

Uma reflexão sobre metodologias *in vitro* para estimativa de índice glicêmico de alimentos

A reflection on *in vitro* methodologies for estimating the glycemic index of foods

Una reflexión sobre las metodologías *in vitro* para la estimación del índice glucémico de los alimentos

Recebido: 17/09/2020 | Revisado: 18/09/2020 | Aceito: 21/09/2020 | Publicado: 21/09/2020

Suellen Raquel Bueno de Melo Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7451-0159>

Faculdade de Nutrição, Universidade Federal da Alfenas, Brasil

E-mail: suellenraquel@yahoo.com.br

Ana Clara Martins do Carmo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3981-5827>

Faculdade de Nutrição, Universidade Federal da Alfenas, Brasil

E-mail: acmc04@hotmail.com

Olga Luisa Tavano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4319-4661>

Faculdade de Nutrição, Universidade Federal da Alfenas, Brasil

E-mail: olga.tavano@unifal-mg.edu.br

Resumo

O Índice Glicêmico (IG) expressa o impacto relativo do carboidrato do alimento na concentração da glicose plasmática, refletindo o fato de que alimentos com maior aumento de resposta glicêmica após sua ingestão apresentam maior IG e vice versa. O conhecimento do IG de alimentos pode orientar a escolha de alimentos mais apropriados para composição da dieta saudável. Porém, estudos para determinação de índice glicêmico de alimentos são trabalhosos e demorados, uma vez que são realizados com participação de voluntários humanos. O interesse por métodos *in vitro* que possam estimar este índice vem sendo crescente. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo discutir a aplicação destas metodologias *in vitro* na estimativa do “índice glicêmico”, através de uma breve revisão narrativa e o teste de ensaios escolhidos para ilustrar a reflexão sobre o tema. Os dois métodos aqui testados foram capazes de apresentar resposta frente à amostra de amido e a observação

das citações sobre a metodologia permite levantar questões como: a utilização de metodologias *in vitro* apresenta-se como algo promissor, de fácil e rápida execução, mas há necessidade da adoção de uma única metodologia *in vitro* de escolha, a ser equiparada a *in vivo*, que permita comparação entre dados gerados e a formação de um banco de dados de valores de IG *in vitro*.

Palavras-chave: Glicose; Amido; Glicemia; Carboidratos.

Abstract

The Glycemic Index (GI) expresses the relative impact of the food's carbohydrate on the plasma glucose concentration, reflecting the fact that foods with a greater increase in the glycemic response after ingestion have a higher GI and vice versa. Knowledge of the GI of foods can guide the choice of the most appropriate foods for the composition of a healthy diet. However, studies to determine the glycemic index of foods are laborious and time consuming, since they are carried out with the participation of human volunteers. The interest in *in vitro* methods that can estimate this index has been growing. In this sense, the present study aimed to discuss the application of these *in vitro* methodologies in the estimation of the “glycemic index”, through a brief narrative review and the test of tests chosen to illustrate the reflection on the theme. The two methods tested here were able to respond to the starch sample and observing the quotes about the methodology allows raising questions such as: the use of *in vitro* methodologies presents itself as something promising, easy and quick to execute, but there is a need the adoption of a single *in vitro* methodology of choice, to be equated *with in vivo*, which allows comparison between generated data and the formation of a database of *in vitro* GI values.

Key words: Glucose; Starch; Blood glucose; Carbohydrates.

Resumen

El Índice Glucémico (IG) expresa el impacto relativo de los carbohidratos del alimento sobre la concentración de glucosa plasmática, reflejando el hecho de que los alimentos con un mayor aumento de la respuesta glucémica tras la ingestión tienen un IG más elevado y viceversa. El conocimiento del IG de los alimentos puede orientar la elección de los alimentos más adecuados para la composición de una dieta saludable. Sin embargo, los estudios para determinar el índice glucémico de los alimentos son laboriosos y requieren mucho tiempo, ya que se realizan con la participación de voluntarios humanos. El interés por los métodos *in vitro* que pueden estimar este índice ha aumentado. En este sentido, el presente estudio tuvo

como objetivo discutir la aplicación de estas metodologías *in vitro* en la estimación del “índice glucémico”, a través de una breve revisión narrativa y la prueba de protocolos elegidos para ilustrar la reflexión sobre el tema. Los dos métodos probados aquí fueron capaces de responder a la muestra de almidón y la observación de las citas sobre la metodología permite plantear ideas como: el uso de metodologías *in vitro* se presenta como algo prometedor, fácil y rápido de ejecutar, pero existe una necesidad. La adopción de una única metodología *in vitro* de elección, equiparable a la *in vivo*, que permite la comparación entre los datos generados y la formación de una base de datos de valores de IG *in vitro*.

Palabras clave: Glucosa; Almidón; Glucosa en sangre; Carbohidratos.

1. Introdução

A determinação e o conhecimento do índice glicêmico (IG) de um alimento são de grande relevância em diversos âmbitos, a exemplo de sua aplicabilidade no manejo do *diabetes mellitus*. Usualmente utilizam-se metodologias *in vivo* para essa determinação, as quais são complexas e dispendiosas (Bohn et al., 2018). Em alternativa aos estudos *in vivo*, apresentam-se os estudos *in vitro*, cujo intuito é simular as condições fisiológicas a fim de que se obtenham resultados que representem o potencial IG em humanos. Análises *in vitro* que possam substituir métodos *in vivo* são interessantes, devido a sua maior praticidade de execução, menor custo e também por questões éticas que possam incluir a participação de seres humanos e animais em pesquisas científicas (Bohn et al., 2018). O estabelecimento de uma metodologia *in vitro* que possa ser utilizada para a determinação de índice glicêmico de alimentos vai ao encontro deste contexto e poderia acelerar o desenvolvimento de tabelas de informações disponíveis sobre os diferentes alimentos.

Neste estudo discutem-se metodologias citadas na literatura científica ao longo do tempo para realização da determinação de índice glicêmico *in vitro*, abordando-se suas questões metodológicas e comparativas aos métodos *in vivo*, abrindo-se assim uma discussão sobre a viabilidade de se adotar métodos *in vitro* como alternativa ou mesmo como substituição às metodologias *in vivo*.

1.1. Índice Glicêmico dos alimentos

A manutenção de concentrações plasmáticas de glicose em níveis mais próximos da normalidade pode contribuir para prevenção ou retardo do surgimento de distúrbios

metabólicos, como o *diabetes mellitus*, além de ser associado à redução de risco para doenças crônicas cardiovasculares, seja para indivíduos diabéticos ou não (Hon et al., 2020, Spieth et al., 2000; Brand-Miller & Foster-Powell, 1999). Essa glicemia pós-prandial é modulada por diferentes fatores, mas dentre os mais importantes está a velocidade e quantidade total de moléculas de glicose liberadas para a corrente sanguínea após ingestão do alimento (Jenkins et al., 1987; Wong, Traianedes & O’Dea, 1985). Uma vez que a digestão é um processo dinâmico, a taxa de absorção destes carboidratos está intimamente ligada à velocidade de liberação de moléculas de mono ou dissacarídeos da matriz do alimento, seja por ação de solubilização ou processos enzimáticos constituintes da digestão.

Além disso, outras características da própria matriz do alimento podem ser consideradas interferentes na velocidade com que carboidratos serão digeridos e absorvidos, como a presença de fibras, lipídios e outros tipos de nutrientes que possam interagir com esse amido, ou diversos outros fatores podem afetar o índice glicêmico dos alimentos. Dentre eles destacam-se fatores fisiológicos que alterem a digestão, absorção e motilidade intestinal e os fatores inerentes ao alimento, como, por exemplo, o processo de maturação de frutas ou efeito de processamentos térmicos (Pi-Sunyer, 2002; Sartorelli & Cardoso, 2006; Sheard et al., 2004).

Dois termos principais foram estabelecidos e indicam a resposta do organismo humano à concentração de carboidratos ingerida através do alimento: o “Índice Glicêmico” (IG) e “Carga Glicêmica” (CG) (WHO, 1998; Jenkins et al., 1981; Wolever et al., 1991), cujas adoções tornam possível a classificação dos alimentos em relação ao seu potencial glicemiante.

A definição de índice glicêmico é dada pelo aumento progressivo da área gerada pela curva de concentração de glicose sanguínea em resposta a um alimento, comparada à mesma área gerada pelo alimento padrão alimento-controle de resposta conhecida, como solução de glicose ou pão branco (Zhang et al., 2020, Jenkins et al., 1981).

Quando se adota a glicose como padrão para comparação, o IG é determinado de acordo com as seguintes classificações: “baixo” quando abaixo de 55, “moderando” quando entre 56 e 69 e “alto” quando maior que 70. Dessa forma assume-se que para valores considerados baixos estes alimentos efetivam uma elevação glicêmica pós-prandial de maneira lenta. Em contrapartida, aqueles com valores classificados como altos elevam-na rapidamente (WHO, 1998; Brand-Miller et al., 1999).

