UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos

EFEITO DO INIBIDOR DE α - AMILASE DO FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris* L.) EM ANIMAIS NORMAIS E
DIABÉTICOS

ELIZABETE WENZEL DE MENEZES

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. FRANCO M. LAJOLO

São Paulo
1985

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo pela eficiente orientação e dedicação com que conduziu nossos estudos.
- A CAPES pela bolsa de estudo concedida durante o curso de pós-graduação.
- A OEA e a FINEP pelos auxílios financeiros a esse trabalho.
- A todo pessoal do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
- A Ursula Maria Lanfer Marquez e Flávio Finardi Filho pela amizade e valiosas sugestões.
- Ao Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli - Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB-USP) pela colaboração na determinação da insulina sérica.

S U M Á R I O

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	6
3 - MATERIAL	7
3.1 - Feijão	7
3.2 - Amilase salivar	7
3.3 - Reagentes	7
3.4 - Animais	8
3.5 - Ração para manutenção de animais diabéticos	8
4 - MÉTODOS	9
4.1 - Físico-Químicos e Bioquímicos'	9
4.1.1 - Obtenção do inibidor de α -amilase	9
4.1.2 - Atividade da α -amilase	10
4.1.3 - Atividade do inibidor de α -amilase	12
4.1.4 - Atividade proteolítica no intestino	12
4.1.5 - Atividade do inibidor de tripsina	12
4.1.6 - Determinação da proteína	13
4.1.7 - Determinação da glicose	13
4.1.8 - Determinação do amido residual	13
4.1.9 - Determinação da insulina	13
4.1.10 - Determinação dos ácidos graxos não esterifi- ficado no soro	14
4.2 - Biológicos: ensaio com animais	14
4.2.1 - Esquema experimental	14

	pág.
4.2.2 - Obtenção do soro	15
4.2.3 - Obtenção dos órgãos	15
4.2.4 - Preparação dos homogenatos de pâncreas , intestino e estômago	15
4.2.5 - Indução da diabetes	16
4.3 - Análise estatística	16
5 - RESULTADOS	18
5.1 - Ação em animais normais	18
5.1.1 - Efeito de doses crescentes do IA sobre a glicemia e digestão do amido	18
5.1.2 - Efeito do IA sobre os níveis séricos de glicose, insulina, ácidos graxos e diges- tão do amido	21
5.1.3 - Efeito do IA, isento de contaminação com inibidor de tripsina, sobre a glicemia e digestão do amido	21
5.1.4 - Efeito do IA sobre a secreção e produção da α -amilase pancreática	28
a) Na presença de contaminação com inibi- dor de tripsina na preparação do IA..	28
b) Na ausência de contaminação com inibi- dor de tripsina na preparação do IA..	28
5.2 - Ação em animais diabéticos: efeito do IA sobre os níveis séricos de glicose, insulina, ácidos graxos e digestão do amido	35
6 - DISCUSSÃO	39
6.1 - Efeito do IA sobre a digestão do amido e outros parâmetros relativos ao metabolismo da glico- se em animais normais	39
6.2 - IA e controle da α -amilase pancreática	46
6.3 - Efeito do IA em animais diabéticos	50

	pág.
7 - CONCLUSÕES	52
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
- SUMMARY	63
- LISTA DE FIGURAS E TABELAS	64

1 - INTRODUÇÃO

Dentre os inibidores enzimáticos contidos naturalmente nos alimentos, os inibidores de proteases (tripsina e quimotripsina) são amplamente citados pela literatura científica, tanto no aspecto físico-químico⁽⁶⁰⁾ como na sua ação biológica⁽²⁵⁾; já, os inibidores de α -amilase (IA), somente nos últimos 15 anos receberam maior importância por parte dos pesquisadores.

Os inibidores de α -amilase (IA) começaram a ser citados na literatura por BOWMAN⁽⁸⁾, a partir de 1945, que verificou a presença de um inibidor hidrossolúvel e termolábil no feijão. Outros autores citam que as primeiras investigações sobre os inibidores de α -amilase foram realizadas por CHRZASZCZ⁽¹²⁾.

Posteriormente, surgiram informações sobre a presença de IA em outras fontes como: microrganismos⁽²⁴⁾, tubérculos^(20,27), cereais^(20,27,63) e leguminosas^(20,50); bem como estudos preliminares sobre os mecanismos de ação sobre enzimas de várias origens⁽⁶⁴⁾.

Sob o aspecto estrutural desses inibidores verificamos que aqueles provenientes do trigo, já tem suas características físico-químicas relativamente elucidadas, inclusive com estrutura primária estabelecida⁽³⁹⁾, mas com relação ao inibidor do feijão (IA), pouco ainda é sabido.

As técnicas de isolamento e caracterização parcial do IA do feijão "branco" e "vermelho" (Phaseolus vulgaris) foram estabelecidas^(51,57,56) sendo também, estudados alguns aspectos do mecanismo de complexação entre a α -amilase e o IA do feijão "vermelho"⁽⁶⁹⁾.

Segundo LAJOLO e FINARDI⁽⁴³⁾ o IA do feijão preto (Phaseolus vulgaris) foi isolado e purificado por extração aquosa, precipitação fracionada por etanol seguida de cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-100, obtendo-se uma purificação de 18 vezes com um rendimento de 32%.

Esses mesmos autores⁽⁴⁴⁾ verificaram que é uma glicoproteína com peso molecular de 53.000 Daltons, ponto isoelétrico de 4,35 e coeficiente de sedimentação ($S_{20,w}^0$) de 4,35. Como resíduos de açúcares foram encontrados manose, xilose, galactose e glicosamina e o IA mostrou-se resistente a proteólise.

Também, foram realizados estudos sobre parâmetros cinéticos do IA⁽⁶⁷⁾ e sobre o efeito de modificações químicas na α -amilase pancreática, na formação do complexo com IA⁽⁶⁸⁾.

Do ponto de vista nutricional existem controvérsias sobre eficiência do inibidor de α -amilase na digestão do amido.

PULLS e KEUP⁽⁵⁸⁾ utilizando o IA do trigo verificaram em humanos, ratos e cães diminuição na digestão do amido levando em consequência a uma hipoglicemia e hipoinsulinemia pós-pancristal. Também FRERICHs e col.⁽²³⁾ utilizando o mesmo inibidor verificaram efeito semelhante em humanos normais, obesos e obesos diabéticos. Entretanto, devido a labilidade desse inibidor do trigo à tripsina e pepsina, acredita-se que seu uso clínico prolongado não tenha efeito significativo na digestão do amido⁽²¹⁾.

Posteriormente, MACRI e cols.⁽⁴⁹⁾ utilizando IA do trigo encapsulado verificaram em ensaios crônicos com galinhas. hipertrofia no pâncreas sem qualquer redução na taxa de crescimento. A partir daí, sureriram que as modificações adaptativas do pâncreas seriam controladas pelo nível de α -amilase do intestino.

GRANUN e ESKELAND⁽²⁷⁾ verificaram efeitos semelhantes aos de MACRI⁽⁴⁷⁾ com relação ao crescimento de galinhas, mas os tecidos pancreáticos opostamente apresentaram-se com características normais.

Jã, FOLSCH e cols.⁽²²⁾ utilizando IA de origem microbiana, verificaram, em ratos, efeitos contrários aos de MACRI e cols.⁽⁴⁹⁾ observaram uma diminuição no peso dos animais e no conteúdo de α -amilase no pâncreas, sugerindo que o mecanismo de secreção da α -amilase não seria regulado por um mecanismo de feedback negativo, como sugerido por esses autores.

Os inibidores de origem microbiana, também foram utilizados em humanos normais, diabéticos e obesos tendo-se evidenciado que são capazes de causar redução na glicemia pós-prandial^(16,21).

Com relação ao IA do feijão JAFFÉ e LETTE⁽³⁶⁾ obtiveram indiretamente informações sobre sua ação "in vitro" e "in vivo", observando que os animais que receberam variedades de feijão com pouca hemaglutinina, também apresentaram uma diminuição no crescimento, sugerindo que esse efeito poderia ser decorrente da presença do IA e de inibidor de tripsina (IT) na amostra.

Jã, SAVAIANO e cols.⁽⁶¹⁾ afirmaram que o IA do "feijão vermelho" (Phaseolus vulgaris), não afeta a digestão do amido, pois em ensaios crônicos com ratos este inibidor não alterou a

taxa de crescimento dos animais.

Entretanto, LAJOLO e cols.⁽⁴⁵⁾ utilizando IA do feijão preto (Phaseolus vulgaris) verificaram comprometimento na digestão do amido e diminuição na glicemia pós-pandrial em ratos que receberam o IA com amido por sonda gástrica; além disso em ensaios semi-crônicos e, em condições de restrição calórica, houve diminuição na taxa de crescimento dos animais. É oportuno, referir que esse inibidor isolado por LAJOLO e cols. é resistente a proteases⁽¹⁹⁾.

Com base na literatura já citada sobre a ação "in vitro"⁽⁵¹⁾ e "in vivo"⁽³⁶⁾ do IA, nos EUA, foram lançados no mercado cerca de 100 diferentes tipos de preparações à base de feijão, denominadas "starch blockers", as quais, teriam efeito de bloquear a digestão do amido e consequentemente causar emagrecimento.

