

RENATO MOREIRA NUNES

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA DE DIFERENTES
CULTIVARES DE SOJA E FARINHA MISTA DE SOJA E MILHO E ANÁLISE
PROTEÔMICA DA SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N972a
2011

Nunes, Renato Moreira, 1969-

Avaliação da qualidade proteica de diferentes cultivares de soja e farinha mista de soja e milho e análise proteômica da soja / Renato Moreira Nunes. – Viçosa, MG, 2011.
xi, 50f. : il. ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 42-50

1. Proteômica. 2. Proteínas - Qualidade. 3. Soja. 4. Farinha de soja. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.633

RENATO MOREIRA NUNES

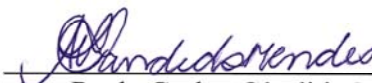
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA DE DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA E FARINHA MISTA DE SOJA E MILHO E ANÁLISE PROTEÔMICA DA SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

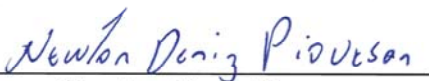
Aprovada: 29 de novembro de 2011.



Maria de Carmo Gouveia Peluzio



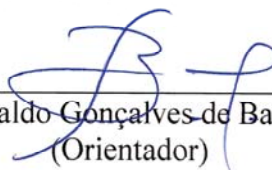
Ana Paula Carlos Cândido Mendes



Newton Deniz Piovesan



Leandro Licursi de Oliveira



Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho inicialmente a minha filha, Maria Eduarda Dias Nunes, inspiração nos dias difíceis, a sua presença em minha vida me fez ter força pra ser exemplo como pai, como ser humano e como professor.

A minha irmã Valéria Mattos da Rosa, presente a todo o momento, a todo instante na minha vida, me dando força, sendo meu alento e meu porto seguro, exemplo de amor e dedicação, não importa o quão difícil fosse, permaneceu ao meu lado e me apoiou.

A minha mãe, Marli Moreira Nunes, que mesmo em outro plano me confortou e me inspirou nos dias mais difíceis de dor...

A minha família, irmãos, cunhadas e principalmente sobrinhos, presentes ou ausentes, vocês fazem parte de mim...

Aos meus alunos do GRUDEH, em especial a Bruna, Fran, Genáina, Letícia e Mara, por se importarem comigo e me ensinarem a aprender novamente.

*“Eu sei que os sonhos são pra sempre
Eu sei aqui no coração
Eu vou ser mais do que eu sou
Para cumprir as promessas que eu fiz
Porque eu sei que é assim
Que os meus sonhos dependem de mim...”*
(Marina Elali)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por tudo que sou e por tudo que me fez transformar, me fortalecendo e me mostrando o caminho a seguir, mesmo quando estava de olhos vendados, muito obrigado;

Ao meu Orientador, Professor e Mestre, Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, conselhos, confiança, incentivo, pela amizade construída e oportunidade oferecida desde o início. Agradeço pelos ensinamentos acadêmicos e de vida;

À minha irmã Valéria, pelo carinho, amor, dedicação, paciência, companheirismo e atenção em todos os momentos desta caminhada;

À minha filha Duda, pelos dias e horas que não pude estar ao teu lado e que mesmo assim você me amou e me deu carinho...

À Renata Dias por todo carinho e amor dedicado a Duda todos estes anos. Minhas desculpas e meu muito obrigado;

À minha Mãe, exemplo de força e perseverança na minha vida;

Aos meus irmãos e cunhadas: Lola, Patrícia, Flávio e Cláudia, Tarcísio e Cláudia, Carlinhos e Guacira, Roberto e Josy, por serem meus amigos e acreditarem em mim. Dando-me força e todo apoio necessário;

Ao meu pai, Carlos Custódio, pelos bons genes e por me ajudar a superar minhas limitações mesmo em sua ausência, estamos em paz agora...

Aos queridos amigos do doutorado: Carla Quinhones, Fernanda, Mateus, Márcia, Lu da Mata e Nathália que não só alegraram meus dias, me confortaram e construíram laços de amizade, mas me ensinaram e participaram efetivamente da construção dessa tese, meu muito obrigado... Obrigado pelo incentivo, apoio, pela amizade, convivência, pelos felizes momentos compartilhados, troca de experiências, e é claro, pelos nossos encontros regados a boas risadas. Em especial a Carla Quinhones, que me ajudou na etapa final da defesa com tanto carinho e desprendimento que me levou as lágrimas pela amizade gratuita e pela descoberta de uma alma mais evoluída que a maioria que conheço, obrigado de coração Carlinha;

À Hércia, porque por uma força do destino maior que a que posso explicar, sempre esteve presente em minha formação e que tive o prazer e a honra de me co-orientar me ajudando a ver a direção e o caminho;

Às minhas amigas Sandra Bragança, Beth Fantuzzi e Flávia Leal, por terem ouvido pacientemente sobre as minhas lutas ao longo da vida...

Aos meus amigos, Marcelo, Paulo Henrique, Arlete, Ana Paula e Renner, Leonardo, Carlos Henrique, Maila e Devanil, a vida perderia o sentido sem vocês...

Aos colegas de disciplina que me ajudaram a ver o mundo por outros olhos;

Aos técnicos de laboratório, Cassiano Silva, Ricardo Antonucci, Teresinha, Naldo, Izabel, Fabiana, Edvaldo e Newton, que ajudaram muito nas análises em momentos difíceis;

Às secretárias, Mimorina, Cleuza, Beth e Diane, que sempre em sua alegria tornaram meus dias mais felizes;

Aos meus professores da graduação, mestrado e doutorado, exemplos ao longo da minha vida do que é ser um profissional;

Aos meus amigos e familiares, que mesmo de longe, acreditaram e torceram o tempo todo por mim;

Aos Inesquecíveis, Renata, Brent, Aruay, Diógeno e João, eu tenho parte de vocês comigo pra sempre...

Aos meus alunos do GRUDEH que sempre me deram apoio e exemplo de perseverança e me ajudaram a aprender a aprender no lugar mais importante de todos, na VIDA;

Aos convidados e suplentes pela gentileza que aceitaram serem membros da banca examinadora, pelas colaborações, considerações e sugestões;

À todos do BIOAGRO e aos funcionários da UFV e do DNS, que colaboraram sempre e que muito me ajudaram com as análises realizadas e também a todos os outros que passaram pelo meu caminho nesses anos;

À FAPEMIG pela concessão de bolsa parcial de estudos;

À UFJF, ao ICB, ao Núcleo de Biomoléculas e ao Departamento de Nutrição que me concederam afastamento parcial da minha carga horária de trabalho para terminar o Doutorado;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.2. Soja	2
2.2. Melhoramento Genético	3
2.3. Avaliação da Qualidade Protéica	4
2.4. Ensaio Biológico	4
2.5. Uso de Farinhas Mistas Vegetais na Alimentação Humana	5
2.6. Eletroforese Bidimensional (2DE)	7
2.7. Proteômica	8
3. OBJETIVO	9
3.1. Geral	9
3.2. Objetivos Específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Material Vegetal - Plantio e Coleta	9
4.2. Composição Centesimal dos Grãos	10
4.3. Aminograma dos Grãos	11
Determinação e Quantificação dos Aminoácidos	11
4.4. Desenvolvimento da Farinha Mista	11
4.5. Composição Centesimal da Farinha Mista de Soja e Milho	12
4.6. Avaliação da qualidade protéica	12
4.7. Dietas experimentais	12
4.8. Delineamento Experimental	13
4.9. Determinação do Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS)	15
4.10. Análise proteômica	16
4.11. Extração Protéica	16
4.12. Quantificação da Proteína Total do Extrato Protéico	17
4.13. Eletroforese Bi-Dimensional (2DE) do Extrato Protéico	17
4.14. Comparação da Expressão Protéica de Diferentes Linhagens	18
4.15. Análise Estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Seleção dos cultivares de soja para amostra	20
5.2. Quantificação Centesimal	21
5.3. Aminograma dos Grãos e Determinação do Escore Químico	21
5.4. Composição das dietas experimentais	24
5.5. Avaliação da Qualidade Protéica e Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS)	26
5.6. Análise proteômica	30
5.7. Análise do proteoma diferencial nas sementes de soja estudadas	32
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
7. REFERÊNCIAS	42

ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
AIN-93G	<i>American Institute of Nutrition for growth</i>
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BBI	Inibidor de quimiotripsina <i>Bowman-Birk</i>
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
CAS	Caseína
CEA	Coefficiente de Eficiência Alimentar
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
COOPADAP	Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba
DV	Digestibilidade Verdadeira
DV-R	Digestibilidade Verdadeira Relativa
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GP	Ganho de Peso
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
KTI	Inibidor de Tripsina Kunitz
LN	Livre de nitrogênio
LOX	Lipoxigenase
mRNA	RNA mensageiro
NPR	Razão Protéica Líquida
NPR-R	Razão Protéica Líquida Relativa
PDCAAS	Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína
PER	Razão da Eficiência Protéica
PER-R	Razão da Eficiência Protéica Relativa
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
QPM	Qualidade Protéica Melhorada
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDS	Dodecilssulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TCA	Ácido tricloroacético
UFV	Universidade Federal de Viçosa
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Gel 2D representativo dos locais de focalização das principais proteínas de reserva, lipoxigenases e as proteínas que podem interferir na qualidade protéica, com possível ação antinutricional como o inibidor de tripsina *Kunitz* (KTI). Baseado nos trabalhos de Hajduch *et al.* (2005), Krishnan *et al.* (2007) e Natarajan *et al.* (2009, 2006). 33
- Figura 2 Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar Monarca. Gel de referência para comparação entre os cultivares CD 201 e CD 2013 PTA. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. 34
- Figura 3 Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar CD 201 comparado com o cultivar Monarca. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. 35
- Figura 4 Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar CD 2013 PTA comparado com o cultivar Monarca. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. 35
- Figura 5 Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar BARC-8. Gel de referência para comparação entre os cultivares parentais CS 3033 PTA (LOX +) e UFVTN 105 AP (LOX -). Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. 37
- Figura 6 Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar CS 3033 PTA (LOX +) comparado com o cultivar BARC-8. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. 37
- Figura 7 Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar UFVTN 105 AP (LOX -) comparado com o cultivar BARC-8. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Determinação de proteína (%) em grãos colhidos de fileiras individuais de plantas de soja.	20
Tabela 2	Composição química centesimal das farinhas de soja e milho integrais (g/100g).	21
Tabela 3	Composição aminoacídica dos cultivares de soja Monarca CD 201 e CD 2013 PTA (Grupo 1) e o valor de escore dos aminoácidos essenciais segundo o padrão FAO/OMS para crianças de 2-5 anos (2007).	22
Tabela 4	Composição aminoacídica dos cultivares de soja CS303 e UFVTN105 e de milho QPM (Grupo 2) e os valores de escore dos aminoácidos essenciais segundo o padrão FAO/OMS para crianças de 2-5 anos (2007).	23
Tabela5	Composição aminoacídica e escore dos aminoácidos essenciais das cinco farinhas mistas dos cultivares de soja e de milho (Grupo 2) na proporção de 30/70 (soja/milho) segundo o padrão FAO/OMS (2007).	23
Tabela6	Composição das dietas de caseína (CAS), livre de nitrogênio (LN) e dietas experimentais T1, T2, T3, T4 e T5 (g/kg) de soja (Grupo 1).	24
Tabela7	Composição das dietas de caseína (CAS), livre de nitrogênio (LN) e dietas experimentais T6, T7, T8, T9, T10 (g/kg) de farinha de soja e milho e da dieta experimental T11 de milho (Grupo 2).	25
Tabela8	Composição centesimal das dietas de caseína (CAS), livre de nitrogênio (LN) e dietas experimentais (g/kg) de soja, farinha mista de soja e milho e milho (Grupo 1 e 2).	25
Tabela9	Consumo alimentar (CA), Ganho de Peso (GP) e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos ratos alimentados com dietas experimentais.	26
Tabela10	Valores de Per, NPR, Digestibilidade aparente e relativo e PDCAAS.	29
Tabela 11	Análise de correspondência dos Spots dos diferentes cultivares em triplicata.	31
Tabela 12	Análise de expressão diferencial entre o cultivar de referência Monarca e CD 201 e CD 2013 PTA.	36
Tabela 13	Análise de expressão diferencial entre o cultivar de referência BARC-8 e os cultivares melhorados CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP (LOX -).	39

RESUMO

NUNES, Renato Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Avaliação da qualidade proteica de diferentes cultivares de soja e farinha mista de soja e milho e análise proteômica da soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Maurilio Alves Moreira e Marcelo Ehlers Loureiro.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa com participação importante na alimentação humana. O melhoramento genético tem desenvolvido novos cultivares com modificações nas frações protéica e lipídica do grão, gerando a necessidade de estudos para avaliar a concentração de nutrientes e valor biológico desses cultivares. Neste estudo avaliaram-se a composição centesimal, valor biológico, o perfil aminoacídico, e a qualidade nutricional de cinco cultivares de soja isolados e em associação ao milho (farinha mista). Foi realizada também a análise da expressão diferencial de proteínas por eletroforese bidimensional dos cinco cultivares de soja utilizados (CD 201, CD 2013 PTA, Monarca, CS 3033PTA e UFVTN105AP) além do cultivar BARC-8. A qualidade protéica foi avaliada em ratos machos Wistar, distribuídos ao acaso em 11 grupos (n=6), durante 14 dias. Os dois grupos testes receberam dietas à base de farinhas de soja misturadas ou não com farinha de milho tratadas a 150° C por 30 minutos. Um grupo controle recebeu dieta livre de nitrogênio e outro grupo de referência, recebeu dieta à base de caseína. Avaliaram-se: ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), coeficiente de eficiência alimentar (CEA), razão da eficiência protéica (PER), razão protéica líquida (NPR), digestibilidade verdadeira (DV) e escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS). O perfil aminoacídico das farinhas de soja integral apresentou-se limitante para cistina e metionina, apenas no cultivar Monarca pelo padrão da FAO/WHO de recomendação nutricional. Não houve diferença entre o consumo alimentar dos animais, no entanto, os valores CEA, PER, NPR, DV e o PDCAAS tanto dos animais alimentados com soja quando da mistura soja e milho foi menor que o padrão caseína ($p>0,05$), indicando que as farinhas não foram adequadas para promover o crescimento e o desenvolvimento dos animais mesmo quando o escore calculado foi adequado. Apesar do melhoramento genético ter proporcionado um aumento dos teores de proteína não se pode afirmar que proporcionou um equilíbrio qualitativo dos aminoácidos essenciais. Outros fatores como a digestibilidade e a biodisponibilidade das proteínas podem ter interferido na avaliação da qualidade

protéica. A análise diferencial das proteínas presentes nos grãos de soja por eletroforese bidimensional revelou entre 650 e 1900 *spots* sendo que destes em média 18 apresentaram diferenças em sua expressão. A análise dos perfis eletroforéticos indica que o ganho de proteínas modificou principalmente a expressão das proteínas de reservas, e que a fração protéica em uma soja de alto teor não é igual a outra de teor normal.

ABSTRACT

NUNES, Renato Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2011. **Evaluation of protein quality of different cultivars of soybean and soybean meal and corn mixed and proteomic analysis of soybean.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Advisers: Hércia Stampini Duarte Martino, Maurilio Alves Moreira and Marcelo Ehlers Loureiro.

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a legume with an important role in human nutrition. Genetic improvement has developed new cultivars with changes in protein and lipid fractions of the grain, leading to the need of studies to evaluate the concentration of nutrients and biological value of these cultivars. This study assessed the centesimal composition, biological value, amino acid profile, and the nutritional quality of five cultivars of soybean alone and in combination with the corn (mixing flour). It was also performed the analysis of differential expression of proteins two-dimensional electrophoresis of the five cultivars of soybean used (CD 201, CD 2013 PTA, Monarca, CS 3033PTA e UFVTN105AP), apart from the cultivar BARC-8. The protein quality was evaluated in male Wistar rats, randomly distributed in 11 groups (n=6) during 14 days. The two tested groups received soybean-based diet whether or not mixed with corn flour treated at 150°C for 30 minutes. A controlled group received a nitrogen-free diet and other reference group received a casein-based diet. The weight gain (WG), feed intake (FI), the food efficiency ratio (FER), the protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR), true digestibility (TD) and protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) were assessed. The amino acid profile of soybean whole flour presented limiting for cystine and methionine only in the cultivar Monarca by the standard of FAO/WHO of nutritional recommendations. There wasn't difference between the animals food consumption, however, the values of the FER, PER, NPR, TD and the PDCAAS both animals fed with soybeans and mixture of soybean and corn was lower than the standard casein ($p>0,05$), indicating that the flours were not adequate to promote growth and the development of animals even when the score was properly calculated. Despite the genetic improvement has provided an increasing of the protein content, we cannot affirm that it provided a qualitative balance of the essential amino acids. Other factors such as the digestibility and bioavailability of the proteins may have interfered in the evaluation of protein quality. The differential analysis of the proteins in the soybeans by two-dimensional electrophoresis showed

between 650 and 1900 spots of which about 18 presented differences in their expression. The analysis of electrophoretic profiles showed that the gain of proteins changed mainly the expression of storage proteins and that the protein fraction in a high content soybean is not like in another of a normal content.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L). Merrill) é uma espécie da família das leguminosas originária da China, sendo considerada a cultura de maior importância econômica mundial, e um dos produtos agrícolas que sofreu maior expansão do seu cultivo no Brasil e no mundo. A combinação entre produtividade, alto teor protéico e outras características favoráveis à indústria de alimentos contribuiu para o aumento de produtos derivados da soja, utilizados tanto para ração animal quanto para a alimentação humana.