Há controvérsias quanto à aplicabilidade do índice glicêmico (Sartorelli & Cardoso, 2006). O parâmetro tem utilidade validada na Austrália, Canadá e Europa, mas a *American*

Diabetes Association (ADA) sugere que a comprovação de sua utilidade clínica ainda requer mais estudos (Sheard et al., 2004). Pesquisadores afirmam sua inaplicabilidade quando se trata de populações devido às inúmeras variáveis que interferem em sua reprodutibilidade (Beebe, 1999; Franz, 1999; Laville, 2004). Sob a ótica dessa discussão a ADA enfatiza a importância quantitativa e qualitativa do carboidrato no impacto glicêmico gerado, colocando a quantidade como fator primordial de controle. O posicionamento da ADA quanto à impossibilidade do uso do índice glicêmico como instrumento principal de controle da glicemia é reafirmado a partir de pontos pautados por ela: o índice glicêmico não considera a resposta glicêmica como uma ação conjunta do total de carboidratos ingeridos, enfatizando somente valores de consumo individual de cada carboidrato, devido à metodologia atualmente aplicada; as tabelas internacionais ignoram respostas geradas a partir do consumo conjunto dos alimentos, prevendo apenas valores correspondentes ao consumo isolado; a precisão da resposta glicêmica considerada pelo IG contempla melhor indivíduos saudáveis do que os diabéticos (Sheard et al., 2004).

Além destes argumentos, ao considerar a área da curva este índice não considera o “formato” desta curva. Um mesmo resultado de área total poderia ser obtido com uma curva suave ao longo das duas horas de ensaio e uma curva na forma de “pico”, com liberação de toda glicose logo nos primeiros momentos da medida. E na prática, esta última forma de liberação poderia impactar de maneira diferente no metabolismo humano. Outra abordagem é que esta medida sempre considera uma mesma quantidade de carboidratos de partida, ou seja, geralmente se utiliza de 50g de carboidratos do determinado alimentos, sem considerar a glicemia por quantidade de alimento, e não de carboidrato.

A elucidação do conceito carga glicêmica é referente tanto à qualidade quanto à quantidade do carboidrato consumido no total do alimento, possibilitando uma quantificação do efeito total na glicose plasmática. Seu valor deriva de um produto do índice glicêmico de um alimento pelo seu carboidrato disponível (Silva et al., 2009). Em ocasiões em que a glicose é tomada como produto padrão de referência classifica-se de acordo com os seguintes valores: baixos quando menor ou igual a 10, moderada quando entre 11 e 19, e alta quando maior ou igual a 20. A carga glicêmica total da dieta é obtida a partir da soma da CG de cada alimento.

Nos dias atuais, o índice glicêmico é mais frequentemente utilizado e disponibilizado do que o valor da “carga glicêmica”. Ao se realizar uma pesquisa utilizando o descritor “glycemic load” na base de dados “PubMed”, a consulta retornou 1028 resultados, contra

4.382 para “glycemic index” na data de 17 de setembro de 2020, incluindo-se as aspas na expressão pesquisada.

1.2. Metodologias para determinação de índice glicêmico dos alimentos

O conceito de “índice glicêmico dos alimentos”, do inglês “glycemic index of foods” foi introduzido por Jenkins et al. (1981), em um estudo com o objetivo de determinar o efeito do consumo de diferentes alimentos na glicemia. Neste estudo foram coletadas amostras de sangue de voluntários saudáveis em jejum, os níveis de glicose foram medidos ao longo de 2 horas e expressos como uma porcentagem da área sob a curva de resposta à glicose, quando a mesma quantidade de carboidrato foi tomada. O índice glicêmico de um alimento atualmente é convencionalmente determinado a partir da curva gerada pela resposta glicêmica de um alimento obtida a partir da amostra de no mínimo seis indivíduos saudáveis, a fim de que se minimize as interferências de variações individuais. A glicose sanguínea é medida após jejum de 10 a 12 horas e posterior consumo de 50g de carboidrato do alimento teste e do padrão em solução. A mensuração da glicemia deve ser realizada a cada 15 minutos em um intervalo de 120 minutos (WHO, 1998; Jenkins et al., 1981; Wolever et al., 1991).

A representação do cálculo do índice glicêmico é dada pela equação: $IG = \frac{\text{área sob a curva do alimento teste}}{\text{área sob a curva do produto padrão}} \times 100$. Considera-se somente a elevação glicêmica sobressalente ao valor determinado para glicose de jejum (WHO, 1998).

Este conhecimento sobre o índice glicêmico é importante devido à relação entre concentrações elevadas de glicose no sangue e o aumento do risco de diabetes tipo II, doença coronariana, doença da vesícula biliar e câncer colorretal, de mama e de endométrio, como encontrado em revisões de literatura e estudos de meta-análise (Barclay et al., 2008; Sieri et al., 2017).

As concentrações de glicose no sangue são mensuradas em humanos através da coleta de uma amostra de sangue após a ingestão de alimentos contendo carboidratos. O Comitê de Definição de Carboidratos Glicêmicos da (American Association for Clinical Chemistry) (AACC) expressou sua preocupação com a considerável variabilidade intra e interindividual dessa medida *in vivo* (Jones, 2007; Jenkins et al., 1981; Brouns et al., 2005; Williams et al., 2008).

Porém, a realização de ensaios *in vivo* apresentam dificuldades, dado que são trabalhosos, onerosos, invasivos e demandam um notável período de experimentação. Portanto, ao longo das últimas décadas foram propostos ensaios *in vitro* em alternativa à

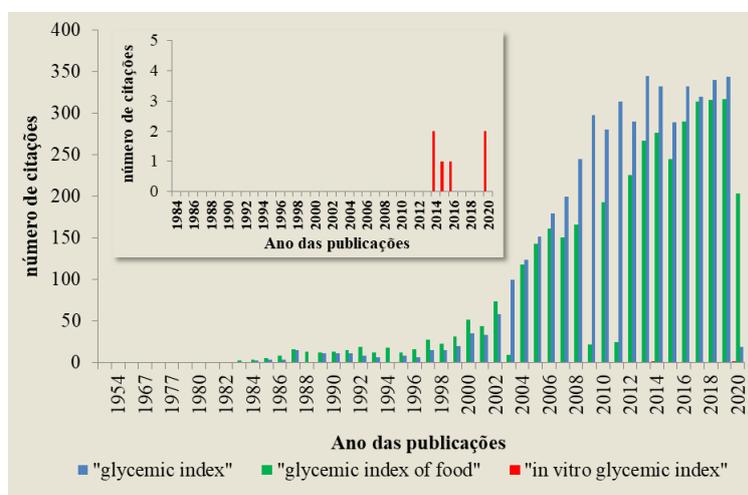
metodologia *in vivo* para estimar a resposta glicêmica dos alimentos (Capriles et al., 2009), apresentando-se com metodologias cujo intuito é simular as condições fisiológicas a fim de que se obtenham resultados que representem o potencial IG em humanos. Métodos *in vitro* de análises que possam substituir métodos *in vivo* são interessantes, devido a sua maior praticidade de execução, menor custo e também por questões éticas que possam incluir a participação de seres humanos e animais em pesquisas científicas. O estabelecimento de uma metodologia *in vitro* que possa ser utilizada para a determinação de índice glicêmico de alimentos vai ao encontro dessas questões e poderia acelerar o desenvolvimento de tabelas de informações disponíveis sobre os diferentes alimentos.

Neste estudo discutem-se metodologias citadas na literatura científica ao longo do tempo para realização da determinação de índice glicêmico *in vitro*, discutindo-se suas questões metodológicas e comparativas aos métodos *in vivo*, abrindo-se uma discussão sobre a viabilidade de se adotar métodos *in vitro* como alternativa ou mesmo como substituição às metodologias *in vivo*.

1.2.1. Índice Glicêmico de alimentos *in vitro*

Embora a expressão “índice glicêmico dos alimentos” tenha sido proposta em 1981 (Jenkins et al., 1981) e já possa ser encontrada na literatura científica (“glycemic index of food”) desde então, apenas em 1986 o termo “índice glicêmico *in vitro*” começa a figurar na literatura científica (com a expressão em inglês “*in vitro* glycemic index”). A Figura 1 ilustra essa evolução do número de citações em que os termos referentes ao índice glicêmico se apresentam na literatura científica desde o ano de 1952, quando a base de dados “PubMed” retornou pela primeira vez uma referência ao termo “glycemic index”.

Figura 1. Número de resultados recuperados da pesquisa pelos termos por ano. Foi utilizada a base de dados “PubMed” (disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) em consulta realizada em 10 de agosto de 2020).



Fonte: Construção dos autores (2020).

É possível verificar-se um aumento gradual no número de publicações em que os termos “glycemic index”, “glycemic index of food” e “*in vitro* glycemic index” são citados, ao longo dos anos. Mas, os trabalhos que citam o índice glicêmico *in vitro* encontram-se em minoria (Figura 1). Em 1986 houve a recuperação de um documento apresentando o descritor “*in vitro* glycemic index”, porém pode ser observado que a expressão utilizada apresenta baixas citações, sendo que entre os anos de 2017 e 2019 não obtiveram resultados referentes a pesquisa, e em 2020, até a data de 17 de setembro de 2020, 17-09-2020 apenas dois resultados foram obtidos. Estas são citações na referida base de dados, entretanto, quando a pesquisa foi realizada no “google acadêmico”, um total de 121 citações com a mesma expressão obtiveram resultados, indicando a necessidade de mais discussões e abordagens metodológicas sobre o tema.

