

MÁRCIA REGINA PEREIRA MONTEIRO

AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE E DA QUALIDADE PROTÉICA DE
LINHAGENS DE SOJA COM AUSÊNCIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA KUNITZ
E DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

MÁRCIA REGINA PEREIRA MONTEIRO

AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE E DA QUALIDADE PROTÉICA DE
LINHAGENS DE SOJA COM AUSÊNCIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA KUNITZ
E DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 30 de outubro de 2000

Prof^a Maria Goreti de A. Oliveira
(Conselheira)

Prof. Gilberto Paixão Rosado
(Conselheiro)

Prof^a Neuza Maria Brunoro Costa

Prof. Afonso Mota Ramos

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

AGRADECIMENTO

A Jesus, por todas as bênçãos e graças.

À minha mãezinha do céu, pela sua intercessão junto a seu filho Jesus.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da UFV, pelo consentimento para utilização de suas instalações.

Aos professores Maria Goreti de Almeida Oliveira, Neuza Maria Brunoro Costa e Gilberto Paixão Rosado, pelas sugestões apresentadas.

Ao meu marido Ademilson, pelo incentivo e amizade.

A Maria Cristina de Albuquerque Barbosa e Rita Maria Alves de Moraes, pela ajuda e amizade.

Aos funcionários Luiz e Lucinda do Departamento de Veterinária da UFV, pela disponibilidade e colaboração.

Aos estudantes e funcionários do BIOAGRO que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

MÁRCIA REGINA PEREIRA MONTEIRO, filha de José Júlio Pereira e de Adelina de Oliveira Silva, nasceu em Teixeiras, Minas Gerais, em 3 de janeiro de 1971.

Em março de 1989, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o, em janeiro de 1993.

Iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica, na Universidade Federal de Viçosa, em março de 1993, concluindo-o em agosto de 1995.

Ingressou no Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em março de 1996, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em outubro de 2000.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Inibidores de proteases.....	4
2.2. Lipoxigenases de grãos de soja.....	10
2.3. Lectinas.....	13
2.4. Digestibilidade.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Seleção do material genético	19
3.1.1. Determinação da atividade enzimática de LOX 1 e 3.....	21
3.1.2. Análise eletroforética de KTI	22
3.1.3. Detecção qualitativa das lipoxigenases 1 e 3.....	22
3.2. Obtenção da farinha de soja integral.....	23
3.3. Determinação de inibidor de proteases em sementes e farinhas de soja	24
3.4. Detecção da atividade hemaglutinante das sementes e das farinhas de soja.....	29
3.5. Determinação do teor de proteína nas sementes de soja	30
3.6. Caracterização físico-química das farinhas de soja integrais.....	30

3.7. Avaliação biológica das farinhas de soja.....	31
3.8. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS).....	35
3.9. Delineamento estatístico	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Caracterização da matéria prima por SDS-PAGE.....	37
4.2. Caracterização das farinhas com relação a sua composição química centesimal.....	39
4.3. Caracterização das sementes e das farinhas integrais de soja para presença de inibidores de proteases (KTI e BBI).....	39
4.4. Detecção da atividade hemaglutinante	44
4.5. Determinação da qualidade protéica das farinhas de soja.....	47
4.5.1. NPR, NPU e PER.....	47
4.5.2. Digestibilidade <i>in vivo</i>	51
4.6. Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) ..	53
5. RESUMO E CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICE	68

RESUMO

MONTEIRO, Márcia Regina Pereira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2000. **Avaliação da Digestibilidade e da Qualidade Protéica de Linhagens de Soja com Ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das Isoenzimas Lipoxigenases.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Gilberto Paixão Rosado.