Em 1983, vários autores^(7,10,26,32) verificaram que os "starch blockers" comerciais não tinham qualquer efeito sobre a digestão e absorção do amido em humanos. Esses autores sugeriam que esta ineficiência poderia ser decorrente de alguns fatores, tais como: o pâncreas, geralmente, secreta uma quantidade em excesso de α -amilase para digerir o amido, ou o tempo de interação do IA e enzima não é suficiente para bloquear a enzima, também foi considerada a possibilidade de digestão e inativação desse inibidor pelas proteases pancreáticas bem como pela pepsina.

Entretanto, foi observado por ensaios "in vitro" ^(29,47) que esses "starch blockers" continham baixa concentração de IA, teores elevados de inibidores de proteases, lectinas e outras proteínas não permitindo portanto conclusões seguras sobre a sua eficiência ou não.

Em vista, portanto, dos resultados contraditórios da literatura acreditamos ser de interesse científico esclarecer o efeito do IA do feijão sobre a digestão do amido e parâmetros ligados ao metabolismo da glicose.

2 - OBJETIVOS

Estudar o efeito do inibidor de α -amilase, isolado do feijão (Phaseolus vulgaris L.), sobre a digestão do amido e sobre parâmetros do metabolismo da glicose em animais normais e diabéticos, bem como verificar seu efeito sobre a secreção e produção de α -amilase pancreática.

3 - MATERIAL

3.1 - Feijão

Estudamos sementes de feijão preto, Phaseolus vulgaris L., da variedade brasileira Rico-23, provenientes do Instituto Agronômico de Campinas - SP.

3.2 - Amilase salivar

A α -amilase (1,4- α -D-glucan glucanohydrolase EC 3.2.1.1) foi obtida de saliva humana, purificada por precipitação fracionada com acetona. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 6,9 e armazenado a -18°C até o momento do uso.

3.3 - Reagentes

Albumina sérica bovina, tripsina, glicose-oxidase, peroxidase, BAPA (Benzoilarginina-para-Nitroanilida), Streptozotocina, Ácido 3,5 di-Nitrossalicílico, β -mercaptoetanol foram obtidos da Sigma Chemical Company; DEAE-celulose da Whatman Limited; os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.4 - Animais

Foram utilizados ratos machos (Rattus norvegicus, var. albinus), da linhagem "Wistar", obtidos a partir de colônias mantidas no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, com rações comerciais.

3.5 - Ração para manutenção de animais diabéticos

A ração utilizada continha: 25% proteína (Proteimax - 70), 8% óleo de soja, 4% mistura salina, 1% mistura vitamínica, 1% fibra (microcel), 3% metionina e farinha de mandioca q.s.p. 100%. As misturas salina e vitamínica foram preparadas conforme as necessidades de ratos⁽³⁵⁾.

A composição por análise foi a seguinte: umidade (10%), proteína (24,1%), extrato etéreo (8,7%), cinza (4,2%), fibra (11,8%) e carboidratos (41,2%) por diferença.

4 - MÉTODOS

4.1 - Físico-Químicos e Bioquímicos

4.1.1 - Obtenção do inibidor de α -amilase

Utilizamos dois tipos de preparações de IA.

Uma primeira foi obtida essencialmente como descrito por LAJOLO⁽⁴²⁾ até a fração "DEAE"-celulose". Porém para reduzir o teor de contaminação com o inibidor de tripsina incluiu-se uma fase adicional intermediária de purificação com celite: bentonite segundo HANOVAR⁽³³⁾. O esquema final adotado foi o seguinte: extração aquosa (20% de farinha de feijão), acidificação (pH = 5,0) e aquecimento (70°C por 15 min.). Posteriormente foi adicionada uma mistura de celite:bentonite (1:1), na proporção de 10% do peso inicial da farinha, mantendo-se a mistura sob agitação por 4 horas a 6°C; seguindo-se de centrifugação a 4080 x g por 20 min, precipitação fracionada com etanol (50-70% de saturação) e separação em DEAE-celulose. A fração ativa foi coletada, precipitada com etanol até 70% de saturação, centrifugada a 10.400 x g por 30 min e o IA assim obtido ressuspenso em água para ser administrado aos animais.

Após verificar que mesmo teores residuais de IT influíam nos resultados biológicos, resolvemos introduzir uma segunda

fase adicional para maior remoção desse inibidor, o que foi conseguido com o uso do β -mercaptoetanol.

Isso foi possível, porque o β -mercaptoetanol não afeta o perfil eletroforético do IA, indicando que pontes de dissulfeto não são importantes na sua estrutura⁽¹⁹⁾. Esse reagente por êm é capaz de dissociar pontes de dissulfetos essenciais para a manutenção da atividade do inibidor de tripsina⁽³⁷⁾.

Nessa segunda fase procedeu-se da seguinte maneira: a fração coletada após passagem em DEAE-celulose foi tamponada com fosfato 0,1M pH=6,9, incubada com β -mercaptoetanol (1%) por 30 min a 37°C e posteriormente dialisada por 24 horas contra água destilada.

Na primeira preparação o tratamento com celite: bentonite reduziu de mais de 80% a contaminação de IT na preparação de IA. Por outro lado, o tratamento adicional com β -mercaptoetanol não alterou o rendimento do IA mas reduziu em 99,9% a atividade do IT.

Na Tabela 1 são mostrados esses resultados indicados para uma dose de 80 UIA (que foi a dose comumente usada nas experiências com animais).

4.1.2 - Atividade da α -amilase

Foi determinada através da reação com ácido 3,5 dinitrossalicílico e amido como substrato, segundo BERNFELD⁽⁶⁾ adaptado por LAJOLO⁽⁴²⁾; sendo que uma Unidade Internacional de α -amilase (UA) equivale a liberação de 1 μ mol de maltose/min a 37°C.

Tabela 1 - Efeito do tratamento com celite/bentonite e β -mercaptoetanol na remoção do inibidor de tripsina.

F r a ç ã o	Inibidor		Proteína	Ativ. Inib. α -amilase		Ativ. Inib. Tripsina		Ativ. Hemaglutinante	
	mg	mg	mg	UIA	UIT	%	AHG	%	
Extrato Bruto Aquoso	40		336	80	105.600	100	1/346	100	
DEAE-Celulose**									
c/Cel. Bent.	41		42	80	13.775	13	0	0	
β -mercaptoetanol*									
c/Cel. Bent.	40		28	80	100	0,1	0	0	

* fração utilizada nas experiências de itens (5.1.3) e (5.1.4 b)

** fração utilizada nas demais experiências.

A atividade da α -amilase no pâncreas foi expressa por grama de tecido (UA/g) e no intestino como atividade total presente no intestino delgado (UA/intestino).

4.1.3 - Atividade do inibidor de α -amilase

Empregou-se o método adaptado por LAJOLO⁽⁴²⁾. Estabeleceu-se que uma unidade inibidora de α -amilase (UIA) corresponde a inibição total de 10 Unidades Internacionais de α -amilase (UA), após 20 minutos de incubação a 37°C em tampão fosfato 0,02M pH = 6,9.

4.1.4 - Atividade proteolítica no intestino

Foi determinada, usando-se o método de KAKADE⁽³⁸⁾, com o BAPA como substrato. Uma unidade de tripsina (UT) corresponde ao aumento de 0,01 unidades de absorbância em 410 nm/10 ml de mistura de reação. A atividade proteolítica no intestino foi expressa como atividade de tripsina total presente no intestino delgado (UT/intestino).

4.1.5 - Atividade do inibidor de tripsina

Para avaliação da atividade anti-trípica na amostra de IA, verificamos a redução da velocidade de ação da tripsina

bovina sobre o BAPA, na presença de inibidor de tripsina, conforme o método de KAKADE⁽³⁸⁾. O teor do inibidor de tripsina foi expresso em unidades de tripsina inibida (UTI).

4.1.6 - Determinação da proteína

Usou-se sempre o método de LOWRY⁽⁴⁸⁾. O teor de proteína no pâncreas foi expresso por grama de tecido (mg/g pâncreas) e no intestino como proteína total presente no intestino delgado (mg/intestino).

4.1.7 - Determinação da glicose

A glicose no soro e urina foi determinada com glicose oxidase e peroxidase, segundo a técnica descrita por BERGMAYER e BERNT⁽⁵⁾.

4.1.8 - Determinação do amido residual

O amido residual no estômago e intestino foi dosado pela técnica de BERNFELD⁽⁶⁾, após tratamento descrito por LAJOLLO⁽⁴²⁾. A quantidade de amido foi calculada multiplicando-se a concentração de glicose por 0,9; considerando-se % de recuperação da técnica.

4.1.9 - Determinação da insulina

A insulina sérica foi determinada pelo método de radioimunoensaio, segundo MORGAN e LAZAROW⁽⁵²⁾ modificado por PUPO e MARREIRO⁽⁵⁹⁾.

4.1.10 - Determinação de ácidos graxos não esterificados no soro.

Foram avaliados pelo método colorimétrico descrito por FALHOLT⁽¹⁷⁾ e referidos no texto simplesmente como ácidos graxos.

