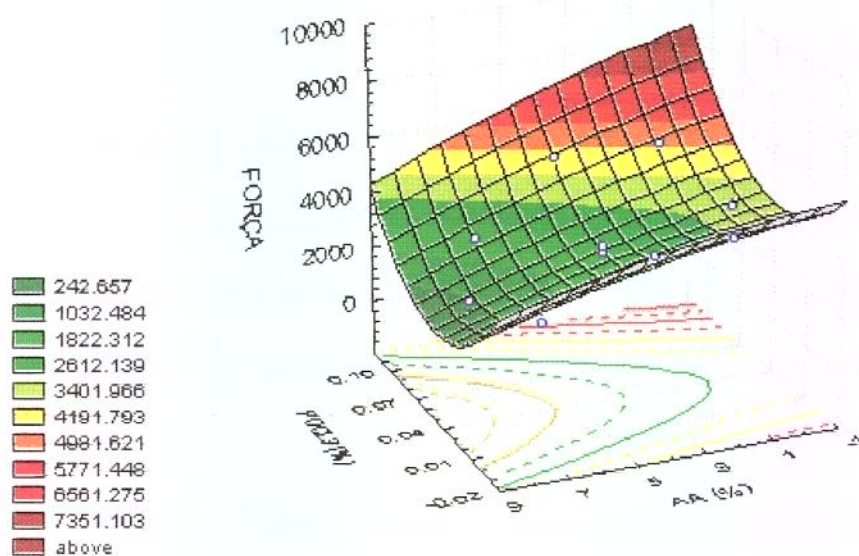


Figura 5: Variação da força do gel em função das variáveis % de oxiclureto de fósforo e % de anidrido acético.

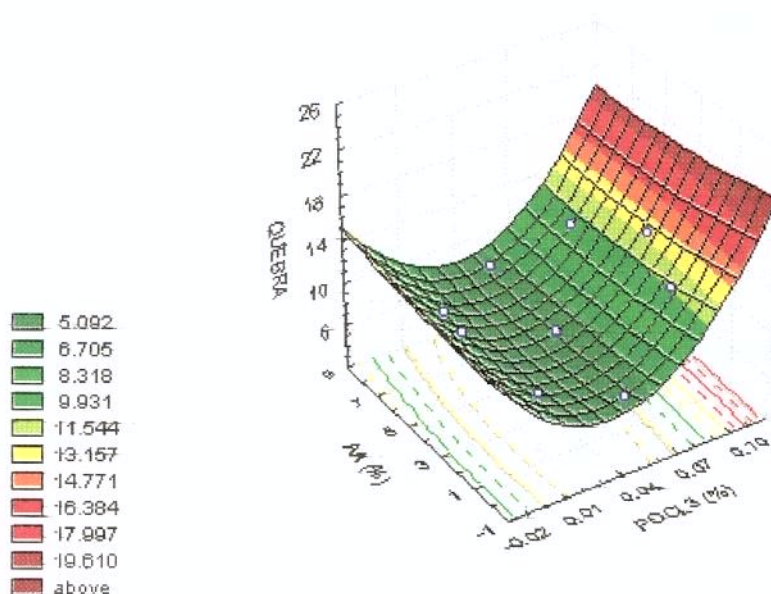


Figura 6: Variação da quebra de viscosidade em função das variáveis % de oxiclureto de fósforo e % de anidrido acético.

4.2.2. Avaliação das Propriedades Funcionais dos Amidos Quimicamente Modificados (hidrolisados, intercruzados e/ou acetilados)

A textura, aparência e sabor são os três principais componentes na aceitação dos alimentos. Analisando as maioneses no texturômetro, pode-se simular, através de uma curva força-tempo, a mastigação do alimento. De acordo com esta curva, pôde-se verificar quais os ensaios com os amidos modificados que mais se aproximaram da maionese usada como padrão (75% de óleo) (Tabela 5, 6 e 7)

Através da análise de variância, (teste de Tukey), da força e adesividade das maioneses, definiu-se quais amostras foram significativamente iguais ($p < 0,05$) à amostra padrão:

◆ Quanto à força de penetração:

- Amido de mandioca com 0,05% de POCl_3 e 8% de anidrido acético (ensaio 8).
- Amido de mandioca com 0,0146% de POCl_3 e 6,8284% de anidrido acético (ensaio 3).
- Amido de milho ceroso com 0% de POCl_3 e 4% de anidrido acético (ensaio 5).

◆ Quanto à adesividade:

- Amido de mandioca com 0,05% de POCl_3 e 8% de anidrido acético (ensaio 8).
- Amido de milho ceroso com 0% de POCl_3 e 4% de anidrido acético (ensaio 5).
- Amido de milho ceroso com 0,10% de POCl_3 e 4% de anidrido acético (ensaio 6).
- Amido de milho ceroso com 0,05% de POCl_3 e 8% de anidrido acético (ensaio 8).
- Amido de milho ceroso com 0,05% de POCl_3 e 4% de anidrido acético (ensaio 9).

Comparando-se os resultados da textura da maionese, observou-se que os derivados amido de mandioca e de milho ceroso, modificados com POCl_3 e anidrido acético, respectivamente, nas proporções de 0,05% de POCl_3 e 8% de anidrido acético (M8) e 0% de POCl_3 e 4% de anidrido acético (W5), foram os melhores substitutos de gordura.

Tabela 5: Força e adesividade da maionese padrão (75% de óleo) e das maioneses fabricadas com os derivados de amido de milho ceroso (W) quimicamente modificados.

Ensaio	Força (g)	Adesividade (mm)
Padrão	28,91 ^a ± 0,76	9,73 ^b ± 0,41
W1	52,97 ± 0,43	9,54 ± 2,00
W2	47,30 ± 1,35	9,99 ± 0,80
W3	20,04 ± 0,63	10,00 ± 0,29
W4	22,87 ± 0,96	9,83 ± 0,52
W5	29,84 ^a ± 0,70	9,98 ^b ± 0,20
W6	32,27 ± 1,06	9,74 ^b ± 1,17
W7	79,11 ± 0,76	9,67 ± 1,50
W8	25,00 ± 0,76	9,58 ^b ± 0,39
W9	23,85 ± 1,03	9,56 ^b ± 0,46
W10	22,97 ± 1,96	9,92 ± 0,80

^a, ^b: não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância em relação à amostra padrão.

Tabela 6: Força e adesividade da maionese padrão (75% de óleo) e das maioneses fabricadas com os derivados de amido de mandioca (M) quimicamente modificados.

Ensaio	Força (g)	Adesividade (mm)
Padrão	$28,91^a \pm 1,80$	$9,73^b \pm 0,30$
M1	$114,082 \pm 3,00$	$9,89 \pm 0,14$
M2	$228,83 \pm 2,66$	$9,88 \pm 1,37$
M3	$31,13^a \pm 3,76$	$9,65 \pm 0,26$
M4	$68,45 \pm 0,24$	$9,96 \pm 0,34$
M5	$125,69 \pm 1,85$	$9,19 \pm 0,00$
M6	$119,56 \pm 4,00$	$9,95 \pm 1,65$
M7	$135,28 \pm 2,05$	$9,39 \pm 2,00$
M8	$26,57^a \pm 2,41$	$8,82^b \pm 1,10$
M9	$39,43 \pm 1,11$	$9,74 \pm 0,10$
M10	$38,33 \pm 1,99$	$9,88 \pm 0,06$

^{a, b}: não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância em relação à amostra padrão.

Tabela 7: Força e adesividade da maionese padrão (75% de óleo) e das maioneses fabricadas com os derivados de amido de milho normal (N) quimicamente modificados.

Ensaio	Força (g)	Adesividade (mm)
Padrão	28,91 $\pm$ 0,00	9,73 $\pm$ 0,45
N1	58,72 $\pm$ 1,76	9,62 $\pm$ 0,77
N3	43,18 $\pm$ 1,46	9,87 $\pm$ 2,74
N4	36,71 $\pm$ 3,01	9,89 $\pm$ 1,80
N5	50,16 $\pm$ 4,00	10,00 $\pm$ 3,15
N6	57,46 $\pm$ 3,45	9,99 $\pm$ 2,16
N7	78,54 $\pm$ 0,70	9,72 $\pm$ 0,41
N8	44,79 $\pm$ 0,76	9,20 $\pm$ 0,27
N9	38,38 $\pm$ 0,90	9,46 $\pm$ 0,92
N10	32,93 $\pm$ 1,39	9,82 $\pm$ 0,21

Amostras significativamente diferentes ($p \geq 5$) em relação à amostra padrão.

4.3. AMIDOS ESTERIFICADOS COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LINEAR

Foram testados vários métodos na esterificação do amido com ácidos graxos de cadeia linear: esterificação com anidrido ou cloreto do ácido em presença de piridina; esterificação com os próprios ácidos em presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC), variando-se o solvente (dimetilsulfóxido ou formamida). Apesar de serem métodos bastante difundidos na literatura, a esterificação dos amidos com os anidridos ou cloreto dos ácidos em presença de piridina mostrou-se trabalhoso, principalmente no que se refere à purificação dos compostos e ao tempo gasto para a esterificação. Definiu-se então, pelo uso do método 3 (DCC), que apesar de ser um método relativamente caro, produz um produto de fácil purificação e uma reação viável, além de ser um método inédito para esterificação de amidos.

4.3.1. Confirmação das Reações de Esterificação

De acordo com SILVERSTEIN et al. (1994), os ésteres possuem duas bandas características de absorção na região do infravermelho, bastante intensas, provenientes das deformações axiais de C=O e C-O. A vibração de deformação axial das ligações C=O ocorre na região entre 1735 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} gerando uma banda intensa para ésteres alifáticos e a vibração de deformação axial das ligações C-O ocorre com frequência próxima a 1240 cm^{-1} , gerando uma banda de intensidade média, para ésteres provenientes de álcoois alifáticos. Tendo em vista que o intervalo de frequências referente à banda de deformação axial C=O é mais

desimpedido e a banda é mais intensa, optou-se por usá-la como referência de análise.

Através de análises no espectrofotometro de infravermelho, observou-se a formação dos ésteres purificados dos amidos com ácido láurico (Figura 7). Quando comparado com o espectro de infravermelho do amido *in natura* (Figura 8), observou-se o aparecimento de uma banda de intensidade média em 1745 cm^{-1} , devido à deformação axial das ligações C=O de ésteres alifáticos. As demais bandas apresentaram uma pequena variação em suas frequências devido à substituição de alguns hidrogênios pelas unidades de ácido láurico. Açúcares apresentam uma banda intensa e larga no infravermelho na faixa de 3800 a 3200 cm^{-1} , devido às hidroxilas, que associam-se por pontes de hidrogênio. Esta banda tende a desaparecer quando todas as hidroxilas são acetiladas. Polímeros de glicose apresentam uma banda intensa em aproximadamente 1023 cm^{-1} , devido à deformação axial de C-OH (SILVERSTEIN et al., 1994).

Não foi possível obter a esterificação do amido com ácido palmítico, fato comprovado pela inexistência da banda de C=O no espectro de infravermelho (Figura 9). Comparativamente, uma unidade de ácido láurico tem 12 carbonos enquanto uma unidade de ácido palmítico tem 16 carbonos. Considerando que a reação com o ácido láurico formou o amido esterificado, é possível que o impedimento estérico gerado pela cadeia maior (4 carbonos a mais) tenha impedido a reação de esterificação.

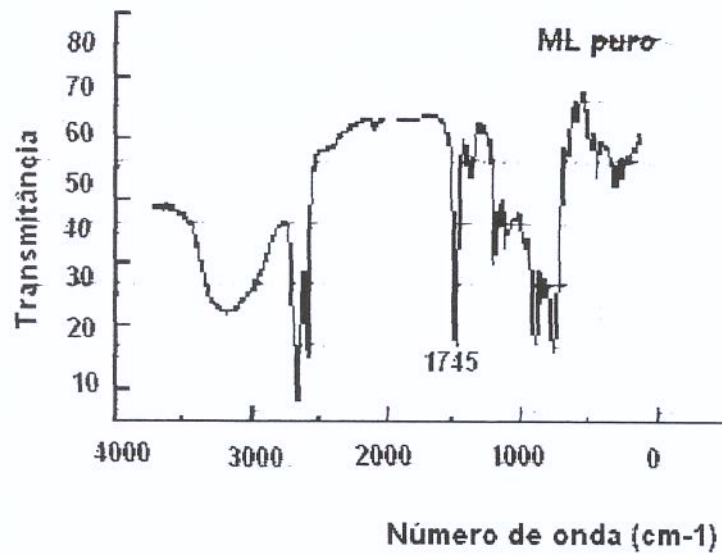


Figura 7: Espectro de absorção infravermelho do amido de mandioca esterificado com ácido láurico purificado (ML puro).

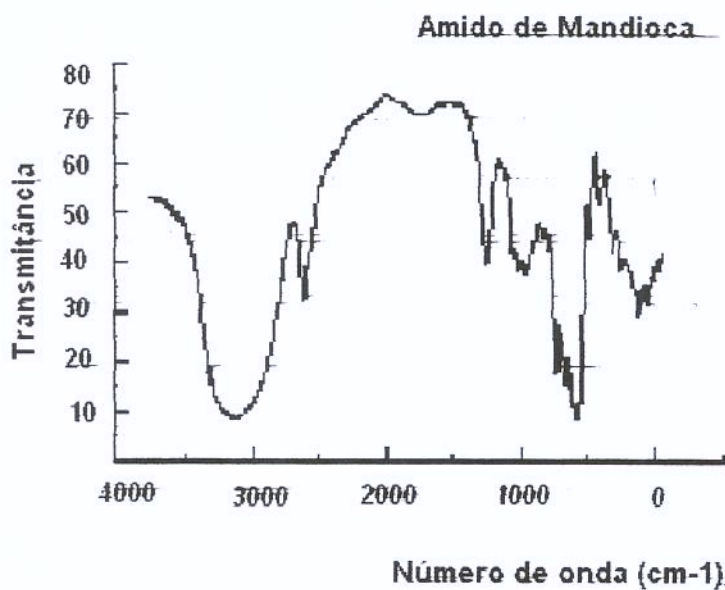


Figura 8: Espectro de absorção infravermelho do amido de mandioca *in natura*.