Apesar disso, a fração protéica encontrada no grão desta leguminosa não é considerada ideal por apresentar baixo teor dos aminoácidos metionina e lisina, além de conter fatores alergênicos e antinutricionais. Portanto, para o consumo por animais e humanos, a soja deve sofrer tratamento térmico, impedindo que os inibidores de proteases atuem no organismo e deve ser associada a outros alimentos que complementem seu valor nutricional, pois o seu consumo isolado e sem tratamento térmico pode levar a uma deficiência de aminoácidos na dieta.

Com base nestes dois aspectos da soja, existe uma busca constante de melhorias genéticas para diminuir os fatores que dificultam a digestão da proteína da soja e aumentem a aceitação dessa leguminosa pelo consumidor. Pesquisas vêm sendo feitas também no sentido de aumentar o conteúdo protéico da soja. Além da melhoria genética, a combinação de leguminosas e cereais pode possibilitar a elaboração de misturas de proteínas vegetais com valor nutricional comparável ao de proteínas de origem animal. Apesar da transição epidemiológica dos últimos anos, da desnutrição para a obesidade, ainda existe um grupo considerável de indivíduos vulneráveis à má alimentação, entre eles as crianças de baixa renda, os idosos e pacientes hospitalizados que representam um grupo de risco nutricional importante no que diz respeito à desnutrição protéica, dessa forma as modificações genéticas que estão sendo realizadas na soja com o intuito de aumentar o teor protéico desta leguminosa, vão ao encontro das necessidades desses grupos específicos da população.

Neste sentido, os novos cultivares desenvolvidos e as combinações de produtos realizadas devem ser analisados, tanto no que se refere ao teor de proteínas e sua expressão diferencial, quanto à sua digestibilidade e aceitação do produto, de forma a atender as necessidades do consumidor final.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

A soja (*Glycine max* (L). Merrill) é um dos alimentos básicos mais consumidos pela população de países como China e Japão. Nos países ocidentais, a soja vem sendo utilizada para a produção de alimentos industrializados, rações e óleo comestível (ANDERSON, WOLF, 1995; LIU, 1999; SINGH *et al.*, 2008). Os Estados Unidos produzem 38% da soja consumida no mundo, seguido pelo Brasil (25%), Argentina (19%), China (7%), Índia (3%), Canadá (2%) e Paraguai (2%), (SINGH *et al.*, 2008).

Devido às propriedades nutricionais e funcionais da soja, desde a década de 1960, a proteína de soja vem sendo utilizada como matéria prima em preparações para o consumidor (SINGH *et al.*, 2008). Dados de 1994 (TRAINA e BREENE, 1994), já apontam que mais de 95% da soja era utilizada na produção de óleo e de farelo para uso na alimentação animal. Apenas uma parte pequena da soja é processada e utilizada como parte de produtos industrializados consumidos pelo homem na forma de farinhas desengorduradas, flocos, concentrados e isolados.

Os principais constituintes da soja são a proteína e os lipídios, sendo que o grão de soja contém cerca de 40% de proteína e 20% de lipídios em peso seco. Além disso, é uma boa fonte de minerais e de vitaminas do complexo B. A soja contém, ainda, um pequeno número de componentes conhecidos como fatores antinutricionais. Estes incluem inibidores de proteases, lectinas, lipoxigenases, oligossacarídeos, fitatos, oxalato, saponinas, entre outros (PANIZZI e MANDARINO, 1994; MARTINO *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2008), que necessitam ser desativados para o seu consumo por animais e humanos. Carvalho *et al.* (2009) mostraram em seus estudos que a eliminação genética da lipoxigenase da semente de soja causou uma diminuição nos níveis de inibidor de tripsina nos grãos.

As proteínas da soja são alvo de intensa investigação e elas têm desempenhado um papel cada vez mais importante na alimentação humana ao longo das últimas décadas. Por anos as modificações utilizadas na indústria de alimentos, desenvolvidas e aplicadas para minimizar as características consideradas indesejáveis da soja, não têm gerado aumento significativo da aceitação que influenciem o consumo a ponto de garantir os efeitos benéficos associados a essa leguminosa (OBULESU e SWAMYLINGAPPA, 2006; MORAES, 2002; LIU, 1999; WANG, 1986). Além disso, muitas das substâncias responsáveis pelas características indesejáveis são também

responsáveis pelas propriedades da soja relacionadas à saúde, que a caracterizam como alimento funcional (MONTEIRO *et al.*, 2003).

As características funcionais da soja determinam o seu uso em diferentes tipos de alimentos. São importantes a sua solubilidade, viscosidade, capacidade de formar emulsão e de absorver água e gordura. Estas características são influenciadas pela densidade, tamanho das partículas, composição e estabilidade da farinha (TRAINA e BREENE, 1994; MONTEIRO *et al.*, 2003).

Tentativas de introdução da soja na alimentação humana na forma pura, transformada e/ou associada com outros ingredientes vêm sendo feitas há algum tempo. No setor de alimentos a base de soja, a linha de bebidas é a que mais cresce (BEBIDAS, 2006) acompanhando a tendência do mercado mundial na busca por saúde e praticidade (SOUZA, 2006). No entanto, novas melhorias ainda são necessárias para um maior aproveitamento das potencialidades dos alimentos formulados com soja e o entendimento a respeito de suas qualidades nutricionais.

2.2. Melhoramento Genético

O interesse mundial pelo cultivo da soja deve-se à excelente combinação que ela apresenta entre produtividade, conteúdo de óleo e conteúdo de proteína (WOBUS *et al.*, 2000). Portanto, o melhoramento genético da soja depende do entendimento dos fatores genéticos e fisiológicos que afetam tais caracteres.

Os programas de melhoramento de soja têm se concentrado no desenvolvimento de variedades mais produtivas. Mais recentemente, há também uma preocupação com características de qualidade, tais como conteúdo e composição do óleo e da proteína de reserva (GONÇALVES *et al.*, 2007). Para desenvolver variedades com melhores características de qualidade, o melhorista tem recorrido ao germoplasma, tanto ao adaptado quanto ao silvestre, buscando a variabilidade genética. Esses novos materiais e as linhagens derivadas precisam ser caracterizados sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e nutricional (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Neste sentido, ao longo do processo de melhoramento genético e nas etapas finais do mesmo, as análises nutricionais, bioquímicas e proteômicas são importantes para a verificação da avaliação do valor biológico, quantificação de proteínas específicas e a expressão protéica dos novos cultivares.

2.3. Avaliação da Qualidade Protéica

Fatores antinutricionais afetam negativamente a qualidade e a segurança dos alimentos. A presença de inibidores de tripsina e de outros inibidores de crescimento é geralmente acompanhada de pancreatite hipertrófica, hiperplasia e adenoma acinar em modelos animais. Embora o calor inative alguns inibidores, isso ocorre de forma incompleta. Por outro lado elevadas temperaturas também podem destruir a lisina e aminoácidos sulfurados, levando ao surgimento de reações de escurecimento (FRIEDMAN *et al.*, 1984). O tratamento térmico adequado aumenta a digestibilidade da proteína e melhora sua qualidade nutricional (SINGH *et al.*, 2008).

A elaboração de produtos expandidos por meio do processo de extrusão tem crescido desde a década de 80. Em geral, a extrusão resulta em gelatinização de amido, desnaturação de proteínas, formação de complexos entre amido e lipídio e entre proteína e lipídio (MERCIER *et al.*, 1980). Estas mudanças, segundo Chen *et al.* (1991), influenciam positivamente a aparência, aroma, sabor e textura dos produtos extrusados.

A soja é reconhecida como excelente fonte para melhorar o perfil de aminoácidos e aumentar conteúdos totais de proteína e de alguns minerais como P, Ca, K, Na, Mg, Fe e Cu quando adicionada a alimentos derivados do milho (ZOIA *et al.*, 1997; BORGES *et al.*, 1999). No entanto o valor biológico do milho é baixo, por isso alguns estudos tentam produzir o melhoramento genético da proteína do milho produzindo o milho de alta qualidade protéica (QPM), o qual combina a alta qualidade nutricional do gene opaco-2 (alta lisina e triptofano) com as características agronômicas do milho comercial (WILLIAMS *et al.*, 2009)

A mistura de milho e soja processada é bastante estudada por vários autores (LORENZ e JANSEN, 1980; GUZMAN *et al.*, 1989; FERNANDES *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2008). No entanto, há ainda poucos dados disponíveis sobre o valor biológico destas misturas e seu efeito no organismo.

2.4. Ensaio Biológico

A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais é normalmente conduzida por meio de ensaios biológicos. O desenvolvimento das ciências biológicas está intrinsecamente ligado ao estudo em modelos animais. A importância da pesquisa pré-clínica na medicina, utilizando tais modelos, pode ser constatada no paralelismo

existente entre o aumento deste tipo de abordagem e os avanços no conhecimento médico. Segundo Nicoll e Russell (1991), mais de 70% dos principais avanços biomédicos estão relacionados à experimentação com animais. Modelos experimentais animais são satisfatoriamente utilizados ao longo dos anos para avaliar a qualidade protéica de alimentos.

Ao longo dos anos várias características da soja têm sido relatadas. Segundo Singh *et al.* (2008) as proteínas da soja contêm todos os aminoácidos essenciais necessários para a alimentação humana promovendo o crescimento e manutenção no organismo. Sua digestibilidade é comparada à da carne, leite, peixe e ovo.

Trindade (2001) verificou que algumas fontes protéicas de origem vegetal, como a soja, têm valor biológico equivalente ao das fontes protéicas de origem animal de alta qualidade, como a proteína do ovo e a do leite, fornecendo, portanto, quantidade ideal de aminoácidos essenciais para o consumo.

Neste sentido, o consumo de soja poderia auxiliar no aporte protéico dos indivíduos favorecendo a retenção de nitrogênio. Segundo Yildiz (2010) e Waitzberg (2000), o balanço nitrogenado corresponde à diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e o valor excretado pela urina e fezes. Este valor pode ser positivo, negativo ou igual à zero, neste último caso representando o equilíbrio, sendo este um valor referencial para a evolução nutricional do paciente.

A associação de proteínas de diferentes fontes pode melhorar o perfil aminoacídico, fator fundamental para a mudança do quadro de balanço nitrogenado negativo, quando utilizamos proteínas complementares e de elevada digestibilidade. Como benefícios, obtemos uma melhora do estado geral de indivíduos desnutridos, conseqüentemente reduzindo o tempo de recuperação, bem como as complicações clínicas o que reverte em maior economia para o país com relação aos gastos com saúde pública (WHO, 205; WHO, 2003). Neste sentido, a combinação de soja com outras fontes de proteína representa um vasto campo de estudos para a verificação de sua qualidade protéica.

2.5. Uso de Farinhas Mistas Vegetais na Alimentação Humana

Nos últimos anos, com o aparecimento do interesse por uma vida mais saudável, uma das principais respostas ao apelo do consumidor foi a remoção e ou redução de ingredientes que, quando consumidos em excesso, podem ser prejudiciais, tais como gordura, açúcar e sal. Com isto surgiram movimentos populares que estimulam o

consumo de alimentos com “baixo teor de gordura”, “poucas calorias” e “baixo teor de açúcar”. Essas características representam importante fator nutricional em um produto, e podem estar associadas a características funcionais que acrescentam ainda uma alternativa para o consumidor melhorar a sua dieta (SINGH *et al.*, 2008). A soja apresenta propriedades funcionais e o uso de produtos derivados de soja tem aumentado devido aos efeitos benéficos deste produto que incluem diminuição do colesterol plasmático e prevenção do câncer, diabetes e obesidade, bem como proteção contra doenças do intestino e problemas renais (SINGH *et al.*, 2008).

A produção de farinhas compostas não é uma prática nova. A viabilidade técnica e econômica do uso de farinhas mistas em alimentos já foi demonstrada e empregada na indústria. No Brasil, alguns programas de produção de alimentos formulados (surgidos desde a década de 70 como a Soleina, Vitasoy, Sacy, Fortifex, Cerelina, concentrados proteicos de peixe e macarrão com soja (Silva, 1995)) têm surgido cuja preocupação é a de substituir a proteína de origem animal da dieta - ou reduzir a quantidade de sua fonte - por fontes de origem vegetal, uma vez que estas apresentam custos mais baixos e são mais saudáveis. Os derivados protéicos da soja e do milho podem ser usados na suplementação ou em substituição parcial da farinha de trigo, para a obtenção de produtos como pão, biscoito e macarrão (Guilherme e Jokl, 2005). No entanto, poucos dados sobre a composição protéica e valor biológico são disponíveis com relação a estes produtos.

Existem importantes aplicações das proteínas de soja combinadas com outros tipos de proteínas. A adição de proteínas de soja a farinhas mistas de cereais aumenta tanto a quantidade quanto a qualidade de aminoácidos destes produtos. Misturas terapêuticas de soja e milho pré-processadas são usadas na África para recuperação de crianças desnutridas, muitas vezes como o único suplemento oferecido a estas crianças, apresentando uma taxa de recuperação que varia de 25 a 95% com média de 65%. A grande variação destes valores é atribuída ao desperdício do uso pelas próprias famílias (MATILSKY *et al.*, 2009).

Com base em pesquisas nutricionais realizadas em todos os continentes, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2004; FAO, 2001) relatou que, embora em termos percentuais tenha havido decréscimo na incidência de desnutrição entre 1990 e 1999 e posteriormente em 200 e 2002, quando analisados em conjunto, os índices da prevalência da desnutrição são responsáveis por milhões de mortes no mundo todo. Entre os anos de 2000 e 2002, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estimou que 852 milhões de pessoas

apresentavam desnutrição, sendo 815 milhões em países em desenvolvimento. Dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde mostram que a desnutrição protéico calórica é responsável direta ou indiretamente por 54% das 10,8 milhões de mortes de crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2005). em números absolutos 623,7 milhões de pessoas nesses continentes ainda são acometidas por essa carência nutricional. A desnutrição, medida pelo retardo do crescimento infantil, alcança cerca de 10% das crianças brasileiras e se distribui no território nacional com intensas diferenças regionais (POF, 2010; MONTEIRO, 2003).

Monteiro *et al.* (2009) afirmam que em dez anos a desnutrição infantil poderia deixar de ser um problema de saúde pública no Brasil. A conquista desse resultado dependerá da manutenção das políticas econômicas e sociais que têm favorecido o aumento do poder aquisitivo dos mais pobres e de investimentos públicos que permitam completar a universalização do acesso da população brasileira aos serviços essenciais de educação, saúde e saneamento e, por consequência, a uma alimentação de melhor qualidade. Para isso, é primordial que se conheça os alimentos e seus efeitos no organismo, associando a ciência da Nutrição às demais ciências afins.

2.6. Eletroforese Bidimensional (2DE)

Dentre as ferramentas utilizadas na biologia molecular para análise das frações protéicas está a eletroforese bidimensional. Após a extração de proteínas por método químico, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) é utilizada para separar as proteínas de acordo com dois parâmetros independentes, o ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão e a massa molecular na segunda dimensão (O'FARRELL, 1975). As proteínas separadas por 2DE podem ser visualizadas por coloração com *Coomassie blue*, coloração por prata, corantes fluorescentes, detecção imunológica ou por radiomarcagem (LÓPEZ, 2007).

Segundo Candiano *et al.*(2004), a coloração do gel 2D utilizando o método com *Coomassie blue* apresenta sensibilidade suficiente para detectar 1 ng de uma dada proteína. Castro (2009) relata que a utilização de nitrato de prata para coloração de géis com proteínas de semente de soja não apresentaram bons resultados. A prata, apesar de ser mais sensível que o *Coomassie*, não apresenta repetitividade.

A capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa, e a possibilidade de comparação entre perfis protéicos de

diferentes amostras, destaca essa metodologia entre as principais ferramentas na análise proteômica. A separação e visualização de proteínas de um extrato bruto obtido de um tecido, organismo ou célula por 2DE seguida por sua análise em software e posteriormente espectrometria de massa é o método mais comum para análises proteômicas (SARMA *et al.*, 2008). A partir desse ponto, *spots* de proteínas específicas podem ser identificados em banco de dados ou separados e analisados por espectrometria de massas para a determinação de proteínas ou peptídeos de interesse em um determinado estudo.

2.7. Proteômica

O monitoramento das alterações nos níveis de proteínas é crucial para obter um panorama completo dos diferentes processos biológicos do organismo. Contudo, estas alterações não são consequência apenas de processos transcricionais, mas também traducionais e pós-traducionais, visto que muitos estudos demonstram discrepância entre os níveis de mRNA e conteúdo de proteínas em uma mesma célula (PICOLI, 2004).