4.2 - Biológicos: ensaios com animais

4.2.1 - Esquema experimental

Os ensaios com ratos foram de curta duração (0,5 até 4 horas) e realizados com animais pesando por volta de 100 g (normais) ou de 300 g (diabéticos). Antes dos ensaios os animais foram alojados em gaiolas individuais e mantidos em jejum por 18 horas, recebendo somente água "ad libitum". Então, amido sozinho (180 mg amido em 2 ml solução fisiológica/100g) ou amido com doses variáveis de IA (10 até 80 UIA/100g) foram administradas por sonda gástrica. Após tempos variáveis de 0,5; 1; 2; 3 até 4 horas, conforme a experiência, amostras de sangue e órgãos foram obtidos conforme descrito respectivamente nos itens 4.2.2 e 4.2.3.

Em todos os experimentos constituiu-se um grupo "jejum" que recebeu por sonda apenas solução fisiológica, os valores obtidos com esse grupo foram tomados como tempo "zero".

4.2.2 - Obtenção do soro

Para determinação da glicemia — o sangue foi coletado em alíquotas de 100 μ l da veia caudal, e o soro obtido após a precipitação das proteínas com ácido perclórico 0,34N e centrifugado a 278 x g por 15 min.

Para determinação de insulina e ácidos graxos — o sangue foi obtido por punção cardíaca e após a retração do coágulo foi centrifugado a 495 x g por 20 min.

4.2.3 - Obtenção dos órgãos

Com os animais anestesiados por éter, o pâncreas foi retirado e limpo de tecido adiposo. As extremidades do estômago (esôfago - piloro) foram amarradas e o órgão removido juntamente com o intestino delgado. O conteúdo do estômago ou do intestino delgado foram coletados através de lavagens com tampão fosfato 0,02M pH = 6,9 gelado. Após a remoção os órgãos e tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C até análise.

4.2.4 - Preparação dos homogenatos de pâncreas, intestino e estômago

O pâncreas foi descongelado, homogeneizado (ultra turex por 1 min) em tampão fosfato 0,02M pH = 6,9 gelado, centrifugado

sob refrigeração a 4080 x g por 10 min. No sobrenadante foi determinada a atividade da α -amilase e o teor de proteínas.

O conteúdo intestinal foi descongelado e centrifugado sob refrigeração a 1110 x g por 20 min; no sobrenadante determinou-se a atividade da α -amilase, da tripsina e o teor de proteína e, no precipitado o amido residual. O mesmo tratamento foi realizado no estômago sendo determinado o amido residual no precipitado.

4.2.5 - Indução da diabetes

A diabetes foi induzida por Streptozotocina administrada pela veia caudal na proporção de 45 mg/Kg peso corporal, segundo a técnica descrita por CHORVATHOVA⁽¹¹⁾. Para reduzir a mortalidade os animais receberam 4 U insulina/Kg peso corporal nos três primeiros dias após a injeção.

Até o momento do experimento os animais receberam a dieta descrita no item 3.5.

Após o 8º dia da indução já apresentavam características do desenvolvimento da diabetes, como se pode ver na Tabela 2, (valor médio de 20 animais por grupo).

4.3 - Análise estatística

A comparação entre médias foi realizada usando-se teste "t" student, segundo FEDERE⁽¹⁸⁾. Nas tabelas e figuras os resultados estão representados com os respectivos desvio-padrão.

Tabela 2 - Efeito da Streptozotocina (4,5 mg/100g peso) na indução de diabetes*

Grupo	Diabéticos	Controle
Glicemia (mg %)	331 $\pm$ 46 ^a	75 $\pm$ 5 ^b
Glicose Urina (g/24hs)	1,5 $\pm$ 0,6	—
Vol. Urina (ml/24hs)	105 $\pm$ 37 ^a	7 $\pm$ 3 ^b
Ing. Líquido (ml/24hs)	123 $\pm$ 44 ^a	31 $\pm$ 5 ^b
Cons. Ração (g/24hs)	25 $\pm$ 7 ^a	16 $\pm$ 4 ^b
Aumento de peso (g)	-28 $\pm$ 15	+14 $\pm$ 5
Insulina (μ V/ml)	42 $\pm$ 16 ^a	70 $\pm$ 8 ^b
Ác. Graxos (m Mol/l)	0,864 $\pm$ 0,10 ^a	0,766 $\pm$ 0,15 ^b
Ativ. α -amilase pancreática (UA/g pâncreas)	180 $\pm$ 29 ^a	1625 $\pm$ 266 ^b

* oitavo dia após a injeção

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

5 - RESULTADOS

5.1 - Ação em animais normais

Experiências com animais normais foram realizadas primeiramente com o IA tratado até DEAE-celulose, contendo 13% de inibidor de tripsina (IT); após verificarmos que essa contaminação interferia no conteúdo das proteases presentes no intestino delgado passamos a utilizar o IA tratado até β -mercaptoetanol, o qual continha somente 0,1% de IT.

5.1.1 - Efeito de doses crescentes do IA sobre a glicemia e digestão do amido

Os resultados dos experimentos, visando verificar o efeito de doses crescentes do IA sobre a digestão do amido, estão representados nas Tabelas 3 e 4; os animais receberam, através de sonda gástrica quatro doses de inibidor 10; 20; 40 e 60 UIA/100g peso corporal, acrescidas de 180 mg amido/100g peso. O sangue foi retirado da veia caudal após 0; 1/2, 1,2 e 3 horas da administração e na 3a. hora os animais foram sacrificados. O extrato de inibidor administrado corresponde à fração DEAE-celulose (Tabela 1) contendo respectivamente 5,2; 10,3; 21,0 e 31,0 mg IA nas doses de 10; 20; 40 e 60 UIA. Cada grupo continha 6 ani- mais.

Tabela 3 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a glicemia

Grupo	Peso (g)	Amido Admin. (mg)	Glicose sérica (mg%)			
			0,5 h	1h	2h	3h
Controle	130 $\pm$ 10	233	89 $\pm$ 9 ^a	107 $\pm$ 10 ^a	93 $\pm$ 10 ^a	85 $\pm$ 8 ^a
E10	123 $\pm$ 9	221	68 $\pm$ 14 ^b	78 $\pm$ 21 ^b	85 $\pm$ 11 ^b	81 $\pm$ 11
E20	124 $\pm$ 8	223	52 $\pm$ 11 ^c	62 $\pm$ 8 ^c	85 $\pm$ 7 ^b	86 $\pm$ 8
E40	138 $\pm$ 5	248	57 $\pm$ 11 ^c	56 $\pm$ 17 ^d	80 $\pm$ 11 ^c	80 $\pm$ 6
E60	131 $\pm$ 5	235	55 $\pm$ 11 ^c	53 $\pm$ 7 ^d	59 $\pm$ 10 ^d	79 $\pm$ 7 ^b

Controle (Amido) E = Experimental (10, 20, 40 ou 60 UIA com Amido)

a $\neq$ b $\neq$ c $\neq$ d ($P \leq 0,05$)O grupo jejum apresentou um valor médio de 60 $\pm$ 6 mg

Tabela 4 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal.

Grupo	Peso (g)	Amido Ingerido (mg)	Tempo (h)	Amido Residual (mg)			* %
				Estômago	Intestino	Total	
Jejum	116 $\pm$ 7	—	0	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	—
Controle	130 $\pm$ 10	233	3	1,8 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 0,9	3,4 $\pm$ 1,6 ^a	1,2
E10	123 $\pm$ 9	221	3	10,6 $\pm$ 5,8	7,0 $\pm$ 2,2	17,8 $\pm$ 5,9 ^b	7,8
E20	124 $\pm$ 8	223	3	14,7 $\pm$ 6,0	9,7 $\pm$ 4,2	24,4 $\pm$ 8,4 ^b	10,7
E40	138 $\pm$ 5	248	3	23,3 $\pm$ 8,4	13,0 $\pm$ 6,1	36,2 $\pm$ 12,0 ^b	14,4
E60	131 $\pm$ 5	235	3	20,2 $\pm$ 9,2	20,1 $\pm$ 6,7	44,8 $\pm$ 13,7 ^b	18,8

Controle (Amido) E = Experimental (10, 20, 40 e 60 UIA com amido)

a $\neq$ b (P < 0,001)

* % do ingerido

5.1.2 - Efeito do IA sobre os níveis séricos de glicose, insulina, ácidos graxos e digestão do amido

Neste experimento, foram utilizadas 80 UIA acrescidas de amido (180 mg/100g peso corporal), sendo os animais sacrificados em diferentes tempos após a administração (0; 1/2; 1; 2 e 4 horas). O extrato de inibidor administrado corresponde à fração DEAE-celulose (Tabela 1) contendo 41 mg IA na dose de 80 UIA.

As Figuras 1, 2, 3 e a Tabela 5 demonstram os efeitos do impendimento da digestão do amido, proporcionados pelo IA, sobre o metabolismo da glicose. Cada grupo continha 6 animais.

5.1.3 - Efeito do IA, isento de contaminação com inibidor de tripsina, sobre a glicemia e digestão do amido

Neste experimento foram utilizados 80 UIA acrescidas de amido (180 mg/100g peso corporal), sendo os animais sacrificados em tempos diferentes após a administração (0, 1, 2 e 4 horas). O extrato de inibidor administrado corresponde à fração β -mercaptoetanol (Tabela 1) contendo 40 mg de IA na dose de 80 UIA.