Por outro lado, embora estes resultados de retorno de citações da expressão “*in vitro* glycemic index” possam ser baixos, é importante destacar que as pesquisas incluíram apenas os resultados para as expressões exatas, mas justamente o que se observa na literatura é uma grande quantidade de trabalhos que apresentam dados de “digestibilidade *in vitro* dos carboidratos” e que pouco se distinguem em metodologia daquelas apontadas como determinações do índice glicêmico *in vitro* ou mesmo o uso do descritor “índice glicêmico” (glycemic index) e ao se conferir a metodologia utilizada havia citação de etapa de digestão *in vitro*. É importante ressaltar que já no final da década de 1940 e início da década de 1950 há

citações de estudos que não utilizaram especificamente estes descritores, mas já esboçam as primeiras citações claras sobre o tema, como o trabalho de Lowry & Thiessen (1950), que trazem ensaios *in vitro* sobre a digestão de carboidratos na presença de proteínas.

Muitos dos estudos focam na resposta do amido frente à digestão humana. O amido é um dos carboidratos mais quantitativamente importantes na dieta humana e sua digestão, entendida como sua taxa potencial de hidrólise e absorção, vai influenciar diretamente nas concentrações de glicose plasmática advindas da alimentação. O amido pode ser classificado como “rapidamente digerível”, “lentamente digerível” e “resistente”, a depender principalmente de sua composição (proporção entre amilose e amilopectina) e “compactação”/“estruturação” dos grânulos de amido (Jenkins et al., 1987; Wong et al., 1985). Desta forma, o que se percebe a princípio é uma grande confusão de termos. Seria necessário que se padronizasse o que se chama de digestão e de IG.

Na Tabela 1 encontram-se destacados alguns dos principais estudos referentes ao tema e que abordam o índice *in vitro*, a partir do principal estudo divulgado por Jenkins e seus colaboradores em 1981.

Tabela 1. Breve histórico sobre índice glicêmico em sua primeira década de citações e introdução das metodologias *in vitro*.

1981	O termo “índice glicêmico” dos alimentos é proposto por David J. A. Jenkins, Thomas M. S. Wolever, Rodney H. Taylor, Helen Barker, Hashmein Fielden, Allen C. Bowling, Hillary C. Newman, Alexandra L. Jenkins e David V. Goff, em 1981.
1982	Jenkins et al. (1982), realizam o estudo pioneiro através do qual possibilitou-se estabelecer a relação entre a taxa de digestão dos alimentos e a glicemia pós-prandial, através da relação significativa entre açúcares e oligossacarídeos liberados em ensaio <i>in vitro</i> e a área sob a curva de glicose no sangue. A partir daí introduz-se ensaios <i>in vitro</i> com a sugestão de que estes poderiam ajudar a identificar alimentos de uso para pacientes diabéticos e, ao mesmo tempo, ampliar a discussão acerca dos fatores que afetam a glicemia pós-prandial. Sendo estabelecido como um referencial para estudos subsequentes ao longo dos anos.
1983	Yoon et al. (1983) pesquisaram sobre o efeito do ácido fítico na digestibilidade do amido, no qual foi realizado um estudo <i>in vitro</i> e correlacionado à resposta da glicose no sangue (índice glicêmico) em voluntários saudáveis. A digestão <i>in vitro</i> foi proposta com utilização de saliva humana, em pH e temperatura fisiológicos.

-
- 1985 Brand et al. (1985) realizaram um estudo a fim de comparar a digestibilidade *in vitro* do amido e a resposta pós-prandial da glicose no sangue de alimentos cozidos convencionalmente *versus* alimentos industrializados. Utilizou-se saliva humana e pancreatina suína no ensaio *in vitro*, que também foi realizado em temperatura fisiológica (37°C). Quando correlacionados com os resultados do consumo dos mesmos alimentos em voluntários saudáveis, os alimentos processados produziram um índice glicêmico mais alto.
-
- 1986 Jenkins et al. (1986) caracterizaram as diferenças na resposta glicêmica produzida a partir da consideração de fatores nela interferentes, como, por exemplo, natureza do amido e quantidade disponível no alimento, processamento, conteúdo de fibras, presença de antinutrientes. A partir dessa abordagem os alimentos passaram a ser classificados de acordo com seu índice glicêmico. Sugere-se também a partir dessa discussão a possibilidade da manipulação das dietas a fim de alcançar-se objetivos metabólicos específicos como, por exemplo, a utilização de alimentos com baixo índice glicêmico no tratamento de diabetes e hiperlipidemia. No entanto os autores sugerem cautela quanto à utilização dos resultados obtidos admitindo a necessidade de estudos complementares abrangendo demais fatores que possam interferir nessa resposta.
-
- 1987 Ross et al. (1987) utilizaram um método modificado de Jenkins et al. (1981) para verificar a digestibilidade *in vitro* do amido, no qual o trigo foi cozido e moído em um pilão para simular a mastigação, foi utilizado tampão fosfato (pH 6,9), saliva humana e pancreatina suína. As diferenças nas respostas glicêmicas e insulínicas aos produtos de trigo podem ser explicadas devido processamento e o grau de gelatinização alcançado.
-
- 1988 Heaton et al. (1988) pesquisaram sobre a influência do tamanho da partícula das farinhas de trigo, milho e aveia e seus efeitos sobre as respostas plasmáticas de glicose e insulina e sobre a taxa de digestão *in vitro* de amido. A hidrólise do amido *in vitro* pela amilase pancreática foi mais rápida com a diminuição do tamanho das partículas dos três cereais, porém, sua correlação com os dados *in vivo* foi inconclusiva.
-
- 1989 Bornet et al. (1989) correlacionaram respostas da insulina e glicemia em humanos sadios a amidos processados de diferentes formas, com a hidrólise da α -amilase *in vitro* no qual as amostras foram testadas cruas, em forma de géis e cozidas. Como resultado, encontrou-se que ao serem submetidas ao cozimento as amostras aumentaram as respostas plasmáticas, demonstrando que o processamento altera a ação enzimática sobre o amido.
-

- 1990 Brand et al. (1990) Avaliam respostas plasmáticas de glicose e insulina em refeições indianas, sustentando a hipótese de que a digestão lenta e absorção dos amidos tradicionais pode ser um fator protetor aos indivíduos propensos ao desenvolvimento do diabetes.

Fonte: Construção dos autores (2020).

A partir desta perspectiva dos fatos apontados na Tabela 1, as simulações *in vitro* de processos de digestão vem sendo cada vez mais utilizadas para estudar sobre o comportamento gastrointestinal de alimentos e produtos farmacêuticos. Apesar dos estudos em humanos ainda serem considerados como "padrão ouro" para abordar questões relacionadas com a dieta, os métodos *in vitro* têm a vantagem de serem mais rápidos, menos dispendiosos, menos trabalhosos e não têm restrições éticas. Eles permitem ainda que um número relativamente grande de amostras sejam mensuradas em paralelo. A reprodutibilidade, escolha de condições controladas e amostragem fácil tornam os modelos *in vitro* muito adequados para estudos e construção de hipóteses (Minekus et al., 2014).

Métodos que simulam a digestão geralmente incluem a fase oral, gástrica, pequenas fases intestinais, e ocasionalmente consideram a fermentação intestinal. Esses métodos tentam mimetizar as condições fisiológicas *in vivo*, considerando a presença de enzimas e suas respectivas concentrações, pH, tempo de digestão e concentração de sais, entre outros fatores (Minekus et al., 2014).

Uma vez que grande parte da resposta glicêmica é relativa ao potencial de hidrólise dos carboidratos por amilases digestivas, métodos *in vitro* que relacionem à cinética de hidrólise com a potencial liberação de glicose podem ser propostos, com grande possibilidade de alcançarem respostas bastante significativas e correlacionadas com o dado gerado *in vivo*. Na literatura inúmeros protocolos e propostas de estimativas podem ser encontrados, sendo necessário que se faça uma avaliação sobre suas reais aplicações para expressarem esta informação (Simsek & Nehir, 2015; Chung et al., 2008; Frei et al., 2003).

Muitos trabalhos apresentam sob a denominação de "índice glicêmico *in vitro*" a expressão do grau de hidrólise de amido do alimento, apenas entendida como o computo do número de ligações glicosídicas rompidas, mas não trazem o computo da efetiva liberação de glicose como medida principal. Outros apresentam resultados que já incluem o computo de glicose liberada, mas a cinética de liberação não leva em consideração o tempo relativo para essa potencial resposta em situação pós-prandial (Simsek & Nehir, 2015; Chung et al., 2008; Frei et al., 2003).

A determinação do índice glicêmico *in vitro* se baseia principalmente na detecção de glicose liberada (Arnhold et al., 2016) ou em ligações glicosídicas rompidas (Borges et al., 1987) a partir da aplicação de uma amilase ou sequência de amilases sobre a amostra contendo o carboidrato.