As farinhas de soja integrais utilizadas neste trabalho foram obtidas, a partir de grupos de sementes (bulks) derivadas de linhagens que diferem entre si com relação à presença de lipoxigenases (LOX) e/ou inibidor de tripsina Kunitz (KTI). Para essa seleção e confirmação dos genótipos realizaram-se análises de lipoxigenases, de inibidores de tripsina e de quimotripsina. Realizou-se ainda, análise da composição química centesimal para caracterização das farinhas e atividade hemaglutinante nas sementes e nas farinhas de soja derivadas. Constatou-se, através da atividade hemaglutinante, que o tratamento térmico (89°C por 5 minutos) aplicado no processamento das farinhas foi suficiente para inativar as lectinas presentes na soja.

Com o objetivo de avaliar a qualidade protéica e digestibilidade *in vivo* das farinhas de soja, procedeu-se aos ensaios biológicos com ratos, em que foram avaliados o PER (Relação da Eficiência Protéica), NPR (Razão Protéica Líquida), NPU (Utilização Protéica Líquida) e a digestibilidade. Os valores de PER, NPR, NPU para as variedades de soja foram inferiores aos valores

obtidos para caseína, possivelmente em virtude da deficiência da proteína de soja em algum tipo de aminoácido essencial. Para as farinhas sem KTI foram obtidos valores de digestibilidade maiores que para as farinhas com KTI, e esses foram bem próximos aos da caseína. Isto comprova que a eliminação genética do KTI melhora consideravelmente a digestibilidade da proteína de soja. No entanto, essa diferença não refletiu em melhor qualidade protéica dessa variedade, visto que não houve diferença nos valores de PER, NPR e NPU entre as variedades estudadas.

Procedeu-se a determinação da composição aminoacídica das farinhas e cálculo do PDCAAS (Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade) , constatando-se que o aminoácido limitante dessa soja é lisina e não metionina, ao contrário do que aponta a literatura, possivelmente em decorrência do melhoramento genético que levou a essa alteração. Os resultados do PDCAAS não indicaram diferença entre as farinhas sem KTI das farinhas derivadas de linhagens com KTI, como foi observado pelos resultados da digestibilidade *in vivo*.

Conclui-se que a retirada genética do inibidor de tripsina Kunitz melhora significativamente a digestibilidade da proteína de soja, eliminando a necessidade de se empregar altas temperaturas nos produtos de soja visando inativação desse inibidor e, conseqüentemente, evitando o superaquecimento com insolubilização de proteínas, perdas de características funcionais e destruição de alguns aminoácidos.

ABSTRACT

MONTEIRO, Márcia Regina Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2000. **Digestibility and protein quality evaluation from soy strains in absence of Kunitz trypsin and isoenzymes lipoxigenases.** Advisor: Maurílio Alves Moreira. Committee Members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Gilberto Paixão Rosado.

The whole soy flours used in this work were obtained from seed bulks derived from strains differing in relation to presence of lipoxigenases (LOX) and/or Kunitz trypsin (KTI). Analyses for lipoxigenase and trypsin and chemotrypsin inhibition were performed in order to select and confirm the genotypes. Chemical content analysis was also performed so as to characterize the flours and the hemagglutinating activity in the seeds and the derived soy flour. It was observed from that activity that the thermal treatment (89° C for 5 min) on the flour processing was enough to inactivate the lectins present in the soy.

In order to evaluate the *in vivo* digestibility and protein quality for the soy flours, biological tests with rats were performed and from these tests, PER, NPR, NPU and digestibility were evaluated. PER (Protein Efficiency Ratio), NPR (Net Protein Ratio) and NPU (Net Protein Utilization) values were obtained below the values for casein. This result may be due to the deficiency of sulfured amino acids in soy protein. Flours without KTI showed higher values for digestibility than flours with KTI. These values were quite close to the ones for

casein. This indicates that the KTI genetic elimination in soy improves the digestibility for the soy protein a lot. However, this difference did not reflect in better protein quality of this soy strain, since there was no differences in the values of PER, NPR and NPU between the strains.

Amino-acidic content for the flours and PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) values were determined showing that lysine rather than methionine is the limiting amino acid for this soy, different of that pointed by literature, possibly because the genetic enhancements. PDCAAS showed no difference between flours without KTI and the flours derived from KTI strains as it was observed from the *in vivo* digestibility results.