Nas Tabelas 6 e 7 verificamos o efeito do inibidor sobre a glicemia e a digestão do amido. Cada grupo continha 6 animais.

Figura 1 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a glicemia, após a administração de amido por sonda gástrica.

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

Os resultados estão representados com os respectivos desvio-padrão.

Figura 2 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a insulina sêrica, após a administração de amido por sonda gástrica.

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

Os resultados estão representados com os respectivos desvio-padrão.

Figura 3 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre o nível sérico de ácidos graxos, após a administração de amido por sonda gástrica.

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

Os resultados estão representados com os respectivos desvio-padrão.

Tabela 5 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal.

Grupo	Peso (g)	Amido Ingerido (mg)	Tempo (h)	Amido Residual (mg)			* %
				Estômago	Intestino	Total	
Jejum	101 $\pm$ 5	—	0	0,9 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,6	—
C _{1/2}	93 $\pm$ 11	167	1/2	22,0 $\pm$ 18,0	39,0 $\pm$ 10,0	61,0 $\pm$ 18,0 ^a	35
E _{1/2}	95 $\pm$ 15	171	1/2	101,0 $\pm$ 15,0	6,4 $\pm$ 4,2	107,0 $\pm$ 14,5 ^b	61
C ₁	93 $\pm$ 14	167	1	12,0 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 2,0	17,0 $\pm$ 1,5 ^a	9
E ₁	100 $\pm$ 15	180	1	68,0 $\pm$ 13,0	7,3 $\pm$ 4,1	75,0 $\pm$ 11,0 ^b	40
C ₂	101 $\pm$ 14	182	2	9,2 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 5,2 ^a	6
E ₂	101 $\pm$ 7	182	2	23,0 $\pm$ 13,0	22,0 $\pm$ 3,0	46,0 $\pm$ 12,0 ^b	24
C ₄	90 $\pm$ 17	162	4	0,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,2 ^a	0
E ₄	94 $\pm$ 14	169	4	19,0 $\pm$ 7,2	12,0 $\pm$ 8,4	31,0 $\pm$ 12,0 ^b	17

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

*% do ingerido

Tabela 6 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a glicemia.

G r u p o	Glicemia (mg %)				
	0h	1/2h	1h	2h	4h
Controle	47 $\pm$ 7	73 $\pm$ 6 ^a	83 $\pm$ 22 ^a	76 $\pm$ 10 ^a	58 $\pm$ 9
E _(com amido)	47 $\pm$ 7	43 $\pm$ 2 ^b	49 $\pm$ 5 ^b	57 $\pm$ 6 ^b	49 $\pm$ 5
E _(sem amido)	47 $\pm$ 7	49 $\pm$ 9 ^b	42 $\pm$ 6 ^b	43 $\pm$ 5 ^b	46 $\pm$ 8

Controle (Amido) E = Experimental (80 UIA com Amido e 80 UIA sem Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

Tabela 7 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal.

Grupo	Peso (g)	Amido Ingerido (mg)	Tempo (h)	Amido Residual (mg)			* %
				Estômago	Intestino	Total	
Jejum	94 $\pm$ 5	—	0	2,3 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 1,0	—
C ₁	88 $\pm$ 5	158	1	7,5 $\pm$ 7,7	21,0 $\pm$ 4,0	28,0 $\pm$ 42,0 ^a	16
E ₁	90 $\pm$ 5	162	1	10,0 $\pm$ 3,8	75,0 $\pm$ 9,9	85,0 $\pm$ 11,0 ^b	51
C ₂	87 $\pm$ 2	157	2	5,9 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 0,4 ^a	5
E ₂	89 $\pm$ 5	160	2	2,1 $\pm$ 1,0	31,0 $\pm$ 11,0	33,0 $\pm$ 11,0 ^b	19
C ₄	88 $\pm$ 4	158	4	2,8 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,7	4,3 $\pm$ 0,8 ^a	1
E ₄	89 $\pm$ 6	160	4	3,3 $\pm$ 3,3	14,4 $\pm$ 2,7	18,0 $\pm$ 6,0 ^b	9

C = Controle (Amido) E = Experimental (80 UIA com amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

*% do ingerido

Os grupos experimental com 80 UIA sem amido apresentaram de 1-4hs, valor médio de 2,9 $\pm$ 0,63 mg

5.1.4 - Efeito do IA sobre a secreção e produção da α -amilase pancreática

- a) Na presença de contaminação com inibidor de tripsina na preparação do IA

As determinações da atividade α -pancreática, da proteína por grama de pâncreas (Tabela 8); da atividade da α -amilase, proteína total e atividade da tripsina presente no intestino (Tabela 9 e 10) foram realizadas nos grupos de animais que receberam 80 UIA (item 5.1.2), sendo que o extrato de IA administrado correspondeu à fração DEAE-celulose (Tabela 1).

- b) Na ausência de contaminação com inibidor de tripsina na preparação do IA

As determinações da atividade α -amilase pancreática, da proteína por grama de pâncreas (Tabela 11); da atividade da α -amilase, proteína total e atividade da tripsina presente no intestino (Tabela 12 e 13) foram realizadas nos grupos de animais que receberam 80 UIA (item 5.1.3), sendo que o extrato de IA administrado correspondeu à fração β -mercaptoetanol (Tabela 1).

Tabela 8 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a atividade da α -amilase e teor de proteína na no pâncreas.

Grupo	Ativ. α -amilase (UA/g pâncreas) $\times 10^{-2}$				Proteína (mg/g pâncreas)			
	0h	1h	2h	4h	0h	1h	2h	4h
Controle	224 $\pm$ 51	164 $\pm$ 43 ^a	204 $\pm$ 43	216 $\pm$ 65	103 $\pm$ 18	96 $\pm$ 7 ^c	95 $\pm$ 12	99 $\pm$ 17
Experimental	224 $\pm$ 51	190 $\pm$ 56 ^b	205 $\pm$ 68	195 $\pm$ 20	103 $\pm$ 18	60 $\pm$ 18 ^d	112 $\pm$ 10	101 $\pm$ 19

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,05) c $\neq$ d (P $\leq$ 0,01)

Tabela 9 - Efeito do inibidor de α -amilase pancreática e sobre proteína total presentes no intestino.

Grupo	Ativ. α -amilase total (UA/intestino)				Proteína Total (mg Prot/intestino)			
	0h	1h	2h	4h	0h	1h	2h	4h
Controle	265 $\pm$ 7	390 $\pm$ 73 ^a	413 $\pm$ 24 ^a	291 $\pm$ 63 ^a	9 $\pm$ 1	13 $\pm$ 3 ^a	13 $\pm$ 2 ^a	9 $\pm$ 2 ^a
Experimental	265 $\pm$ 7	75 $\pm$ 7 ^b	538 $\pm$ 83 ^c	938 $\pm$ 135 ^b	9 $\pm$ 1	16 $\pm$ 4 ^c	25 $\pm$ 4 ^b	28 $\pm$ 2 ^b

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001) a $\neq$ c (P $\leq$ 0,02)

Tabela 10 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a atividade da tripsina no intestino,

Grupo	Ativ. Tripsina Total (UT/Intestino)			
	0 h	1h	2h	4h
Controle	2002 $\pm$ 671	1951 $\pm$ 377 ^a	2112 $\pm$ 280 ^a	2083 $\pm$ 370 ^a
Experimental	2002 $\pm$ 671	240 $\pm$ 70 ^b	390 $\pm$ 95 ^b	400 $\pm$ 125 ^b

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

Tabela 11 - Efeito do inibidor de α -amilase isento, de inibidor de tripsina, sobre a atividade da α -amilase e teor de proteína no pâncreas.

Grupo	Ativ. α -amilase (UA/g Pâncreas) $\times 10^{-2}$				Proteína (mg/g Pâncreas)			
	0h	1h	2h	4h	0h	1h	2h	4h
Controle	224 $\pm$ 51	164 $\pm$ 43 ^a	204 $\pm$ 43 ^a	216 $\pm$ 65 ^a	103 $\pm$ 18	96 $\pm$ 7	95 $\pm$ 12	99 $\pm$ 17
E _(com amido)	224 $\pm$ 51	197 $\pm$ 65 ^b	178 $\pm$ 46 ^b	183 $\pm$ 24 ^b	103 $\pm$ 18	89 $\pm$ 18	83 $\pm$ 9	91 $\pm$ 14
E _(sem amido)	224 $\pm$ 51	198 $\pm$ 23 ^b	188 $\pm$ 20 ^b	198 $\pm$ 36 ^b	103 $\pm$ 18	107 $\pm$ 6	110 $\pm$ 4	102 $\pm$ 9

Controle (Amido) E = Experimental (80 UIA com Amido e 80 UIA sem Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,04)

Tabela 12 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a atividade da α -amilase pancreática e sobre proteína total presentes no intestino.