Carboidratos que possuem seu grupo carbonílico livre são denominados açúcares redutores e possuem a capacidade de se oxidar em solução alcalina diante de agentes oxidantes. Tal oxidação só ocorre se o monossacarídeo em questão se apresentar em sua forma linear, equilibrado com sua estrutura cíclica. Desta forma, o carbono carbonílico, que possui denominação de anomérico quando está em estrutura cíclica é oxidado a um grupo carboxílico. Em contrapartida, os carboidratos dos quais os carbonos anoméricos estão relacionados a ligações glicosídicas, incapazes de se estruturarem em sua forma linear e, conseqüentemente, de sofrerem oxidação em solução alcalina, denominam-se açúcares não redutores, sendo a sacarose um exemplo (Silva et al., 2009; Nelson & Cox, 2014).

Os teores de açúcares redutores e açúcares redutores totais podem ser mensurados através de inúmeros métodos químicos não seletivos, fornecendo resultados com considerável grau de confiabilidade quando realizados corretamente, posteriormente à eliminação de interferentes (Borges et al., 1987).

Para se realizar a análise de açúcares redutores, os métodos químicos mais conhecidos são fundamentados na redução de íons cobre em soluções alcalinas, porém também existem métodos com outros princípios, com finalidade de obtenção de compostos finais com coloração mensurável na região do Visível (Dubois et al., 1956; Lane et al., 1934; Miller, 1959).

Inicialmente o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi aplicado para estimar açúcares no sangue e na urina (Gonçalves et al., 2010; Teixeira et al., 2012). Em seguida, o ensaio foi aperfeiçoado por Miller (1959), de forma que seu protocolo foi o mais amplamente utilizado por muitos anos, com diversas finalidades, sendo também o mais citado na literatura. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante presente no reativo DNS) reage com o carbono carbonílico de açúcares redutores, em condições alcalinas, sendo reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto corado que possui absorção máxima de luz a 540 nm (Gonçalves et al., 2010; Negrulescu et al., 2012). Foi primeiramente desenvolvido com a finalidade de determinar açúcares redutores na urina de indivíduos e diabéticos. O ensaio baseia-se na capacidade do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ser reduzido pela glicose a um composto análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) de coloração característica. A relação direta entre a

colorimetria gerada e a quantidade de açúcares redutores presente é possível devido a forte absorção da luz por esse composto aromático (Gonçalves et al., 2010).

A desvantagem neste caso é que uma molécula de glicose, uma molécula de maltose ou um fragmento de amido contendo, por exemplo, 10 unidades de glicose ainda ligadas por suas ligações glicosídicas, podem oferecer a mesma resposta por conterem igualmente um terminal redutor livre. Mas, uma vez que cada ligação glicosídica rompida libera um terminal redutor livre, a leitura deste ensaio pode fornecer um parâmetro de eficiência de hidrólise de carboidratos frente à uma amilase ou sequência de amilases de escolha.

Por outro lado é possível utilizar-se o dado do número de moléculas de glicose especificamente. Diferentes metodologias podem ser utilizadas como ensaios com uso de cromatografia líquida de alta eficiência ou uso de “kits enzimáticos” de determinação de glicose por técnicas espectrofotométricas (BIOCLIN, 2018).

Uma vez que as técnicas de simulação das “digestões” de carboidratos são variadas e diferentes protocolos são citados com o objetivo de se estimar o IG *in vitro*, este trabalho pretende colaborar com a discussão sobre a viabilidade de se adotar uma metodologia de referência para determinação *in vitro* deste índice, fazendo uma reflexão sobre o tema com base na aplicação de dois protocolos selecionados após o levantamento sobre estes métodos na literatura a partir de 1986, ano considerado como o pioneiro desta técnica.

2. Metodologias

2.1. Material

Foi utilizada amostra de amido de milho puro, comercialmente obtido.

2.2. Determinação da umidade das amostras

Para estimativa mais exata do total de carboidratos presente na amostra, o teor de umidade da amostra de amido foi determinado em estufa com circulação de ar, a 105°C, até peso constante. O peso em massa seca foi utilizado para os cálculos.

2.3. Determinação de índice glicêmico *in vitro* - Ensaio 1

Foi reproduzida a metodologia proposta por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997), cujas principais etapas estão representadas na Figura 2, utilizando-se o amido de

milho como amostra teste. Brevemente: a 50 mg de amostra foram acrescentados 10 mL de tampão HCl-KCl pH = 1,5 e 0,2 mL de solução pepsina (1 g/10 mL de tampão HCl-KCl). A amostra foi incubada a 40°C/60 min em banho-maria com agitação constante, nesta fase identificada como “fase gástrica”. Após este tempo foi adicionado Tampão Tris-Maleato pH = 6,9 até volume final de 25 mL. A “fase intestinal I” foi iniciada pela adição de 5,0 mL de solução de α -amilase (2,6 UI/5 mL de tampão Tris-Maleato), e então a amostra foi novamente incubada a 37°C em banho-maria, sob agitação constante, por 90 minutos adicionais. Após esta nova incubação a fase intestinal I foi interrompida pela incubação da amostra em banho-maria sob fervura e agitação intensa por 5 minutos. Após refrigeração, para 1 mL de hidrolisado foram acrescentados 3,0 mL de tampão fosfato 0,4 mol/litro, pH 4,75, e então iniciou-se a “fase intestinal II” com a adição de 60 μ l de amiloglicosidase e esta a mistura foi mantida em 60°C por 45 min, em banho sob agitação. A reação foi interrompida pela fervura das amostras por 5 min e imediato resfriamento em banho de gelo. Este hidrolisado teve seu volume ajustado para 100 mL e foi considerado para as determinações de grau de hidrólise do amido, como descrito a seguir no item 2.5. O percentual de hidrólise (%H) calculado conforme descrito em 2.5, foi utilizado para a estimativa do Índice Glicêmico *in vitro* (IGiv), considerando-se a fórmula proposta pelos autores: $IGiv = 39,71 + 0,549.HI$.

Adicionalmente, o IGiv foi calculado considerando-se um ensaio onde a fase intestinal I foi realizada como descrito acima, estendendo-se o período de incubação para 120 minutos, como também testado pelos autores.

Ao longo do experimento alíquotas foram tomadas em diferentes tempos de hidrólises e ao final das etapas para melhor avaliação das reações, sendo cada alíquota tomada também inativada sob fervura.

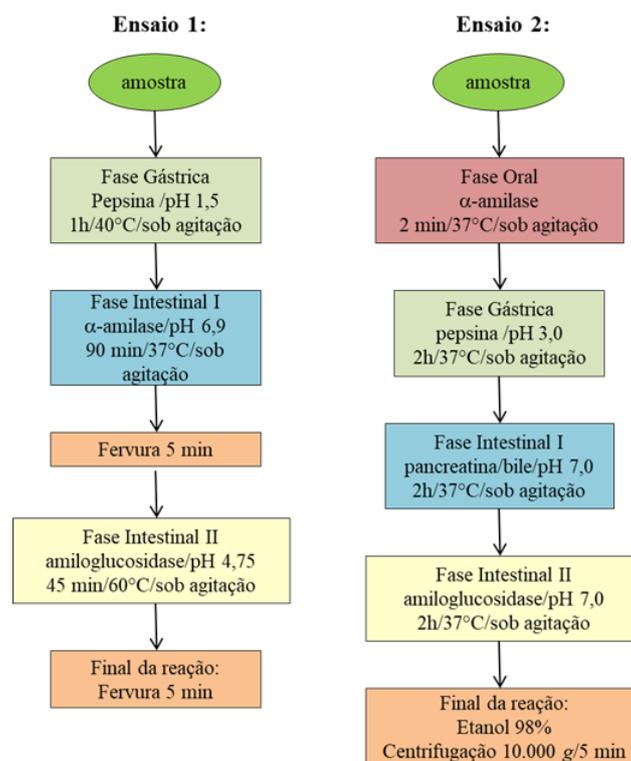
2.4. Determinação de índice glicêmico *in vitro* - Ensaio 2

Foi reproduzida a metodologia proposta por Alongi, Melchior & Anese (2019), cujo protocolo simula uma fase oral, uma fase gástrica e as fases intestinais I e II, também representadas na Figura 2. Brevemente: para a fase oral, 1 g de amostra (massa seca de amido) foram adicionados 12 μ l de CaCl₂ 0,3 mol/litro, 388 μ l de H₂O e 1600 μ l de α -amilase (6,4 mg/ml). Após incubação a 37 °C sob agitação por 2 minutos o pH da solução foi ajustado para o valor de 3,0 por adição de HCl 1 mol/litro, para início da simulação da fase gástrica, quando foram adicionados 140 μ l de H₂O e 1,82 mL da solução de pepsina (0,31 mg/mL - 2000 U/mL). A solução foi incubada a 37°C, sob agitação, por 2 horas. Subsequentemente, o

pH da solução foi ajustado para o valor de 7,0 com NaOH 1 mol/litro para início da terceira fase, que simula a fase intestinal I, quando foram adicionados 5,4 µl de CaCl 0,3 mol/litro, 175,5 µl de H₂O, 2,14 mL da solução de pancreatina (22,15 mg/mL ou 100 unidades/mL) e 334 µl da solução de bile previamente preparada (160 mmols/litro). A mistura foi incubada a 37°C, sob agitação, por outras 2 horas. A fase intestinal II foi iniciada com a adição de 86 µl da enzima amilglucosidase (AMG 300L) mantendo-se a incubação a 37 °C por mais por 2 horas, sob agitação. Ao final do tempo de hidrólise o hidrolisado foi precipitado pela adição de 4 volumes de etanol 98%, recolhendo-se o sobrenadante após centrifugação a 10.000 g/5 minutos. Este sobrenadante foi utilizado para as determinações de glicose conforme descrito no item 2.5. Adicionalmente, alíquotas foram igualmente coletas ao final das outras fases e em diferentes intervalos das fases intestinais, para melhor acompanhamento da reação de hidrólise, e tiveram o mesmo tratamento com a precipitação com o etanol 98%.