It follows that the genetic withdrawal of Kunitz trypsin inhibitor significantly improves digestibility of soy protein, eliminating the need to deploy high temperatures in soy products to inactivate this inhibitor and, consequently, avoiding overheating with protein insolubilization, loss of functional characteristics and loss of some aminoacids.

1. INTRODUÇÃO

A soja é um dos alimentos básicos consumidos pela população dos países asiáticos, principalmente China e Japão. Nos países ocidentais a soja tem sido cultivada para a produção de óleo comestível, ingredientes para ração animal e ingredientes funcionais para incorporação em alimentos industrializados (ANDERSON e WOLF, 1995).

Segundo TRAINA e BREENE (1994) mais de 95% da soja é utilizada na produção de óleo e farelo. O farelo é utilizado na alimentação animal. Uma pequena porcentagem da soja é processada e usada como ingrediente na alimentação humana na forma de farinhas desengorduradas, flocos, concentrados e isolados. Grão de soja é utilizado na fabricação de extrato hidrossolúvel de soja, na produção de tofu e a farinha desengordurada é utilizada como ingrediente em alimentos formulados como massas, temperos, molhos, sopas, coberturas, bebidas e sobremesas congeladas.

A ação da farinha de soja em alimentos depende das suas características funcionais. Dentre essas destacam-se a 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).

Os principais constituintes da soja são a proteína e o óleo, sendo que o grão de soja contém cerca de 40% de proteína e 20% de óleo em peso seco. 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, oligossacarídeos, fitatos e saponinas (PANIZZI e MANDARINO, 1994).

Os inibidores de proteases representam cerca de 6% das proteínas presentes nos grãos de soja (BRANDON et al, 1993). Existem evidências que os inibidores de proteases exercem efeitos anticarcinogênicos (BURNS, 1987; HAWRYLEWICZ et al, 1995). No entanto, o uso em cobaias de produtos derivados de soja contendo inibidores ativos, por tempo prolongado, promoveu desenvolvimento de hiperplasia nodular pancreática (aumento do número de células) e adenomas celulares (tumor benigno) (BRANDON et al, 1988). Os inibidores de proteases de soja são constituídos pelo inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk (BBI) (STAHLHUT e HYMOWITZ, 1983). Cerca de 80% da inibição da atividade triptica de grãos de soja é causada pela ação do KTI (BRANDON et al, 1987).

Apesar da soja possuir um bom valor nutritivo, seus produtos sofrem restrições por parte dos consumidores ocidentais, devido ao sabor característico denominado “beany flavor” (RACKIS et al, 1979). O “beany flavor” é originado da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração protéica. Estes compostos são produtos finais de uma série de reações que se inicia com a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados, catalisada por lipoxigenases (LOX). Estas enzimas constituem cerca de 1% do total de proteínas presentes no grão de soja (AXELROD, 1981).

Produtos de soja requerem tratamento térmico para melhorar seu valor nutritivo, o que é alcançado, em parte, pela inativação dos inibidores de proteases. Porém, o tratamento térmico não é suficiente para inativação completa desses inibidores. Tem sido demonstrado que pode ser encontrada atividade residual de 10 a 15% de inibição de proteases em produtos de soja, mesmo após tratamento térmico (BRANDON et al, 1991). BRANDON et al (1993) relatam que certos grupos da população podem estar ingerindo cerca de 10 mg de inibidores de proteases ativos por dia. Esta quantidade pode ser biologicamente significativa. Segundo SAVAGE et al (1995), a autoclavagem e outras condições de tratamento térmico, utilizados para inativação dos inibidores, podem destruir aminoácidos importantes como cisteína, arginina e lisina. O superaquecimento pode, além de diminuir o valor nutricional da

proteína, afetar a funcionabilidade desta no alimento, por diminuir a solubilidade e essa está diretamente relacionada com a capacidade de formar emulsão, formação de espuma, gelatinização e viscosidade.