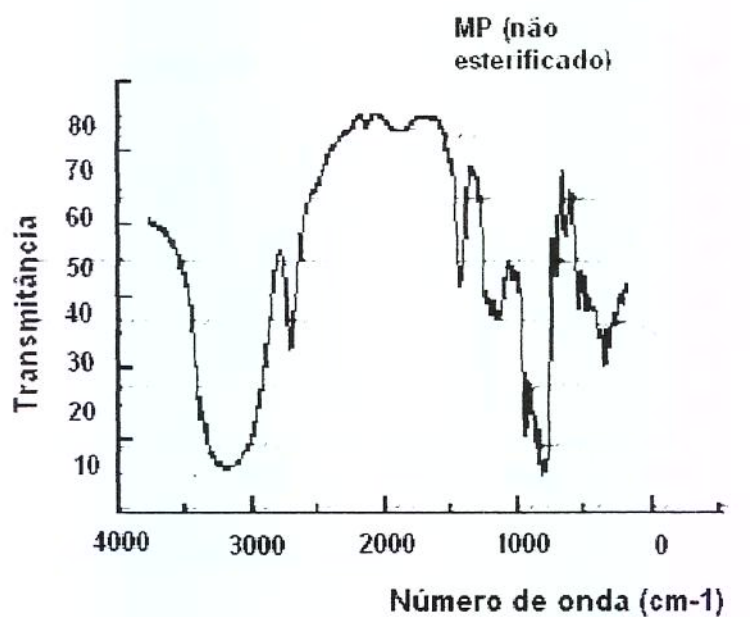


Figura 9: Espectro de absorção infravermelho do produto resultante da tentativa de esterificação do amido de mandioca com ácido palmítico (MP).

◆ Curva de Calibração

Com o objetivo de determinar o grau de esterificação dos amidos, foi traçada uma curva de calibração, à partir do laureato de etila, onde obteve-se a equação da reta:

$Y=0,8199X + 0,3971$; onde:

Y = altura máxima do pico $\sim 1739\text{ cm}^{-1}$ / altura máxima do pico $\sim 1023\text{ cm}^{-1}$; X = número de ligações éster/unidade de glicose.

$R^2 = 0,97$;

A Tabela 8 mostra o número de ligações éster/unidade de glicose de cada amido esterificado com ácido láurico, e dos amidos previamente selecionados para uso como substitutos de gordura, a saber: amido de mandioca, ensaio 8, (parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético = M8), e amido de milho ceroso, ensaio 5 (parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético = W5).

Tabela 8: Número de ligações éster/unidade de glicose dos amidos de milho normal e ceroso e amido de mandioca quimicamente modificados.

Amido esterificado	Número de ligações éster/unidade de glicose
Milho normal +ácido láurico (NL)	0.65 (c)
Milho ceroso + ácido láurico (WL)	0.74 (a)
Mandioca + ácido láurico (ML)	0.73 (b)
Milho ceroso ensaio 5 (W5) ¹	menos de 0.03 (d)
Mandioca ensaio 8 (M8) ²	menos de 0.03 (d)

Análise de variância (teste de tukey): médias com mesma letras são significativamente iguais ($p < 0,05$).

¹ Ensaio 5: amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético.

² Ensaio 8: amido de mandioca parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético.

Observou-se, através da análise de variância, (teste de Tukey), que o amido de milho ceroso obteve o maior grau de esterificação, enquanto que o amido de milho normal, o menor, nas reações de esterificação com ácido láurico, provavelmente devido a diferenças morfológicas/estruturais destes amidos que

dificultariam ou facilitariam a substituição. Já nos amidos acetilados com anidrido acético, o grau de substituição foi bastante baixo, devido ao tempo de reação.

4.3.2 Avaliação das Propriedades Funcionais dos Amidos Esterificados com Ácidos Graxos de Cadeia Linear.

Após as modificações químicas, os amidos esterificados foram usados, com sucesso, na substituição de 50% do óleo da maionese. Entretanto, observou-se que as maioneses fabricadas com os amidos de mandioca esterificado com ácido láurico apresentou os melhores resultados (força de penetração no gel e adesividade do gel) em relação à maionese fabricada com 75% de óleo (padrão) (Figura 10).

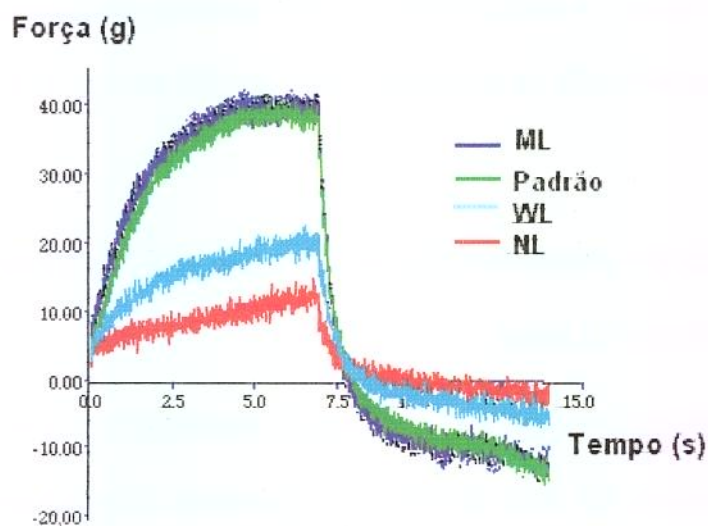


Figura 10: Resultados das análises no texturômetro das maioneses fabricadas com os amidos de mandioca, milho ceroso e milho normal parcialmente hidrolisados e esterificados com ácido láurico (ML, WL e NL, respectivamente) e da maionese padrão (sem substituição do óleo).

Uma vez que os amidos esterificados com ácido láurico não eram miscíveis em água, nem formavam géis, concluiu-se que eles agiriam como emulsificantes, diferentemente dos outros substitutos de gordura selecionados, M8 (amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado e acetilado com anidrido acético) e W5 (amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com anidrido acético), que atuam como substitutos de gordura por estabilizarem grandes quantidades de água em uma estrutura de gel cujos resultados em termos de propriedades lubrificantes e de fluxo são semelhantes às dos lipídeos.

4.4. VALOR CALORÍFICO DOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS

Observou-se que os substitutos de gordura M8 (ensaio 8, amido de mandioca parcialmente hidrolisado e inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético), W5 (ensaio 5, amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético) e ML (amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico) possuem valor calorífico semelhante ao do amido (Tabela 9).

Tabela 9: Valor calorífico do amido, do óleo e dos substitutos de gordura.

AMIDO	CALORIA (KCal/100g)
M8	$360 \pm 0,98$
W5	$370 \pm 0,80$
ML	$710 \pm 0,50$
Amido	$400 \pm 0,16$
Óleo	$900 \pm 0,05$

4.5. ESTUDO DA ESTRUTURA DOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS

4.5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN C^{13}) foi utilizada com a finalidade de se verificar em qual carbono dos monômeros de glicose a esterificação ocorreu preferencialmente. Entretanto, não se conseguiu um sistema em que o amido esterificado fosse satisfatoriamente solúvel, de modo a permitir a análise.

A Figura 11 mostra, através do espectro de RMN C^{13} do amido de mandioca *in natura*, em meio a DMSO- d_6 , os deslocamentos químicos referentes aos seis carbonos que compõem cada monômero de glicose presente no amido. O espectro do amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico apresentou os mesmos sinais que o espectro do amido de mandioca *in natura* (Figura 12). Considerando que os dados dos espectros de infra-vermelho comprovam a reação de esterificação, é possível inferir que o DMSO- d_6 dissolveu apenas algumas moléculas de sacarídeos, que não reagiram, contidos na amostra do amido esterificado com ácido láurico, justificando assim, os espectros com sinais idênticos. Tendo em vista os resultados obtidos, acredita-se que a ressonância magnética nuclear de estado sólido seria mais eficiente na determinação do carbono esterificado.

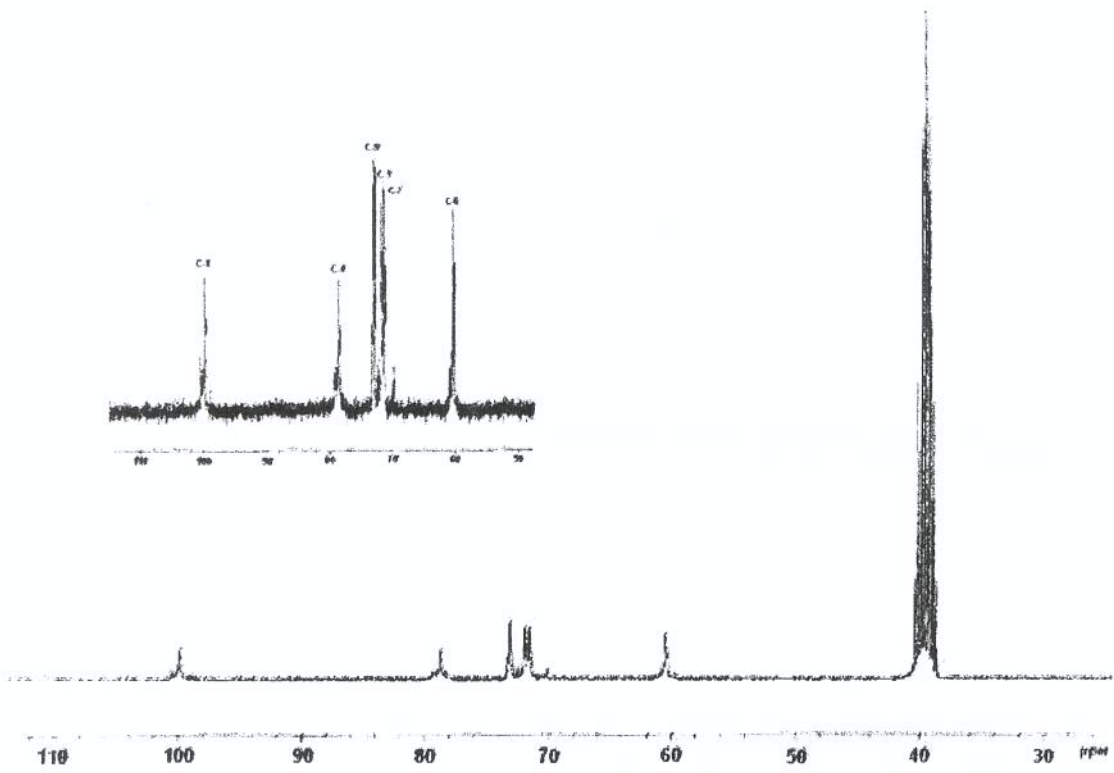


Figura 11: Espectro de carbono do amido de mandioca *in natura*.

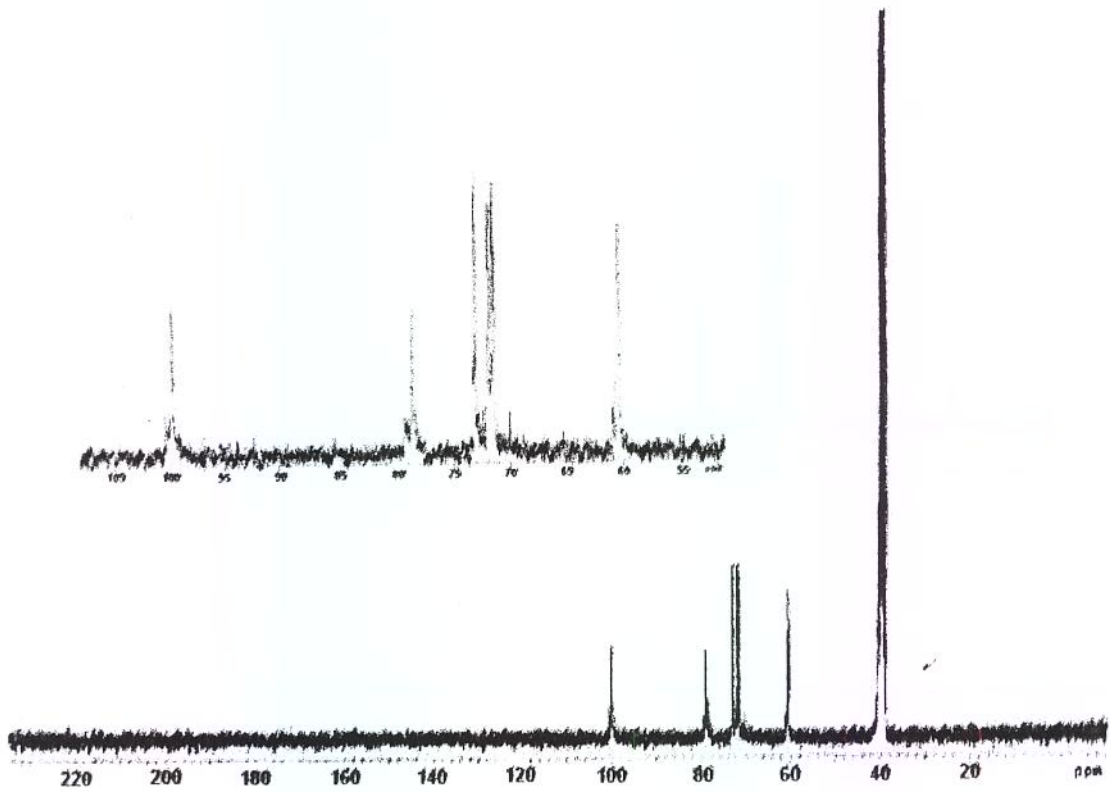


Figura 12: Espectro de carbono do amido de mandioca esterificado com ácido láurico.

4.5.2. Difractometria de Raio-X

Através dos difractogramas de raio-X (Figura 13), observou-se que os amidos de milho, normal e ceroso, e o amido de mandioca apresentaram padrão de cristalinidade tipo A (picos em 2θ igual a 15, 17, 18 e 23), confirmando os resultados observados na literatura (GALLANT et al. (1992); LII et al. (1982) e EERLINGEN et al. (1993). Os amidos modificados M8 e W5 mantiveram o padrão de cristalinidade dos amidos nativos (Figuras 14 e 15). Os amidos esterificados com ácidos graxos (Figura 16) apresentaram padrão de cristalinidade tipo V, possivelmente devido à complexação da amilose com ácidos graxos.