Para efeito de comparação, o Índice Glicêmico *in vitro* (IGiv) foi também expresso com a utilização do % de hidrólise gerado nesta metodologia mas com a aplicação da fórmula descrita no item 2.3.

Figura 2. Representação esquemática das reações de hidrólise do amido para determinação do índice glicêmico *in vitro* para o Ensaio 1, conforme descrito por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997), e Ensaio 2, conforme descrito por Alongi, Melchior e Anese (2019).



Fonte: Construção dos autores (2020).

2.5. Determinações dos percentuais de hidrólise

2.5.1. Determinação de terminais redutores liberados

A determinação de açúcares redutores dos hidrolisados (terminais redutores) foi realizada de acordo com descrito por Miller (1959) com uso de DNS e leitura realizada em espectrofotômetro a 540nm contra branco da reação. Uma curva analítica de glicose foi elaborada e os resultados foram expressos em μmol de glicose/mL ($y = 0,5231x - 0,0511$; $R^2 = 0,9957$). Foi considerado que cada novo terminal redutor liberado corresponde a uma ligação glicosídica rompida. O percentual de ligações rompidas foi considerado o grau de hidrólise. O 100% de ligações potencialmente disponíveis foi estimado considerando-se o total de glicose na amostra através da massa de amido utilizada e do peso molecular da glicose, admitindo-se que cada glicose livre apresenta um terminal redutor.

2.5.2. Determinação de glicose livre

O total de glicose livre liberado pelas hidrólises foi também determinado nos hidrolisados através de uso de Kit enzimático de determinação (Bioclin®) com leituras em espectrofotômetro a 505 nm, contra branco da reação. Uma curva analítica de glicose foi elaborada e os resultados expressos em μg de glicose/mL ($y = 0,0162x - 0,0051$; $R^2 = 0,9984$). O percentual de glicose liberada foi considerado o grau de hidrólise. O 100% de moléculas de glicose disponíveis foi estimado considerando-se a massa total de amido utilizada e do peso molecular da glicose.

2.6. Análises Estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Quando necessária, a comparação entre resultados foi aplicado teste de análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, através do software Statsoft STATISTICA 8.0.

3. Resultados e Discussão

Após consulta à literatura buscou-se identificar a primeira referência mais citada na literatura para tal determinação. Duas referências foram selecionadas dentre as mais citadas, cuidando-se para que também apresentassem propostas de simulações de digestões bastante distintas. A primeira referência selecionada foi o trabalho publicado por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997). Esta referência apresentava 931 citações em 17 de setembro de 2020 e, como etapas principais, a adoção de sequência de uso de enzimas digestivas utilizando pepsina, alfa-amilase e então ação da amiloglucosidase para mimetizar a digestão do amido. Ao final, considerando-se a correlação com ensaios *in vivo*, os autores estabeleceram a fórmula: $IGiv = 39,71 + 0,549.HI.$, para conversão do dado de percentual de hidrólise da amostra em índice glicêmico, neste caso *in vitro* (IGiv). Este foi considerado o “Ensaio 1” neste trabalho.

A segunda metodologia abordada, denominada neste trabalho como “Ensaio 2”, foi a de Alongi, Melchior & Anese (2019), sendo esta mais recente e que apresentava uma proposta com protocolo em fases de digestão, incluindo fase oral, gástrica e intestinal I e II, com sequência de tratamento com enzimas digestivas e solução de bile, mais elaboradas que as utilizadas no Ensaio 1. As duas foram comparadas em suas respostas frente à simulação de hidrólise de amido e a seguir são apresentados os resultados e observações sobre tal ensaio, considerando-se os perfis de hidrólise durante as etapas dos protocolos e os resultados finais expressos como IGiv.

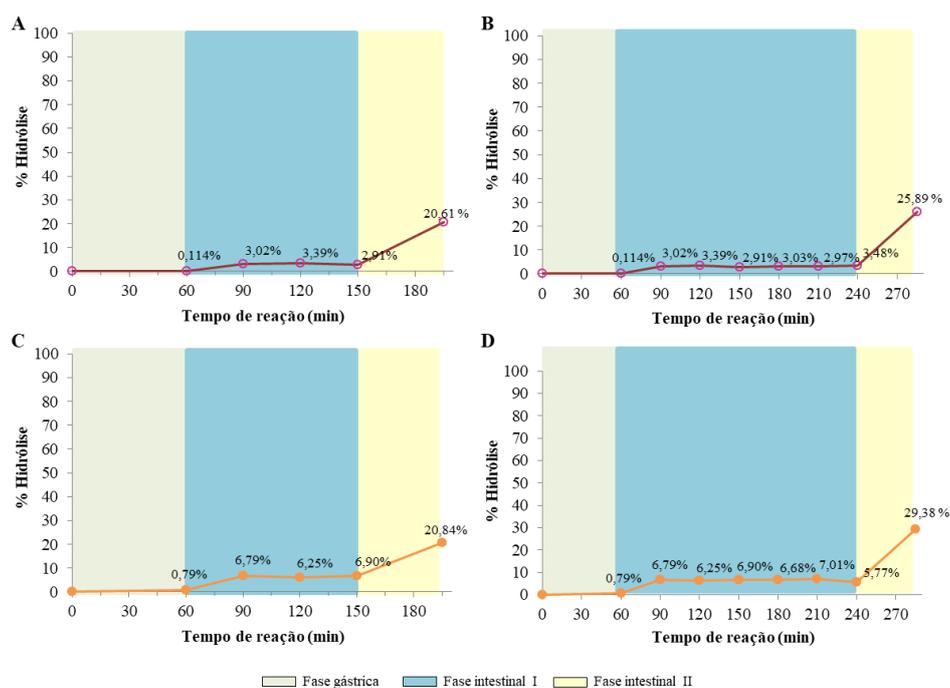
3.1. Perfil de hidrólise com a aplicação do Ensaio 1

Para a metodologia proposta por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997) é possível verificarmos, a princípio, que o ensaio não conta com divisões claras dos processos digestivos que simulassem a condição fisiológica, embora faça uso de uma etapa com pepsina e depois com sequência de amilases, conforme se observa na Figura 2. Além disso, observa-se que foram adotadas as temperaturas que coincidem com as temperaturas ótimas daquelas enzimas incluídas nas etapas, sugerindo um distanciamento das condições fisiológicas. Como exemplo, a etapa de hidrólise com a amiloglucosidase que é realizada neste caso a 60 °C.

A Figura 3 apresenta os resultados para diferentes pontos do processo e permite distinguir a eficácia das enzimas, confirmando que, conforme esperado, a amiloglucosidase é a enzima mais efetiva da reação quando comparada à α -amilase, já que a etapa de hidrólise

com a α -amilase colaborou com cerca de 19% do valor obtido ao final do processo, conforme se observa na figura 3A. Também como esperado, a etapa contendo apenas pepsina não apresentou valores de hidrólise significativos, uma vez que a pepsina é uma protease, e que não se espera ter ação de hidrólise sobre ligações glicosídicas. Com relação ao desempenho da α -amilase, esta é uma enzima considerada “endo-enzima”, ou seja, rompe as ligações que estão ao longo da molécula, ou seja, libera grandes fragmentos de cadeias de amido, enquanto a amiloglucosidase é considerada uma exo-enzima, ou seja, rompe as ligações a partir das extremidades das moléculas de amido, liberando diretamente moléculas de glicose (Woolnough et al., 2008). Para melhor observar-se os efeitos das etapas enzimáticas propostas sobre a digestão do amido, além da determinação direta da glicose liberada, através do uso do kit enzimático (Figura 3A), também foi adotada a determinação dos terminais redutores liberados no meio, através do reagente DNS (Figura 3C). Esta determinação permite detectar aqueles fragmentos de cadeia de amido liberados, de diferentes tamanhos, ou seja, número de unidades de glicose. Uma maltose, por exemplo, poderia ser assim detectada, ao contrário do que ocorreria com o uso do kit, específico para moléculas de glicose. E sua detecção poderia ser importante, pois este método apenas relaciona a eficiência de hidrólise da amostra com o que seria a resposta glicêmica *in vivo*, sendo que uma maltose poderia ser absorvida e ter sua digestão finalizada nos enterócitos.

Figura 3. Perfil de hidrólise do amido frente a aplicação do método 1, conforme descrito por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997), com detecção de grau de hidrólise através de método kit de glicose monoreagente (A e B) e pelo uso do DNS (C e D). Os gráficos A e C apresentam os resultados adotando-se a realização da fase intestinal I por 90 minutos. Os gráficos B e D apresentam os resultados adotando-se a realização da fase intestinal I por 120 minutos.



Fonte: Construção dos autores (2020).