O proteoma pode ser definido como o conjunto completo de proteínas expressas por um genoma em uma situação celular específica, incluindo o conjunto de todas as proteínas, isoformas e modificações pós-traducionais (HOOG e MANN, 2004; NEWTON *et al.*, 2004). O proteoma de uma célula, tecido ou organismo é composto por milhares de proteínas e apresenta, portanto, uma alta complexidade. A análise proteômica refere-se à avaliação sistemática desse proteoma, de forma a comparar a expressão protéica de células, tecidos ou organismos em distintos momentos fisiológicos (WILKINS *et al.*, 1995).

Os estudos proteômicos fornecem importantes informações para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas. Para isso, a proteômica faz uso de um conjunto de ferramentas e estratégias de bioquímica analítica, de modo a auxiliar os estudos do genoma funcional (PANDEY e MANN, 2000).

Para o estudo da proteômica são necessárias ferramentas, métodos e equipamentos específicos, como a extração protéica, construção de géis bidimensionais ou por HPLC (*High performance liquid chromatography*) para visualização e separação de proteínas e o espectrômetro de massas para análise das proteínas de interesse.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a qualidade biológica e protéica de cinco diferentes cultivares de soja, que fazem parte do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) por meio de ensaio biológico e determinação do perfil protéico dos cultivares.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar biologicamente os cultivares de soja, sendo dois cultivares com teor normal de proteínas e três com alto teor de proteína;
- 2) Avaliar a qualidade nutricional de uma farinha mista de soja e milho comparado à caseína;
- 3) Comparar os proteomas de cultivares normais de soja com aqueles de alto teor de proteína por eletroforese bidimensional;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal - Plantio e Coleta

Os cultivares de soja utilizados neste estudo (CD 201, CD 2013 PTA, Monarca, CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP - cultivar isento de lipoxigenase) foram disponibilizados pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV e foram multiplicados na área experimental da COOPADAP (Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba) em São Gotardo – MG no ano agrícola 2008/2009. O cultivar CD 201 foi desenvolvido pela COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola) e o cultivar Monarca foi desenvolvido pela COOPADAP. A isolinha com alto teor de proteínas CD 2013 PTA foi derivada do cultivar CD 201 por meio de retrocruzamentos, tendo como genitor doador para alto teor de proteína o genótipo BR 8014887. As isolinhas com alto teor de proteínas CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP foram derivadas do cultivar Monarca por meio de retrocruzamentos, tendo como genitor doador para alto teor de proteína o genótipo BARC-8. Ambos os doadores para alto teor de proteínas possuíam mais de 45% de proteína.

Inicialmente, os genótipos foram plantados em fileiras individuais, as quais foram colhidas separadamente. Aproximadamente 15 fileiras de cada cultivar foram colhidas e armazenadas em pacotes, perfazendo um total de 87 pacotes, contendo cerca de 350g de grãos cada. Estes foram limpos, pesados e analisados inicialmente para teor de proteína pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976) e posteriormente pela quantificação do nitrogênio total, utilizando o destilador semimicro *Kjeldahl*, de acordo com o método AOAC (AOAC, 1996). Após esta etapa, foram selecionados para cada cultivar os pacotes contendo a maior concentração protéica até perfazer um total de 1 kg de grãos por genótipo. Em seguida, para cada cultivar, os grãos foram misturados, foi retirada uma alíquota, que foi moída em um moinho de faca. A farinha obtida foi passada em peneira de 60 *mesh* (0,25mm) e o pó resultante foi usado para a determinação da composição centesimal dos grãos.

Os grãos de milho utilizados, Variedade QPM BR (Qualidade Protéica Melhorada) foram disponibilizados pela Embrapa Milho-Sorgo de Sete Lagoas – MG. A variedade QPM BR desenvolvida por um programa de melhoramento da EMBRAPA para otimizar a qualidade protéica do milho, têm a aparência e o sabor similares ao milho comum, mas com conteúdos dos aminoácidos lisina e triptofano cerca de 50% maiores que o milho normal.

4.2. Composição Centesimal dos Grãos

Para a realização das análises biológicas foi necessário fazer a quantificação centesimal e determinar o valor calórico dos grãos. Para tanto, foram determinados: umidade, conteúdo de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas.

A umidade foi determinada por dessecação, até o peso constante, em estufa (Marconi®, modelo MA 035) a 105 °C (AOAC, 1996).

O conteúdo de proteína foi determinado com base na quantificação do nitrogênio total (nitrogênio inorgânico e orgânico) utilizando o destilador semi-micro *Kjeldahl*, de acordo com o método AOAC (1996). O conteúdo de proteína foi obtido utilizando-se o fator de correção de 6,25.

Para a determinação de lipídios, foi utilizado o método de extração em aparelho extrator de *Soxhlet*, empregando éter de petróleo como solvente, conforme descrito pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (PREGNOLATTO e PREGNOLATTO, 1985).

O teor de carboidratos foi estimado por diferença em relação à soma dos teores

de proteínas, lipídios, cinzas e umidade (AOAC, 1996). Este procedimento está previsto pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003).

A análise de cinzas foi determinada por incineração em mufla a 550°C, conforme a metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (PREGNOLATTO e PREGNOLATTO, 1985).

O conteúdo calórico da farinha integral de soja e da farinha integral de milho foi calculado de acordo com a composição do alimento em proteínas, lipídios e carboidratos, sendo utilizados os fatores de conversão 4,0; 9,0 e 4,0 Kcal/g dos macronutrientes, respectivamente.

4.3. Aminograma dos Grãos

Determinação e Quantificação dos Aminoácidos

Para uma análise mais aprofundada da qualidade protéica, o uso de PDCAAS (escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína) (YLDIZ, 2010; FAO, 1991) exige a determinação quantitativa e qualitativa dos aminoácidos das proteínas totais dos grãos. Esta análise foi realizada por cromatografia de troca iônica com derivação pós-cromatográfica com ninidrina (MOORE *et al.*, 1958; SPACKMAN *et al.*, 1963; LUCAS e SOTELO, 1980). A análise foi realizada em um analisador automatizado (ALONZO e HIRS, 1968) do Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

4.4. Desenvolvimento da Farinha Mista

Inicialmente, os grãos de soja e de milho foram limpos manualmente (catação) e lavados em água corrente, em seguida, secos à temperatura ambiente por 24 horas. Logo após, os grãos de soja foram submetidos a calor seco de 150 °C por 30 min, com base nos estudos de Andrade *et al.* (2010), para inativar os fatores antinutricionais. Posteriormente, todos os tipos de cultivares em separados foram moídos em um moinho de faca e passados em peneira de 60 *mesh* (0,25mm), embalados e mantidos a -20 °C até o momento da preparação da ração animal. O percentual de soja na composição do produto destinado aos animais foi de 30%, de acordo com o perfil aminoacídico determinado para a soja e para o milho para se chegar a um escore químico no mínimo igual a um.

4.5. Composição Centesimal da Farinha Mista de Soja e Milho

A determinação dos teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos da soja e do milho foram realizados segundo o método da AOAC (1996).

A composição de proteínas, carboidratos e lipídios da nova formulação foi analisada, baseando-se nos dados da composição dos respectivos alimentos produzidos nas etapas anteriores de caracterização da soja e do milho. A proporção de soja e milho foi decidida tendo em vista a proporção de 70% de milho e 30% de soja na mistura, com base em análise do escore químico dos aminoácidos, buscando uma complementaridade e um valor de escore no mínimo igual a um.

4.6. Avaliação da qualidade protéica

A avaliação da qualidade protéica dos cultivares de soja e milho, e da mistura soja-milho foi realizada no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A avaliação das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaios biológicos, durante 14 dias, utilizando-se 98 ratos machos da raça *Wistar (Rattus norvegicus* var. *Albinus*, Rodentia), recém-desmamados, com 28 dias de idade.

4.7. Dietas experimentais

A composição das dietas experimentais foi padronizada segundo a formulação do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993), modificada de modo a fornecer 9,5% de proteína, exceto para a dieta livre de nitrogênio (aprotéica). O teor de proteína das farinhas de soja, da mistura soja-milho e das dietas experimentais foi determinado em triplicata após as dietas serem formuladas, pelo método semi-micro *Kjeldahl* (AOAC, 1996), multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25, para garantir que todas as dietas tivessem o mesmo teor de proteína, variando apenas sua fonte.

O grupo de referência recebeu uma dieta padrão AIN-93G modificada para 9,5% de proteína contendo como fonte protéica a caseína (CAS) e o grupo controle recebeu uma dieta livre de nitrogênio (LN). Os grupos testes são descritos a seguir: cinco grupos, cada um recebendo farinha de soja de um dos cinco tipos diferentes de cultivares de soja, um grupo recebendo milho como fonte protéica e cinco grupos

recebendo farinha de soja de um dos cinco tipos de cultivares mais milho na proporção de 30:70, que foi estabelecido a partir dos resultados do aminograma. Foram então realizados dois blocos de experimentos sendo o Grupo Teste 1 composto pelas dietas à base de soja e o Grupo Teste 2 composto pela mistura de soja e milho e o milho isolado, perfazendo o total de 11 tratamentos como resumido a seguir:

Grupo teste 1

LN = dieta livre de nitrogênio (aprotéica – grupo controle);

CAS = dieta à base de caseína (grupo referência);

T1 = dieta à base de farinha de soja CD 201;

T2 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA;

T3 = dieta à base de farinha de soja Monarca;

T4 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA;

T5 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP;

Grupo Teste 2

LN = dieta livre de nitrogênio (aprotéica – grupo controle);

CAS = dieta à base de caseína (grupo referência);

T6 = dieta à base de farinha de soja CD 201 + farinha de milho integral (30/70);

T7 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA + farinha de milho integral (30/70);

T8 = dieta à base de farinha de soja Monarca + farinha de milho integral (30/70);

T9 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA + farinha de milho integral (30/70);

T10 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP+ farinha de milho integral (30/70);

T11 = dieta à base de farinha de milho integral.

4.8. Delineamento Experimental

A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaios biológicos com ratos machos, da raça *Wistar (Rattus norvegicus* var. *Albinus*, Rodentia), recém-desmamados, com 28 dias de idade, e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Noventa e seis animais, em delineamento inteiramente casualizado, foram divididos em onze grupos de seis cada e ajustados por peso, de modo que a variação média dos pesos entre os grupos fosse a menor possível.

Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais, em ambiente de temperatura controlada a $22 \pm 3^\circ \text{C}$ e ciclo de claro e escuro de 12 horas, por 14 dias, durante os quais os animais receberam água destilada e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum* nos dias programados sempre no mesmo horário pela manhã.

O consumo alimentar (CA) e o ganho peso (GP) dos animais foram monitorados semanalmente, durante o período experimental. Foram determinados os seguintes índices de qualidade protéica: coeficiente de eficiência alimentar (CEA), coeficiente de eficácia protéica (PER); razão protéica líquida (NPR), digestibilidade verdadeira (DV) e escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) que foram calculados segundo Sgarbieri (1996).

O CEA foi calculado por meio da equação:

$$\text{CEA} = \frac{\text{Ganho de massa (g)}}{\text{Consumo alimentar (g)}}$$

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com indigocarmin, na proporção de 200 mg.100 g⁻¹ de dieta, e foram oferecidas aos animais no 8º e 11º dias de ensaio. Para a avaliação da digestibilidade protéica, no 8º dia do experimento, as dietas normais foram retiradas e substituídas por dieta marcada. No 9º dia, as dietas marcadas foram retiradas e substituídas por dietas normais, sendo coletadas somente as fezes marcadas de todos os animais. Todas as fezes (marcadas e não marcadas) foram coletadas no 10º dia do experimento. No 11º dia a dieta normal foi substituída novamente por dieta marcada e no 12º dia foram coletadas somente as fezes não marcadas de todos os animais.

As fezes coletadas do 9º ao 12º dia do experimento foram acondicionadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, foram secas em estufa com circulação de ar (MA 035 Marconi Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) a 105°C, durante 24 horas. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e moídas em mini processador (Arno, PRC, São Paulo, Brasil) para a determinação em triplicata do teor de nitrogênio pelo método semi-micro *Kjeldahl* (AOAC, 1996). O teor de nitrogênio das fezes dos grupos experimentais foi utilizado para o cálculo da digestibilidade verdadeira.

O cálculo foi feito de acordo com a seguinte fórmula (YILDIZ, 2010):

$$D = \frac{I - (F - FK)}{I \times 100}$$

Onde:

- D = digestibilidade;
I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;
F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste;
FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Ao final do período experimental também foram determinados o Quociente de Eficiência Protéica (PER), a Razão Protéica Líquida (NPR) (YILDIZ, 2010; FAO, 1991).

O PER foi determinado considerando-se o ganho de peso do grupo-teste em relação ao consumo de proteína do grupo-teste:

$$PER = \frac{\text{Ganho de massa (g) do grupo teste}}{\text{Proteína consumida (g) pelo grupo teste}}$$

O NPR foi determinado no 14º dia do experimento, considerando o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo livre de nitrogênio, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, segundo o método de Bender e Doell (1957).

$$NPR = \frac{\text{Ganho de massa ajustado (g) do grupo teste}}{\text{Proteína consumida (g) pelo grupo teste}}$$

O ganho de peso ajustado foi obtido somando-se ao ganho de peso de cada animal, a perda de peso média dos ratos que receberam a ração isenta de proteína e o consumo de proteína foi obtido por intermédio do teor de proteína da dieta multiplicado pelo consumo total de ração de cada animal.

4.9. Determinação do Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS)

A partir da determinação e quantificação do perfil de aminoácidos foi determinado o escore de aminoácidos. A proteína de referência utilizada foi baseada na

necessidade de aminoácidos para crianças de 2 a 5 anos, conforme *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2007):

$$\text{Escore de Aminoácido} = \frac{\text{mg de aminoácido essencial por g da proteína-teste}}{\text{mg de aminoácido essencial por g da proteína de referência}}$$

Em seguida, foi calculado o PDCAAS, conforme FAO (1991):

$$\text{PDCAAS} = \text{Primeiro limitante} \times \text{digestibilidade verdadeira}$$

Calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade verdadeira da proteína. Assumiu-se que a proteína cujo PDCAAS fosse igual ou superior a 1,0 seria considerada de boa qualidade (YILDIZ, 2010; HENLEY e KUSTER, 1994).

4.10. Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada em três etapas:

- 1 - Extração protéica e quantificação da proteína total;
- 2 - Eletroforese bidimensional;
- 3 - Comparação da expressão protéica dos diferentes genótipos de soja.

4.11. Extração Protéica

Inicialmente, a extração de proteínas dos cinco cultivares de grãos de soja foi realizada em triplicata, com base em protocolo proposto por Wang *et al.* (2003) com pequenas alterações:

O material vegetal, aproximadamente 5g de grãos, foi pulverizado em nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo. Em seguida, foram acrescentados 15 mL de uma solução contendo PVPP (*polyvinylpolypyrrolidone*) 1%, beta-mercaptoetanol 2%, PMSF (*phenylmethylsulphonylfluoride*) 1mM e acetona gelada. A mistura foi agitada e sonicada à potência de 30% da potência máxima do aparelho *Ultra Sonic Processor* (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB), centrifugada a 6.000 g, a 4°C, por 15 minutos.

Na sequência, o precipitado (*pellet*) foi lavado sucessivamente em acetona, TCA

10% (ácido tricloroacético) em acetona, TCA 10% em água, acetona 80% e etanol 80%. As lavagens foram seguidas por centrifugação a 6.000 g, a 4°C, por 10 minutos. Ao final do processo, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e armazenado a -80° C.

Com o intuito de promover a lise celular, em uma segunda etapa, foi adicionado á amostra 10 mL do tampão SDS (sulfato de dodecil sódio) denso (sacarose 30%; SDS 2%; Tris-HCl 0,1M, pH 8,0; mercaptoetanol 2%; PMSF 1mM) foram acrescentados ao pó obtido anteriormente (100 a 300 mg) e a mistura foi agitada. Em seguida, foram adicionados 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 e após agitação a mistura foi centrifugada a 6.000 g, a 4 °C, por 10 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso pela adição de 20 mL de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado e a mistura foi centrifugada a 6.000 g, a 4°C, por 30 minutos. Em seguida, o precipitado foi lavado na seguinte sequência: acetato de amônio 0,1 M em metanol, acetona 80%, etanol 70%. Todas as lavagens foram seguidas de centrifugação a 6.000 g, a 4°C, por 15 minutos. Finalmente, o precipitado foi seco à temperatura ambiente, solubilizado em um tampão contendo uréia 7M, tiouréia 2M e CHAPS 4% (*3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*). Para completar a solubilização das amostras, elas foram submetidas ao processo de ultrasonicação a 10% da potência máxima do aparelho *Ultra Sonic Processor* (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB), e posteriormente armazenadas a -80 °C até o momento da quantificação.

4.12. Quantificação da Proteína Total do Extrato Protéico

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo Método de *Bradford* (BRADFORD, 1976). As amostras foram posteriormente armazenadas a -20°C.