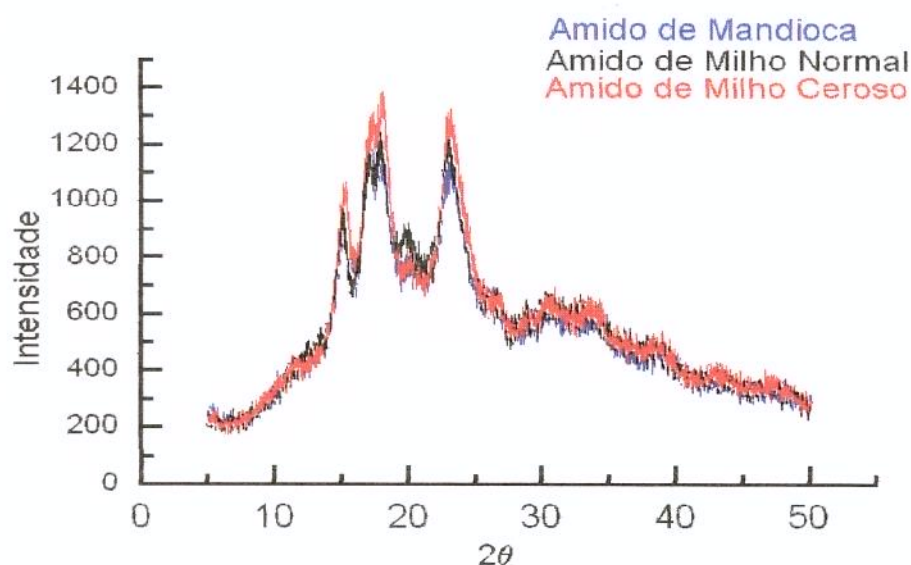


Figura 13: Difractogramas de raio-X dos amidos de milho normal, ceroso e amido de mandioca

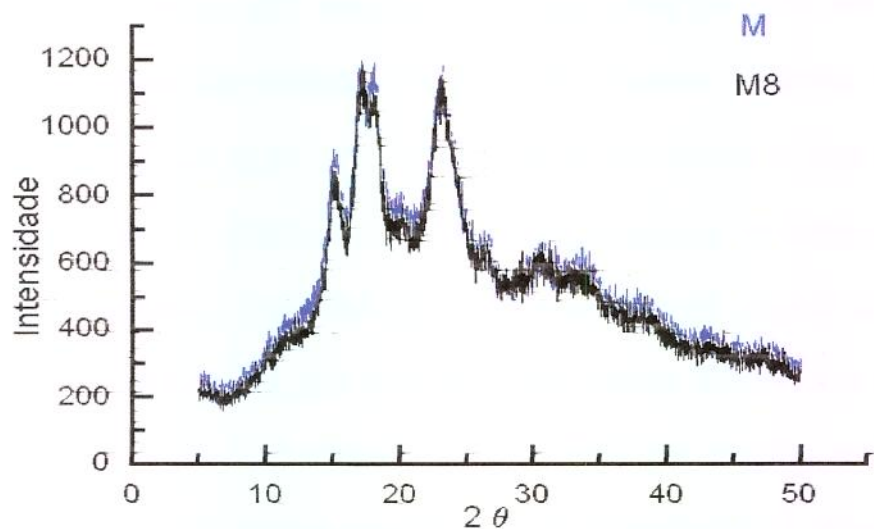


Figura 14: Difractogramas de raio-X dos amidos de amido de mandioca *in natura* (M) e amido de mandioca modificado (M8).

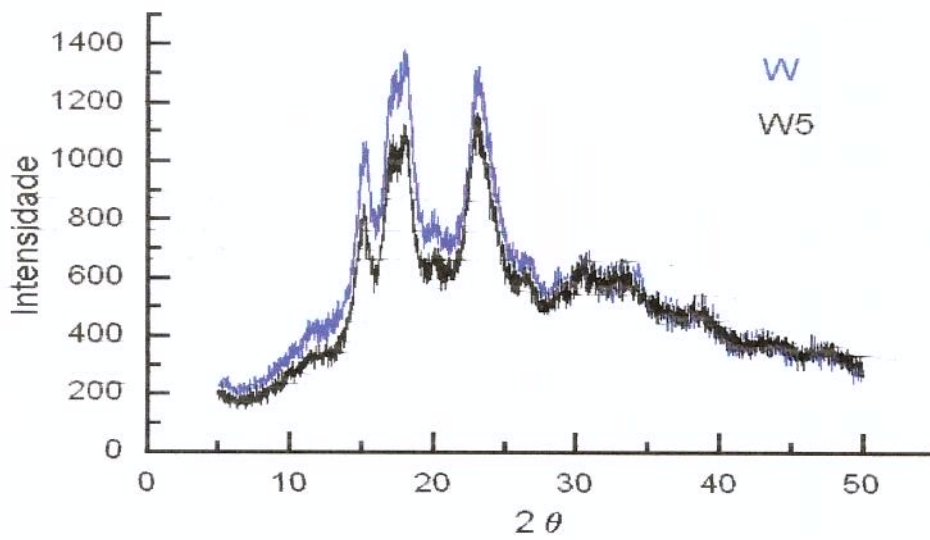


Figura 15: Difractogramas de raio-X dos amidos de amido de milho ceroso *in natura* (W) e amido de milho ceroso modificado (W5).

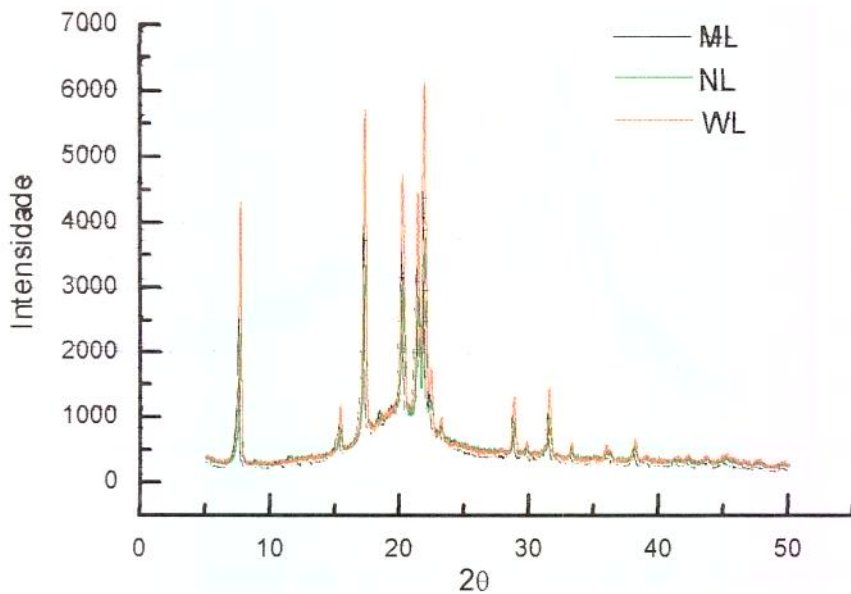


Figura 16: Difractogramas de raio-X dos amidos de mandioca, de milho normal e de milho ceroso parcialmente hidrolisados e esterificados com ácido láurico (ML, NL, e WL, respectivamente).

Além de fornecer informações sobre o tipo de estrutura cristalina presente nos amidos, a análise de difração de raio-x pode fornecer informações sobre a quantidade relativa de regiões cristalinas e de fases amorfas (FRENCH, 1984). Segundo GALLANT et al. (1992), a técnica de difração de raio-x detecta as repetições ordenadas regulares das hélices, refletindo a ordem tridimensional dos cristais do amido; através desta classificação pode-se agrupar a maioria dos amidos de acordo com suas propriedades físicas. De acordo com COLONNA et al. (1992), esta técnica é o melhor método para estimar a cristalinidade.

Pela Tabela 10, pode-se observar a cristalinidade relativa dos amidos estudados. Uma vez que o amido de milho ceroso possui maior quantidade de amilopectina em relação ao amido de mandioca, e, segundo ZOBEL (1988), a amilopectina é a responsável pela parte cristalina do grânulo, seria esperado que o amido de milho ceroso apresentasse uma maior cristalinidade relativa, como comprovado. Os amidos de mandioca M8 e de milho ceroso W5, obtiveram a menor cristalinidade relativa, possivelmente devido à hidrólise ácida a que foram submetidos, que teria destruído parte da região cristalina. Apesar de ter sido submetido às mesmas condições de hidrólise, o amido de mandioca esterificado com ácido láurico apresentou uma cristalinidade intermediária possivelmente devido à complexação das moléculas de amilose com o ácido graxo.

Tabela 10: Cristalinidade relativa dos amidos de milho ceroso (W) e de mandioca (M) *in natura* e dos amidos quimicamente modificados (ML, M8 e W5)

Amostra	Cristalinidade relativa
W	24758,8 (a)
M	23616,6 (b)
ML	23495,6 (c)
M8	22736,9 (d)
W5	22571,2 (e)

Médias seguidas com a mesma letra são estatisticamente iguais (teste de tukey, $p \leq 0,5$).

4.5.3. Microscopia

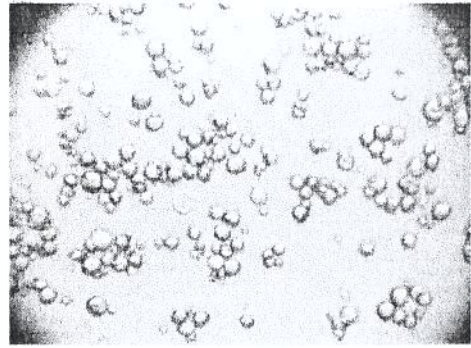
Uma vez que as regiões amorfas e cristalinas apresentam um alto grau de ordem, o grânulo exibe birrefringência, quando sob luz polarizada. Esta birrefringência é frequentemente comparada a uma cruz de malta (Figura 17).

Os amidos de mandioca e milho ceroso *in natura*, os hidrolisados com ácido clorídrico, e os submetidos a modificações químicas: M8 (parcialmente hidrolisados com ácido clorídrico, inter cruzados e acetilados com anidrido acético), W5 (parcialmente hidrolisados com ácido clorídrico, e acetilados com anidrido acético) e ML (parcialmente hidrolisados com ácido clorídrico e esterificados com ácido láurico) foram analisados ao microscópio ótico (Figuras 18 e 19) sob luz sem interferências e sob luz polarizada. Confirmou-se a manutenção da birrefringência sob todos os tratamentos. Os campos fotografados com luz polarizada das amostras M8, W5 e ML são os mesmos expostos à luz sem interferência de filtros (Figura 19) e confirmam que as hidrólises ácidas, e após, o inter cruzamento, a acetilação ou a esterificação foram tratamentos brandos do ponto de vista estrutural, visto que permanece a cristalinidade de grande parte dos grânulos.

Amido de mandioca



(a)

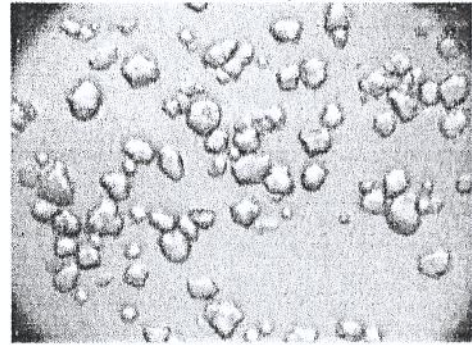


(b)

Amido de milho ceroso



(a)



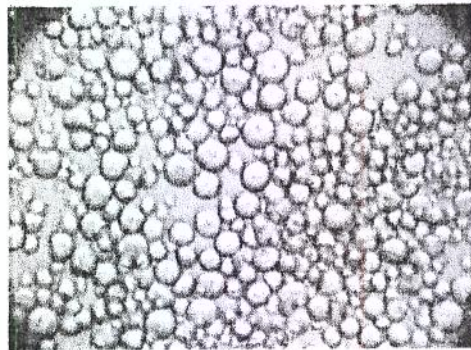
(b)

Figura.17: Microscopia ótica dos amidos de mandioca e de milho ceroso *in natura*, sob luz polarizada (a) e sob luz sem interferências (b).

Amido de mandioca hidrolisado



(a)

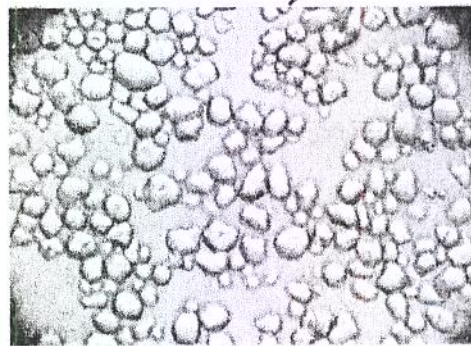


(b)

Amido de milho ceroso hidrolisado



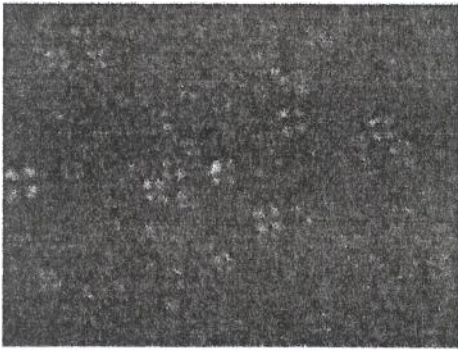
(a)



(b)

Figura.18: Microscopia ótica dos amidos de mandioca e de milho parcialmente hidrolisados com ácido clorídrico, sob luz polarizada (a) e sob luz sem interferências (b).