Grupo	Ativ. α -amilase Total (UA/Intestino)				Proteína Total (mg Prot./Intestino)			
	0h	1h	2h	4h	0h	1h	2h	4h
Controle	265 $\pm$ 7	390 $\pm$ 73 ^a	413 $\pm$ 24 ^a	291 $\pm$ 63 ^a	9 $\pm$ 1	13 $\pm$ 3 ^a	13 $\pm$ 2 ^a	9 $\pm$ 2 ^a
E _(com amido)	265 $\pm$ 7	51 $\pm$ 9 ^b	165 $\pm$ 47 ^b	322 $\pm$ 98	9 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2 ^b	23 $\pm$ 4 ^b	13 $\pm$ 3 ^b
E _(sem amido)	265 $\pm$ 7	87 $\pm$ 23 ^b	102 $\pm$ 31 ^b	226 $\pm$ 57 ^b	9 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1 ^b	21 $\pm$ 3 ^b	14 $\pm$ 2 ^b

Controle (Amido) E = Experimental (80 UIA com Amido e 80 UIA sem Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

Tabela 13 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a atividade da tripsina no intestino.

Grupo	Ativ. Tripsina Total (UT/Intestino)			
	0h	1h	2h	4h
Controle	2002 $\pm$ 671	1951 $\pm$ 377	2112 $\pm$ 289	2083 $\pm$ 370 ^a
E (com amido)	2002 $\pm$ 671	1978 $\pm$ 179	2280 $\pm$ 240	2242 $\pm$ 118 ^b
E (sem amido)	2002 $\pm$ 671	2080 $\pm$ 589	2278 $\pm$ 400	2138 $\pm$ 504
Controle (Amido)	E = Experimental (80 UIA com Amido e 80 UIA sem amido)			
a $\neq$ b	(P $\leq$ 0,04)			

5.2 - Ação em animais diabéticos: efeito do IA sobre os níveis séricos de glicose, insulina, ácidos graxos e digestão do amido

A diabetes foi induzida com Streptozotocina, com uma eficácia de 80% no método, sendo que após o 8º dia da indução os animais apresentavam alterações decorrentes ao desenvolvimento da diabetes: hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria, polidipsia, polifagia e diminuição no peso corporal (Tabela 2).

Os animais com cerca de 300-350 mg% de glicemia foram agrupados, permanecendo 16 horas em jejum até a administração do inibidor, 80 UIA acrescidos de amido (180 mg/100g peso corporal), e após 1 e 4 horas foram sacrificados. O extrato de inibidor administrado corresponde a fração DEAE-celulose (Tabela 1).

Na Figura 4 e nas Tabelas 14 e 15 demonstramos os efeitos do impedimento da digestão do amido, proporcionados pelo IA, sobre o metabolismo da glicose em animais diabéticos. Cada grupo continha 8 animais.

Figura 4 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a glicemia de animais diabéticos, após a administração de amido por sonda gástrica.

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)
Os resultados estão representados com os respectivos desvio padrão.

Tabela 14 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido em animais diabéticos

(grupo)	Peso (g)	Amido Ingerido (mg)	Tempo (h)	Amido Residual (mg)			* %
				Estômago	Intestino	Total	
J	221 $\pm$ 15	—	0	1,2 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 1,1	3,7 $\pm$ 1,2	—
C ₁	214 $\pm$ 12	385	1	26,0 $\pm$ 22,0	127,0 $\pm$ 50,0	153,0 $\pm$ 36,0 ^a	39
E ₁	211 $\pm$ 19	380	1	50,0 $\pm$ 27,0	288,0 $\pm$ 59,0	339,0 $\pm$ 64,0 ^b	88
C ₄	199 $\pm$ 13	358	4	1,7 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 1,8	5,3 $\pm$ 1,8 ^a	0,5
E ₄	202 $\pm$ 16	364	4	2,5 $\pm$ 1,5	50,0 $\pm$ 26,0	53,0 $\pm$ 26,0 ^b	14

C = Controle (Amido) E = Experimental (80 UIA com Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,001)

*% do ingerido

Tabela 15 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre os níveis séricos de insulina e ácidos graxos em animais diabéticos.

Grupo	Insulina (μ V/ml)		Ácidos Graxos (mM/l)	
	0 h	1 h	2 h	4 h
Controle	26 ± 10	29 ± 10^a	$0,864 \pm 0,10$	$0,740 \pm 0,27^c$
Experimental	26 ± 10	24 ± 5^b	$0,864 \pm 0,10$	$1,284 \pm 0,38^d$

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

a $\neq$ b (P $\leq$ 0,01) c $\neq$ d (P $\leq$ 0,001)

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Efeito do IA sobre a digestão do amido e outros parâmetros relativos ao metabolismo da glicose em animais normais

Numa primeira experiência avaliamos o efeito de doses crescentes do IA sobre a digestão do amido. Pudemos verificar (Tabela 3 e Figura 5) que qualquer uma das quatro doses utilizadas, por um período de 30 minutos, após a administração, tem o efeito equivalente de retardar o aumento da glicemia sérica, retardo esse proporcional à dose administrada. Deve-se ressaltar que esse aumento, de qualquer forma, nunca atinge o nível elevado obtido após 1 hora para o grupo controle que recebeu somente amido. Esses fatos mostram que há uma redução na quantidade total de glicose que atinge o compartimento plasmático.

Por outro lado (vide Tabela 4 e Figura 6), a nível do intestino observou-se, após 3 horas, um aumento na percentagem de amido presente, também proporcional à quantidade de IA administrada, mostrando a sua eficiência no bloqueio da digestão e explicando a redução da glicemia.

Como mesmo a dose mais alta de 60 UIA não foi suficiente para impedir totalmente o aumento da glicemia (Tabela 3 e Figura 5) realizamos experiência adicional com uma dose maior, de 80 UIA, e, nesse caso, conseguimos uma redução na glicemia eficaz até o fi-

Figura 5 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a glicemia.

▲ Controle (Amido) Experimental (Amido com
● 10 UIA; ★ 20 UIA; △ 40 UIA ou * 60 UIA)

Figura 6 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal, após 3 horas da administração do amido por sonda gástrica.

C = Controle (Amido) E = Experimental (Amido com 10 UIA;
20 UIA; 40 UIA ou 60 UIA).

nal da digestão (4 horas) (Figura 1). A área diferencial entre as curvas do grupo controle e experimental foi de cerca de 100%, indicando que, praticamente nenhuma glicose atingiu o compartimento plasmático.

Efeitos semelhantes sobre o alisamento da curva glicêmica foram encontrados por LAJOLO⁽⁴²⁾, que porém, não estudou a relação efeito x dose. Utilizando IA da mesma variedade de feijão este autor obteve, com 11,5 mg de IA, uma área diferencial de 55%, o que corresponde à nossa dose de 20 UIA (cerca de 10,3 mg IA), a qual causou uma redução de 61% na glicose sérica.

A relação dose x efeito foi estudada também por PULLS e KEUP⁽⁵⁸⁾ utilizando, porém, inibidor de trigo. Eles verificaram efeitos de redução da glicemia com 9, 36 e 144 mg IA/250 mg de amido, mas, mesmo a maior dose não foi tão efetiva como a nossa de 80 UIA, que contém apenas 40 mg IA/180 mg amido. Assim, parece que o IA do trigo é menos eficaz no bloqueio da digestão do amido pelo menos "in vivo".

Quando se administrou apenas amido (grupo controle) verificamos que, após uma hora (Tabela 5), o amido residual no trato digestivo era apenas de cerca de 9% sendo, portanto, quase que totalmente digerido nesse período. Porém, na presença de 80 UIA encontramos após 1 e 4 horas, respectivamente, cerca de 40 e 24% do amido residual, indicando que o IA causa um retardo significativo na digestão desse carboidrato (Figura 7).

Verificamos também, por outro lado, um retardo na velocidade de esvaziamento gástrico, sugerido pelo teor de amido residual no estômago que, no grupo experimental, foi bastante superior ao do gru

Figura 7 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal.

Controle (Amido) Experimental (80 UIA com Amido)

po controle nos tempos de 30 e 60 min (Tabela 5).

Esse retardo pode ser explicado de duas maneiras. Pode ser devido, segundo CRANE⁽¹⁴⁾ simplesmente à presença de proteína no estômago consequente à administração do IA (cerca de 42 mg de proteína) (Tabela 1). Essa hipótese é pelo menos em parte confirmada pelos dados obtidos quando os animais receberam o IA tratado com β -mercaptoetanol; pois nesse caso o teor de proteína foi menor (de 28 mg) (Tabela 1) e o retardo foi praticamente inexistente (Tabela 7).

A segunda explicação pode estar relacionada à presença da contaminação, na preparação do IA, com inibidor de tripsina que no caso da segunda experiência foi eliminado (preparação tratada com β -mercaptoetanol) (Tabela 1).

Nos inclinamos mais pela segunda hipótese pensando na refratariedade à digestão do inibidor de tripsina, ainda mais que a diferença no teor de proteína presente no estômago dos animais nas duas experiências foi de apenas 20 mg.

LAJOLO⁽⁴²⁾ sugeriu que a redução da glicemia causada pela ingestão de IA com amido é devida realmente a um impedimento na digestão do amido e não a um efeito inespecífico, ou à redução na absorção de glicose; mas a possibilidade do IA alterar a velocidade do trânsito gastro-intestinal não deve ser totalmente descartada.

Assim, parece confirmado que o IA de feijão quando presente na luz intestinal diminui a velocidade da digestão do amido, através do impedimento da sua hidrólise enzimática, causando em consequência, uma redução na glicemia pós-prandial e que esse efeito é proporcional à dose de inibidor administrada para uma

quantidade fixa de amido.