4.13. Eletroforese Bidimensional (2DE) do Extrato Protéico

Para a primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF) foram usadas fitas (contendo imobilinas) de 24 cm e pH 3-10 (*GE Healthcare*) reidratadas por 14-20 horas em 450 µL de solução de reidratação (uréia 7M, tiuréia 2M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0,002%, tampão IPG 2%, DTT 2 %). As amostras (com 120 µg de proteínas solubilizadas) foram aplicadas nas canaletas do aparato de reidratação da GE (*reswellingtray*). A IEF foi realizada no equipamento *IPGphor III* (*GE Healthcare*) a 20°C, e as condições elétricas foram: 1 hora a 200 V, 1 hora a 500 V, 1 hora a 800 V, 2:30 horas a 11300 V, 1:30 horas a 12000 V.

A separação das proteínas de soja por eletroforese 2D utilizando uma faixa ampla

de gradiente de pH (3 a 10) possibilita uma visualização de um maior conjunto de proteínas contida nas sementes, além disso, é possível identificar as regiões com as proteínas predominantes. A estabilidade das tiras utilizadas na primeira dimensão nos possibilita focalizar tanto as proteínas ácidas como as básicas em um mesmo gel quando se utiliza este tipo de faixa (LÓPEZ, 2007). A utilização deste gradiente de pH apresenta uma adequada resolução e é eficiente quanto a reprodutibilidade nos resultados, possibilitando uma boa comparação analítica entre as diferentes amostras de soja estudadas.

A segunda dimensão foi desenvolvida em gel de poliacrilamida 12,5%, de acordo com os procedimentos de Angelika (2004). Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas por 15 min em 10 mL de solução de equilíbrio (uréia 6M, 30% glicerol, 2% SDS, azul de bromofenol 0,002%, Tris-HCl 50mM, pH 8.8) contendo DTT 100 mM e iodoacetamida 250 mM. A separação da segunda dimensão foi realizada no *Protean Daltsix (GE Healthcare)* com espaçadores de 1,5mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As condições da eletroforese foram de 30 min a 15 mA/gel, 6 h a 30mA/gel. A revelação dos géis foi realizada segundo Neuhoff *et al.* (1983). Os géis foram corados pela adição de azul de Coomassie G-250 coloidal 0,02% por 72 h, fixados três vezes em solução contendo ácido fosfórico 2% e etanol 30% por 30 min cada fixação. Em seguida, os géis foram enxaguados três vezes em ácido fosfórico 2% por 20 minutos cada enxague e incubados em solução contendo etanol 18%, sulfato de amônio 15% e ácido fosfórico 2% por 30 minutos. Finalmente, foram mantidos em solução de ácido acético 5% até a digitalização.

4.14. Comparação da Expressão Protéica de Diferentes Linhagens

As imagens dos géis corados foram digitalizadas utilizando um scanner de transdução-reflexão e calibradas com o programa *Labscan (GE-Healthcare)*. As análises de imagem foram realizadas no *Image Master 2D Platinum (GE-Healthcare)*, sendo realizadas comparando os cultivares Monarca e BARC-8 (géis de referência) dos dois grupos com os diferentes cultivares melhorados. O cultivar Monarca serviu como referência para a análise dos cultivares CD 201 e CD 2013 PTA, e o cultivar BARC-8 serviu como referência para a análise dos cultivares CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP

A abundância relativa de cada *spot* dentro de um mesmo cultivar foi determinado através da média da abundância relativa de triplicatas biológica. A detecção dos *spots* e comparação entre os géis foram realizadas no programa *Image*

Master 2D Platinum. Os *spots* foram identificados de acordo o peso molecular e o ponto isoelétrico e de acordo com os parâmetros de *Smooth* (valor =1); *saliency* (valor =100) e *minime área* (valor = 20). Estes valores foram programados para que esta detecção pudesse identificar o número máximo de *spots* protéicos, sem, no entanto comprometer a sensibilidade e a especificidade do processo de detecção.

Os *spots* detectados nos géis 2D foram submetidos a uma sobreposição dos mapas protéicos com o objetivo de identificar os *spots* comuns entre os três cultivares dentro dos dois blocos estudados (*matching*). Deste modo, foi realizado o *matching* dos *spots* entre os géis de referência das amostras de soja marcadas como referência e as respectivas linhagens melhoradas.

Após esta etapa foi realizada uma edição manual, que visa à correção, adição e remoção de alguns *spots* que o programa não conseguiu marcar de forma eficiente ou ficaram agrupados como um só *spot*.

Nas análises foram considerados *spots* diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais em pelo menos três géis.

4.15. Análise Estatística

A análise estatística das determinações químicas e dos dados dos ensaios biológicos, bem como da expressão diferencial dos géis 2D foi realizada por análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAEG-UFV 9.1 para análises de dados paramétricos. Para “P” significativo, utilizou-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação entre médias (VIEIRA e HOFFMANN, 1989).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos cultivares de soja para amostra

A determinação do conteúdo de proteínas dos grãos colhidos de fileiras individuais de plantas de cada um dos cinco genótipos de soja permitiu a identificação de grãos com elevado conteúdo protéico (Tabela 1). Considerando cada genótipo, grãos provenientes das fileiras com maiores conteúdos de proteína foram misturados para obter 1 kg para cada genótipo, os quais foram avaliados quanto à sua composição centesimal (Tabela 2).

Tabela 1. Determinação de proteína (%) em grãos colhidos de fileiras individuais de plantas de soja e armazenados em pacotes

Cultivar	Nº de pacotes	Peso total kg	% Ptn Total	DP	Nº de fileiras	% Ptn 1 kg	DP
CD 201	12	3,009	40,94 ^a	3,13	5	38,55 ^c	2,51
CD 20133PTA	29	10,279	42,07 ^a	1,37	4	43,76 ^a	0,35
Monarca	15	6,203	41,22 ^a	0,80	3	40,24 ^{bc}	0,12
CS 3033PTA	15	5,217	44,61 ^a	1,30	4	45,97 ^a	0,61
UFVTN105AP	16	6,577	42,05 ^a	1,00	3	43,31 ^{ab}	0,00
TOTAL	87				19		

As médias, dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ptn - Proteína

DP – Desvio Padrão

Pode-se perceber pela Tabela 1, que inicialmente os cultivares de soja com alto teor protéico não se diferenciam dos demais. Kumar *et al.* (2006) demonstraram que um dos fatores que pode afetar negativamente a quantidade protéica da soja é a latitude e o índice pluviométrico durante o período de crescimento da planta. Vários fatores climáticos podem influenciar sobre a composição física e química de sementes de soja entre eles o foto período, o estresse hídrico e altas temperaturas durante o desenvolvimento da semente (PIPER e BOOTE, 1999). Este fato foi o que justificou a seleção das fileiras de plantas armazenadas em pacotes com maior teor de proteínas. Portanto, entre os 87 pacotes de plantas, 19 foram selecionadas de forma a aumentar as chances de detecção de expressão diferencial pela análise proteômica.

5.2. Quantificação Centesimal

Após a seleção dos grãos com elevado teor protéico, foi realizada a sua quantificação centesimal (Tabela 2) para subsidiar a produção da ração oferecida aos ratos e a sua avaliação biológica.

A Tabela 2 apresenta o resumo da composição química centesimal das farinhas de soja integrais utilizadas neste trabalho. Pode ser observado que o teor de proteína da soja variou de 39% a 44%, lipídios de 18% a 20%, umidade de 5% a 7%, cinzas de 4% a 5% e carboidratos de 25% a 30%. Esses valores são típicos de farinhas integrais de soja e estão de acordo com os valores médios encontrados por Monteiro *et al.* (2004) para farinha de soja com teor de proteína menor ou igual a 45%. O trabalho de Yamada *et al.* (2003) mostra que a soja cultivada no Brasil apresenta conteúdo de proteína variando de 29,2 a 57,9% e de lipídios de 14,7 a 28,4%, dependendo da variedade cultivada.

Tabela 2. Composição química centesimal das farinhas de soja e milho integrais (g/100g).

Farinha integral (g.100g ⁻¹)	Umidade	Calorias	Carboidratos*	Proteínas	Lipídios	Cinzas
CD 201	5,41	460,05	30,02	39,43	20,25	4,89
CD 20133PTA	7,60	445,05	25,38	43,38	18,89	4,75
Monarca	5,98	456,86	27,94	41,77	19,78	4,53
CS 3033PTA	5,04	452,13	27,44	44,47	18,28	4,77
UFVTN105AP	5,62	449,15	26,60	44,31	18,39	5,08
Milho Embrapa	12,32	366,31	72,37	9,78	4,19	1,34

*Inclui a fração da fibra alimentar.

5.3. Aminograma dos Grãos e Determinação do Escore Químico

Para obter uma mistura entre cereais e leguminosas com elevada qualidade protéica, foi necessário determinar os aminograma de cada cultivar e calcular o escore dos aminoácidos essenciais, como mostrado nas Tabelas 3 e 4. O valor de uma determinada proteína para a nutrição depende da sua composição aminoacídica. Daí a importância de determinar a qualidade das proteínas que comumente integram os alimentos. O valor biológico de uma proteína não é afetado, se ela for deficiente num aminoácido não essencial. A caseína, por exemplo, que é a principal proteína do leite, apresenta um baixo teor de glicina que, dentre os aminoácidos indispensável, é o de estrutura mais simples, podendo ser sintetizado no organismo animal, não afetando o valor biológico dessa proteína. No entanto, a deficiência de aminoácidos essenciais leva

a uma baixa qualidade protéica (YILDIZ, 2010).

Observou-se que os teores de aminoácidos das cinco farinhas integrais estudadas neste trabalho praticamente não diferem entre si. Isso indica que a maior concentração de proteína de alguns cultivares não favoreceu especificamente a expressão de um determinado tipo de proteína em detrimento de outro. Além disso, a retirada da lipoxigenase parece não ter alterado a composição aminoacídica do cultivar UFVTN 105AP.

Na Tabela 3, é possível verificar que quando comparados com a proteína de referência da FAO (2007), apenas a Monarca apresenta cistina + metionina como aminoácidos limitantes e na Tabela 4, que o milho apresenta a isoleucina como aminoácido limitante em sua composição (valores sublinhados). No entanto, na mistura contendo 30% de soja e 70% de milho, todos estes valores são corrigidos, gerando um escore químico no mínimo igual a 1 (um), o que corresponde, teoricamente, a uma proteína de alto valor biológico, como verificado na Tabela 5.

Tabela 3. Composição aminoacídica (mg) dos cultivares de soja Monarca, CD 201 e CD 2013 PTA (Grupo 1) e o valor de escore dos aminoácidos essenciais segundo o padrão FAO/OMS para crianças de 2-5 anos (2007).

Aminoácido mg	Criança 2-5 anos	Soja CD 201	Soja CD 2013 PTA	Soja Monarca	Soja CD 2013 PTA	Soja Monarca	Soja CD 2013 PTA
Ácido Aspártico		111,86		109,94		109,69	
Treonina	27,00	49,78	1,84	47,05	1,74	49,71	1,84
Serina		55,44		57,75		53,36	
Ácido Glutâmico		168,87		164,14		167,86	
Prolina		53,35		51,21		36,36	
Glicina		40,19		39,33		39,18	
Alanina		44,83		43,45		42,89	
Cistina ^a	26,00 ^a	15,09	1,14 ^a	14,86	1,16 ^a	13,17	0,99 ^a
Metionina		14,45		15,28		12,61	
Valina	42,00	48,52	1,16	44,63	1,06	52,50	1,25
Isoleucina	31,00	41,32	1,33	39,94	1,29	45,81	1,48
Leucina	63,00	76,30	1,21	73,25	1,16	74,29	1,18
Tirosina ^b	46,00 ^b	39,82	2,23 ^b	37,80	2,17 ^b	40,53	2,21 ^b
Fenilalanina		62,69		61,81		61,21	
Histidina	18,00	33,24	1,85	31,96	1,78	31,82	1,77
Lisina	52,00	70,98	1,36	69,55	1,34	66,21	1,27
Arginina		90,90		86,32		88,00	
Triptofano	7,40	14,57	1,97	11,77	1,59	14,70	1,99

^a Cistina + Metionina

^b Tirosina + Fenilalanina

Tabela 4. Composição aminoacídica (mg) dos cultivares de soja CS303 e UFVTN105 e de milho QPM (Grupo 2) e os valores de escore dos aminoácidos essenciais segundo o padrão FAO/OMS para crianças de 2-5 anos (2007).

Aminoácido mg	Criança	Soja CS303		Soja UFVTN 105		Milho	
	2-5 anos	APTN	Escore	AP	Escore	QPM	Escore
Ácido Aspártico		106,54		104,98		88,04	
Treonina	27,00	48,75	1,81	44,67	1,65	49,33	1,83
Serina		51,97		52,47		51,87	
Ác. Glutâmico		159,55		151,35		169,37	
Prolina		55,12		49,19		58,34	
Glicina		39,23		37,43		51,44	
Alanina		42,44		40,99		63,92	
Cistina ^a	26,00 ^a	13,42	1,08 ^a	14,44	1,11 ^a	23,62	1,46 ^a
Metionina		14,69		14,54		14,29	
Valina	42,00	52,08	1,24	52,62	1,25	55,71	1,33
Isoleucina	31,00	45,17	1,46	52,18	1,68	27,11	0,87
Leucina	63,00	72,65	1,15	71,12	1,13	84,97	1,35
Tirosina ^b	46,00 ^b	41,42	2,23 ^b	45,56	2,38 ^b	33,09	1,76 ^b
Fenilalanina		60,98		63,79		47,65	
Histidina	18,00	31,97	1,78	36,41	2,02	43,19	2,40
Lisina	52,00	64,58	1,24	65,42	1,26	52,09	1,00
Arginina		87,01		92,09		74,08	
Triptofano	7,40	12,62	1,70	9,29	1,25	11,94	1,61

^a Cistina + Metionina

^b Tirosina + Fenilalanina

Tabela 5. Composição aminoacídica (mg) e escore dos aminoácidos essenciais das cinco farinhas mistas dos cultivares de soja e de milho (Grupo 2) na proporção de 30/70 (soja/milho) segundo o padrão FAO/OMS (2007).

mg	Fenilalanina /tirosina	Histidina	Isoleucina	Leucina	Lisina	Metionina /cistina	Treonina	Triptofano	Valina	% Proteína
FAO 2007	46,00	18,00	31,00	63,00	52,00	26,00	27,00	7,40	42,00	
T6	87,27	46,23	31,37	82,37	57,76	35,40	49,46	12,73	53,55	18,68
Escore	1,90	2,23	1,01	1,31	1,11	1,36	1,83	1,72	1,27	
T7	86,40	39,82	30,95	81,45	57,33	33,63	48,64	11,89	52,38	19,86
Escore	1,88	2,21	1,00	1,29	1,10	1,29	1,80	1,61	1,25	
T8	87,04	39,78	32,72	81,76	56,32	34,31	49,44	12,77	54,74	19,38
Escore	1,89	2,21	1,06	1,30	1,08	1,32	1,83	1,73	1,30	
T9	87,23	39,82	32,52	81,27	55,84	34,97	49,15	12,14	54,62	20,19
Escore	1,90	2,21	1,05	1,29	1,07	1,34	1,82	1,64	1,30	
T10	89,77	42,89	34,63	80,82	56,09	35,23	47,93	11,14	54,78	20,14
Escore	1,95	2,38	1,12	1,28	1,08	1,35	1,78	1,51	1,30	

T6 = dieta à base de (30%) farinha de soja CD 201 + (70%) farinha de milho integral;

T7 = dieta à base de (30%) farinha de soja CD 2013 PTA + (70%) farinha de milho integral;

T8 = dieta à base de (30%) farinha de soja Monarca + (70%) farinha de milho integral;

T9 = dieta à base de (30%) farinha de soja CS 3033PTA + (70%) farinha de milho integral;

T10 = dieta à base de (30%) farinha de soja UFVTN105AP + (70%) farinha de milho integral.

Os resultados demonstraram, que os aminoácidos com mais baixa concentração para as farinhas de soja analisadas foram cisteína + metionina, como seria esperado. Blanco e Bressani (1991) citam que proteínas de leguminosas têm como fator limitante o teor de aminoácidos sulfurados. O fato das farinhas de soja do presente trabalho não apresentarem esta característica exceto pela Soja CD 2013 PTA que apresenta estes aminoácidos como limitantes, pode nos indicar que o melhoramento genético modificou a composição protéica destas linhagens. Onyango *et al.* (2004) verificaram que a lisina é, geralmente, o aminoácido limitante da proteína de milho, o que difere no caso do milho fornecido pela EMBRAPA, que também sofreu melhoramento genético, podendo ser esta uma das causas de mudanças do perfil aminoacídico da variedade estudada.

5.4. Composição das dietas experimentais

Tabela 6. Composição das dietas (g) de caseína (CAS), livre de nitrogênio (LN) e dietas experimentais T1, T2, T3, T4 e T5 (g/kg) de soja (Grupo 1).