M8 (parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico, intercruzado e acetilado)

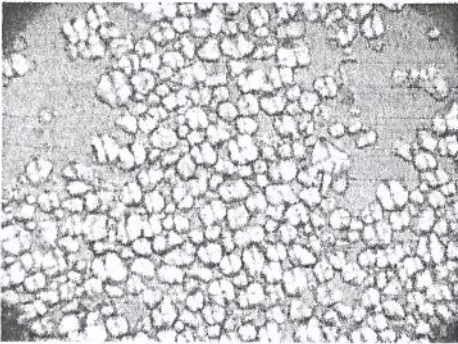


(a)

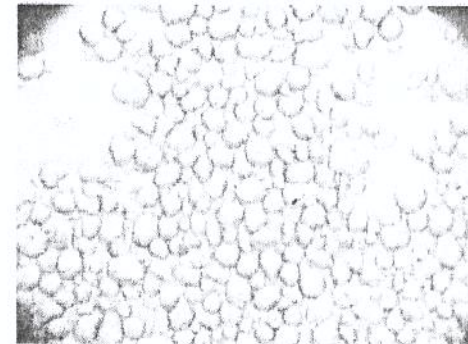


(b)

W5 (parcialmente hidrolizado com ácido clorídrico, acetilado com anidrido acético)

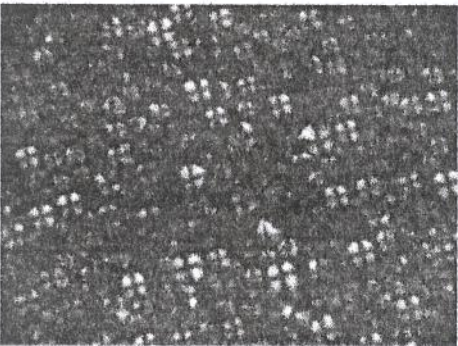


(a)

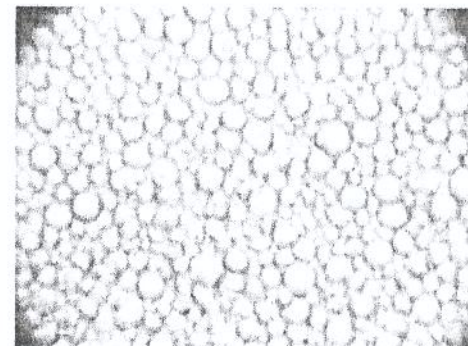


(b)

ML (amido de mandioca parcialmente hidrolisada com ácido clorídrico e esterificada com ácido láurico)



(a)



(b)

Figura 19: Microscopia ótica dos amidos de mandioca e de milho ceroso selecionados como os melhores substituto de gordura (M8, W5, ML), sob luz polarizada (a) e sob luz sem interferências (b).

Os mesmos amidos foram micrografados no microscópio eletrônico de varredura para detectar diferenças estruturais. As Figuras 20 a 26 mostram as micrografias dos amidos de milho ceroso e de mandioca *in natura* e submetidos aos diversos tratamentos.

No amido de milho ceroso *in natura* (Figura 20) a forma preponderante é cúbica, as superfícies apresentam-se com as marcações arredondadas características dos amidos desta espécie. Os grânulos apresentam 0,90 μm em média (por face) e distribuem-se entre 0,38 μm e 1,44 μm . A Figura 21 mostra o polimorfismo característico dos amidos de mandioca. Os grânulos têm em média 0,88 μm no maior diâmetro e se distribuem entre 0,23 μm a 1,59 μm . A Figura 22 mostra que a hidrólise ácida atingiu, em sua maioria, as camadas superficiais dos grânulos de amido de milho ceroso. Os grânulos de amido de mandioca de menor tamanho foram mais severamente hidrolisados (Figura 23). O amido de mandioca demonstra-se mais hidrolisado do que o amido de milho ceroso (Figura 22); o fato confirma os resultados obtidos na difractometria de raio-x, onde o amido de milho ceroso apresentou uma maior cristalinidade relativa. Os grânulos de amido de milho ceroso submetido à hidrólise ácida e à acetilação com anidrido acético (W5) apresentam ruptura e corrosões superficiais acentuadas, sobretudo aqueles de menor tamanho. Observa-se pequenas camadas sobre a superfície dos grânulos. A Figura 25 apresenta a micrografia do amido de mandioca parcialmente hidrolisado, intercruzado e acetilado. Os grânulos apresentam sinais de corrosão, além de pequenas camadas sobrepostas nas superfícies dos grânulos, atribuídas

à modificação provocada pela reação de acetilação (esterificação). A micrografia do amido esterificado com ácido láurico (Figura 26) mostra que o ácido graxo está totalmente apostado sobre as superfícies dos grânulos. Entretanto, em sua maioria, os grânulos permanecem reconhecíveis sob a camada de ácido láurico.

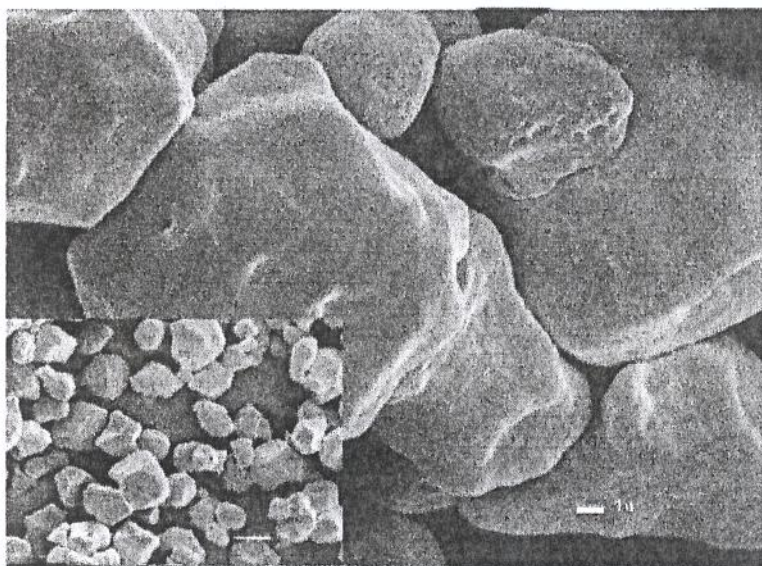


Figura 20: Micrografias do amido de milho ceroso *in natura* observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).

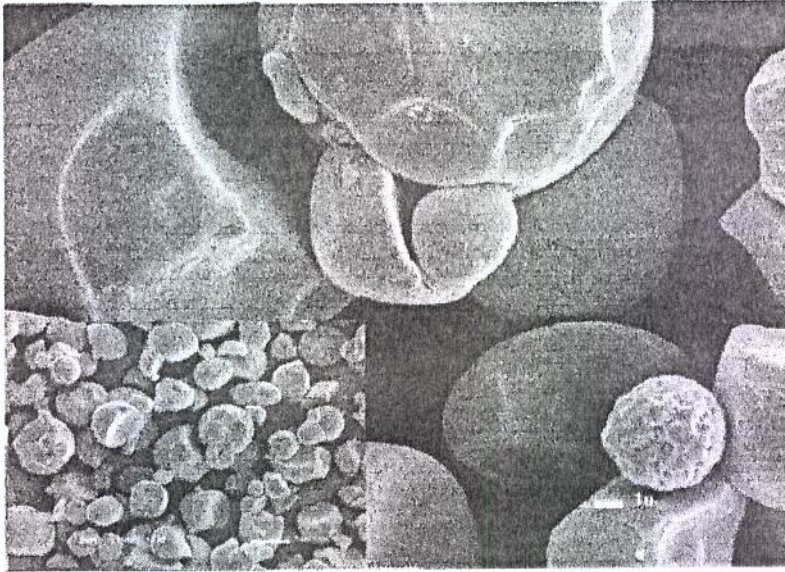


Figura.21: Micrografias do amido de mandioca *in natura* observado em SEM (aumento de 5000X e 1500X, no detalhe).

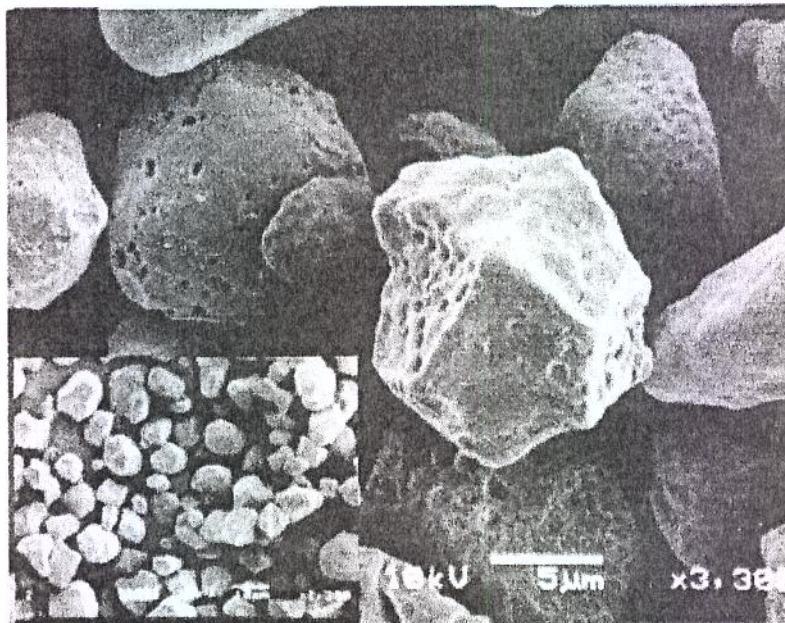


Figura 22: Micrografias do amido de milho ceroso após hidrólise ácida observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).

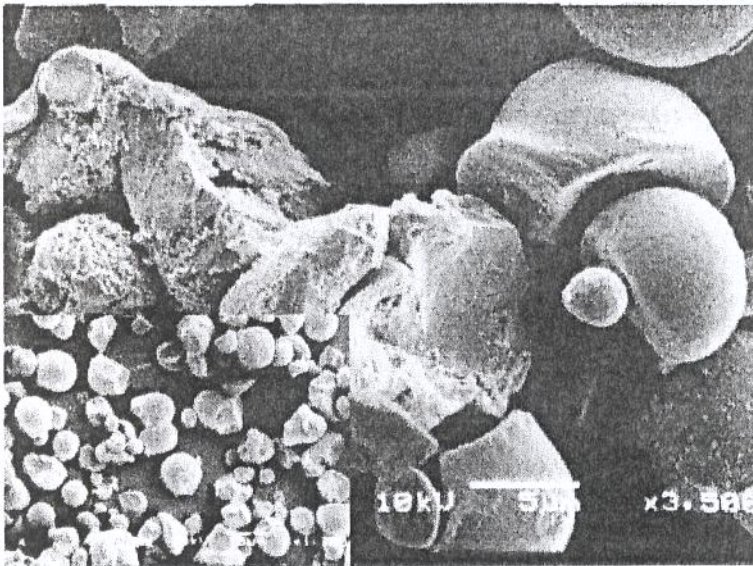


Figura 23: Micrografias do amido de mandioca após hidrólise ácida, observado em SEM (aumento 5000X e 1500 vezes, no detalhe).

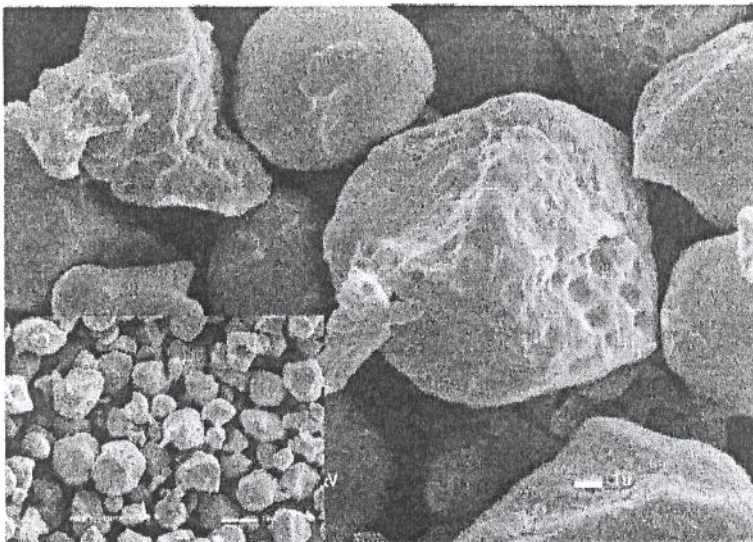


Figura 24: Micrografias do amido de milho ceroso, parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico e acetilado com anidrido acético (w5) observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).

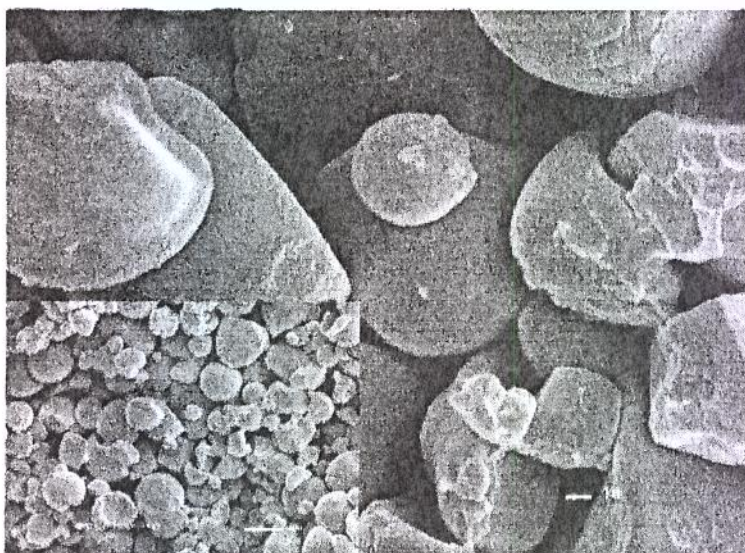


Figura 25: Micrografias do amido de mandioca parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico, inter cruzado com oxiclureto de fósforo e acetilado com anidrido acético (M8) observado em SEM (aumento 5000X e 1500X, no detalhe).