De fato, a comparação dos resultados obtidos através da mesma hidrólise, mas pelas duas distintas metodologias de detecção de seus produtos, mostram que, como esperado, há mais fragmentos de amido liberados em solução do que apenas moléculas de glicose. A Figura 3A apresenta para todos os pontos de análise um percentual de hidrólise menor do que para os pontos gerados pela análise dos terminais redutores (Figura 3C) para quase todos os pontos do processo, embora o ponto final da reação não tenha sido superior ao valor obtido através do uso do Kit.

Uma vez que no trabalho original Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997), citam que a melhor correlação com os ensaios *in vivo* foram obtidas com a hidrólise na segunda etapa (fase intestinal I) realizada em 90 minutos, os mesmos autores realizaram a hidrólise considerando o tempo máximo de hidrólise nessa etapa de 120 minutos. Desta forma, adicionalmente neste presente estudo, considerou-se também os perfis de hidrólise quando a fase intestinal I foi levada a 120 minutos de duração, e os dados podem ser observados na

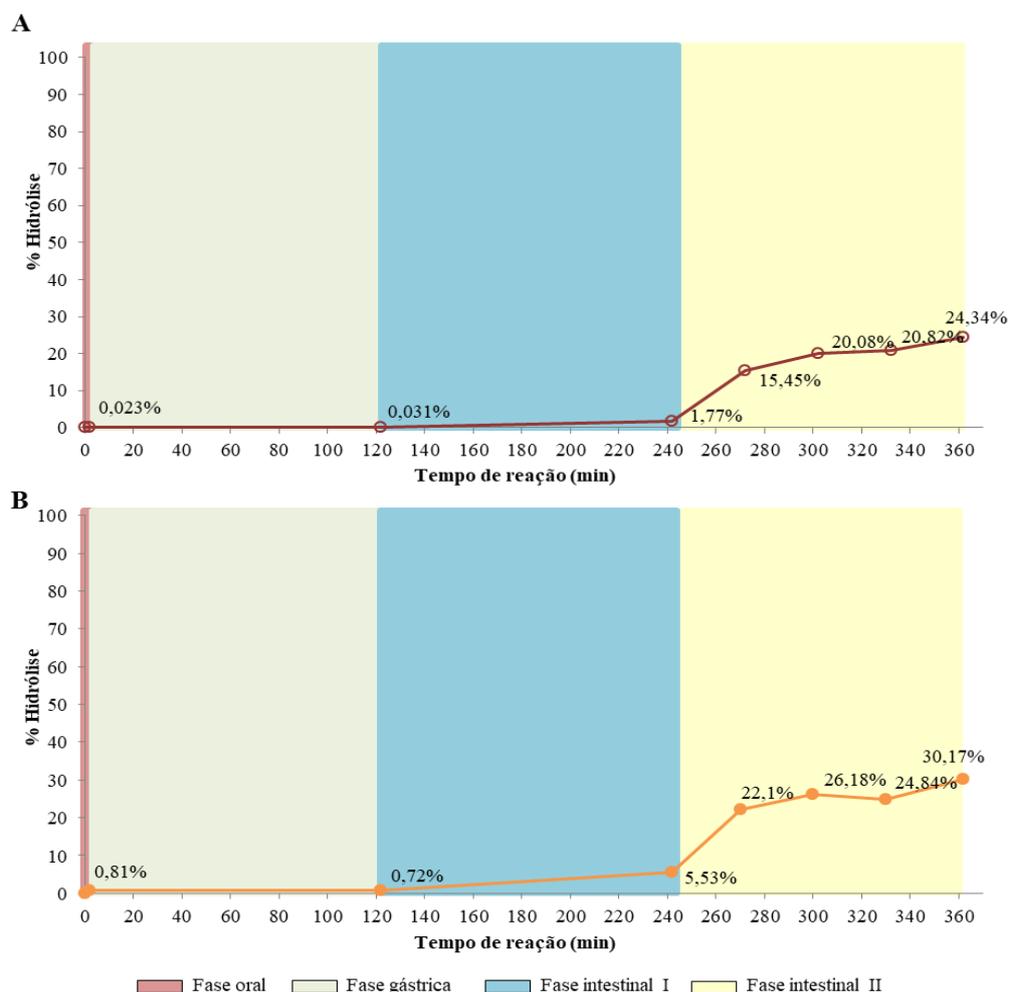
Figura 3 (B e D). Para os resultados da etapa de fase intestinal I pouca alteração foi observada no perfil de hidrólise, porém, houve impacto no final do ensaio, gerando um aumento do percentual de hidrólise após a etapa de fase intestinal II, onde foram observados percentuais de $25,89\% \pm 0,31$ para a detecção realizada com o kit, e $29,38\% \pm 0,42$ para o uso do DNS, ou seja, apresentando um aumento significativo nos dados e também significativamente diferenciando-se os resultados finais ($p \leq 0,05$). Este maior valor para o dado gerado com uso do DNS é esperado, como já considerado anteriormente, uma vez que fragmentos com mais de uma unidade de glicose liberados podem ser aqui detectados, diferentemente do que ocorre com uso do Kit.

3.2. Perfil de hidrólise com a aplicação no ensaio 2

A aplicação do ensaio conforme proposta de Alongi, Melchior & Anese (2019) geraram os resultados as respostas expressas na Figura 4. Esta metodologia representa cada fase da digestão, pois simula desde a fase oral até a intestinal, conforme pode ser observado no esquema representado na Figura 2, que permite também observarmos que os ensaios são realizados em meios de reação com temperaturas e pHs mais próximos dos fisiológicos. Conforme sugerido por Minekus et al. (2014), é importante a utilização das enzimas em condições que mimetizem a fisiologia humana, ou seja, em pH que simulasse o pH humano em cada etapa da reação e não em seu pH ótimo de atividade, buscando simular de forma fidedigna os processos que ocorreriam *in vivo*, assim como as temperaturas utilizadas que também foram as fisiológicas.

Para melhor efeito de comparação entre os métodos, os hidrolisados gerados pelos dois protocolos foram igualmente analisados pelas metodologias de análise de glicose (Kit) e terminais redutores (DNS). As figuras 4A e 4B ilustram este comportamento distinto em cada fase da etapa da digestão.

Figura 4. Resposta da amostra de amido à determinação de índice glicêmico através da aplicação do protocolo do ensaio 2, conforme descrito por Alongi, Melchior & Anese (2019), com detecção de grau de hidrólise através de método do Kit de glicose monoreagente (A) e pelo uso do DNS (B).



Fonte: Construção dos autores (2020).

Neste caso, também como já esperado, o valor obtido para o índice glicêmico através do uso do reagente DNS (Figura 4B) foi superior ao obtido com o kit de glicose (Figura 4A), sendo respectivamente $30,17 \pm 1,67 \%$ e $24,34 \pm 0,64 \%$. Também como esperado, os resultados indicaram que as fases oral e gástrica praticamente não contribuíram para o resultado final. Conforme descrito por Eliasson (2004) sabe-se que o amido é estruturalmente constituído por amilose e amilopectina, onde a amilose é constituída por moléculas de glicoses agrupadas por ligações glicosídicas α -1,4 em sua estrutura linear e a amilopectina é uma estrutura ramificada composta por ligações glicosídicas em α -1,4 e α -1,6. Retomam-se assim as considerações pelas quais se justificam a fase oral não ter apresentado significância,

pois a enzima presente nela é a α -amilase, segundo Lévêque et al. (2000) esta enzima possui atividade hidrolítica de ligações α -1,4, porém com eficiência reduzida quando comparada às amilases subsequentes ao processo digestivo cuja atividade hidrolítica é mais alta. Sabe-se que no estômago não há digestão de carboidratos, assim é esperado que não se apresente enzimas com tais especificidades, acrescidas nessa etapa apenas de modo a se mimetizar os processos *in vivo* e se aproximar do processo fisiológico. Já a fase intestinal se mostra mais efetiva, o que também era esperado e desejável, já que em humanos a fase intestinal da digestão é a etapa crucial sendo esta a que dispõe de mais tempo e de uma quantidade enzimática maior e mais especializada, pois é a fase absorviva dos nutrientes onde estes devem atingir seu potencial ótimo estrutural afim de que sejam utilizados por suas devidas vias metabólicas (Woolnough et al., 2008). Este ciclo conta com amilase pancreática e amilases especializadas presentes na borda em escova. A fim de que se simulasse uma hidrólise efetiva foi pertinente a utilização da amiloglicosidase, pois conforme descreve Obel (2001) ela hidrolisa eficientemente ligações tipo α -1,4 e α -1,6 produzindo glicose a partir dessa quebra, simulando uma condição ótima o que ocorreria no intestino humano.

Embora o Ensaio 2 apresente mais diferenciações entre etapas da digestão e condições que melhor mimetizam as fisiológicas, observa-se que os resultados finais, tanto obtidos com uso do Kit quanto do DNS, pouco se diferenciaram daqueles obtidos no Ensaio 1. Esta observação reforça que o maior efeito de hidrólise do amido, em ambos os ensaios, foi propiciado pela amiloglicosidase e que, uma vez que os dois ensaios incluem uma etapa final com esta enzima os produtos gerados foram bastante similares.