Ingredientes (g)	CAS-1	LN-1	T1	T2	T3	T4	T5
Amido de Milho	50,69	59,75	42,59	44,11	44,36	44,79	44,75
Fonte Protéica	9,06	0,00	20,46	18,44	19,05	17,96	18,00
Amido Dextrinizado	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de Soja	7,00	7,00	3,70	4,20	3,34	4,00	4,00
Fibra	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Mix Mineral	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mix Vitamina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

LN-1 = dieta livre de nitrogênio (controle);
CAS-2 = dieta à base de caseína (referência);
T1 =dieta à base de farinha de soja CD 201;
T2 =dieta á base de farinha de soja CD 2013 PTA;
T3 =dieta à base de farinha de soja Monarca;
T4 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA;
T5 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP;

Tabela 7. Composição das dietas de caseína (CAS), livre de nitrogênio (LN) e dietas experimentais T6, T7, T8, T9, T10 (g/kg) de farinha de soja e milho e da dieta experimental T11 de milho (Grupo 2).

Ingredientes	CAS-2	LN-2	T6	T7	T8	T9	T10	T11
Amido de Milho	50,01	59,75	22,16	24,50	23,56	24,91	24,89	0,00
Fonte Protéica	9,74	0,00	45,50	42,45	43,70	41,85	41,90	89,50
Amido Dextrinizado	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	0,00
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	1,51
Óleo de Soja	7,00	7,00	3,30	3,73	3,53	3,86	3,84	3,94
Fibra	5,00	5,00	0,79	1,07	0,96	1,13	1,12	0,00
Mix Mineral	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mix Vitamina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

LN-2 = dieta livre de nitrogênio (aprotéica – grupo controle);

CAS-2 = dieta à base de caseína (grupo referência);

T6 = dieta à base de farinha de soja CD 201 + farinha de milho integral (30/70);

T7 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA + farinha de milho integral (30/70);

T8 = dieta à base de farinha de soja Monarca + farinha de milho integral (30/70);

T9 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA + farinha de milho integral (30/70);

T10 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP + farinha de milho integral (30/70);

T11 = dieta à base de farinha de milho integral.

Tabela 8. Composição centesimal das dietas de caseína (CAS), livre de nitrogênio (LN) e dietas experimentais (g/kg) de soja, farinha mista de soja e milho (Grupo 1 e 2).

Grupo 1	Calorias	Carboidrato	Proteína	Lipídio	%CHO	%PTN	%LIP
Caseína 1	345,85	61,02	8,22	7,66	70,58	9,51	19,93
LN 1	340,01	68,27	0,28	7,55	80,31	0,33	19,98
T1	348,59	60,69	8,28	8,27	69,64	9,50	21,35
T2	345,95	60,44	8,22	8,12	69,89	9,50	21,13
T3	344,17	61,29	8,18	7,56	71,23	9,51	19,76
T4	345,55	61,24	8,21	7,73	70,88	9,50	20,13
T5	345,06	61,06	8,20	7,75	70,79	9,51	20,22
Grupo 2	Calorias	Carboidrato	Proteína	Lipídio	%CHO	%PTN	%LIP
Caseína 2	346,29	60,48	8,23	7,67	69,86	9,51	19,92
LN 2	340,01	68,27	0,28	7,55	80,31	0,33	19,98
T6	363,29	64,02	8,63	7,67	70,49	9,50	18,99
T7	360,83	63,57	8,57	7,66	70,47	9,50	19,11
T8	362,42	63,85	8,61	7,68	70,47	9,50	19,08
T9	361,90	63,83	8,59	7,67	70,55	9,49	19,07
T10	361,45	63,73	8,58	7,67	70,53	9,50	19,09
T11	368,49	66,27	8,75	7,67	71,94	9,50	18,73

LN1 = dieta livre de nitrogênio (aprotéica – grupo controle);

Caseína 1 = dieta à base de caseína (grupo referência);

T1 = dieta à base de farinha de soja CD 201;

T2 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA;

T3 = dieta à base de farinha de soja Monarca;

T4 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA;

T5 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP;

LN 2 = dieta livre de nitrogênio (aprotéica – grupo controle);

Caseína 2 = dieta à base de caseína (grupo referência);

T6 = dieta à base de farinha de soja CD 201 + farinha de milho integral (30/70);

T7 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA + farinha de milho integral (30/70);

T8 = dieta à base de farinha de soja Monarca + farinha de milho integral (30/70);

T9 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA + farinha de milho integral (30/70);

T10 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP + farinha de milho integral (30/70);

T11 = dieta à base de farinha de milho integral.

5.5. Avaliação da Qualidade Protéica e Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS)

Não houve diferença estatística no consumo alimentar (CA) dos animais nos experimentos (Grupo 1 e 2), no entanto, com relação ao ganho de massa e CEA, observa-se que todos os grupos diferem do tratamento com caseína (Tabela 9). Os ratos não alimentados com caseína apresentaram baixo peso e perda de pelos. Isto demonstra que apesar de terem consumido a mesma quantidade de alimento, a dieta com proteínas de origem vegetal, mesmo apresentando um escore adequado (Tabela 5), não promoveu um bom crescimento dos animais em relação à dieta com caseína. Neste sentido, o CEA é uma importante ferramenta para avaliar a ingestão de nutrientes e sua absorção pelos tecidos, nos dando um indicativo da qualidade da proteína da dieta.

Tabela 9. Consumo alimentar (CA), Ganho de Massa (GP) e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos ratos alimentados com dietas experimentais.

Grupo1	CA	GP	CEA
Caseína 1	136,3 ^a	47,7 ^a	0,34 ^a
T1	125,9 ^a	25,8 ^b	0,23 ^b
T2	109,5 ^a	23,3 ^b	0,20 ^b
T3	134,6 ^a	31,3 ^b	0,21 ^b
T4	126,5 ^a	32,3 ^b	0,23 ^b
T5	126,5 ^a	32,3 ^b	0,25 ^b
Grupo 2	CA	GP	CEA
Caseína 2	241,9 ^a	71,0 ^a	0,29 ^a
T6	166,7 ^a	19,5 ^b	0,11 ^b
T7	191,8 ^a	27,7 ^b	0,14 ^b
T8	225,8 ^a	32,7 ^b	0,14 ^b
T9	186,8 ^a	25,5 ^b	0,13 ^b
T10	191,8 ^a	32,0 ^b	0,16 ^b
T11	174,1 ^a	24,7 ^b	0,13 ^b

As médias, dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

Caseína 1 = dieta à base de caseína (grupo referência);

T1 = dieta à base de farinha de soja CD 201;

T2 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA;

T3 = dieta à base de farinha de soja Monarca;

T4 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA;

T5 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP;

Caseína 2 = dieta à base de caseína (grupo referência);

T6 = dieta à base de farinha de soja CD 201 + farinha de milho integral (30/70);

T7 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA + farinha de milho integral (30/70);

T8 = dieta à base de farinha de soja Monarca + farinha de milho integral (30/70);

T9 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA + farinha de milho integral (30/70);

T10 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP + farinha de milho (30/70);

T11 = dieta à base de farinha de milho integral.

Estes resultados podem ser devido a diversos fatores, tais como o tratamento térmico, presença de fatores antinutricionais não inibidos pelo tratamento térmico ou presença de substâncias que podem causar danos ao trato digestório do animal, entre outros. O tratamento térmico aplicado à soja teve o objetivo de reduzir a atividade dos fatores antinutricionais como BBI (inibidor de quimiotripsina *Bowman-Birk*) e o KTI (inibidor de tripsina). Este último representa cerca de 80% da atividade de inibição trípica presente nos grãos de soja (TAN-WILSON, 1988), e é um dos mais importantes fatores antinutricionais da soja, acompanhado pela presença de lectinas (VASCONCELOS *et al.*, 2001; FREEDMAN e BRANDON, 2001; RIZZI *et al.*, 2003). No entanto, o aquecimento também pode levar à redução da solubilidade protéica (HUANG *et al.*, 2008, ANDRADE *et al.*, 2010), o que pode ter afetado negativamente a qualidade nutricional da soja. Apesar dos estudos de Andrade *et al.* (2010) terem avaliado o melhor tipo de tratamento térmico, inclusive para uma das variedades utilizados neste trabalho, o tratamento térmico pode não ser totalmente adequado como técnica para a redução da atividade dos fatores antinutricionais presentes nos grãos da soja (WIRIYAUMPAIWONG; SOPONRONNARIT; PRACHAYAWARAKOM, 2004).

Outro aspecto importante relacionado ao tratamento térmico da soja é que alguns estudos mostram que o consumo de soja *in natura* pode causar lesões ao epitélio intestinal de animais devido a presença dos fatores antinutricionais (BRUNE *et al.*, 2010), no entanto, Andrade (2010) demonstrou que as mesmas lesões foram encontradas em ratos que consumiram soja tratada termicamente a 150°C por 30 min. Estes apresentaram redução da altura das vilosidades intestinais e inflamação do tecido epitelial.

A mesma condição de atrofia do intestino foi observada por Olguin *et al.* (2003) com o uso de hidrolisado protéico de soja, que sugere que este resultado é devido a uma alta proliferação microbiana causada por componentes das fibras e a oligossacarídeos não digeríveis da soja.

É importante salientar que além dos inibidores de proteases, a soja possui componentes com ação antinutricional, que podem influenciar na sua qualidade nutricional, como fitatos, lipoxigenase, oxalato, saponinas, hemaglutininas, entre outros (MARTINO *et al.*, 2001).

Lectinas (hemaglutininas) são proteínas caracterizadas como fatores antinutricionais presentes nos grãos de soja, responsáveis por cerca de 10% da proteína total na leguminosa. Estas proteínas se ligam a carboidratos presentes no epitélio

intestinal, afetando negativamente a absorção de nutrientes e estão presentes em níveis moderados na soja e ervilha (NATARAJAN *et al.*, 2009).

Tendo em vista que a composição aminoacídica da soja não parece ser o responsável pelo crescimento inferior dos animais, como mostrado na Tabela 10, podemos dizer que neste caso, além da digestibilidade, outros fatores podem estar interferindo na qualidade protéica da soja

O quociente de eficiência protéica (PER) estima o quanto da proteína ingerida é usada para o crescimento do animal. Geralmente, um PER abaixo de 1,5 indica uma proteína de baixa qualidade, entre 1,5 e 2,0, uma proteína de qualidade média, e acima de 2,0, uma proteína de boa qualidade (FRIEDMAM, 1996). Portanto, os resultados obtidos neste estudo (Tabela 10) indicam que a dieta controle à base de caseína apresenta uma eficiência protéica superior aos grupos experimentais estudados (Grupo 1 e 2).

Os valores encontrados para PER, NPR e Digestibilidade (Tabela 10) relativos à caseína para as dietas à base de farinha de soja, farinha mista de soja e milho e farinha de milho, variaram de:

PER = 39% a 71%;

NPR = 71% a 78%

Digestibilidade = 43% a 85%

Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos valores de PER, NPR e Digestibilidade da dieta com caseína das demais dietas (dieta a base de soja e dieta a base de soja+milho) e houve diferença significativa entre os valores de PER, NPR e Digestibilidade das dietas à base de farinha de soja e milho. Isto demonstra que a qualidade da proteína da farinha de soja é inferior à caseína para promover crescimento e manutenção de peso de ratos (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de PER, NPR, Digestibilidade aparente e relativo e PDCAAS.

Grupo 1	PER	PER R	NPR	NPR R	DIG	DIG R	PDCAAS
Caseína 1	3,72 ^a	100 ^a	4,78 ^a	100 ^a	0,98 ^a	98,00 ^a	1,52 ^a
T1	2,60 ^b	69,82 ^b	3,77 ^b	78,77 ^b	0,42 ^b	43,29 ^b	0,48 ^b
T2	2,24 ^b	60,34 ^b	3,37 ^b	70,56 ^b	0,57 ^b	58,02 ^b	0,52 ^b
T3	2,28 ^b	61,37 ^b	3,56 ^b	74,51 ^b	0,56 ^b	56,96 ^b	0,56 ^b
T4	2,49 ^b	66,89 ^b	3,51 ^b	73,48 ^b	0,57 ^b	58,49 ^b	0,62 ^b
T5	2,67 ^b	71,79 ^b	3,76 ^b	78,69 ^b	0,60 ^b	61,34 ^b	0,67 ^b
Grupo 2	PER	PER R	NPR	NPR R	DIG	DIG R	PDCAAS
Caseína 2	2,58 ^a	100 ^a	3,40 ^a	100 ^a	0,96 ^a	96,00 ^a	1,49 ^a
T6	1,22 ^b	39,49 ^c	2,69 ^b	65,92 ^b	0,50 ^d	52,60 ^c	0,51 ^c
T7	1,52 ^b	48,95 ^{bc}	2,77 ^b	67,92 ^b	0,63 ^c	66,00 ^b	0,63 ^b
T8	1,56 ^b	50,30 ^{bc}	2,69 ^b	65,91 ^b	0,65 ^c	67,49 ^b	0,69 ^b
T9	1,46 ^b	46,94 ^{bc}	2,81 ^b	68,82 ^b	0,61 ^c	63,97 ^b	0,64 ^b
T10	1,75 ^b	56,29 ^b	2,99 ^b	73,32 ^b	0,69 ^c	71,38 ^b	0,74 ^b
T11	1,59 ^b	51,15 ^{bc}	2,92 ^b	71,60 ^b	0,82 ^b	85,62 ^a	0,72 ^b

As médias, dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

Caseína 1 = dieta à base de caseína (grupo referência);

T1 = dieta à base de farinha de soja CD 201;

T2 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA;

T3 = dieta à base de farinha de soja Monarca;

T4 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA;

T5 = dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP;

Caseína 2 =dieta à base de caseína (grupo referência);

T6 = dieta à base de farinha de soja CD 201 + farinha de milho integral (30/70);

T7 = dieta à base de farinha de soja CD 2013 PTA + farinha de milho integral (30/70);

T8 = dieta à base de farinha de soja Monarca + farinha de milho integral (30/70);

T9 = dieta à base de farinha de soja CS 3033PTA + farinha de milho integral (30/70);

T10 =dieta à base de farinha de soja UFVTN105AP + farinha de milho integral (30/70);

T11 =dieta à base de farinha de milho integral.

Pode-se observar na Tabela 10, que os resultados encontrados para PER operacional, NPR e Digestibilidade não são estatisticamente diferentes entre os cultivares de soja com lipoxigenase (T4 - CS 3033PTA) e o cultivar sem lipoxigenase (T5 - UFVTN105AP). Isso indica que a eliminação da lipoxigenase do grão não alterou a qualidade protéica da farinha de soja.

Os valores de digestibilidade indicam o quanto das proteínas ingeridas é hidrolisado pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo; esta etapa constitui o primeiro fator que pode afetar a eficiência da utilização da proteína da dieta (STIPANUK, 2000; YILIZ, 2010). Caso alguma proteína não seja devidamente hidrolisada isso poderá causar má absorção pelo organismo, acarretando a sua eliminação nas fezes ou metabolização por microrganismos do intestino grosso, o que

resultará em uma alteração da digestibilidade e diminuição dos valores de qualidade da proteína.

Os valores de PER, NPR e Digestibilidade para as farinhas integrais de soja encontrados neste trabalho (Tabela 10) foram diferentes quando comparados aos valores encontrados por Monteiro *et al.*(2004) e Pires *et al.* (2006). O tratamento térmico empregado pode levar ao aparecimento de diferenças nos resultados encontrados tendo em vista que dependendo da intensidade do tratamento pode ocorrer diminuição da absorção de alguns nutrientes (HUANG *et al.*, 2008, ANDRADE *et al.*, 2010).

O PDCAAS tem sido recomendado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2007) para avaliar a qualidade da proteína em humanos (SARWAR, 1997). Ele se baseia na relação direta entre o primeiro aminoácido limitante encontrado na soja e a digestibilidade. Neste sentido, como a digestibilidade encontrada foi baixa, um dos maiores problemas da soja como alimento pode ser devido ao aproveitamento do organismo de suas proteínas, tendo em vista que seu escore não apresenta limitantes exceto pela linhagem CD 201 APT. No entanto, o seu PDCAAS indica, ao contrário do escore, um baixo aproveitamento nutricional de suas proteínas, decorrente, por um lado, da sua baixa digestibilidade e, de outro, provavelmente acarretado pela redução dos valores de biodisponibilidade de seus aminoácidos. Estes dois fatores contribuem, portanto, para um PDCAAS inferior a 1,0 (um) o que foi evidenciado pela diminuição do crescimento dos animais quando comparados ao padrão.

5.6. Análise proteômica

Inicialmente foi feita uma caracterização global das proteínas encontradas nos cultivares melhorados. A análise proteômica foi realizada pelo estudo do perfil protéico das amostras de soja nos dois grupamentos em comparação com suas correspondentes amostras de alto teor protéico.

Sendo assim, o cultivar Monarca serviu como referência para a análise dos cultivares CD 201 e CD 2013 PTA, e o cultivar BARC-8 serviu como referência para a análise dos cultivares CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP.

A quantidade de *spots* detectado em cada triplicada pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11. Análise de correspondência dos Spots dos diferentes cultivares em triplicata.