Cabe ressaltar, que esse IA é resistente à proteólise "in vitro", FINARDI⁽¹⁹⁾. Não havendo alterações no número de resíduos de NH_2 e da atividade inibidora da α -amilase em presença de proteases (tripsina, quimotripsina, pepsina e pronase), embora ANDRIOLO⁽³⁾ tenha verificado inativação do IA do feijão em pH inferiores a 3.

Pudemos observar que o IA do feijão não é digerido "in vivo", uma vez que, obtivemos significativa recuperação do IA presente no conteúdo intestinal de animais que receberam inibidor com ou sem amido. O tratamento consistiu na incubação de extratos intestinais com EDTA (10 mg) e tripsina (0,04 mg) a 37°C por 30 min. e posterior adição de cálcio (1,1 mg), centrifugação à $3020 \times g$ por 20 min e diálise por 16 horas contra água, seguindo-se o doseamento do IA.

A ação "in vivo" do IA foi confirmada também, através de outros parâmetros relacionados com o metabolismo da glicose.

Em nossos experimentos pudemos observar que o IA influencia indiretamente na liberação de insulina (Figura 2) sendo esse efeito, mais uma vez, decorrente do comprometimento da digestão do amido e redução da glicemia pós-prandial (resultados obtidos com animais diabéticos serão discutidos adiante).

Por outro lado, verificamos altos níveis sanguíneos de ácidos graxos (Figura 3) nos animais que receberam o IA decorrentes da baixa glicemia levando conseqüentemente a uma maior mobilização de lípidos do tecido adiposo.

Esses efeitos do IA sobre tais parâmetros são de interesse no caso de indivíduos obesos, uma vez que, esses possuem

um elevado nível de insulina circulante, KREISBERG⁽¹⁴⁾, e que essa exerce grande efeito lipogênico no organismo humano, MOUNT-CASTLE⁽⁵³⁾.

Assim, a redução da digestão do amido e da hipoglicemia pós-prandial, causada pelo IA, são suficientes ainda para manter baixos níveis de insulina e para mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo fazendo pensar em possíveis aplicações dessa substância.

6.2 - IA e controle da α -amilase pancreática

Com os resultados expostos até o momento, verificamos que o IA interfere na digestão do amido e que tal efeito parece ser decorrente do comprometimento da α -amilase com o IA a nível intestinal.

Sabe-se também, há vários anos, que diferentes tipos de dietas proporcionam uma adaptação das enzimas pancreáticas relativas ao seu componente predominante. Porém, não se tem ainda conhecimento preciso de qual o mecanismo envolvido capaz de induzir mudanças na síntese e ou secreção dessas enzimas, havendo a respeito algumas teorias⁽¹³⁾.

Em vista disso, nos propusemos a explorar nossos resultados com o inibidor de α -amilase, à luz dessas teorias.

Na primeira experiência, quando administramos aos animais a preparação de IA ainda contaminado com inibidor de tripsina (IT) (Tabela 9), os resultados referentes à secreção da α -amilase nos induziram a pensar em algum controle semelhante ao me-

canismo que controla a secreção de proteases pelo pâncreas. Isso porque, com 2 e 4 horas verificamos um expressivo aumento na atividade da α -amilase intestinal que poderia ser decorrente da presença de IA ou de amido residual não digerido.

Essa idéia foi abandonada ao verificarmos que a quantidade de tripsina presente na luz intestinal estava substancialmente reduzida (Tabela 10), possivelmente devido a complexação com o IT. Com o abaixamento do nível de tripsina ocorre, como é sabido a liberação de Colecistoquimina-Pancreozimina que agindo no pâncreas causa a liberação inespecífica de enzimas pancreáticas contidas nos grânulos de zimogênios⁽⁴⁰⁾ e, estimula também a síntese de proteases⁽³⁰⁾⁽⁶²⁾.

Apesar de comprometidos pela presença de IT na preparação de IA, esses resultados foram apresentados para alertar com relação a necessidade de eliminação completa desse inibidor nas experiências que procuram estudar mecanismos digestivos em proteínas vegetais.

Quando utilizamos o IA tratado com β -mercaptoetanol ; tratamento que resultou na eliminação de 99,9% do IT (Tabela 1); verificamos que, contrariamente aos resultados anteriores, o teor de tripsina no intestino era elevado indicando a não interferência pela contaminação de IT (Tabela 13). Nesse caso também, contrariamente aos resultados da experiência anterior o teor de α -amilase intestinal não se modificou (Tabela 12). Justificando as suspeitas discutidas anteriormente.

O grupo que recebeu sô IA e o grupo que recebeu IA com amido também apresentaram semelhantes teores de α -amilase intestinal (Tabela 12). Como o teor de glicose sanguínea (Tabela 6)

nesses grupos foi o mesmo não havendo praticamente absorção de glicose que pudesse estimular o pâncreas^(1,15,31,46) e como só havia amido (14,4 mg) presente no grupo que recebeu IA com amido e não no outro (4,3 mg) após 4 horas, pode-se concluir que pelo menos em ensaios de curta duração não parece haver controle de secreção-produção da amilase a nível intestinal. Se houvesse, o teor de α -amilase no grupo que tinha amido residual no intestino deveria ser maior (Tabela 7). Aparentemente como sugerido por NAIN e KARE⁽⁵⁴⁾ a secreção da α -amilase poderia ser decorrente de um estímulo inespecífico causado pela presença de alimento no trato gastro-intestinal.

Se de um lado a liberação parece ser devida a estímulo inespecífico, pelo menos a síntese parece ser controlada pelos níveis de glicose sérica^(1,15,31,46) e insulina^(55,65,66) sérica ou pela glicose que atinge o pâncreas^(2,9) decorrentes da digestão do amido ao atingir o intestino; resultados obtidos com o IA parecem confirmar parte dessas teorias. De fato, analisando a (Tabela 8) vemos que a nível do pâncreas houve no grupo controle um aumento na atividade de α -amilase no tempo de 2 horas e paralelamente aumento da glicose e insulina sérica desses mesmos animais (1 hora)(Figura 1 e 2).

No grupo onde a digestão foi bloqueada pelo IA, e não houve absorção de glicose a atividade da amilase permaneceu constante.

Os baixos teores de proteína no pâncreas após 1 hora da ingestão do IA (Tabela 8) podem ser explicados através da contaminação com IT na amostra de IA, essa liberação de proteína seria estimulada pela complexação da tripsina com o IT, fato já

confirmado pelos baixos teores de tripsina no intestino desses animais (Tabela 10). Posteriormente, verificamos com 2 horas aumento no teor de proteína, esse aumento foi decorrente da síntese de proteases, uma vez que a atividade da α -amilase permaneceu constante. Já no experimento sem contaminação com inibidor de tripsina no IA não se verificou qualquer alteração na liberação de proteínas pelo pâncreas (Tabela 11).

Verificamos até o momento, através de ensaios de curta duração, que o IA do feijão interfere na hidrólise do amido sem afetar a secreção da α -amilase nem a síntese dessa enzima. Os nossos dados porém, não podem ser comparados com os de autores que baseados em ensaios crônicos sugeriram outros mecanismos sobre a modulação da secreção e síntese da α -amilase no pâncreas.

É o caso dos resultados obtidos por MACRI e cols.⁽⁴⁹⁾ que ao administrarem IA do trigo, por 28 dias, em galinhas, verificaram aumento na atividade da α -amilase pancreática e hipertrofia no pâncreas, sugerindo que o nível da α -amilase no intestino controlaria sua síntese e secreção de forma semelhante ao mecanismo das proteases. No entanto, FOLSH e cols.⁽²²⁾ alimentando ratos com IA de origem microbiana, após 20 ou 60 dias, observaram diminuição no conteúdo da α -amilase pancreática sem qualquer alteração histológica no pâncreas, acreditando que a secreção e a síntese da α -amilase seriam controladas por um mecanismo diferente da tripsina; o mesmo foi concluído por IHSE & LILJA⁽³⁴⁾ estudando a secreção da α -amilase em porcos com fístula pancreática.

Portanto, com o uso do IA a curto prazo foi possível verificar que o mecanismo que controla a liberação e produção da α -amilase pancreática é diferente do da tripsina. Sugerimos

assim, a realização de ensaios crônicos com o IA para poder confirmar se esses efeitos sobre a α -amilase persistem ou não a longo prazo.

6.3 - Efeito do IA em animais diabéticos

Em animais diabéticos pudemos verificar um alisamento na curva glicêmica (Figura 4), onde a área diferencial entre as curvas do grupo controle e experimental foi de praticamente 100%. Portanto, como decorrência do impedimento da digestão do amido nenhuma glicose atingiu o compartimento plasmático.

É oportuno comentar que o teor de amilase pancreática em ratos diabéticos é cerca de 10 vezes menor do que em ratos normais⁽⁴⁾, fato também observado por nós (Tabela 2). Aparentemente, por isso, a eficiência do IA em diabéticos pode ser ainda maior do que aquela obtida em organismos normais.

Observamos também, como nos animais normais, retardo na digestão do amido (Tabela 14) restando após 1 hora 88% do ingerido no trato gastro-intestinal e 39% no controle em diabéticos; nos animais normais os valores correspondentes foram de 40% de amido residual na presença de IA e 9% no grupo controle após o mesmo tempo (Tabela 5). Essa diferença está de acordo portanto, com a já discutida menor produção de α -amilase. Esses resultados merecerão estudos adicionais.