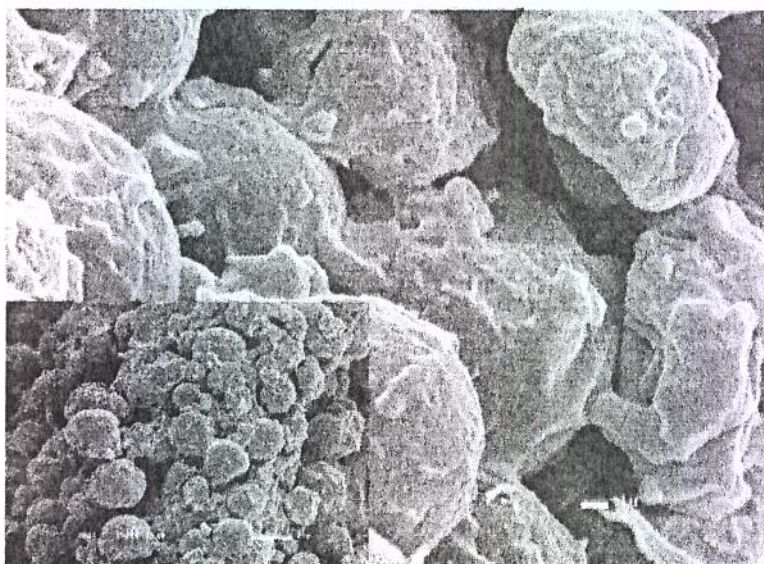


Figura 26: Micrografias do amido de mandioca parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico e esterificado com ácido láurico (ML), observado em SEM (aumento de 5000X, e 1500X, no detalhe).

4.5.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Tabela 11 e a Figura 27 apresentam os resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de mandioca e de milho ceroso *in natura*. Os dados (pico A) mostram que o amido de milho ceroso, quando comparado com o amido de mandioca, necessita de maior entalpia para fusão dos cristais. Este resultado está de acordo com o maior grau de cristalinidade do amido de milho ceroso *in natura*, determinado através da cristalografia de raio-x.

No amido de mandioca um outro pico endotérmico na região entre 100 e 110 °C, referente à dissociação do complexo amilose-lipídeo também foi observada. A entalpia necessária para tal dissociação (0,74 J/g) é bem menor que a necessária para a fusão dos cristais de amilopectina (5,82 J/g). No amido de milho ceroso, rico em amilopectina, este pico não foi observado.

Tabela 11. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de mandioca e de milho ceroso *in natura*.

Amido	Pico A			Pico B		
	To	Tp	ΔH	To	Tp	ΔH
mandioca	52,44	60,76	5,82	101,99	106,48	0,74
Milho ceroso	55,98	67,32	17,05	-	-	-

Onde T_o = temperatura de gelatinização ($^{\circ}\text{C}$), T_p = temperatura de pico ($^{\circ}\text{C}$), e ΔH = entalpia (J/g).

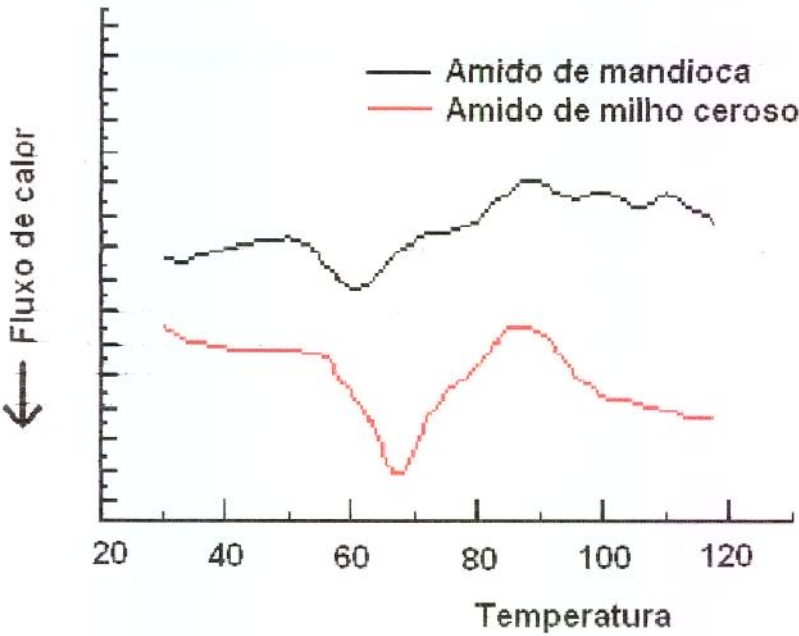


Figura 27: Resultados das análises calorimétricas (DSC) dos amidos de mandioca e milho ceroso *in natura*.

A Tabela 12 e a Figura 28 apresentam os resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de milho ceroso *in natura* e para o amido substituto de gordura W5 (amido de milho ceroso parcialmente hidrolizado com ácido clorídrico e acetilado com anidrido acético). Observa-se que a hidrólise teria diminuído a presença das regiões cristalinas e, com isto, diminuído a entalpia de fusão dos cristais de amilopectina. Não foi observada a presença do complexo amilose-lipídeos.

Tabela 12. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de milho ceroso *in natura* (W) e para os amidos de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com anidrido acético (W5).

Amido	Pico A		
	T _o	T _p	ΔH
W5	55,43	60,46	2,33
W	55,98	67,32	17,05

Onde T_o = temperatura de gelatinização (°C), T_p = temperatura de pico (°C), e ΔH = entalpia (J/g).

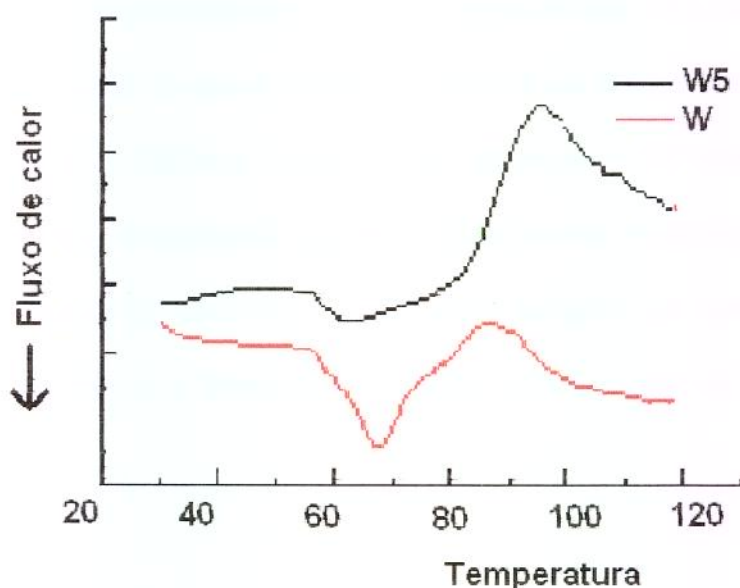


Figura 28: Resultados das análises calorimétricas do amido de milho ceroso *in natura* (W) e do amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com anidrido acético (W5).

A Tabela 13 e a Figura 29 apresentam os resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de mandioca *in natura* e amido de mandioca parcialmente hidrolisado com ácido clorídrico, inter cruzado com oxiclureto de fósforo e acetilado com anidrido acético (M8). Conclui-se novamente que a hidrólise teria diminuído a presença das regiões cristalinas e a entalpia de fusão dos cristais de amilopectina. A presença das ligações cruzadas teria diminuído a mobilidade das cadeias e aumentado a temperatura de fusão dos cristais de amilopectina (Figura 29). Os dados mostram também que o tratamento do amido M8 não favoreceu a formação do complexo amilose-lipídeo.

Tabela 13. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de mandioca *in natura* (M) e amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado e acetilado com anidrido acético (M8).

Amido	Pico A			Pico B		
	To	Tp	ΔH	To	Tp	ΔH
M	52,44	60,76	5,82	101,99	106,48	0,74
M8	78,22	80,92	1,53	-	-	-

Onde T_o = temperatura de gelatinização ($^{\circ}\text{C}$), T_p = temperatura de pico ($^{\circ}\text{C}$), e ΔH = entalpia (J/g).

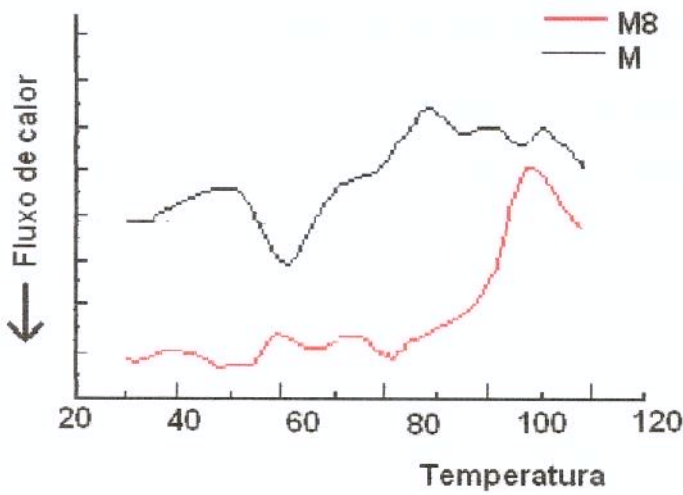


Figura 29: Resultados das análises calorimétricas (DSC) do amido de mandioca *in natura* (M) e do amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado e acetilado com anidrido acético (M8).

A Tabela 14 e a Figura 30 apresentam os resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para os amidos de mandioca *in natura* e amido de mandioca parcialmente hidrolizado com ácido clorídrico e esterificado com ácido láurico (ML). A hidrólise ácida sofrida pelo amido de mandioca teria diminuído a entalpia de fusão dos cristais. Além disto, a presença da cadeia lateral nos amidos de mandioca parcialmente hidrolisados e esterificados com ácido láurico, possivelmente teria diminuído a temperatura de fusão dos cristais de amilopectina. O tratamento químico sofrido pelo amido também influenciou na redução da temperatura de dissociação do complexo amilose-lipídeos.

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos na calorimetria diferencial de varredura para o amido de mandioca *in natura* (M) e amido de mandioca parcialmente hidrolizado e esterificado com ácido láurico (ML).

Amido	Pico A			Pico B		
	To	Tp	ΔH	To	Tp	ΔH
M	52,44	60,76	5,82	101,99	106,48	0,74
ML	48,09	50,91	3,72	90,03	95,44	0,74

Onde T_o = temperatura de gelatinização ($^{\circ}\text{C}$), T_p = temperatura de pico ($^{\circ}\text{C}$), e ΔH = entalpia (J/g).

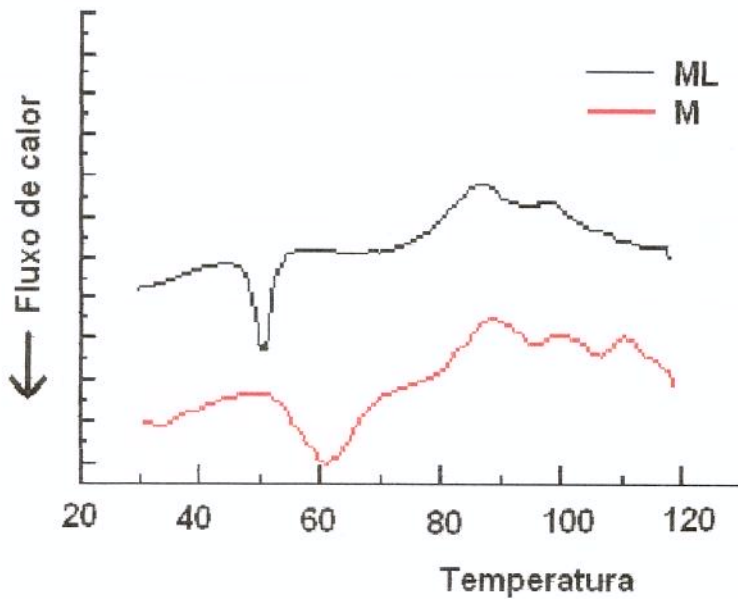


Figura 30: Resultados das análises calorimétricas (DSC) do amido de mandioca *in natura* (M) e do amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico (ML).

4.5.5. Hidrólise Enzimática *in vitro*

A Figura 31 mostra a quantidade de açúcar redutor presente em cada tubo após a reação de hidrólise enzimática *in vitro*. Observou-se que o amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado com oxicloreto de fósforo e acetilado com anidrido acético (M8) e o amido de milho ceroso parcialmente acetilado com anidrido acético (W5) foram os que mais sofreram a ação enzimática. Estes resultados estão de acordo com as imagens obtidas ao Microscópio Eletrônico de Varredura e com os resultados obtidos na difractometria de raio-X, onde se verificou a menor cristalinidade destes amidos. Segundo

GALLANT et al. (1992 e 1997), a parte cristalina do grânulo é menos digerida que a parte amorfa, sugerindo que a organização interna do cristal apresenta blocos que resistem diferencialmente ao ataque enzimático. Já o amido de mandioca parcialmente hidrolisado pela ação do ácido clorídrico e esterificado com ácido láurico (ML) foi o menos hidrolisado enzimaticamente, possivelmente devido ao maior grau de esterificação, que dificultaria a ação das enzimas.

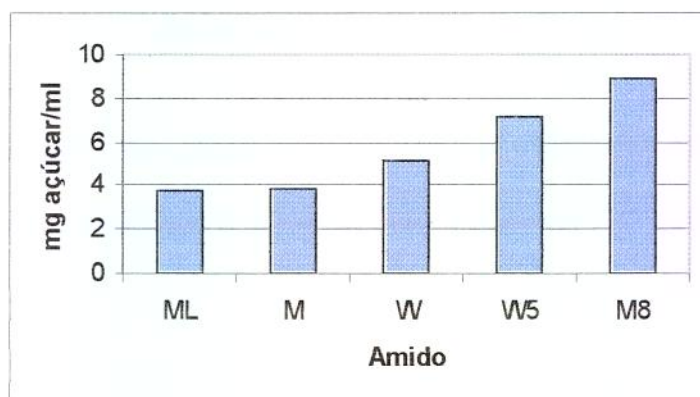


Figura 31: Quantidade de açúcar redutor presente em cada tubo após a reação de hidrólise enzimática *in vitro*.

4.5.6. Análises Cromatográficas em Gel Sephadex G-50

As Figuras 32 e 33 apresentam o perfil de eluição das frações de amidos *in natura* (M, W) e de amidos substitutos de gordura (ML, M8, W5) após terem sido hidrolisados com α -amilase e lipase. Pela Tabela 15 pode-se observar a

porcentagem de carboidratos recuperados com intervalos de DP variando entre 1-20 e entre 20-40.