	GEL	Monarca	CD 201	CD 2013 PTA	BARC-8	CS 3033 PTA	UFVTN 105
Nº Spots	A	699	602	555	1604	1896	1558
	B	462	669	433	1036	1809	1016
	C	1241	627	549	2300	1698	4224
Diferencial	A	10	13	14	30	21	14
	B	10	14	13	33	15	17
	C	18	13	13	38	14	34

Agrupamento 1: Monarca (referência), CD 201 e CD 2013 PTA;

Agrupamento 2: BARC-8 (referência), CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP;

Nº Spots (A, B e C): são as diferentes extrações realizadas para cada amostra;

Diferencial (A, B e C): o número de *spots* com expressão diferencial, encontrados em cada linhagem quando comparado aos géis de referência dos cultivares Monarca e BARC-8 .

Os dados apresentados na Tabela 11 são reforçados pela orientação dos vetores que são gerados a partir do pareamento do mesmo *spot* entre o gel de referência de cada amostra e um dos géis analisados para cada uma das diferentes amostras analisadas.

Isto é possível através de um recurso presente no programa *Image Master* para analisar e convalidar o posicionamento dos *spots* (dados não apresentados). Como os vetores entre as triplicatas aparecem apontando para o mesmo sentido do gel podemos concluir que não houve distorções visíveis na migração dos *spots* das linhagens estudadas.

Como a expressão gênica de uma célula muda constantemente dependendo do seu estágio de desenvolvimento, estudar estas características é um grande desafio. Existe além de fatores inerentes ao genoma, a influência do meio ambiente que pode afetar grandemente a característica estudada (PANDEY e MANN, 2000).

Desta forma, não é possível em um momento específico e em um único gel, a visualização de todas as proteínas expressas em uma determinada semente (HERBERT *et al.*, 2001). A separação de proteínas com pesos moleculares extremos, muito baixos ou muito altos, é bastante difícil por eletroforeses 2D com uma faixa ampla de pH. Também as proteínas altamente hidrofóbicas e alcalinas irão necessitar de métodos específicos de preparação das amostras. Além disso, proteínas com um baixo nível de expressão, como as enzimas, fatores de transcrição e algumas proteínas estruturais, podem não ser reveladas pelos métodos convencionais de coloração, tais como nitrato de prata e o *coomassie blue*.

Estes fatores, associados aos resultados não estatisticamente significantes da quantificação protéica das linhagens estudadas, pode ter mascarado a expressão diferencial das amostras analisadas, resultando assim em géis onde as proteínas de reservas que são a maior porção da semente (LIU, 1997) nem sempre apresentaram diferença significativa na análise dos géis 2D.

Uma possível fonte de variação foi a impossibilidade de realizar a corrida de segunda dimensão das amostras (18 ao todo) devido a limitações do aparelho que comporta apenas seis géis. Desta maneira foi realizada a corrida para a variedade estudada e suas repetições biológicas.

Apesar dos cuidados tomados durante o processo de extração protéica e confecção dos géis, visando minimizar a interferência de fatores ambientais e erros de manipulação, algumas amostras da Tabela 11 apresentaram diferenças consideráveis no número de *spots* detectados, como foi o caso das amostras identificadas como “gel C” para os seguintes genótipos: Monarca, CS 3033 PTA, UFVTN 105 AP e BARC-8. Estas diferenças podem ser explicadas pelas variações da técnica de eletroforese 2D, devido aos processos de coloração e descoloração do gel e às impurezas inerentes à amostra.

5.7. Análise do proteoma diferencial nas sementes de soja estudadas

Para uma melhor visualização das diversas proteínas encontrada no gel, inicialmente foram evidenciados os três principais grupamentos de proteínas nas sementes estudadas que poderiam influenciar na qualidade protéica da soja (Figura 1):

- 1 – Lipoxigenases;
- 2 – Proteínas de reservas destacando-se: a glicinina e β -conglucina
- 3 – As proteínas com possível ação antinutricional como o inibidor de tripsina *Kunitz* (KTI) e inibidor de quimiotripsina *Bowman-Birk* (BBI).

Estas análises mostraram reprodutibilidade dos resultados, havendo grande similaridade entre géis de um mesmo cultivar, como demonstra a análise de correspondência dos *spots* mostrada na Tabela 11.

A localização e determinação destas proteínas foi baseada nos trabalhos de Hajduch *et al.* (2005), Krishnan *et al.* (2007) e Natarajan *et al.* (2009, 2006).

Hajduch *et al.* (2005), mostram mapas de alta resolução de proteoma de referência de sementes de soja a partir da segunda semana até a sexta semana após a floração, com a expressão de 679 *spots* em um gel 2D.

Krishnan *et al.* (2007), realizaram um trabalho onde foram identificadas as frações das principais proteínas de reservas, e Natarajan *et al.* (2009, 2006) realizaram um estudo de diferentes métodos de extração para determinar proteínas de baixa abundância na semente de soja.

A fração 7S corresponde a cerca 35% das proteínas solúveis do grão de soja que são formadas pelas proteínas de reserva β -conglucina (7S globulina), responsável por cerca de 85 % do total dessa fração. O Citocromo C, a β -amilase, as lipoxigenases e as lectinas (hemaglutininas) também fazem parte da fração 7S. A fração 11S compreende entre 31 e 52% das proteínas solúveis do grão de soja. A proteína 11S globulina também conhecida como glicinina, é a proteína de reserva predominante entre as globulinas da soja (CASTRO, 2009). A glicinina é composta por diferentes combinações de 5 subunidades que são denominadas de G1 até G5 (LEE *et al.*,2007). As glicininas G1 e G2 são consideradas os principais agentes alergênicos da globulina 11S (HELM *et al.*, 2000).

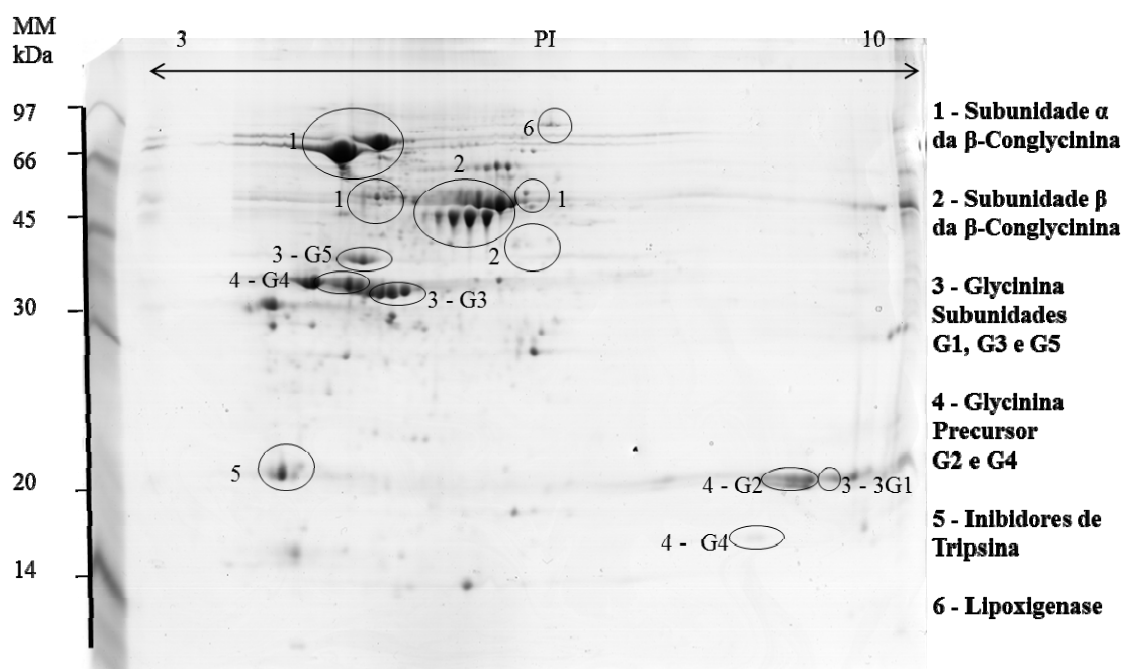


Figura1. Gel 2D representativo dos locais de focalização das principais proteínas de reserva, lipoxigenases e as proteínas que podem interferir na qualidade protéica, com possível ação antinutricional como o inibidor de tripsina Kunitz (KTI). Baseado nos trabalhos de Hajduch *et al.* (2005), Krishnan *et al.* (2007) e Natarajan *et al.* (2009, 2006).

Após a localização das regiões destas proteínas nos géis 2D, foi observada a presença destes *spots* como integrantes destas regiões demarcadas. A maioria das proteínas reveladas nas amostras analisadas corresponde às frações 7S e 11S das

globulinas (observação visual), que são caracterizadas como as principais proteínas de reserva da soja como será mostrado nas Figuras de 2 a 7.

Alguns *spots* destes grupos presentes em alguns géis analisados apresentaram expressão diferencial, podendo justificar dessa maneira o aumento do percentual protéico em alguns grãos de soja melhorados para alto teor de proteína, considerando que as proteínas de reservas compõem a maior porção protéica do grão de soja, seria esperado que um aumento da quantidade de proteínas nestes grãos fosse acompanhado de um aumento das proteínas de reserva.

Nas imagens obtidas dos géis bidimensionais (figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7) foi possível perceber a presença de vários *spots*, que correspondem aos diversos grupos protéicos presentes na soja. Podemos observar visualmente nos géis obtidos que não houve alteração significativa entre as principais frações protéicas dos cultivares estudados.

A partir dos dados de % de volume (porcentagem em volume) obtidos para cada *spot* detectado, foi realizada a análise diferencial das imagens. A análise dos valores de % volume de cada *spot* entre as amostras de referência e a melhorada, permitiram a observação de variações na abundância protéica entre os extratos analisados.

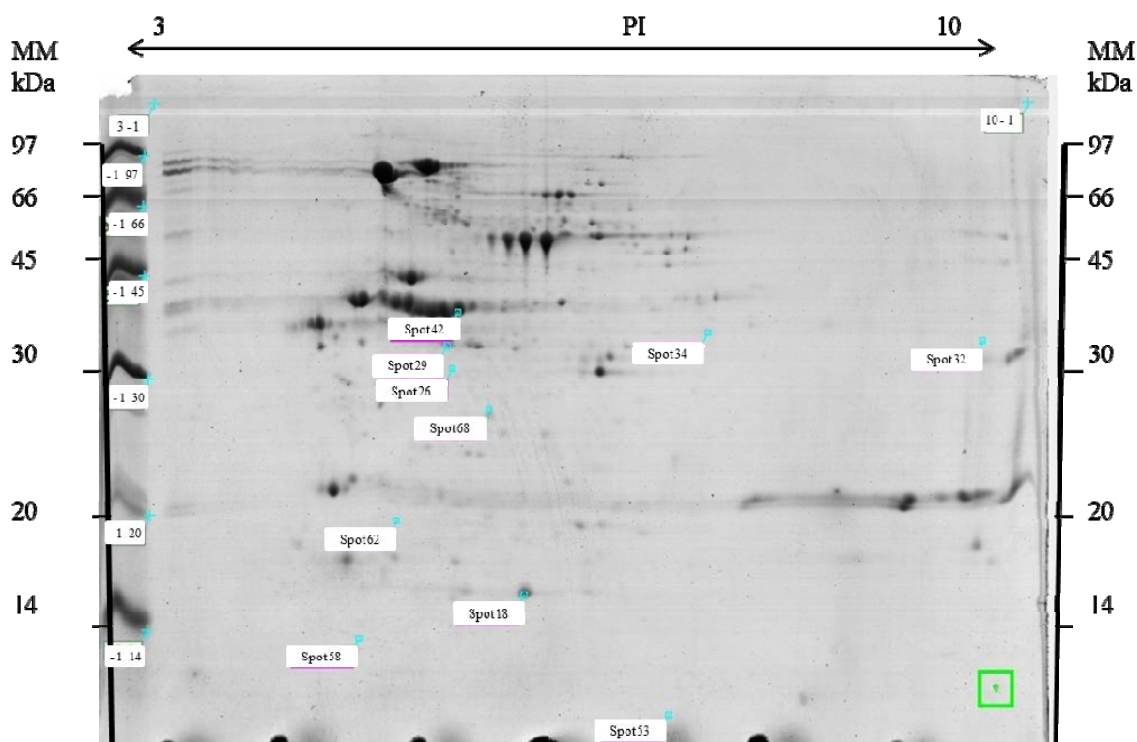


Figura 2. Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar Monarca. Gel de referência para comparação entre os cultivares CD 201 e CD 2013 PTA. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial.

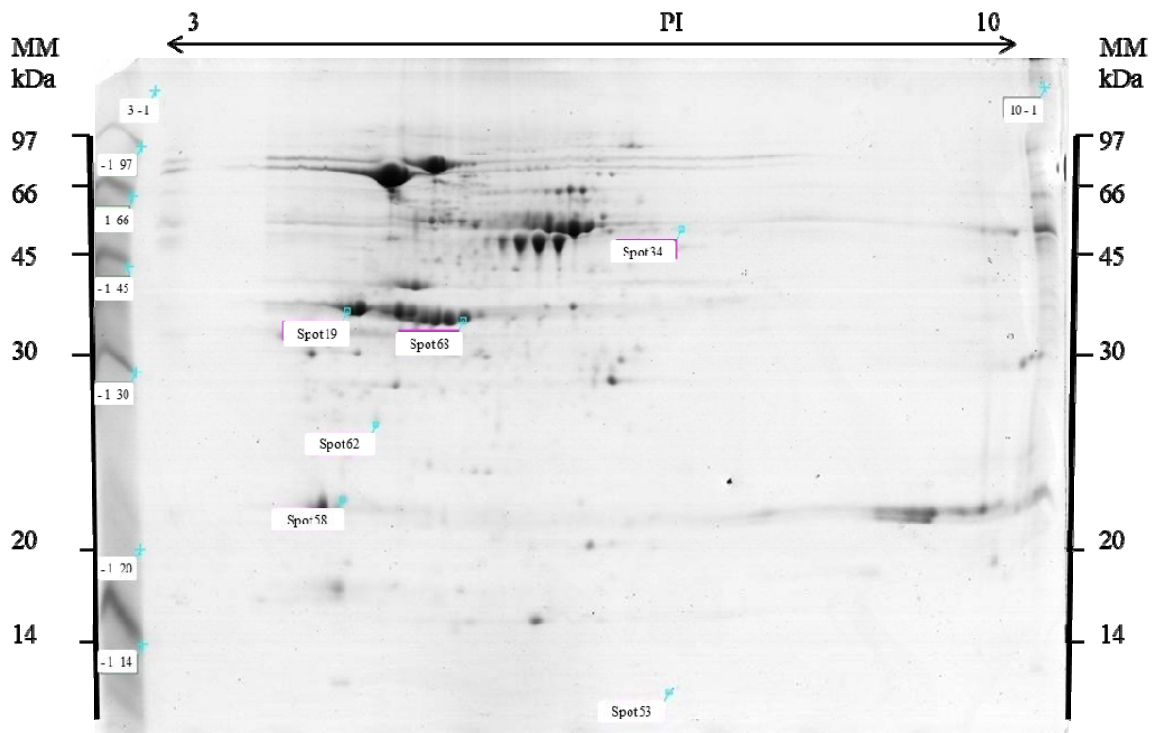


Figura 3. Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar CD 201 comparado com o cultivar Monarca. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial.

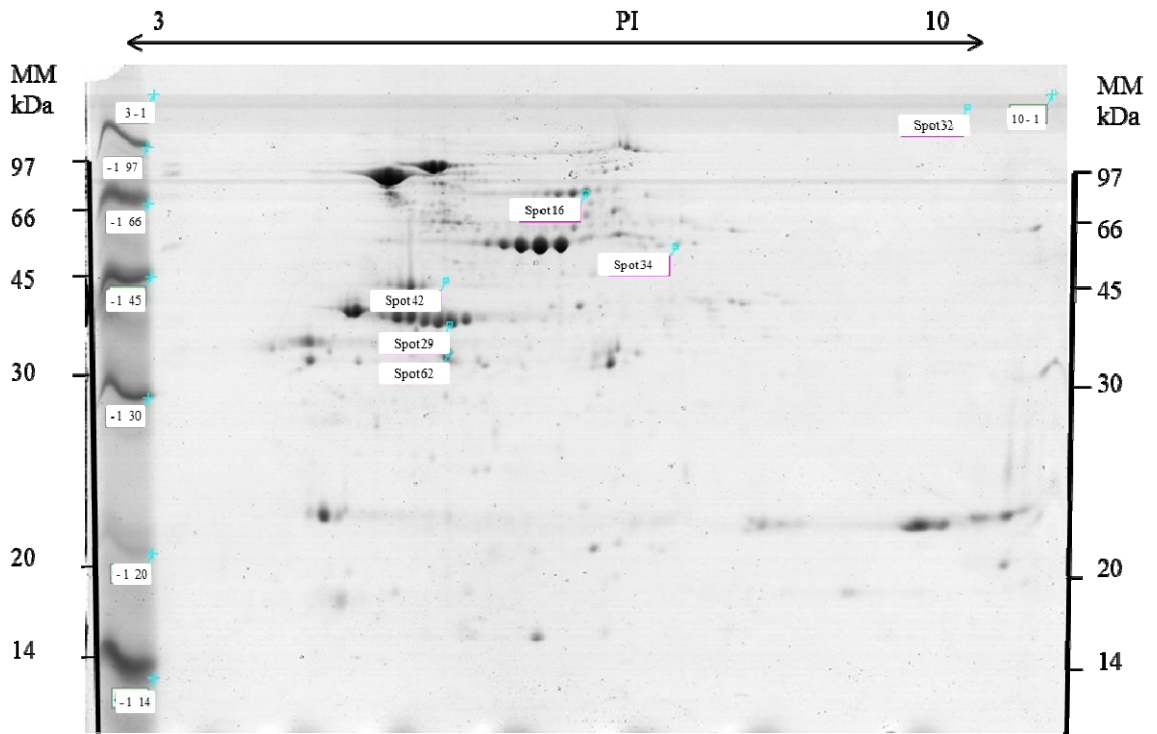


Figura 4. Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar CD 2013 PTA comparado com o cultivar Monarca. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial.