Efeitos semelhantes aos nossos, relacionados com a redução da glicemia, foram encontrados por outros autores utilizando respectivamente IA do trigo ou de microrganismos em huma-

nos normais, diabéticos e obesos. Esses autores consideram que o IA poderia representar um modelo de terapia da obesidade e controle de diabetes^(16,23).

Decorrente do impedimento da digestão do amido pelo IA, pudemos observar também aumento nos níveis de ácidos graxos (Tabela 15) de maneira semelhante verificada nos animais normais (Figura 3), apesar de não haver diferenças marcantes nos teores de insulina.

Dessa forma, o IA tem efeito sobre a digestão do amido em animais diabéticos como em normais, ressaltando novamente que, devido a deficiência da α -amilase nesses animais acreditamos que menores doses de IA poderiam ter os mesmos efeitos.

7 - CONCLUSÕES

- 7.1 - O IA impede a digestão do amido em animais normais causando hipoglicemia e conseqüentemente alterando outros parâmetros ligado ao metabolismo da glicose (insulina e ácidos graxos não esterificados).
- 7.2 - Esse impedimento da digestão do amido é decorrente do bloqueio enzimático da α -amilase na luz intestinal.
- 7.3 - Existe uma relação dose x efeito. Sendo a dose de 40 mg IA/180 mg amido em animais normais a que causa um alisamento total da curva glicêmica.
- 7.4 - Em ensaios de curta duração a redução da disponibilidade da α -amilase no intestino, causada por sua complexação com o IA, não controla a secreção e produção da α -amilase pancreática. Parece também, não haver controle desses parâmetros pela presença de amido residual no trato gastro-intestinal.

7.5 - O IA afeta a digestão do amido também em animais diabé
ticos, proporcionando um alisamento total da curva glii
cêmica com 40 mg IA/180 mg.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABDELJLIL, A.B. & DESNUELLE, P. Sur L'adaptation des enzymes exocrines du pancreas a la composition du regime. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 81:136-49, 1964.
- 2 - ABDELJLIL, A.B.; PALLA, J.C.; DESNUELLE, P. Effect of insulin on pancreatic amylase - Biochim. Biophys. Acta , Amsterdam, 158:25-35, 1968.
- 3 - ANDRIOLO, S.; ROUANET, J-M; LAFONT, J.; BESANÇON, P. Inactivation of Phaseolamin, an α -amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris by gastric acid and digestive protease. Nutr. Report. Inter., Los Altos, 29(1):149-56, 1984.
- 4 - BAZIN, R. & LAVAU M. Diet composition and insulin effect on amylase to lipase ratio in pancreas of diabetic rats. Digestion, Basel, 19:386-91, 1979.
- 5 - BERGMAYER, M.V. & BERNET, E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer, H.U., Methods of enzymatic analysis, 2a. ed., New York, Academic Press, 1974, p.1204-12.
- 6 - BERNFELD, P. Amylase α and β . Meth. Enzymol., New York, 1: 149-54, 1955.
- 7 - BO-LINN, G.W.; SANTA ANA, C.A.; MORAWSKI, S.G.; FORDTRAN, J. S. Starch blockers - their effect on caloric absorption from a high-starch meal. New England J. Med., Boston, 307: 1413-6, 1982.

- 8 - BOWMAN, D.E. Amylase inhibitor in navy beans Science, Washington, 102:2549-50, 1945.
- 9 - BUCKO, A.; KOPEC, Z. KAPPELLER, J. MIKULAJOVA, M. - Adaptation of pancreatic amylase activity to enhanced parenteral carbohydrate intake in rats, and electron microscopic findings. Nutr. Metab. Basel, 20:117-24, 1976.
- 10 - CARLSON, G.L. A bean α -amylase inhibitor formulation (starch blocker), is ineffective in man. Science, Washington, 219:393-5, 1983.
- 11 - CHORVÁTHOVÁ, V.; KOPEC, Z.; OVECKA, M. Streptozotocin-induced diabetes in rats. Biologia, Bratislava, 36(6): 453-6, 1981.
- 12 - CHRZASZCZ, T. & JANICKI, J. Sisto-amylase. In natürlicher paralyser der amylase. Biochem. Z., 260, 354-68, 1933.
- 13 - CORRING, T. Possible role of hydrolysis products of the dietary components in the mechanisms of the exocrine pancreatic adaptation to the diet. Wld. Rev. Nutr. Diet., New York, 27:132-44, 1977.
- 14 - CRANE, R.K. The physiology of the intestinal absorption of sugar. In: JEANES, A. & HODGE, J. Physiological effects of food carbohydrates, Washington, American Chemical Society, 1975, p.2-19.
- 15 - DANIELSSON, A.; MARKLUND, S.; STIGBRAND, T. Effects of starvation and islet hormones on the synthesis of amylase in isolated exocrine pancreas of the mouse. Acta Hepato-Gastroenterol., Stuttgart, 21:289-97, 1974.
- 16 - EICHLER, H.G.; KORN, A.; GASIC, S.; PIRSON, W.; BUSINGER, J. The effect of a new specific α -amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursion in normal subjects and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. Diabetologia, New York, 26:278-81, 1984.

- 17 - FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 46:105-11, 1973.
- 18 - FEDERE, W.I. Experimental design, New York, Mac Millan , 1955,p.544.
- 19 - FINARDI-FILHO, F. Parâmetros estruturais do inibidor de α -amilase de feijão (*Phaseolus vulgaris*). São Paulo, 63p., 1983 |Te se de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Univ. São Paulo|.
- 20 - FINARDI-FILHO, F. & LAJOLO, F.M. Identificação eletroforética de inibidor de α -amilase em geis de poliacrilamida-amilopectina. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2:21-32 , 1982.
- 21 - FÖLSCH, U.R. Delaying of carbohydrate absorption by α -amylase inhibitors. In: Delaying absorption as a therapeutic principle in metabolic diseases, Ludwig-Helmeyer-Symposium of the "Gesellschaft für fortschritte auf dem gebiet der innern medizin", Dusseldorf 1982, edited by W. Creutzfeld of U.R. Fölsch. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1983, p.79-86.
- 22 - FÖLSCH, U.R.; GRIEB, N.; CASPARY, W.F.; CREUTZFELDT, W. Influence of short - and long-term feeding of an α -amylase inhibitor (BAY e 4609) on exocrine pancreas of the rat . Digestion, Basel, 21:74-82, 1981.
- 23 - FREDICHS, H; DAWEKE, H.; GRIES, F.; GRUNEKLEE, D.; HESSING, J.; JAHNKE, K.; KEUP, U.; MISS, M.; OTTO, H.; PULS, W. ; SCHIMIDT, D.; ZUMFELDE, C. A novel pancreatic amylase inhibitor (BAY d 7791) experimental studies on rats and clinical observations in normal and obese diabetic and non diabetic subjects. Diabetologia, New York, 9: 68, 1974 (abstract).

- 24 - FROMMER, W.; JUNGE, B.; MULLER, L.; SCHMIDT, D.; TRUSCHEIT, E. Neve enzyminhibitoren aus mikroorganismen. Planta Med., Stuttgart, 35:195-217, 1979.
- 25 - GALLAHER, D. & SCHNEEMAN, B.O. Nutritional and metabolic response to plant inhibitors of digestive enzymes. Adv. Exp. Med. Biol., New York, 177:299-319, 1984.
- 26 - GARROW, J.S.; SCOTT, P.F.; HEELS, S.; NAIR, K.S.; HALLIDAY, D. A study of starch blockers in man using ¹³C-enriched starch as a tracer. Hum. Nutr. Clin. Nutr., London, 37c: 301-5, 1983.
- 27 - GRANUN, P.E. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from rye (Secale cereale) flour. J. Food Biochem, Westport, 2:103-20, 1978.
- 28 - GRANUN, P.E. & ESKELAND, B. Nutritional significance of amylase inhibitors from wheat. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 23(1):155-63, 1981.
- 29 - GRANUN, P.E.; HOLM, H.; WILCOX, E.; WHITAKER, J.R. Inhibitory properties of two commercially available starch blocker preparations. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 28(6):1233-45, 1983.
- 30 - GREEN, G. & LYMAN, R.L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats (36384) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 140:6-12, 1972.
- 31 - GRENDELL, J.M. & ROTHMAN, S.S. Digestive end products mobilize secretory proteins from subcellular stores in the pancreas. Am. J. Physiol., Bethesda, 241, 4, 67-73, 1981.