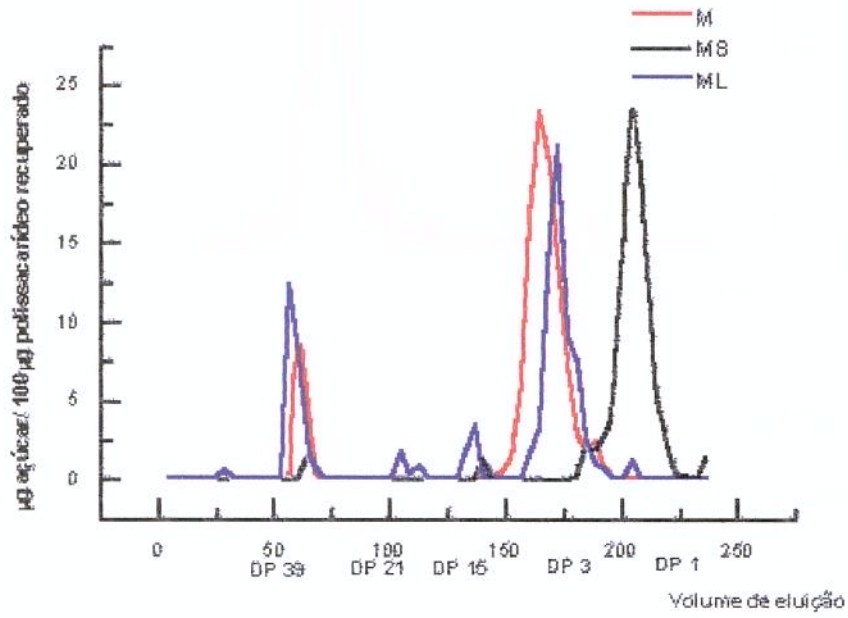


Figura 32: Perfil de eluição das frações de amidos de mandioca: M (*in natura*), e dos substitutos de gordura (M8 e ML).

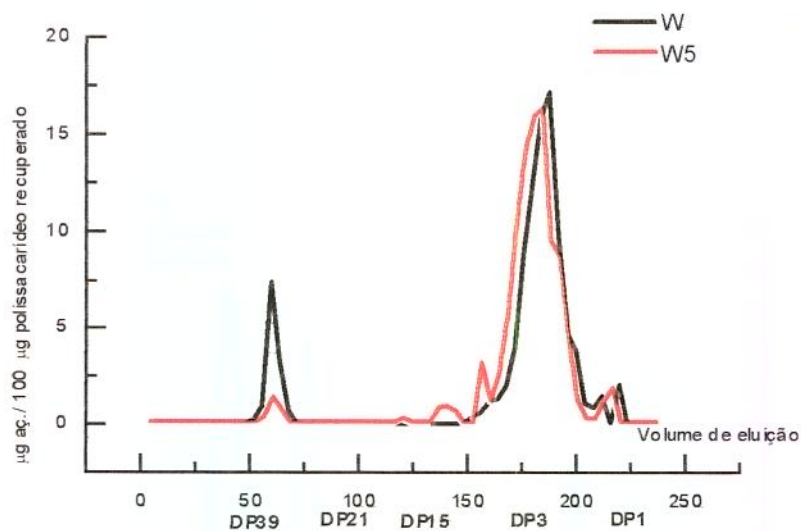


Figura 33: Perfil de eluição das frações de amidos de milho ceroso: W (*in natura*), e do substituto de gordura (W5).

Tabela 15: Perfil de eluição do amido de milho ceroso (W) e de mandioca (M) *in natura* e dos amidos substitutos de gordura: M8, W5 e ML.

	Amido				
DP	M	M8	ML	W	W5
40-20	8,91%	2,02%	25,97%	12,54%	2,16%
20-1	91,09%	97,96%	74,03%	87,46%	97,84%

Os dados da Tabela 15 confirmam os resultados obtidos anteriormente quando mostram que o amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado e acetilado (M8) é mais susceptível à ação enzimática. A presença de ligações cruzadas possivelmente dificultariam a ação da enzima no sentido da formação moléculas de tamanho menor.

O perfil de eluição do amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e esterificado com anidrido acético (W5) apresentou maior quantidade de moléculas com DP entre 1 e 20. A hidrólise ácida usada na metodologia de obtenção deste substituto de gordura e sua baixa cristalinidade, facilitariam a quebra das moléculas.

O amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico apresentou um perfil de eluição diferente dos demais com vários picos de diferentes DP (Figura 32), mostrando que a esterificação ocorreu de modo heterogêneo nos monômeros de glicose do amido.

Comparando-se o amido de mandioca e o amido de milho ceroso, observou-se que o segundo, devido possivelmente à sua maior cristalinidade, apresentou menor quantidade de moléculas com DP entre 1 e 20 do que o amido de mandioca.

4.6. ENSAIO NUTRICIONAL EM RATOS COM DIETAS CONTENDO OS AMIDOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS

O ensaio biológico teve como objetivo verificar, através do metabolismo lipídico e da integridade do trato gastrointestinal, a inocuidade dos amidos substitutos de gordura selecionados.

4.6.1. Composição das Dietas

Segundo McDONALD (1997), dietas semi-purificadas apresentam biodisponibilidade ideal e para ensaios de curto período são as mais adequadas.

A quantidade de óleo de soja pertinente à dieta de referência, AIN'93 é 70g/Kg. Nas dietas experimentais fornecidas aos animais dos outros grupos 90% do óleo foi substituído pelos amidos quimicamente modificados (M8, W5 e ML).

A dieta semi-purificada, AIN'93 apresentou 395 kcal/100g e as três dietas experimentais, ML, M8 e W5, apresentaram os seguintes teores calóricos: 383, 360 e 361 Kcal/100g, respectivamente.

A pequena diferença entre as 4 dietas não invalida-as entre si do ponto de vista de teor calórico porque sendo as ingestas *ad libitum*, a regulação calórica dependeu de cada animal (Tabela 16).

Tabela 16: Composição centesimal das dietas utilizadas em cada grupo.

Dieta	Umidade	Proteína	Lipídeos	VCT
	(%)	(%)	(%)	(Kcal/100g)
Grupo C	9,67	20,24	8,42	395,00
Grupo M8* [†]	9,98	22,33	1,18	360,00
Grupo W5* [†]	9,96	21,61	1,20	361,00
Grupo ML* [†]	9,97	21,98	2,30	383,00

*Os valores calóricos dos amidos modificados foram: M8=360Kcal/100g, W5=370Kcal/100g e ML=710Kcal/100g.

[†]O óleo de soja foi mantido para os três grupos experimentais em níveis suficientes para fornecer a quantidade de ácidos graxos essenciais aos animais.

4.6.2. Resultados Fisiológicos

A Figura 34 mostra a média de ingestão das dietas dos quatro (04) grupos experimentais; a quantidade consumida foi semelhante em todos os grupos (C, M8, W5 e ML), durante os 16 dias de ensaio, demonstrando a aceitabilidade das dietas. O mesmo aconteceu com o ganho ponderal, demonstrando desempenho semelhante para todas as dietas (Figura 35).

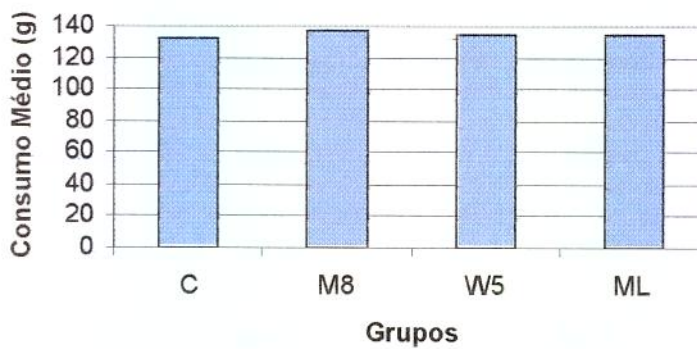


Figura 34: Ingesta (g) das dietas controle (C) e modificadas (M8, W5 e ML).

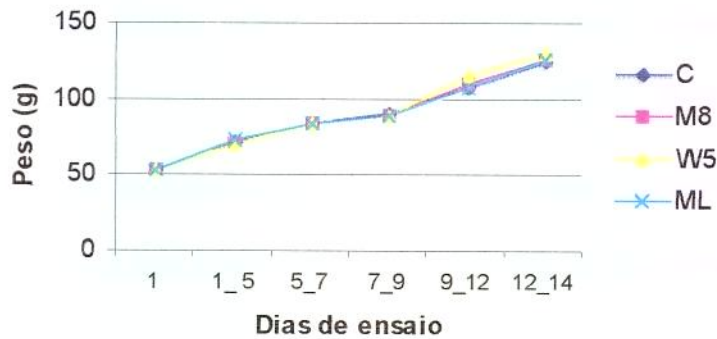


Figura 35: Curva ponderal dos Grupos C, M8, W5, e ML.

Quanto à disponibilidade do amido, BOOTH & GROS (1963) observaram baixa digestibilidade e disponibilidade calórica de ésteres de amilose com duas ou mais substituições. Neste trabalho, as hidrólises enzimáticas (item 4.5.5.) indicaram razoável digestibilidade *in vitro* nos amidos substitutos de gordura, possivelmente devido ao menor grau de esterificação (0,73 ligações ésteres/unidade de glicose nos amidos ML e menos que 0,03 ligações

ésteres/unidade de glicose nos amidos M8 e W5) fato que poderia facilitar a digestibilidade.

A Tabela 17 apresenta o perfil do metabolismo lipídico no soro dos ratos sacrificados ao término do mesmo (16º dia).

Tabela 17: Taxa de colesterol, HDL e triglicerídeos nos soros dos ratos sacrificados ao 16º dia de ensaio.

Grupos		Colesterol	HDL	Triglicerídeos
		(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
16º dia	Controle	44,99	39,44	7,51
	M8	64,28	21,34	7,24
	W5	60,04	27,95	7,72
	ML	70,69	24,51	10,16

Ao propor a substituição (em peso) de 90% do óleo de soja da dieta de ratos, por amidos modificados (M8, W5 e ML) obteve-se um perfil de colesterol, HDL, e triacilglicerol semelhante entre os grupos experimentais.

Procurou-se referendar estes valores com a literatura. LEE et al. (1989) e RULE et al. (1996) utilizando dietas contendo óleos vegetais (palma e/ou soja e milho) apresentaram no soro valores para o colesterol e os triglicerídeos que

variaram entre 5,4 à 100 mg/dL de colesterol e 16,2 a 65 mg/dL de triglicerídeos. Segundo o “Canadian Council on Animal Care”, o colesterol normal para ratos seria 27mg/dL, mas admitem o intervalo entre 10 à 54 mg/dL. Com efeito, a Tabela 13 demonstra que o perfil de colesterol, HDL e triacilglicerol estabelecido está dentro de valores normais.

De acordo com os resultados obtidos (ingesta, ganho ponderal e metabolismo lipídico) conclui-se que houve aceitação dos amidos substitutos de gordura presentes na dieta e que estes propiciaram respostas metabólicas normais e ausência de toxicidade. São portanto amidos modificados recomendáveis do ponto de vista alimentar.

4.6.3. Resultados Histológicos

O esquema alimentar *ad libitum* favoreceu a ação trófica tópica que o alimento induz continuamente sobre a mucosa gastro-intestinal (LINDER, 1991). As dietas diferiram tão somente quanto à introdução de amidos modificados em substituições parciais ao óleo de soja das formulações. Tendo ocorrido ingesta e ganho ponderal semelhante e do ponto de vista metabólico tendo permanecido saudáveis e com índices de metabolismo energético semelhante, os resultados anatomo-histológicos eram previsíveis, isto é, normais (Figuras 36 a 45).

Todos os grupos apresentaram jejunos e íleos com vilosidades bem estruturadas e epitélio íntegro, demonstrando não haver dano estrutural que

pudesse ser atribuído a ingesta dos amidos substitutos de gordura. A estrutura hepática demonstrou-se preservada em todos os ensaios e está demonstrada com clareza nas Figuras 39 e 44.

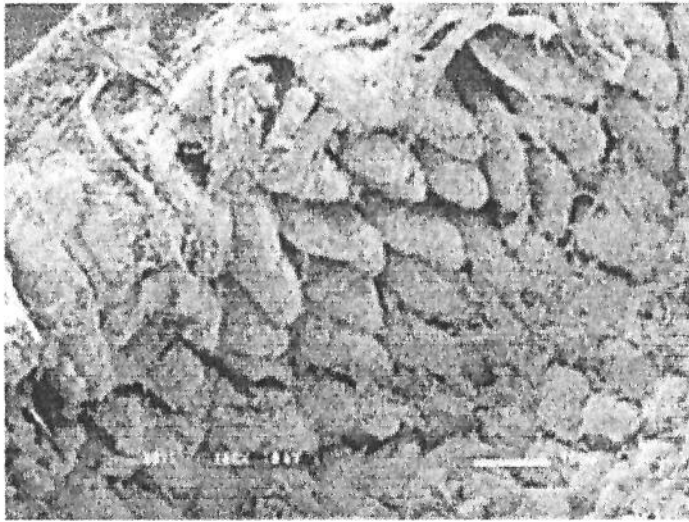


Figura 36: Micrografia do jejuno de rato do Grupo Controle ao fim do ensaio, (aumento 180X).

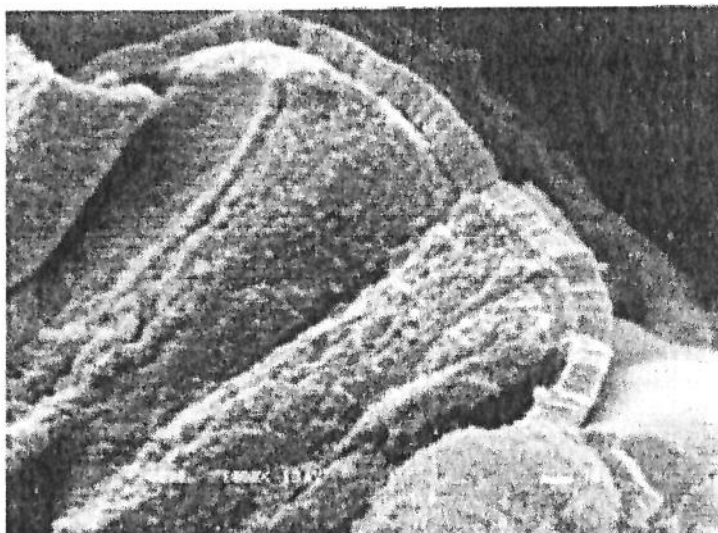


Figura 37: Micrografia de enterócitos de rato do Grupo Controle (aumento 6000X).