Percebem-se nos géis as formas peptídicas que correspondem às frações de β -conglucina e glicina bem como diversas outras proteínas características da soja, como o inibidor de tripsina e a presença de lipoxigenase. Pode-se observar na Tabela 12 que as linhagens CD 201 e CD 2013 PTA apresentam uma quantidade maior de proteínas do que o cultivar Monarca que foi utilizada como referência.

No entanto a linhagem CD 2013 PTA apresenta uma diminuição dos níveis da subunidade G3 da glicina quando comparada ao Cultivar Monarca que por outro lado apresenta diminuição dos níveis de G4 glicina (proteína alergênica).

E por fim, salienta-se a presença do *spot* 34, uma proteína não identificada, presente nos géis com diferentes valores de expressão.

Tabela 12. Análise de expressão diferencial entre o cultivar de referência Monarca e CD 201 e CD 2013 PTA.

<i>Mach ID</i>	Max	<i>Match</i>		CD 2013		Grupo Protéico Provável
		<i>Count</i>	Monarca	CD 201	PTA	
16	-3,47	2	-3,47			SBP2
18	-2,29	2				GR-RBP2
19	-37,28	2	-37,28			G4 Glicina
26	-182,12	2	-182,12			Não identificado
29	-14,14	2	-14,14			Aglutinina
32	-2,64	2	-2,64			Não identificado
34	5,18	3	-5,18	-2,46	5,18	Não identificado
42	-11,81	2			-11,81	G3 Glicina
53	-1,57	2	-1,57			Não identificado
58	-24,91	2	-24,91			Não identificado
62	-19,70	2	-19,70		-2,29	Aglutinina

SBP2 - *sucrose binding protein*

GR-RBP2 - *glycine-rich RNA-binding proteins*

Mach ID – Número de identidade do *spot* marcado nos géis analisados

Max – Valor de intensidade molecular (MM) diferencial em kDa (intensidade dos *Spots*)

Match Count – Número de géis que apresentam a mesmo *Mach ID*

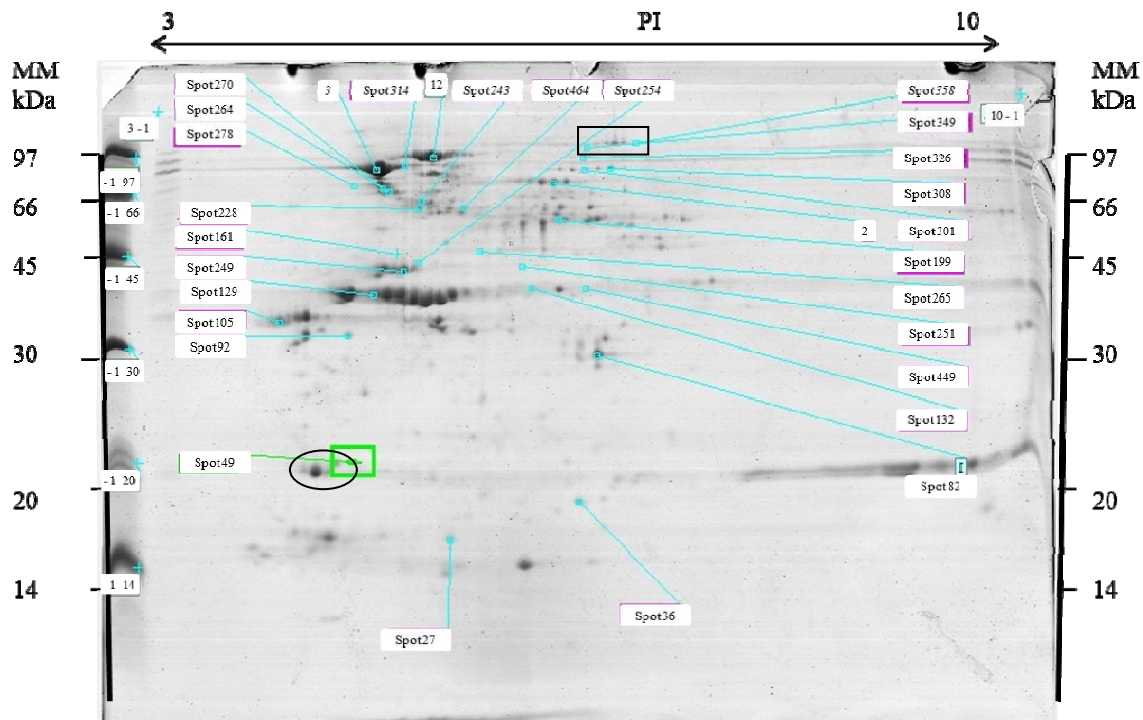


Figura 5. Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar BARC-8. Gel de referência para comparação entre os cultivares parentais CS 3033 PTA (LOX +) e UFVTN 105 AP (LOX -). Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. A marcação retangular simboliza a localização das lipoxigenases e a circular a localização do grupamento KTI

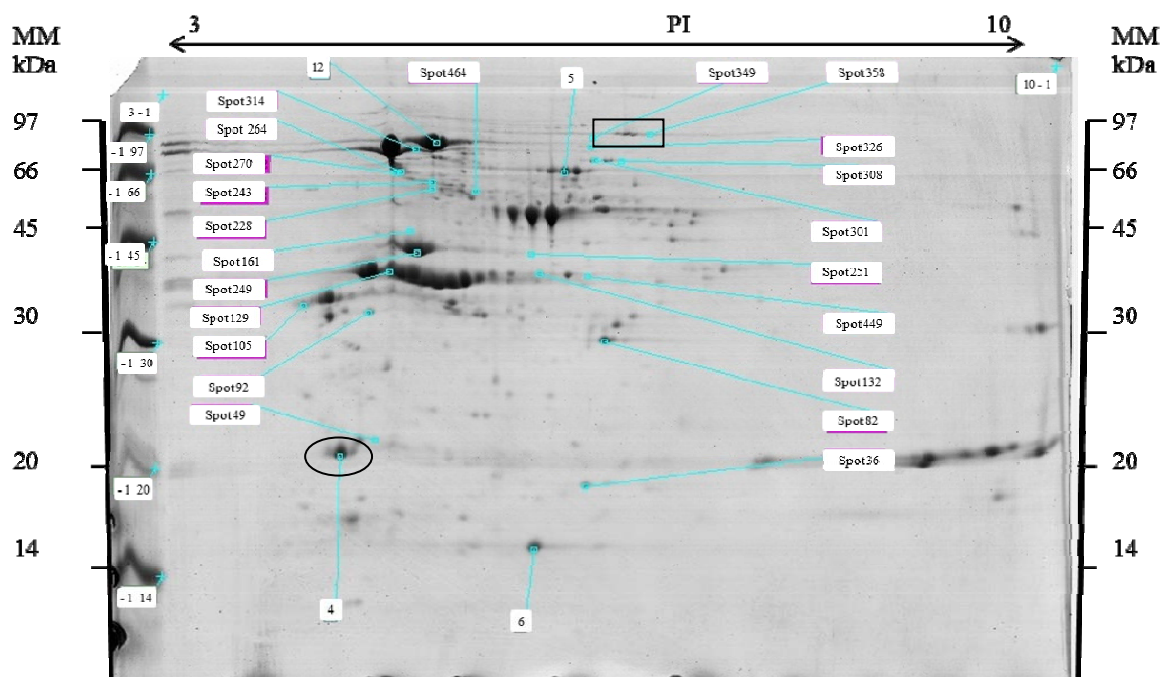


Figura 6. Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar CS 3033 PTA (LOX +) comparado com o cultivar BARC-8. Os *spots* marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. A marcação retangular simboliza a localização das lipoxigenases e a circular a localização do grupamento KTI

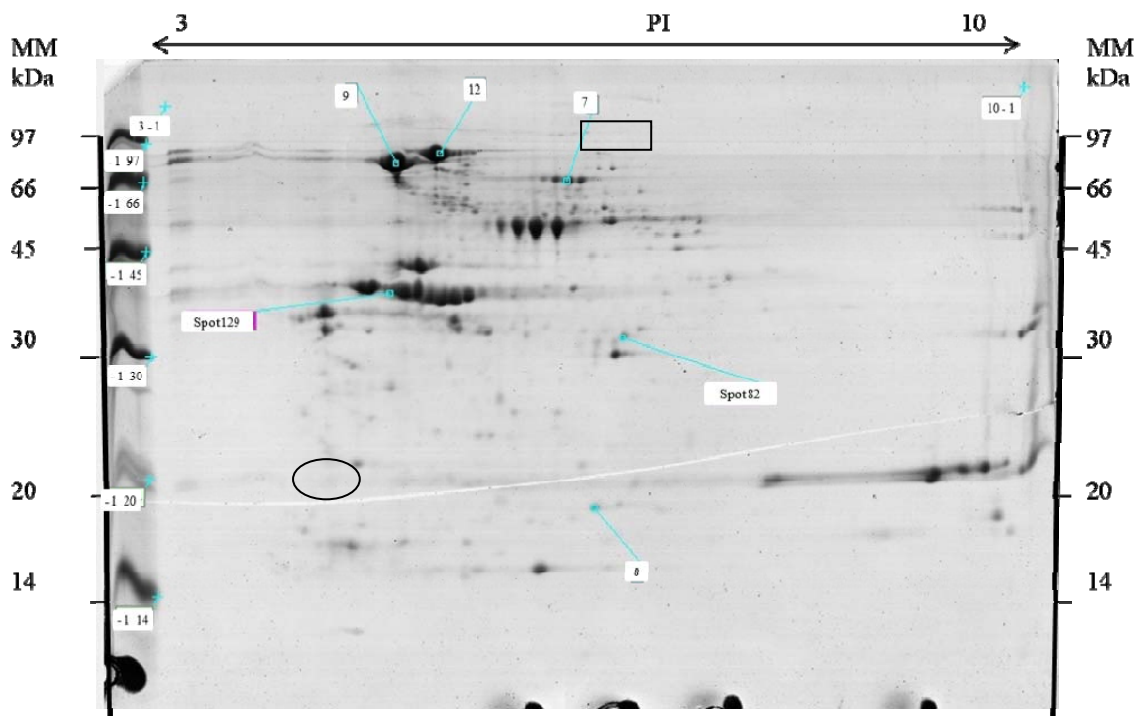


Figura 7. Gel bidimensional do extrato protéico do cultivar UFVTN 105 AP (LOX -) comparado com o cultivar BARC-8. Os spots marcados representam as proteínas detectadas como expressão diferencial. A marcação retangular simboliza a localização das lipoxigenases e a circular a localização do grupamento KTI

Da mesma forma que para a Tabela 12, a análise dos resultados da Tabela 13 mostra que, apesar do cuidado durante o ajuste manual dos *spots* pode ser observado que algumas correlações estão equivocadas como no caso do *spot* 358 (Figura 5 e Figura 6) marcado no cultivar BARC-8 e CS 3033 PTA (LOX +) que podemos identificar como o grupamento lipoxigenase, que apresenta uma correlação como esperada no gel do cultivar UFVTN 105 AP (LOX -) (Figura 7), já que o mesmo não deveria existir e por isso deveria ter uma correlação negativa, demonstrado com um quadrado, o mesmo acontece com a possível localização do inibidor de Tripsina (KTI), que não é detectado como expressão diferencial pelo programa, mas quando observamos no gel marcado com um círculo, percebemos uma nítida diferença de sua expressão no mesmo.

Na Tabela 13, pode-se observar na linhagem UFVTN 105 AP, o aumento das proteínas e uma variação nas Subunidades G5 da Glicinina e subunidade β da β -Conglicinina.

De uma forma geral a linhagem CS303 APTN apresenta uma diminuição das proteínas de reserva e da lipoxigenase, não apresentando um aumento diferencial em outras proteínas exceto pelo *spot* 82, quando comparado à linhagem BARC-8. Esta última apresenta um aumento das subunidades G4 e G5 da Glicinina, bem como de outras não identificadas marcadas nos *spots* 449,92 e 82.

Tabela 13. Análise de expressão diferencial entre o cultivar de referência BARC-8 e os cultivares melhorados CS 3033 PTA e UFVTN 105 AP (LOX -).

<i>Mach ID</i>	Max	<i>Match Count</i>	BARC-8	CS303 PTA (LOX +)	UFVTN 105 (LOX-)	Grupo Protéico Provável
27	-3,62	3			-3,62	GR-RBP2
36	-1,58	3		-1,58		Não identificado
49	-8,64	3		-8,64		Inibidor de tripsina
82	5,45	3	5,45	3,35	-2,96	Não identificado
92	1,91	3	1,63	-1,13	-1,91	Não identificado
129	3,06	3	3,06	-1,20	-1,24	G4 Glicinina
132	-1,92	3		-1,92		Não identificado
161	-5,01	3		-5,01		G5 Glicinina
199	-2,10	3			-2,10	SBP2
228	-6,97	3		-6,97		Sub $\alpha\beta$ -Conglicinina
243	-3,46	3		-3,46		Sub $\alpha\beta$ -Conglicinina
249	2,19	3	2,19	-2,19	-2,18	G5 Glicinina
251	8,96	3	-6,86	-8,96	8,96	Sub $\beta\beta$ -Conglicinina
254	35,99	3	-7,06	-35,99	35,99	G5 Glicinina
264	-1,69	3		-2,24		Sub $\alpha\beta$ -Conglicinina
265	3,79	3	3,79	-3,79	-2,35	Sub $\beta\beta$ -Conglicinina
270	-2,53	3	-2,53	-3,73		Sub $\alpha\beta$ -Conglicinina
278	-3,71	3			-7,09	Não identificado
301	-2,13	3		-2,13		Não identificado
308	-5,79	3		-5,79		Não identificado
314	-1,58	3		-2,09		Sub $\alpha\beta$ -Conglicinina
326	-2,02	3		-2,02		Não identificado
349	-4,85	3		-4,85		Não identificado
358	-1,99	3		-1,99		Lipoxigenase
449	-3,99	3		-4,14	-3,99	Não identificado
464	-6,39	3			-6,39	Sub $\alpha\beta$ -Conglicinina

SBP2 - *sucrose binding protein*

GR-RBP2 - *glycine-rich RNA-binding proteins*

Mach ID – Número de identidade do *spot* marcado nos géis analisados

Max – Valor de intensidade molecular (MM) diferencial em kDa

Match Count – Número de géis que apresentam a mesmo *Mach ID*

As diferenças estatísticas observadas na Tabela 12 e 13 podem ser devidas a efeitos genéticos decorrentes do processo de melhoramento da soja. Entretanto, fatores ambientais como tipo de solo, temperatura, umidade e condições de cultivo podem influenciar fortemente a expressão genética e conseqüentemente o proteoma da semente.

A análise proteômica demonstra ser uma ferramenta adequada para determinar as similaridades e diferenças entre os cultivares existentes, contudo esta análise deve ser realizada cuidadosamente e com revisões após a execução do software de detecção de *spots*.

Cabe ressaltar que os *spots* considerados estatisticamente diferentes, podem posteriormente ser alvo de investigação nas diferentes amostras de referência e melhoradas, sendo que a análise do gel bidimensional permite ainda a obtenção de dados referentes ao ponto isoelétrico, peso molecular, intensidade, área, volume e % de intensidade, os quais não foram listados por não fazerem parte do objetivo deste trabalho.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A soja e o seu uso como alimento representam, nas últimas décadas, uma importante fonte de estudos. Inúmeros trabalhos com alegações positivas e outros com características negativas sobre a soja, vem estudando de forma isolada alguns fatores benéficos e outros prejudiciais no uso dessa leguminosa.

O presente trabalho, no qual foram avaliados cultivares melhorados de soja, mostra que há aspectos ligados ao uso dessa leguminosa na alimentação, tais como: tratamento térmico, absorção de nutrientes e complementaridade protéica, que precisam ainda ser mais bem explorados e estudados para o seu melhor entendimento. É possível que estudos citológicos associados à análise por espectrometria de massas das proteínas e de outros nutrientes possam ajudar a elucidar alguns questionamentos levantados neste trabalho.