- 32 - HOLLENBECK, C.B.; COULSTON, A.M.; QUAN, R.; BECKER, T.R. ; VREMAN, H.J.; STEVENSON, D.K.; REAVEN, G.M. Effects of a commercial starch blocker preparation on carbohydrate digestion and absorption: in vivo and in vitro studies. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, 38:498-503, 1983.
- 33 - HONAVAR, P.M.; SHIH, C.V.; LIENER, I.E. Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from Phaseolus vulgaris. J. Nutr., Philadelphia, 77:109-14, 1962.
- 34 - IHSE, I. & LILJA, P. Effects of intestinal amylase and trypsin on pancreatic secretion in the pig. Scand. J. Gastroent., Oslo, 14(8):1009-13, 1979.
- 35 - INSTITUTE of laboratory animal resources. Committee on laboratory animal diets: a report. Nutrition abstracts of reviews, b.; livestock feed and feeding, Slough, 49(11): p.413-9, 1979.
- 36 - JAFFE, W.G. & LETTE, L.V. Heat-labile growth-inhibiting factors in bean (Phaseolus vulgaris). J. Nutr., Philadelphia, 94:203-10, 1968.
- 37 - KAKADE, M.L.; ARNOLD, R.L.; LIENER, I.E.; WAIBEL, P.E. Unavailability of cystine from trypsin inhibitors as a factor contributing to the poor nutritive value of navy beans. J. Nutr., Philadelphia, 99:34-42, 1969.
- 38 - KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. - Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedures. Cereal chem., Saint Paul; 51:376-82, 1974.
- 39 - KASHLAND, N.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of α -amilase. Phytochemistry, New York, 20(8):1781, 1981.

- 40 - KONIJN, A.M.; GUGGENHEIM, K.; BIRK, Y. Amylase synthesis in pancreas of rats fed soybean flour. J. Nutr., Philadelphia, 97:265-70, 1968.
- 41 - KREISBERG, R.A.; BOSHELL, B.R.; DI PLACIDO, J.; RODDAM, R. F. Insulin secretion in obesity. N. Eng. J. Med., Boston, 276:314-9, 1967.
- 42 - LAJOLO, F.M. Inibidor de amilase do (Phaseolus vulgaris): estudo bromatológico. São Paulo, 133p, 1977. |Tese de livre-docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Univ. São Paulo|.
- 43 - LAJOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F. Purificação do inibidor de α -amilase do feijão preto (Phaseolus vulgaris) Var. Rico-23. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 4(1):11 1984.
- 44 - LAJOLO, F.M. & FINARDI-FILHO, F. Partial characterization of the amylase inhibitor of black beans (Phaseolus vulgaris) variety Rico-23. J. Am. Chem. Soc., Washington, 33(1):132-8, 1985.
- 45 - LAJOLO, F.M.; MANCINI-FILHO, J.; MENEZES, E.W. Effect of a bean (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitor on starch utilization. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 30(1): 45-54, 1984.
- 46 - LAVAU, M.; BAZIN, R.; HERZOG, J. Comparative effects of oral and parenteral feeding on pancreatic enzymes in rat. J. Nutr., Philadelphia, 104:1432-7, 1974.
- 47 - LIENER, I.E.; DONATUCCI, D.A.; TAREZA, J.C. Starch Blockers: a potential source of trypsin inhibitors and lectins. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, 39:196-200, 1984.
- 48 - LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem., Baltimore, 193:265-75, 1951.

- 49 - MACRI, A.; PARLAMENTI, R.; SILANO, V.; VALFRE, F. - Adaptation of the domestic chicken, gallus domesticus, to continuous feeding of albumin amylase inhibitors from wheat flour as gastro-resistant microgranules. Poult. Sci., Champaign, 56:434-41, 1977.
- 50 - MANCINI-FILHO, J. & LAJOLO, F.M. Fatores antinutricionais em diferentes variedades de feijões (Phaseolus vulgaris, L.) Cienc. Cult., São Paulo, 33(1):94-7, 1981.
- 51 - MARSHALL, J.J. & LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, (Phaseolus vulgaris). J. biol. Chem., Baltimore, 250(20):8030-7, 1975.
- 52 - MORGAN, G.R.; LAZAROW, A. Immunoassay of insulin: two antibody system. Plasma insulin levels of normal subdiabetic and diabetic rats. Diabetes, New York, 12:115-26, 1963.
- 53 - MOUNTCASTLE, V.B. Fisiologia Médica, 13a. ed., vol. II, cap. 73, Guanabara, Koogan, 1984, p.1804.
- 54 - NAIN, M. & KARE, M.R. Taste stimuli and pancreatic functions In: Morley, K.R. & Owen, M., The chemical senses and nutrition, New York, Academic Press p.145-62, 1977.
- 55 - PALLA, C.J.; ABDELJLIL, B.; DESNUELLE, P. Action de L'insuline sur la biosynthese de l'amylase et de quelques autres enzymes du pancreas de rat. Bioch. Biophy. Acta, Amsterdam, 158:25-35, 1968.
- 56 - PICK, K.H. & HOBBER, G. Proteinacions α -amylase inhibitor from beans (Phaseolus vulgaris), Immunological characterization. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chim., Berlin, 359:1379-84, 1979.

- 57 - POWERS, J.R. & WHITAKER, J.R. Purification and some physical and (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitor. J. Food Biochem., Westport, 1:217-38, 1977.
- 58 - PULS, W. & KEUP, U. Influence of an α -amylase inhibitor (BAY d 7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading tests in rats, dogs and man. Diabetologia, New York, 9(2):97-101, 1973.
- 59 - PUPO, A.A.; MARREIRO, D. Dosagem de insulina pelo radioimunoensaio com duplo anticorpo. Rev. As. Med. bras., São Paulo, 16:153-6, 1970.
- 60 - RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. Food Chemistry, Barking, 6:235-53, 1980.
- 61 - SAVAIANO, D.A.; POWERS, J.R.; COSTELO, M.J.; WHITAKER, J.R.; CLIFFORD, A.J. The effect of an α -amylase inhibitor on the growth rate of weaning rats. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 15(4):443-7, 1977.
- 62 - SCHNEEMAN, B.O. & LYMAN, R.L. Factors involved in the intestinal feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat (38656). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 148:897-903, 1975.
- 63 - SILANO, V. Biochemical and nutritional significance of wheat albumin inhibitors of α -amylase. Cereal Chem., St. Paul, 55:722-31, 1978.
- 64 - SILANO, V.; FURIA, M.; GIANFREDA, L.; MACRI, A.; PALESCANDOLO, R.; RAB, A.; SCARDI, V.; STELLA, E.; VALFRE, F. - Inhibition of amylase from different origins by albumins from the wheat kernel. Biochim. Biophys. Acta, Amester-dam, 391:170-8, 1975.

- 65 - SNOOK, J.T. Dietary regulations of pancreatic enzymes in the rat with emphasis on carbohydrate. Am. J. Physiol., Bethesda, 221(5):1383-7, 1971.

- 66 - SOLING, H.D. & UNGER, K.O. The role of insulin in regulation of α -amylase synthesis in the rat pancreas. Europ. J. Clin. Invest., Berlin, 2:199-212, 1972.

- 67 - TANIZAK, M.M. & LAJOLO, F.M. Kinetics of the interaction of pancreatic α -amylase with a kidney bean (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitor, J. Food Biochem., Westport, 9(2): 71-90, 1985.

- 68 - TANIZAK, M.M.; LAJOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F. Combination of black bean (Phaseolus vulgaris) amylase inhibitor with modified pancreatic α -amylase. J. Food Biochem., Westport, 9(2):91-104, 1985.

- 69 - WILCOX, E.R.; WHITAKER, J.R. Some aspects of the mechanism of complexation of red kidney bean α -amylase inhibitor and α -amylase. J. Am. Chem. Soc., Washington, 23:1783-91, 1984.

S U M M A R Y

An α -amylase inhibitor purified from black beans (Phaseolus vulgaris L.) prevents the utilization of starch either in normal or diabetic rats during short-time starch loading tests. It causes hypoglycaemia and alters accordingly the serum insulin and non esterified fatty acids levels. These effects are dose dependent and doses higher than 31 mg of the inhibitor can promote the complete smoothing on serum glucose level. The existence of starch in the presence of the inhibitor in the intestine doesn't alter the secretion or production of α -amylase by the pancreas.

TABELAS

	pag.
1 - Efeito do tratamento com celite/bentonite e β -mercaptoetanol na remoção do inibidor de tripsina	11
2 - Efeito da Streptozotocina (4,5 mg/100g peso) na indução de diabetes	17
3 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a glicemia	19
4 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal ...	20
5 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal	25
6 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a glicemia	26
7 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal.....	27
8 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a atividade da α -amilase e teor de proteína no pâncreas	29
9 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a atividade da α -amilase pancreática e sobre proteína total presentes no intestino	30

pág.

10 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a atividade da tripsina do intestino	31
11 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a atividade da α -amilase e teor de <u>pro</u> teína no pâncreas	32
12 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a atividade da α -amilase pancreática e sobre proteína total presentes no intestino	33
13 - Efeito do inibidor de α -amilase, isento de inibidor de tripsina, sobre a atividade da tripsina no <u>intesti</u> no	34
14 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido em animais diabéticos	37
15 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre os n $\acute{e}$ veis s $\acute{e}$ ricos de insulina e $\acute{a}$ cidos graxos em animais diabéticos	38

FIGURAS

	pag.
1 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a glicemia, após a administração de amido por sonda gástrica	22
2 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a insulina sérica, após a administração de amido por sonda gástrica..	23
3 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre o nível sérico de ácidos graxos, após a administração de amido por sonda gástrica	24
4 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a glicemia de animais diabéticos, após a administração de amido por sonda gástrica	36
5 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a glicemia	40
6 - Efeito de doses crescentes de inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no gastro-intestinal, após 3 horas da administração de amido por sonda gástrica....	41
7 - Efeito do inibidor de α -amilase sobre a digestão do amido no trato gastro-intestinal	43