Uma forma de resolver o problema dos inibidores e a consequência do tratamento térmico elevado sobre a qualidade da proteína seria a eliminação genética desses na soja. O programa de melhoramento genético da qualidade da soja da UFV, já obteve diversas linhagens promissoras por meio de retrocruzamentos auxiliado por microanálises bioquímicas. Essas linhagens apresentam, além da ausência completa das enzimas lipoxigenases, ausência do inibidor de protease Kunitz.

O objetivo geral do presente trabalho foi o de avaliar a digestibilidade e qualidade protéica de farinhas integrais obtidas de linhagens de soja que diferem com relação à presença do inibidor de tripsina Kunitz e/ou lipoxigenases.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases são encontrados numa grande variedade de plantas, como leguminosas, gramíneas e solanáceas. Os mais estudados são os inibidores de proteases presentes nas leguminosas, principalmente, na soja (RICHARDSON, 1977).

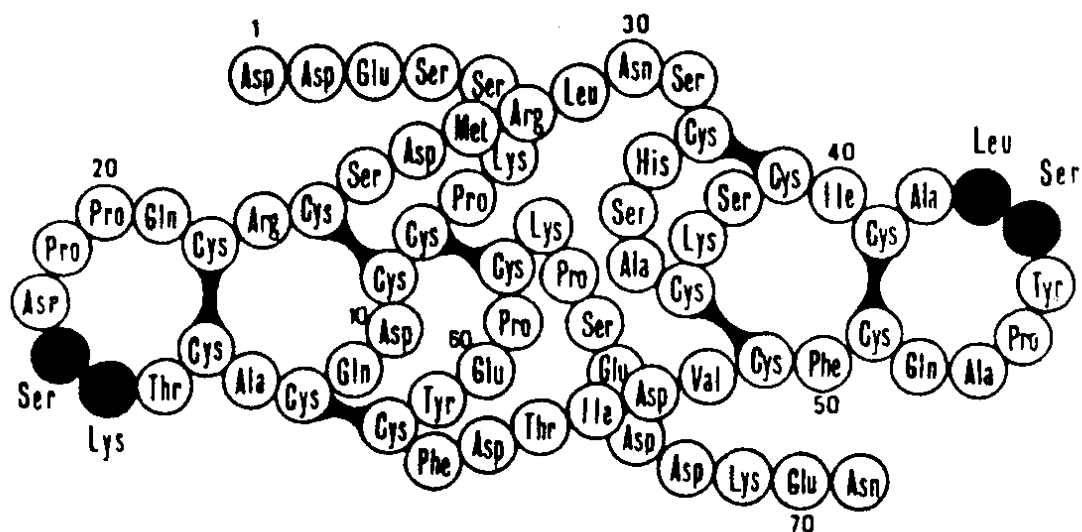
Um possível papel fisiológico desempenhado pelos inibidores de proteases em plantas estaria relacionado com a proteção da planta ao ataque de insetos e de fungos (RYAN, 1981). Danos causados por insetos ou danos mecânicos resultam num acúmulo localizado e sistêmico de inibidores de proteases em folhas de plantas de tomate, tabaco e alfafa (RYAN, 1981).

Os inibidores de protease de grãos de soja estão dentro de duas classes: (1) aqueles que apresentam massa molecular aproximadamente 20.000 daltons, com duas pontes de enxofre, com especificidade para tripsina e (2) aqueles que apresentam massa molecular de aproximadamente 8.000 daltons, contendo sete pontes de enxofre, com capacidade para inibir tanto a tripsina quanto a quimotripsina em sítios de ligação independentes. O primeiro é conhecido como inibidor Kunitz e o segundo como inibidor Bowman-Birk. Isoformas desses dois tipos de inibidores têm sido purificadas e caracterizadas, mostrando diferenças mínimas na sequência de aminoácidos e especificidade pela enzima (LIENER, 1994).