3.3. Estimativa dos Índices Glicêmicos *in vitro* (IGiv)

Conforme proposto por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997), a resposta de grau de hidrólise dos carboidratos pode ser utilizada para se estimar o IG *in vitro*. Esses autores sugeriram uma fórmula baseada na correlação entre os estudos *in vivo* e *in vitro*, permitindo realizar essa conversão. Os resultados finais dos percentuais de hidrólise aqui obtidos pelas diferentes metodologias (correspondentes aos pontos finais das curvas de perfil de hidrólise apresentadas nas Figuras 3 e 4) foram utilizados para as expressões dos IGiv e os dados foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Índice glicêmico *in vitro* (IGiv) do amido.

Método*	IGiv**
Ensaio 1 90' Kit	51,03 ^c ± 0,41
Ensaio 1 90' DNS	51,15 ^c ± 0,04
Ensaio 1 180' Kit	53,92 ^b ± 0,17
Ensaio 1 180' DNS	55,84 ^a ± 0,23
Ensaio 2 Kit	53,06 ^b ± 0,35
Ensaio 2 DNS	56,28 ^a ± 0,92

*Ensaio 1 = Metodologia descrita por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997), considerando-se a fase intestinal II realizada por 90 minutos (90') e por 180 minutos (180'); Ensaio 2 = Metodologia descrita por Alonghi, Melchior & Anese (2019). Em ambos os ensaios há dados obtidos pela determinação de glicose em solução (Kit) e açúcares redutores totais (DNS). **Média ± dp (n=3). Dados seguidos pela mesma letra sobrescrita não apresentam diferença significativa entre si (p< 0.05). Fonte: Construção dos autores (2020).

Antes de serem abordados os dados diretamente é importante tecer considerações a respeito da metodologia, ressaltando que na fórmula proposta pelos autores o grau de hidrólise (HI) da maneira por eles proposta mimetiza o valor obtido do cálculo do total de glicose detectada através da área da curva glicêmica gerada no ensaio *in vivo*. E este é realmente um ponto importante a ser comentado. Na determinação *in vivo* a glicose liberada na corrente sanguínea é calculada considerando-se a área da curva já que essa concentração de glicose advinda da liberação do alimento é dinâmica, ou seja, esta glicose é comumente liberada gradativamente ao longo das duas horas de ensaio, ao mesmo tempo que pode ser consumida neste intervalo. Desta forma, seria muito difícil estabelecer-se o percentual exato de glicose que é detectado no sangue em relação ao disponibilizado, ou seja, não se conseguiria um valor que realmente representasse esse percentual se, por exemplo, o ponto final do ensaio após as duas horas de processo de liberação da glicose fosse o único dado considerado. Uma parte da glicose já poderia ter sido consumida, e, portanto, não computada. Por isso, nesse caso, adotasse o computo total da área da curva, e o 100% não é considerado o total inicial de glicose ingerida e sim a resposta do alimento padrão, que pode ser o pão branco ou uma solução de glicose. Pensando-se no ensaio *in vitro* essa problemática da dinâmica de liberação e consumo da glicose sanguínea não se aplicaria, uma vez que o sistema é estático no sentido de que toda glicose liberada ao longo do processo pode ser encontrada ao final do ensaio, ou seja, não há necessidade de se trabalhar com a área da curva,

podendo estabelecer o ponto final do tempo de hidrólise como o correspondente a esse dado da área no ensaio *in vivo*. Deste modo, para melhor mimetizar o que se considera no IG classicamente determinado, mesmo no *in vitro* adota que o 100% deve ser aquele total de glicose liberada pelo alimento padrão, como o pão branco. Assim, o HI sugerido para a fórmula seria calculado considerando o % de hidrólise da amostra/% de hidrólise do alimento padrão. No presente trabalho, foi considerada a opção da solução de glicose como o alimento padrão, e, portanto, nesse caso, toda a glicose está livre ao final do experimento e detectável nos ensaios adotados (Kit e DNS). Sendo assim, partindo-se tanto para a amostra quanto para a solução de glicose de um mesmo total de glicose em massa, o % de hidrólise calculado (glicose total detectada ao final do ensaio/glicose total da amostra) corresponde diretamente ao HI do protocolo.

Os dados da Tabela 2 refletem claramente as observações já realizadas para os percentuais de hidrólise, sendo que os maiores valores de IGiv ficaram em cerca de 56, sendo os dados correspondentes ao IGiv para o Ensaio 1 180' DNS e Ensaio 2 DNS. Mas, estas determinações para o percentual de hidrólise por DNS foram propostas neste trabalho apenas como ferramenta de melhor análise das liberações de produto, pois, em verdade, o índice glicêmico deve considerar relação com a liberação de glicose pelo alimento. Desta forma, os dados referentes às determinações com uso do Kit devem ser as principalmente consideradas, e, neste caso, os melhores resultados ficaram na faixa de 53.

Em um estudo conduzido com o objetivo de estudar a digestibilidade e índice glicêmico *in vitro* de seis cultivares diferentes de arroz indígena, Frei, Siddhuraju & Becker (2003) investigaram dois tratamentos diferentes em suas amostras e, para estimar o índice glicêmico *in vitro*, seguiram o método proposto por Goñi, Garcia-Alonso & Saura-Calixto (1997). Primeiramente, as amostras foram cozidas e analisadas imediatamente; em outro momento, as amostras foram cozidas e armazenadas em um refrigerador por 24 horas a 4°C, com o intuito de induzir um efeito de retrogradação do amido. Os valores estimados de índice glicêmico oscilaram entre 68 e 109 para arroz cozido e entre 64 e 87 para arroz armazenado contendo amido retrogradado e, portanto, foi constatado que o armazenamento das amostras sob refrigeração acarretou na redução do índice glicêmico estimado para todos os cultivares, demonstrando que o método era capaz de diferenciar as amostras que haviam sofrido diferentes tratamentos térmicos.

Esses resultados de Frei, Siddhuraju & Becker (2003) apresentam faixas de valores próximas às encontradas neste trabalho. E, para melhor efeito de comparação, adicionalmente, o amido foi aqui também testado após pré-aquecimento por 5 minutos sob fervura passando

então pela simulação de digestão referente ao Ensaio 2 e, nestas condições, o IGiv encontrado foi de $74,45 \pm 0,93$, reforçando a capacidade do método de diferenciar as amostras processadas de maneiras distintas e com conseqüente maior ou menor facilidade de digestão.

Com base nas observações obtidas no decorrer deste trabalho foi possível destacar diferentes aspectos da aplicação destes ensaios *in vitro*, conforme apontadas a seguir.

Aspectos positivos observados:

- Teste não invasivo, excluindo a dificuldade de trabalho com voluntários humanos e necessidade de aprovação em comitê de ética;
- Ensaio relativamente rápido, ainda que inclua várias etapas e determinações;
- Uso de quantidade menor de amostra, podendo ser realizada a análise de diferentes amostras ou influência de tratamentos em uma mesma amostra ao mesmo tempo;
- As duas metodologias adotadas demonstraram resultados próximos, embora se diferenciem em seus protocolos de hidrólise. O que não permite que julgue ou aponte uma como destaque positivo ou negativo. Outros estudos, e com maior número de amostras, seriam necessários para alcançar este objetivo.

Aspectos negativos observados:

- Não há um “ensaio padrão ouro” indicado na literatura, sendo encontradas várias referências que abordam o tema, dificultando a adoção da metodologia e a comparação/aplicação dos dados gerados.
- Há utilização de inúmeros reagente e enzimas, exigindo estrutura razoavelmente complexa a depender do protocolo adotado. As análises dos produtos finais podem ser encontradas na literatura com uso de cromatografia líquida de alta eficiência, encarecendo e dificultando a adoção por exigir estrutura laboratorial.
- Não há consideração sobre a absorção dos carboidratos dentro do protocolo, apenas simula-se a digestão como sinônimo de perfil de hidrólise da amostra, sendo necessária a adoção de fórmula de conversão que estime o dado em correspondência com o *in vivo*.

Da forma como foram conduzidos os ensaios, apenas a glicose originalmente disponível é considerada ao final, sendo que em situações *in vivo* outros monossacarídeos, como frutose ou galactose, poderiam ser convertidos à glicose após sua absorção e então detectados.

4. Considerações Finais

Os métodos aqui testados demonstram que os ensaios *in vitro* podem ser promissores e merecem mais discussões a respeito da adoção de um protocolo único e padrão, de maneira que se possam gerar bancos de dados com estes resultados e se permita a comparação entre dados de diferentes trabalhos. A substituição do ensaio *in vivo* ou a utilização paralela deveriam ser mais profundamente debatidas.

Referências

Alongi, M., Melchior, S., & Anese, M. (2019). Reducing the glycemic index of short dough biscuits by using apple pomace as a functional ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 300–305.

Arnhold, T. B., Garlipp, D. C., Fiel, G., Grohe, M., Guth, F., Rasche, J., Hoerlle, J. L. & Lopes, A. L. (2016) Correlação dos valores de lipídios sanguíneos e parâmetros antropométricos em sujeitos praticantes de treinamento de força e em sedentários. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, 10 (62), 717-727.

Barclay, A. W., Petocz, P., McMillan-Price, J., Flood, V. M., Prvan, T., & Mitchell, P. (2008). Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk, a meta-analysis of observational studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 627-637.

Beebe, C. (1999). Diets with a low glycemic index: not ready for practice yet! *Nutrition Today*, 34(2), 82-86.