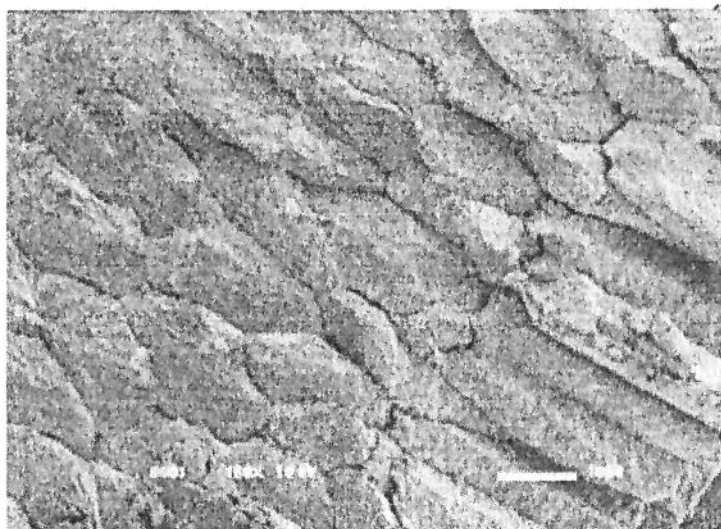


Figura 38: Micrografia do íleo de rato do Grupo Controle ao fim do ensaio (aumento 180X).

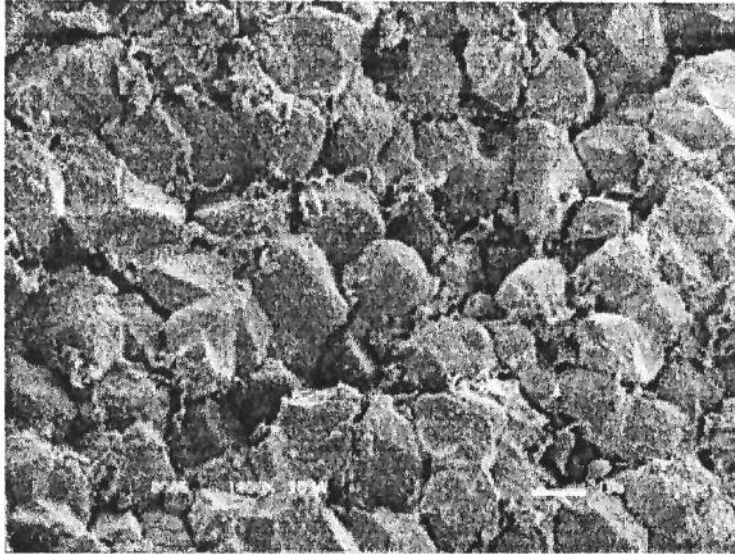


Figura 39: Micrografia do fígado de rato do Grupo Controle (aumento 1000X).

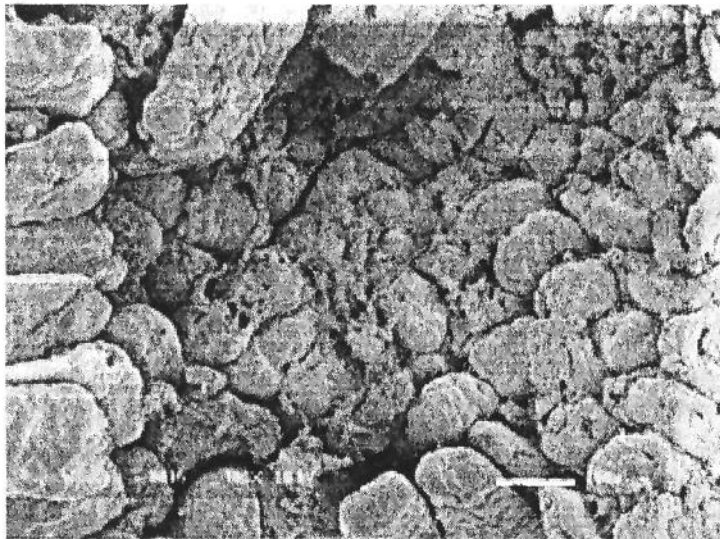


Figura 40: Micrografia do jejuno de rato alimentado com dieta experimental contendo amido de mandioca do grupo M8 (aumento 180X).

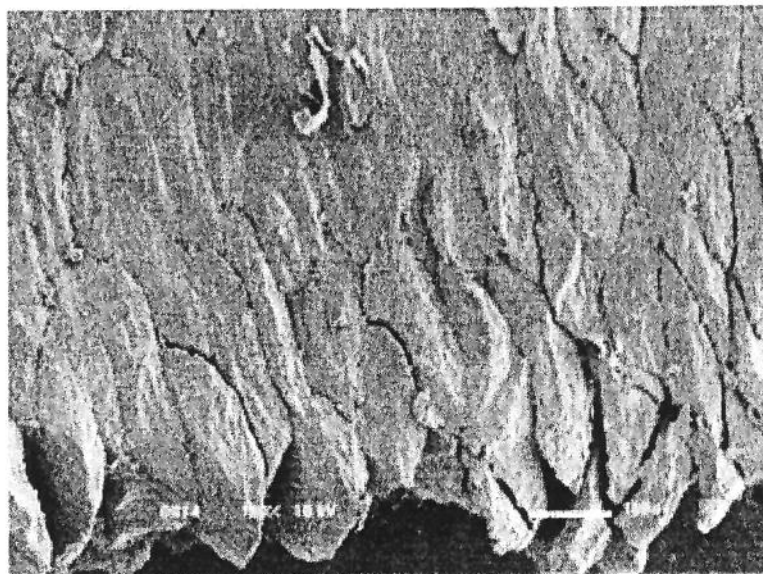


Figura 41: Micrografia do íleo de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca modificado do grupo M8 (aumento 180X).

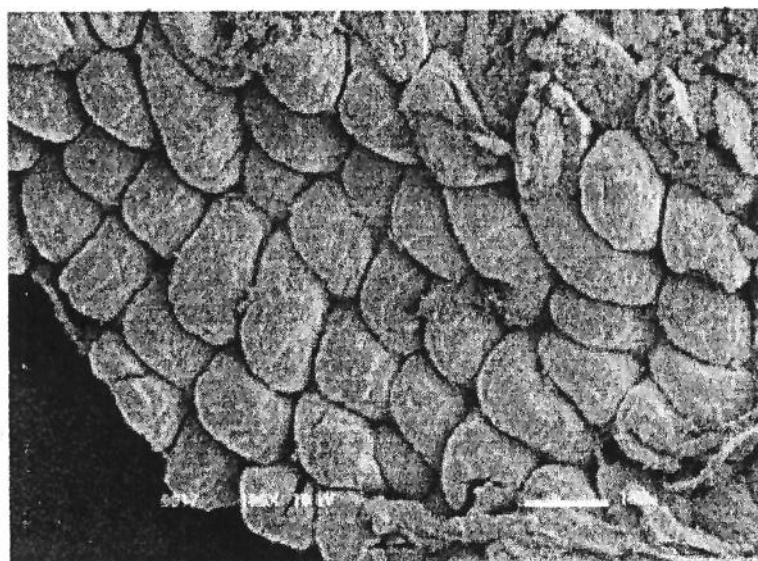


Figura 42: Micrografia do jejuno de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo ML (aumento 180X).

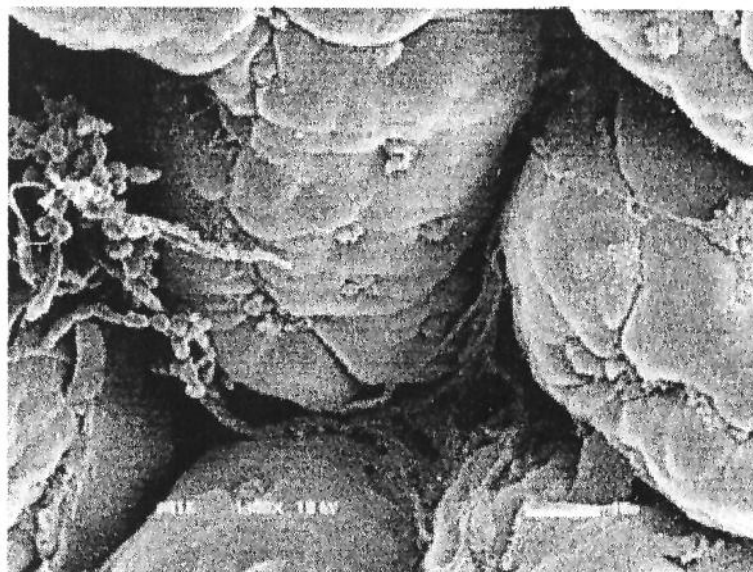


Figura 43: Micrografia da porção terminal de vilosidades do íleo de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo ML (aumento 180X).

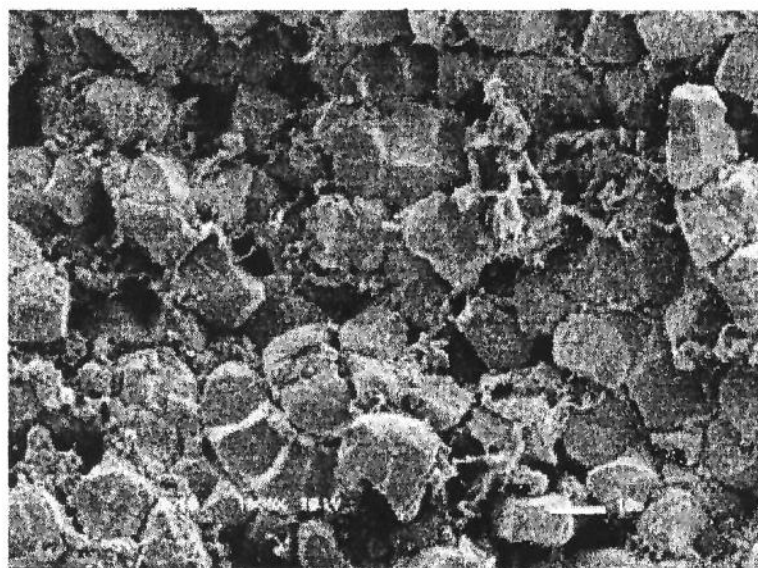


Figura 44: Micrografia dos hepatócitos de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo ML (aumento 1000X).

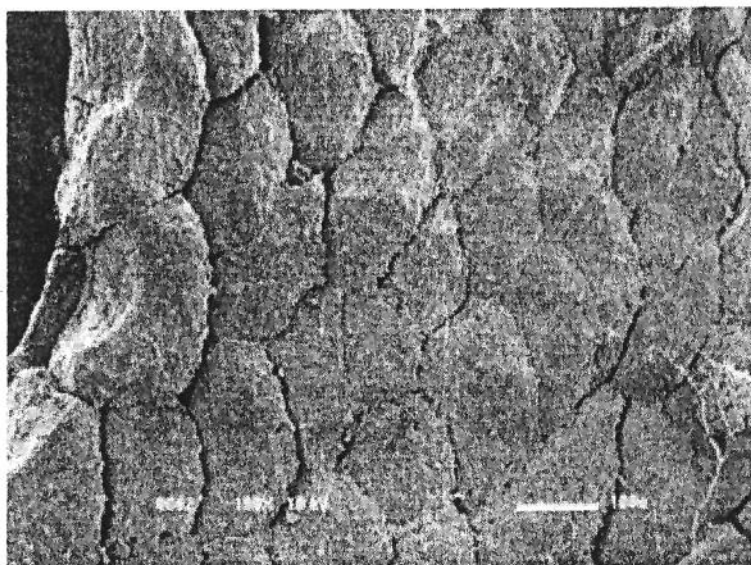


Figura 45: Micrografia das vilosidades do íleo de rato alimentado com dieta experimental contendo o amido de mandioca do grupo W5 (aumento 180X).

4.7. ANÁLISE SENSORIAL DOS AMIDOS SUBSTITUTOS DE GORDURA SELECIONADOS

A Tabela 18 mostra o nível de aceitação das amostras. A maionese fabricada com amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado e acetilado (M8) recebeu um nível de aceitação maior que as fabricadas com os outros substitutos de gordura (W5 e ML), não diferindo da maionese padrão (75% de óleo), em termos globais da aparência.

Tabela 18: Porcentagem de aceitação das maioneses fabricadas com os amidos substituto de gordura (M8, W5 e ML) e da maionese padrão.

Amostra	Aceitação (%)
Padrão	71,39 (a)
M8	66,94 (a)
W5	49,44 (b)
ML	48,33 (b)

Médias seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si (teste de tukey, $p \leq 0,5$).

O Teste de Diferença do controle mostrou que as maioneses fabricadas com os amidos substitutos de gordura diferiam do padrão em relação à textura ($p \leq 0,05$), sendo que as fabricadas com W5 e ML diferiam em maior grau. Em relação à cor, somente a maionese M8 não diferiu significativamente do padrão ($p \leq 0,05$).

Os resultados da análise sensorial confirmam a suposição de YACKEL & COX (1992); segundo estes autores, muitas vezes, um único substituto não é suficiente para reproduzir a variedade de atributos associados à gordura, sendo necessário a reformulação dos produtos tradicionais, algumas vezes com a adição de um novo ingrediente.

V. CONCLUSÕES

Não foi possível a esterificação do amido com ácido palmítico, possivelmente devido ao impedimento estérico gerado pelo tamanho da molécula (16 carbonos, 4 a mais que o ácido láurico). Conclui-se ainda que a esterificação de amido com ácidos graxos de cadeia maior que o ácido palmítico provavelmente não seja possível pelo mesmo motivo.

Três derivados de amidos substituíram a gordura de modo mais eficiente: amido de milho ceroso parcialmente hidrolisado e acetilado com 4% de anidrido acético (W5); amido de mandioca parcialmente hidrolisado, inter cruzado com 0,05% de POCl_3 e acetilado com 8% de anidrido acético (M8) e amido de mandioca parcialmente hidrolisado e esterificado com ácido láurico (0,73 ligações éster/unidade de glicose), ML. Entretanto, concluiu-se que um único substituto não é suficiente para reproduzir a variedade de atributos associados à gordura.