2×10^{-10} M. Ao contrário, Ti^b apresenta um valor mais alto, ou seja, em torno de 1×10^{-8} M, e portanto com menor afinidade pelo centro ativo da enzima (TAN-WILSON et al, 1985).

O complexo enzima-inibidor não se dissocia facilmente devido a forte ligação do inibidor com a enzima. Apesar da forte associação do inibidor com a enzima, a região de contato entre o inibidor e a tripsina se dá em apenas 12 resíduos de aminoácidos. Os 12 resíduos de aminoácidos envolvidos no contato entre o inibidor e a enzima estão dispostos numa alça saliente. Um grupo R específico do sítio reativo do inibidor é reconhecido pelo sítio de especificidade. O oxigênio da carbonila do inibidor é piramidalizado, como se fosse o substrato, e um intermediário tetraédrico é formado quando o oxigênio da serina ataca o grupo carbonila do inibidor. O complexo resultante se ajusta firmemente e a água é excluída do sítio ativo da enzima impedindo a hidrólise e liberação do inibidor (RACKIS et al, 1986).

Quanto ao inibidor Bowman-Birk (BBI), a caracterização destes na soja não tem sido feita de forma tão extensiva. Contudo, cinco isoformas desses inibidores já foram isoladas e caracterizadas. Estas são designados de PI-I a PI-V. O BBI (PI-I) possui 71 resíduos de aminoácidos e sua composição aminoacídica pode ser vista na Figura 2. As diferentes isoformas possuem diferentes massas moleculares e acredita-se que sejam originadas por proteólise após a síntese (TAN-WILSON, 1988; BRANDON et al, 1988). A seqüência aminoacídica próxima aos sítios reativos é bem conservada entre as formas dos inibidores (LIENER, 1994).



Fonte: LIENER (1994).

Figura 2: Seqüência de aminoácidos do inibidor Bowman-Birk.

A molécula do BBI possui dois sítios de ligação independentes: um localizado na Lys (16)-Ser (17) (sítio onde se liga a tripsina) e um outro sítio situado na Leu (43)-Ser (44) (sítio de ligação da quimotripsina) (RACKIS et al, 1986; TAN-WILSON, 1988).

Os inibidores de proteases compreendem cerca de 6% das proteínas totais dos grãos de soja. Em termos percentuais, a soja contém três vezes mais KTI do que BBI (TAN-WILSON, 1988).

Quanto à estabilidade térmica dos inibidores, o BBI purificado é mais estável do que o KTI. Portanto, acreditava-se que a atividade residual de inibição de proteases encontrada nos produtos de soja fosse devida ao BBI. Atualmente, com técnicas analíticas que diferenciam os inibidores, verificou-se que o BBI é mais inativado do que o KTI, quando estes estão presentes em produtos de soja (BRANDON et al, 1991). A maior inativação do BBI, talvez seja em virtude da formação de pontes de enxofre entre resíduos de cisteína da molécula do BBI com cisteína da matriz protéica da soja. Esta reação é acelerada pelo calor, provavelmente porque o calor aplicado ao alimento acelera a formação dessas pontes de enxofre (LIENER, 1995).

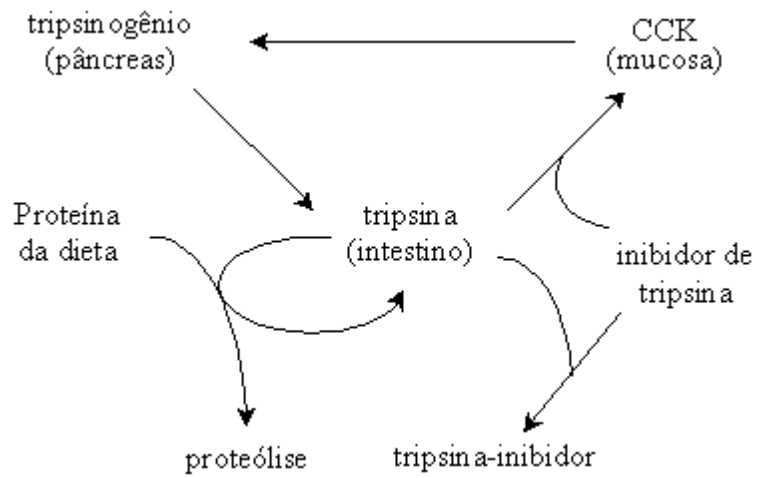
Segundo LIENER (1994), o valor nutritivo da proteína da soja,