Bioclin® Glicose Monoreagente K082. Recuperado de https://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wpcontent/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUcoes_GLIcOSE_MONOREAGENTE.pdf

Bohn, T., Carriere, F., Day, L., et al. (2018) Correlation between *in vitro* and *in vivo* data on food digestion. What can we predict with static *in vitro* digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (13), 2239-2261.

Borges, M. T. M. R., Parazzi, C., & Piedade, S. M. D. S. (1987). Avaliação de Métodos Químicos de Determinação de Açúcares Redutores em Xaropes. Anais do 4º. *Congresso Nacional da STAB*. VIII Convenção da ACTALAC, Olinda, Pe, Brasil, 8-13.

Bornet, F. R. J., Fontvieille, A. M., Rizkalla, S., Colonna, P., Blayo, A., Mercier, C., & Slama G. (1989). Insulin and glycemic responses in healthy humans to native starches processed in different ways: correlation with *in vitro* α -amylase hydrolysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 50, 315-523.

Brand, J. C., Nicholson, P. L., Thorburn, A. W., & Truswell, A. S. (1985). Food processing and the glycemic index. *American Journal of Clinical Nutrition*, 42, 1192-1196.

Brand, J. C., Snow, B. J., Nabhan G. P., & Truswel, A. S. (1990). Plasma glucose and insulin responses to traditional Pima Indian meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 5, 416-420.

Brand-Miller, J., & Foster-Powell, K. (1999). Diets with a low glycemic index: from theory to practice. *Nutrition Today*, 34(2), 64-72.

Brouns, F., Bjorck, I., Frayn, K. N., Gibbs, A. L., Lang, V., Slama, G., et al (2005). Glycaemic index methodology. *Nutrition Research Review*, 18, 145-171.

Capriles, V. D., Guerra-Matias, A. C., & Areas J. A. G (2009). Marcador *in vitro* da resposta glicêmica dos alimentos como ferramenta de auxílio à prescrição e avaliação de dietas. *Revista de Nutrição*, 22, 549-557.

Chung, H. J. Shin, D. H., & Lim, S. (2008). *In vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food Research International*, 41, 579–585.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F (1956). Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. *Nature*, 28(3), 350 -356.

Eliasson, A. C (2004). Starch in food – Structure, function and applications. New York: Boca Raton, CRC. 605p.

Franz, M. J. (1999) . In defense of the American Diabetes Association's recommendations on the glycemic index. *Nutr Today*, 34(2), 78-81.

Frei, M., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Studies on the *in vitro* starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. *Food Chemistry*, 83, 395-402.

Froslie, K. F., Roislien, J., Qvigstad, E., Godang, K., Bollerslev, J, Voldner, N., Henriksen, T., & Veierod, M. B. (2013). Shape information from glucose curves: Functional data analysis compared with traditional summary measures. *BMC Medical Research Methodology*, 13, 6.

Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2, 2046-2048.

Goñi, I., Garcia-Alonso, A., & Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17, 427-437.

Heaton, K. W., Marcus, S. N., Emmett, P. M., & Bolton, C. H. (1988). Particle size of wheat, maize, and oat test meals: effects on plasma glucose and insulin responses and on the rate of starch digestion *in vitro*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 47, 675-682.

Hon, H. W. H., Wong, T. H. T., Tse, I. M. Y., & Louie, J. C. Y. (2020). The effect of a low glycaemic index diet on reducing day-long glycaemia in healthy young adults: A randomized crossover trial. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 1– 10.

Jenkins, D. J. A., Ghafari, H., Wolever, T. M. S., Taylor, R. H., Jenkins, A. L., Barker, H. M., Fielden, H., & Bowling, A. C. (1982). Relationship Between Rate of Digestion of Foods and Post-Prandial Glycaemia. *Diabetologia*, 22, 450-455.

Jenkins, D. J. A., Jenkins, A. L., Wolever, T. M. S., Thompson, L. H., & Rao, A. V. (1986). Simple and Complex Carbohydrates. *Nutrition Reviews*, 44, 2.

Jenkins, D. J. A., Thomas, M. S., Wolever, R. H., Taylor, H. B., Hashmein, Bowling, A. C., Newman, H. C., Jenkins, A. L. & Goff, D. V. (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrates exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34(3), 362-366.

Jenkins, D. J. A., Thorne, M. J., Wolever, T. M. S., Jenkins, A. L., Venkentschwer, R. A., & Thompson, L. U (1987). The effect of starch-protein interaction in wheat on the glycemic response and the rate of *in vitro* digestion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45, 946-951.

Jones, J. M. (2007). Glycemic responses definitions. *Cereal Food World*, 55, 54-55.

Lane, J. H., & Eynon, L. (1934). Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator, *Norman Rodge*, London, 8p.

Laville, M. (2004). Could glycaemic index be the basis of simple nutritional recommendations? *British Journal of Nutrition*, 91(6), 803-804.

Lehniger, L., A., Nelson, L. D, Cox, M.M. (1995). *Princípios de Bioquímica*, (2a ed.), 227 — 228.

Lévêque, E., et al. (2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (1), 3-14.

Lowry, J. R., Thiessen, R. (1950). Studies of the nutritive impairment of proteins heated with carbohydrates: *in vitro* digestion studies. *Archives of Biochemistry*, 25(1), 148-156.

Miller, G. L (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, 31(3) 426-428.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., et al. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113–1124.

Negrulescu, A., Patrulea, V., Mincea, M. M., Ionascu, C., Vlad-Oros, B. A., & Ostafe, V. (2012). Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(12), 2176-2182.

Nelson, D. L., Cox, M. M (2014). Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 1328 p.

Obel, L. B (2001). Putting enzymes to work in bakery applications. *Cereal Foods World*, 46(9), 396-399.

Pi-Sunyer, F. X. (2002). Glycemic index and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(Suppl):290S-8S.

Ross, S. W., Brand, J. C., Thorburn, A. W., & Truswell, A. S. (1987). Glycemic index of processed wheat products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 46, 631-635.

Sartorelli, D. S., & Cardoso, M. A. (2006). Associação entre carboidratos da dieta habitual e *diabetes mellitus* tipo 2: evidências epidemiológicas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, 50(3), 415-425.

Sheard, N. F., Clark, N. G., Brand-Miller, J. C., Franz, M. J., Pi-Sunyer, F. X., Mayer-Davis E., et al (2004). Dietary carbohydrate (amount and type) in the prevention and management of diabetes. A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 27(9), 2266-2270.

Sieri, S., Agnoli, C., Pala, V., Grioni S., Brighenti, F., Pellegrini, N., et al (2017). Dietary glycemic index, glycemic load, and cancer risk: results from the EPIC-Italy study. *Scientific Report*, 7(1), 94-98.

Silva, F. M., Steemburgo, T., Azevedo, M. J., & Mello, V. D (2009). Papel do índice glicêmico e da carga glicêmica na prevenção e no controle metabólico de pacientes com diabetes mellito tipo 2. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, 53, 560- 571.

Simsek S., & Nehir El, S. (2015). *In vitro* starch digestibility, estimated glycemic index and antioxidant potential of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm. *Food Chemistry*, v.168, 257–261.

Spieth, L. E., Harnish, J. D., Lenders, C. M., Raezer, L. B., Pereira, M., Hangen, S. J., & Ludwig, D. S (2000). A low-glycemic index diet in the treatment of pediatric obesity. *Archives of Pediatrics e Adolescent Medicine*, 154, 947-51.

Statistica 8.0 (2007). Statistics computer program for Windows, v.1. Tulsa: StatSoft Inc. Software.

Teixeira, R. S. S., Silva, A. S., Ferreira-Leitão, V. S., & Bon, E. P. S (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *Carbohydrate Research*, 363, 33-37.

Williams, S. M., Venn, B. J., Perry, T., Brown, R., Wallace, A., Mann, J. I., et al (2008). Another approach to estimate the reliability of glycaemic index. *British Journal of Nutrition*, 1, 7-9.

Wolever, T. M. S., Jenkins, D. J. A., Jenkins, A. L., & Josse, R. G. (1991). The glycemic index: methodological and clinical implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 846-854.

Wong, S., Traianedes, K., O’dea, K. (1985). Factors affecting the rate of starch hydrolysis in legumes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 42, 38-43.

Woolnough, J. W., Monro, J. A., Brennan, C. S., & Bird, A. R. (2008). Simulating human carbohydrate digestion in vitro: a review of methods and the need for standardisation. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 2245-2256.

World Health Organization. (1998). Carbohydrates in human nutrition. Report of a Toim
FAO/WHO expert consultation, 66. Rome: WHO.

Yoon, J. H., Thompson L. U., & Jenkins, D. J. A. (1983). The effect of phytic acid on *in vitro*
rate of starch digestibility and blood glucose response. *American Journal of Clinical
Nutrition*, 835-842.

Zhang, J., Jiang, Y., Liu, Y., Chang, Q., Zhao, Y. & Wu, Q. (2020). The association between
glycemic index, glycemic load, and metabolic syndrome: a systematic review and dose–
response meta-analysis of observational studies. *European Journal of Nutrition*, 59, 451–463.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Suellen Raquel Bueno de Melo Moura – 33,33 %

Ana Clara Martins do Carmo – 33,33 %

Olga Luisa Tavano – 33,33 %