As modificações químicas, hidrólise ácida, ligações cruzadas, acetilação e esterificação com ácido láurico, alteraram as propriedades tecnológicas e as características estruturais e funcionais dos amidos, de acordo com o tipo de amido utilizado e com a extensão da modificação. Entretanto, as modificações permitiram a manutenção granular dos amidos: em todos os derivados selecionados observou-se a presença da cruz de malta, principalmente nos grânulos de maior

diâmetro. Os amidos W5 e M8 atuaram como substituto de gordura por estabilizarem grandes quantidades de água em uma estrutura de gel cujos resultados em termos de propriedades lubrificantes e de fluxo são semelhantes às dos lipídeos. Concluiu-se que o amido de mandioca esterificado com ácido láurico (ML) agiria como um emulsificante, pois embora seja efetivo como substituto de gordura em maionese, não tem a propriedade de formar gel.

Os ensaios biológicos, onde se alimentaram ratos jovens com dietas contendo os três amidos modificados demonstraram respostas anatomo-histológicas iguais ao controle. O metabolismo lipídico analisado pelo soro sanguíneo, ou seja, os valores de colesterol, HDL e triglicerídeo também eram normais. Conclui-se, portanto, que os substitutos de gordura selecionados não apresentaram toxicidade.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AACC- American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 7^a ed. v. 1 e 2. 1969.
2. ABURTO, J.; ALRIC, K.; THIEBAUD, S.; BORREDON, E.; BIKIARIS, D.; PRINOS, J.; PANAYIOTOU, C. Synthesis, Characterization and Biodegradability of Fatty-Acid Esters of Amylose and Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v.74, p.1440-1451. 1999.
3. ALEXANDER, R. J. Fat replacers based on starch. **Cereal Foods World**, v.40, n.5, p.366-368. 1995.
4. ANON. Fat substitute update. **Food Technology**, v.44, n.3, p.92, 94, 97. 1990.
5. BARRON, C.; BOUCHET, B.; VALLE, G. D.; GALLANT, D. J. PLANCHOT, V. Microscopical Study of the Destructuring of Waxy Maize and Smooth Pea Starches by Shear and Heat at Low Hydration. **Journal of Cereal Science**, v.33, n.3, p.289-300. 2001.
6. BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. & FREITAS NETO, A. G. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patologica. 239p. 1976.
7. BeMILLER, J. N.. Starch Modification: Challenges and Prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, n.4. 1997.

8. BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917. 1959.
9. BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.69, p.60-78. 1991.
10. BOOTH, A. N.; GROS, A. T. Caloric Availability and Digestibility of New-Type Fats. **The Journal of the American Oil Chemists Society**, v.40, p.551-553. 1963.
11. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. V. 1. 120p. 1984.
12. CÂNDIDO, L. M. B & CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos – Legislação, Mercado, Adoçantes e Edulcorantes, Substitutos de Gordura, Sucedâneos do sal**. 423p. Livraria Varela. 1996.
13. CHAN, K. C.; JIE, X.; PHILLIPS, D. L.; CORKE, H. Development of NMR and Raman Spectroscopic Methods for the Determination of the Degree of Substitution of Maleate in Modified Starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49. n.6. p.2702-2708. 2001.
14. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Cromatografia por exclusão. In: **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Capítulo 4. 6ª ed. Editora da UNICAMP. 1995.

15. COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.46, n.2, p.17-32. 1992.
16. CÔNSOLE, F. M. Z. S.; CAMARGO, C. R. O. **Otimização das condições de hidrólise ácida do amido de mandioca para obtenção de substituto de gordura: caracterização de hidrolisados e aplicação em bolos**. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 160p 1998.
17. DAVIS, E. A. Wheat Starch.. **Cereal Foods Word**, v.39. n.1. 1994.
18. DONAVAN, J. W.; LORENZ, K.; KULP, K. Differential Scanning Calorimetry of Heat-Moisture Treated Wheat and Potato Starches. **Cereal Chemistry**, v.60, n. 5, p.381-387. 1983.
19. DUBOIS, M.; GILLES, K. A ; HAMILTON, J. R.; ROBERS, P. A & SMITH, F. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-354. 1956.
20. EASTMAN, J. **Starch hydrolysates as fat replacements**. A23L 1/05 U.S.5275837, 4 Jan. 1994. Food Science and Technology Abstracts. AN: 94-07-N0056.
21. EERLINGEN, R.C., CROMBEZ, M. AND DELCOUR, J. A. Enzyme-resistant starch I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. **Cereal Chemistry**, v.70, n.3, p.339-344. 1993.

22. EERLINGEN, R. C., M.; DELCOUR, J. A. Enzyme-resistant starch II. Influence of amilose chain length on resistant-starch formation. **Cereal Chemistry**, v.70, n.3, p.345-350. 1993.
23. ELIASSON, A. C. Retrogradation of starch as measured by differential scanning. In: HILL, R. D.; MUNCK, C. **New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates**. 1985.
24. ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.46, n.2, p.33-50. 1992.
25. FAT SUBSTITUTE UPDATE. **Food Technology**, v.44, n.3, p.92, 94, 97. 1990.
26. FRENCH, D. Organization of Starch Granules in **Starch: Chemistry and Technology**. Academic Press. 477p. 1984.
27. GALEAZZI, M. A. M.; DOMENE, S. M. A.; SICHIERI, R. Estudo multicêntrico sobre consumo alimentar. **Revista do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação: Cadernos de debate (NEPA/UNICAMP)**, Volume especial, 1997.
28. GALLANT, D. J.; BOUCHET, B AND BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.32, p.177-191. 1997.

29. GIDLEY, M. J.; COOKE, D.; DARKE, A. H.; HOFFMANN, R. A., RUSSEL, A. L.; GREENWELL, P. Molecular order and structure in enzyme-resistant retrograded starch. **Carbohydrate Polymers**, v.28, n.1, p.23-31. 1995.
30. GIESE, J. Fat, oils, and fat replacers. **Food Technology**, v.50, n.4, p.77-83. 1996.
31. GLICKSMAN, M. Hydrocolloids and the search for the "Oil Grail". **Food Technology**, v.45, n.10, p.94, 96-101, 103. 1991.
32. GRAY, J. A.; BeMILLER, J. N.. Accessibility of Starch Granules to Fatty Acyl Amides.. **Cereal Chemistry**, v.78. n.3. p.236-242. 2001.
33. HARRIS, D.; DAY, G. A. Structure versus functional relationships of a new starch-based fat replacer. **Starch/Stärke**, v.45, n.7, p.221-226. 1993.
34. INGLET, G. E., MANEEPUN, S.; VATANASUCHART, N. Evaluation of Hydrolyzed Oat Flour as a Replacement for Butter and Coconut Cream in Bakery Products.. **Food Science and Technology International**. v.6. n.6. p.457-462. 2000.
35. JAROWENKO, W. Acetylated Starch and miscellaneous organic esters. In: WURZBURG, O. B. (ed.). **Modified Starches: Properties and Uses**, Cap.4, p.55-7. CRC press. 2000.
36. KILARA, A. Fat Substitutes in Ice Cream Production.. **Molochnaya-Promyshlennost'**, n.5, p.31-33. 2000.

37. LEE, J. H.; FUKUMOTO, M.; NISHIDA, H.; IKEDA, I.; SUGANO, M.. The Interrelated Effects of n-6/n-3 and Polyunsaturated/Saturated Ratios of Dietary Fats on the Regulation of Lipid Metabolism in Rats. **Lipids**, p.1893-1899. 1989.
38. LII, C-Y; CHANG, S-M; YOUNG, Y-L. Investigation of the physical and chemical properties of banana starches. **Journal of Food Science**, v.47, n.5, p.1493-1497. 1982.
39. LIM, S. T.; CHANG, E. H.; CHUNG, H. J. Thermal Transition Characteristics of Heat-Moisture Treated Corn and Potato Starches. **Carbohydrate Polymers**, v.46, n.2, p.107-115. 2001.
40. LINDER, M. C. **Nutritional Biochemistry and Metabolism**. 2nd ed. Prentice-Hall International Inc, 603p. 1991.
41. McDONALD, R. B. Some Considerations for the Development of Diets for Mature Rodents used in Long-Term investigations. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 847S-850S. 1997.
42. MARCAZZAN, M.; VIANELLO, F.; SCARPA, M.; RIGO, A. An ESR Assay for α -amylase Activity Toward Succinylated Starch, Amylose and Amylopectin. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.38, p.191-202. 1999.
43. MOSER, G. A.; McLACHLAN, M. S. A Non-Absorbable Dietary Fat Substitute Enhances Elimination of Persistent Lipophilic Contaminants in Humans.. **Chemosphere**, v.39. n.9. p-1513-1521. 1999.

44. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da UNICAMP (Série Manuais), 1995. 299p.
45. NONAKA, M.; NAGAMORI, Y.; YAMADA, K.; SUGANO, M.. Effect of Salatrim-Enriched Biscuit on Lipid Metabolism of Sprague-Dawley Rats.. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v 46, n.10. p.638-644. 1999.
46. PANEK, J. S. & SPARKS, M. A. Synthesis, Resolution and Absolute Stereochemical Assignment of C1-Oxygenated Allylsilanes and C3-Oxygenated Vinylsilanes. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.1, n.11, p.801-816. 1990.
47. PAQUETTE, L. A. **Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis**, v.8. 1995.
48. PATTERSON, R. E.; KRISTAL, A. R.; PETERS, J. C.; NEUHOUSER, J. C.; ROCK, C. L.; CHESKIN, L. J.; NEUMARK-SZTAINER, D.; THORNQUIST, M. D. Changes in Diet, Weight, and Serum Lipid Levels Associated with Olestra Consumption **Archives of Internal Medicine**, v.160, n.17, p.2600-2604. 2000.
49. PHILLIPS, D. L.; JIE, X.; CHAN, H. C.; CORKE, H. Quantitative Analysis of Benzyl Modification in Waxy Maize Starch by Fourier Transform (FT) Raman Spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.78, n.5. p.629-632. 2001.
50. POULSEN, T.; OSTERGARD, K.; NIELSEN, M. A process for making a calorie-reduced emulsified food product and an emulsified food product made by the

- process.. PCT-International. A23L 1/24 wo 94/15486, 21 jun 1994. **Food Science and Technology Abstracts**. AN: 95-10-T0060.
51. PSZCZOLA, D. E. Carbohydrate-based ingredient performs like fat for use in a variety of food applications. **Food Technology**, v.45, n.8, p.262-263, 276, 1991.
52. RALSTON, A. W. & SELBY, W. M. Action of Sodium upon High Molecular Weight Fatty Acid Chlorides. **Journal of American Chemical Society**, v.61, p.1019-1020. 1939.
53. REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H. AND FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951. 1993.
54. RÍOS, J. J.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; MÁRQUES-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. Isolation and Characterization of Sucrose Polyesters.. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, n.4, p.385-390. 1994.
55. RULE, D. C.; LIEBMAN, M.; LIANG, Y. B. Impact of Different Dietary Fatty Acids on Plasma and Liver Lipids is Influenced by Dietary Cholesterol in Rats.. **Nutritional Biochemistry**, v.7, p.142-149. 1996.
56. SAHAI, D.; JACKSON, D. S. Structural and Chemical Properties of Native Corn Starch Granules.. **Starch/Stärke**, v.48, n.7/8, p.249-255, 1996.

57. SCHOENBERG, E. A. Low oil mayonnaise and method of making. A23D 5/00 US4923707, 8 may 1990. **Food Science and Technology Abstracts**. AN: 91-07-V0156.
58. SESSO, A. Fixação de Sistemas Biológicos, p.1-17, in Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. SBM, 179p. 1998.
59. SIEVERT, D. CZUCHAJOUSKA, Z. AND POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch III. X-ray diffraction of autoclaved amylo maize VI starch and enzyme-resistance starch residues. **Cereal Chemistry**, v.68, p.86. 1991.
60. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara Koogan S.A., 5^oed, 1994, 387p.
61. SINGH, V.; ALI, S. Z. Acid Degradation of Starch. The Effect of Acid and Starch Type. **Carbohydrate Polymers**, v.41. n.2. p.191-195. 2000.
62. SOMOGY, M. A. New reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**; v.160, n.1, p.601-68. 1945.
63. VOGEL, A. I. **Textbook of Practical Organic Chemistry; Including Qualitative Organic Analysis**. 4th ed. 1368p. 1978.
64. WALLACE, J. M. JR. & COPENHAVER, J. E. Anhydrides of the Normal Aliphatic Saturated Monobasic Acids. **Journal of American Chemical Society**; v.63, p.699-700. 1941.

65. WHISTLER, R. L. Preparation and Properties of Starch Esters. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p.279-305. 1945.
66. WOLFF, I. A.; OLDS, D. W. & HILBERT, G. E. The Acylation of Corn Starch, Amylose and Amylopectin. **Journal of American Chemical Society**, v.73, p. 346-349. 1951.
67. WU, Y.& SEIB, P. Acetylated and Hydroxypropylated distarch phosphates from waxy barley: paste properties and freeze-thaw stability. **Cereal Chemistry**, v.67, n.2, p.202-208. 1990.
68. WURZBURG, O. W. Starch derivatives and modifications: acetylation. In: WHISTLER, R. L. **Carbohydrate chemistry**, v.4, n.6, p.286-289. 1964
69. WURZBURG, O. W. Converted Starches. In: WURZBURG, O. B. (ed.). **Modified Starches: Properties and Uses**. Cap.4, p.17-40. CRC press. 2000.
70. YACKEL, W. C.; COX, C. Application of starch-based fat replacers. **Food Technology**, v.46, n.6, p.146-148. 1992.
71. ZELENIAK, K. J. ; HOSENEY, R. C. The Glass Transition in Starch. **American Association of Cereal Chemists**, v.64, n.2, p.121-124. 1987.
72. ZOBEL, H. F. Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. Academic Press. 1984.

FINANCIAMENTO

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido na FEA/UNICAMP e contou com o auxílio da FAPESP. A UNICAMP e à FAPESP apresento meus agradecimentos.