Com relação às linhagens de soja estudadas, os resultados encontrados indicam que:

- O cultivo em campo pode trazer alguns vieses para o estudo experimental, como a mudança do teor protéico entre linhagens de um mesmo cultivar;
- A soja não se mostrou uma boa fonte protéica para o desenvolvimento dos animais quando comparada à caseína do leite;
- A mistura soja + milho não parece ser uma boa fonte protéica para a complementação da alimentação de animais experimentais;
- Apesar de apresentar um escore adequado, nem a soja, nem a mistura soja + milho parecem ser eficientes na promoção do crescimento e manutenção dos ratos. Um dos fatores que contribuíram para esse resultado foi à sua baixa digestibilidade;
- Pode-se observar a diferença de perfis de expressão protéica tanto entre os cultivares CD 201 e CD 2013 PTA como entre estes e o cultivar Monarca (proteínas de reserva e proteínas não identificadas)
- A comparação entre o cultivar BARC-8 com o cultivar CS303APTN e o cultivar UFVTN 105 AP também demonstrou haver diferenças entre o cultivar de referência e os melhorados com uma expressão diferencial importante principalmente nas proteínas de reserva.

Este trabalho pode colaborar para estudos futuros que visem à avaliação do uso da soja e suas consequências no trato gastrointestinal e dar subsídios para melhoramentos genéticos visando selecionar proteínas que possam ser importantes na melhor digestibilidade e qualidade proteica da soja.

7. REFERÊNCIAS

_____. Bebidas a base de soja buscam diferenciais para disputar mercado. **Engarrafador Moderno**, v. 17, n. 145, p.10-18, 2006.

ALONZO, N.; HIRS, C. H. W. Automation of sample application in amino acid analysers. **Analytical Biochemistry**, v. 23, p. 272-278, 1968.

ANDERSON, R. L., WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, v.125, p.581-587, 1995.

ANDRADE, G.F. **Efeito da ingestão de farinha integral de soja de elevado teor protéico sobre fatores de risco de doenças crônicas não transmissíveis**. [dissertação]. Ciência da Nutrição: Universidade Federal de Viçosa, MG. Brasil; 2010.

ANDRADE, G.F.; DANTAS, M.I.S.; PIOVESAN, N.D.; NUNES, R.M.; BARROS, E.G.; COSTA, NMB E MARTINO, H.S.D. Tratamento térmico adequado proporciona melhoria da qualidade nutricional de farinhas de soja elaboradas a partir de novos cultivares destinados à alimentação humana. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 541-548, 2010.

ANGELIKA, G. **Handbooks eletroforese 2D**. GE . 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Maryland: AOAC, 1997. v. 2.

BELLAVER, C.; SNIZEK, P.N.Jr. **Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves**. Congresso Brasileiro de Soja, 1999 - CNPSA. EMBRAPA. BR

BENDER, A. E. & DOEL, B. H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. **British Journal of Nutrition**. v. II, p.140-157, 1957

BERNARDI, C. R. **Preparo de hidrolisados protéicos e análise de aminoácidos por duas metodologias**. [dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Brasil; 2000.

BLANCO A, BRESSANI R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (Phaseolus vulgaris). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.

BORGES, G. G.; WANG, S.-H.; CABRAL, L. C.; MAIA, L. H.; ASCHERI, J. L. R. Caracterización química de papillas deshidratadas de grits de maíz e soya. **Alimentaria**, v. 36, n. 305, p. 111-114, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360, de 23 de dezembro de 2003. **Anvisa**: Brasília.

CANDIANO, G. BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARVALHO, A.W. **Caracterização nutricional, biodisponibilidade de ferro e qualidade protéica de novo cultivar de soja sem lipoxigenases e de elevado teor protéico**. 150, f. [Dissertação]. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. Brasil; 2009.

CASTRO, V.A.O.T. **Análise comparativa de mapas protéicos de amostras de soja convencionais e tolerantes ao herbicida glifosato visando à inocuidade alimentar**. 117, f. [Tese]. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP. Brasil; 2009.

CHEN, J.; SERAFIN, F. L.; PANDYA, R. N.; DAUN, H. Effects of extrusion conditions on sensory properties of corn meal extrudates. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 84-89, 1991.

FAO, 2007 - Food and Organization of the United Nations. Committee on World Food Security. Assessment of the world food security situation. Twenty-Seventh Session, Rome, May 28 - June 1, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/X9563E.htm>. Acesso em: 17 mar. 2011.

FAO, 2004 - FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION of UNITED NATIONS (FAO). Geneva: Organização Mundial da Saúde; 2004

FAO/WHO, 1991. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Protein quality evaluation. Rome; 1991.66p. (FAO Food and Nutrition Paper, 51).

FERNANDES, M.S.; WANG, SIN-H.; ASCHERI, J.L.R.; OLIVEIRA, M.F. E COSTA, S.A.J. Produtos extrusados expandidos de misturas de canjiquinha e soja para uso como petiscos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1495-1501, 2002.

FERNANDES, M.S.; WANG, SIN-H.; ASCHERI, J.L.R.; OLIVEIRA, M.F. E COSTA, S.A.J. Efeito da temperatura na absorção de água, solubilidade e dispersibilidade da farinha pré-cozida de milho e soja (70:30). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 234-239, 2003.

FRIEDMAN, M. AND BRANDON, D.L. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, 2001.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 6-29, 1996.

FRIEDMAN, M.; GROSJEAN, O.K.; GUMBMAN, M.R. Nutritional improvement of soy flour. **Journal of Nutrition**, v. 114, p. 2241-2246, 1984.

GONÇALVES, C.A.; SOARES, N.S.; BOLINA, C.O. BARROS, E.G. Influência da Temperatura no Acúmulo de Proteínas em Grãos de Soja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1038-1040, 2007.

GUILHERME, F.F.P. E JOKL, L. Emprego de fubá de melhor qualidade protéica em farinha mista para produção de biscoitos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 63-71, 2005.

GUZMAN, G. J.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A. Properties of soybean-corn mixtures processed by low cost extrusion. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 6, p. 1590-1593, 1989.

HAJDUCH, M.; GANAPATY, A.; STEIN, J.W. and THELEN, J.J. A Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1397 – 1419, 2005.

HELM, R. M.; COCKRELL, G.; CONNAUGHTON, C.; SAMPSON, H.A.; BANNON, G.A.; BEILINSON, V., Livingstone D, Nielsen NC, Burks AW et al. A soybean G2 glycinin allergen: Identification and characterization. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, n. 3, p. 205-12, 2000.

HENLEY EC, KUSTER JM. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 48, p. 74-77, 1994.

HERMAN, E. M.; HELM, R.M.; JUNG, R.; KINNEY, A.J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. **Plant Physiology**, v. 132, p. 36-43, 2003.

HERMAN, E. M. Genetically modified soybeans and food allergies. **Journal Experimental Botany**, v. 54, n. 386, p. 1217-1319, 2003.

HOOG, C.L., MANN, M. Proteomics. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 5, p. 267– 293, 2004.

HUANG, H.; KWOK, K.C; LIANG, H.H. Inhibitory activity and conformation changes of soybean trypsin inhibitors induced by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 724-730, 2008.

KRISHNAN, H.B.; NATARAJAN, S.S.; MAHMOUD, A.A. and NELSON, R.L. Identification of Glycinin and β -Conglycinin Subunits that Contribute to the Increased Protein Content of High-Protein Soybean Lines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 1839–1845, 2007.

KUMAR, V.; RANI, A.; SOLANKI, H. E HUSSAIN, S. M. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 188–195, 2006.

LEE, S. H.; PARKA, H.; CHUNA, H.; CHOA, S.; JUNGA H.; CHOA, S.; KIMB, D.;KANGB, M.; LILLEHOJC, H.S. Dietary phytic acid improves serum and hepatic lipid levels in age ICR mice fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research**, v. 27, p. 505-510, 2007.

LIU, K. Soybeans: **chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1999, p. 532.

LÓPEZ, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p. 190-202, 2007.

LORENZ, K.; JANSEN, G. R. Nutrient stability of full fat soy flour and corn-soy blends produced by low-cost extrusion. **Cereal Foods World**, v. 25, n. 4, p. 161- 172, 1980.

LUCAS, B. e SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperatures and hydrolises times on tryptophan determination of pure proteins and foods. **Analytical Biochemistry**, v.109, p.192-197, 1980.

MARTINO, H.S.D. (2001). **Fatores antinutricionais e biodisponibilidade de minerais em soja geneticamente modificada**. 99 f. [Tese]. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. Brasil; 2001.

MATILSKY, DANIELLE K., MALETA, KENNETH, CASTLEMAN, TONY, MANARY, MARK J. Supplementary Feeding with Fortified Spreads Results in Higher Recovery Rates Than with Corn/Soy Blend in Moderately Wasted Children. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 4, p. 773-778, 2009

MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GREBAUT, J.; DE LAA GUERIVIERE, J. F. Formation of amylose-lipid complexes by twin-screw extrusion cooking of manioc starch. **Cereal Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 4-9, 1980.

MONTEIRO, C. A.; BENÍCIO, M.H.D.; KONNO, S.C.; SILVA, A.C.F.; LIMA, A.L.L. E CONDE, W.L. Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil, 1996-2007. **Revista de Saúde Pública**. v. 43, n. 1, p. 35-43, 2009.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados**, v.17, n.48, p.7-20, 2003.

MONTEIRO, M.R.P.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V. E MOREIRA, M.A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitze das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 195-205, 2004.

MONTEIRO, M.R.P.; MOREIRA, M.A.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.A. E PIRES, C.V. Avaliação da Digestibilidade Protéica de Genótipos de Soja com Ausência e Presença do Inibidor de Tripsina Kunitz e Lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.6, n.1, p.99-107, 2003.

MOORE, S.; SPACKMAN, D.H. e STEIN, W.H. Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins. **Analytical Chemistry**., v. 30, p.1185-1190, 1958.

MORAES, R. M. DE. **Montagem e avaliação de um equipamento para desodorização de “leite de soja” por arraste de vapor superaquecido**. [tese]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP. Brasil; 2002.

MORAIS, R.M.A.; JOSÉ, I.C.; RAMOS, F.G.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p.725-729, 2006.

NATARAJAN, S.S.; KRISHNAN, H.B.; KADSHMAN, S. and GARRETT, W.M. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. **Analytical Biochemistry**, v. 394, p. 259–268, 2009.

NATARAJAN, S.S.; XU, C.; BAE, H.; CAPERNA, T.J. and GARRETT, W.M. Characterization of Storage Proteins in Wild (*Glycine soja*) and Cultivated (*Glycine max*) Soybean Seeds Using Proteomic Analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 3114–3120, 2006.

NEUHOFF, V. *et al.* Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. **Electrophoresis**, v. 6, p. 427–448, 1985.

NEWTON, R. P., BRENTON, A. G., SMITH, C. J., DUDLEY E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1449-1485, 2004.

NICOLL, C.S.; RUSSELL, S.M.; MOZART, A. the Great, and the animal rights/liberation philosophy. **FASEB Journal**, v. 5, p. 2888-2892, 1991.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, V. 250, p. 4007, 1975.

OBULESU, M.; SWAMYLINGAPPA, B. Biochemical, functional and nutritional characteristics of soy protein concentrate prepared by thermal processing. **Journal of Food Science and Technology**, v.43, n. 2, p. 161-166, 2006.

OLGUINA, M.C.; HISANOB, N.; D'OTTAVIOB, A.E.; ZINGALEA, M.I.; REVELANTA, G.C.; CALDERARI, S.A. Nutritional and antinutritional aspects of an Argentinian soy flour assessed on weanling rats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v 16, n. 4, p. 441-449, 2003.

ONYANGO, C., HORSTNOETZOLD, H., BLEY, T.; HENLE, T. Proximate composition and digestibility of fermented and extruded fuji from maize-finger millet blend. **Lebensm-Wiss. U.-Technol.**, v. 37, p. 827-832, 2004.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PANIZZI, M. C. C., MANDARINO, J. M. G. Soybean for human consumption: nutritional quality, processing and utilization. In: Tropical Soybean: Improvement And Production. **FAO Plant Production and Protection Series**, v. 43, n. 1, p. 165-170, 1994.

PICOLI, M.E.F.S. **Uma abordagem proteômica na identificação do citocromo P450 em *Prochilodus*scrofa: uma nova ferramenta em ensaios ecotoxicológicos**. [Tese]. Universidade de Campinas. Campinas - SP, Brasil; 2004.

PIPER, E. L. e BOOTE, K. J. Temperature and Cultivar Effects on Soybean Seed Oil and Protein Concentrations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 10, p. 1233-1241, 1999.

PIRES C.V.; OLIVE, M.G.A; ROSA J.C et al. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006.

PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES. 2008/9 — POF. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz. São Paulo: **Instituto Adolf Lutz**, 1985. 533 p.

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, USA, v.123, p. 1.939-1.951, 1993.

RIZZI, C.; GALEOTO, L.; ZOCCATELLI, G.; VINCENZI,S.; CHIGNOLA, R. AND PERUFFO, A.D.B. Active soybean lectin in foods: quantitative determination by ELISA using immobilized asialofetuin. **Food Research International**, v. 36, n. 8, p. 815-821, 2003.

SARMA, A. D., OEHRLE, N. W., EMERICH, D. W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 379, p. 192-195, 2008.

SARWAR G. The protein digestibility-corrected aminoacid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorlydigestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 758-64, 1997.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

SILVA, A.C. De Vargas a Itamar: Políticas e programas de alimentação e nutrição. **Estudos Avançados**, v. 9 (27), P. 87-107, 1995

SINGH, P.; KUMAR, R.; SABAPATHY, S.N.; BAWA, A.S. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 14-28, 2008.

SOUZA, D. A. O Mercado de bebidas em cena. Disponível em: <<http://www.acnielsen.com.br/>>. Acesso em: 27 de setembro de 2006.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. e MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v.30, p.1190-1206, 1963.

STIPANUK MH. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. Philadelphia: **Saunders Company**; 2000.

TAN-WILSON, A.L. Subclassification of soybean Bowman-Birkiso inhibitors. **Journal America Oil Chemistry Society**, v. 65, n. 9, p. 1475-1478, 1988.

TISELIUS, A. XLV. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. **Transactions of the Faraday Society**, v. 33, p. 524-531, 1937

TRAINA, M. S, BREENE, W. M. Composition, functionality and some chemical and physical properties of eight commercial full-fat soy flours. **Journal Food Processing Preservation**, v. 18, p. 229-252, 1994.

TRINDADE, E.A. Proteínas de soja como fonte de nutracêuticos. Revista **RACINE**. V. 62, p. 26-32, 2001.

VASCONCELOS, ILKA M.; MAIA, ANDREA A.B., SIEBRA, ELISÂNGELA A., OLIVEIRA, JOSE´ T.A.; CARVALHO, ANA DE F.F.U. MELO, VÂNIA M.M.; CARLINI, CÉLIA R. E CASTELAR, LUIZ I. DE M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, V. 12, p. 55– 62, 2001.

WAITZBERG, D.L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática clínica**. São Paulo: Editora Atheneu. 2000

WANG, W.; SCALI M.; VIGNANI R.; SPADAFORA A.; SENSI E.; MAZZUCA S.; CRESTI M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2369-2375, 2003.

WILKINS, M. R., SANCHES, J.C., GOOLEY, A.A., APPEL, R.D., HUMPHERY-SMITH, I., HOCHSTRASSER, D.F., WILLIAMS, K.L. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by Genome Should be Identified and How to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1995.

WILLIAMS, I.O.; AGIANG, M.A.; EKPE, O.O.; ALETAN, U.I.; EDET, E.O.; ATANGWHO, I.J. Nutritional quality of first generation quality protein maize diet and its effects on some biological indices of albino wistar rats. **American Journal of Food Technology**, New York, v.4, p.30-35, 2009

WIRIYAUMPAIWONG, S.; SOPONRONNARIT, S.; PRACHAYAWARAKOM, S. Comparative study of heating processes for full-fat soybeans. **Journal of Food Engineering**, v. 65, n. 3, p. 371-382, 2004.

WOBUS, U.; BÄUMLEIN, H.; CONRAD, U.; MÜNTZ, K. & WEBER, H. 2000. Seeds of change. **Meeting Report**, v. 5, n. 12, p. 512-513, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint **WHO / FAO expert consultation**. Serie 916, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malnutrition. Quantifying the health impact at national and local levels. Geneva: **WHO**. World Health Organization; p. 43. 2005

YAMADA, L.T.P.; BARCELOS, M.F.P.; SOUZA, R.V. E LIMA, A.L. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [Glycine max (L.) Merrill]. **Ciência Agrotécnica**, v. 27, n. 2, p. 406-413, 2003.

YILDIZ, FATI. H. Amino Acids, oligopeptides, polypeptides, and proteins. In: Yildiz, Fatih. Advances in Food Biochemistry. **CRC Press Taylor & Francis Group**. New York. p. 51-100, 2010.

ZOIA, W. F.; WANG, S.-H.; SGARBIERI, V. C. Características sensoriais e nutricionais de angus fortificados com diferentes níveis de farinha de soja desengordurada. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 8, p. 49-56, 1997.