oferecida a ratos, é melhorada quando esta é submetida ao tratamento térmico. A ingestão de soja crua acarreta alterações na digestão e absorção de proteínas, causando hipertrofia seguida de hiperplasia das células exócrinas do pâncreas em animais experimentais (DOEL et al, 1981; ROEBUCK, 1987; LIENER, 1991).

Com o aumento crescente do uso da soja e seus produtos protéicos na alimentação humana, torna-se importante avaliar os efeitos fisiológicos e nutricionais da ingestão de preparações com soja. Produtos de soja disponíveis no mercado retêm de 5 a 20% da atividade inibitória de tripsina (LIENER, 1994).

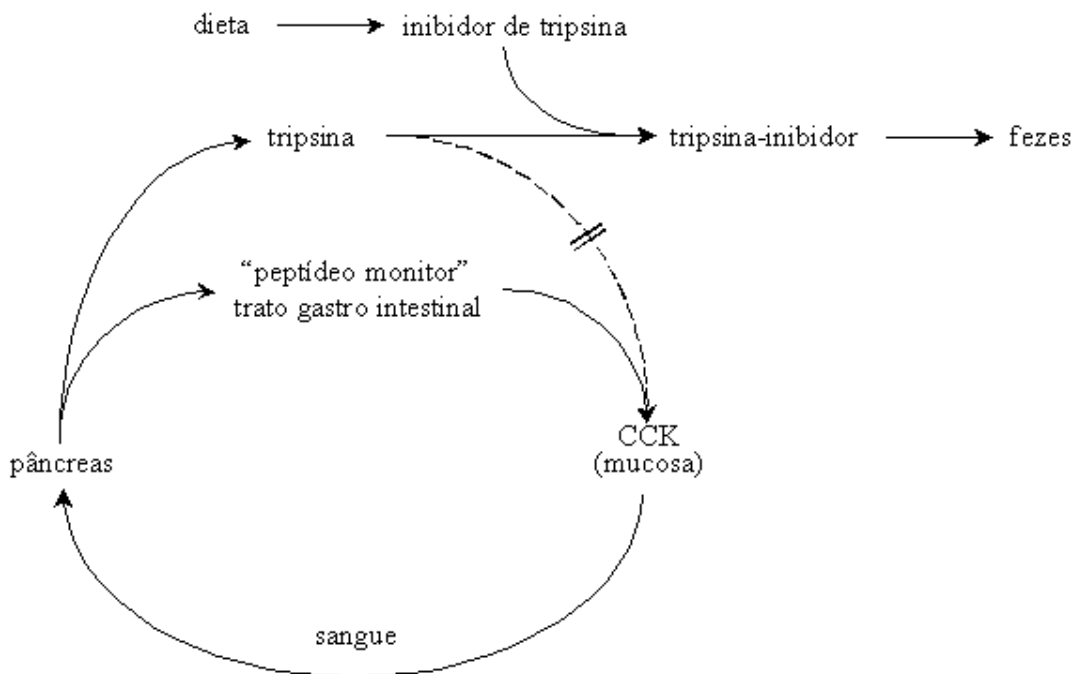
Para explicar o mecanismo pelo qual os inibidores de proteases induzem mudanças fisiológicas e histológicas do pâncreas, LIENER (1995) propôs o mecanismo “feedback” negativo no controle da secreção pancreática de tripsina. Neste mecanismo quando a quantidade de tripsina livre diminui no intestino, o pâncreas aumenta a síntese e secreção da enzima (Figura 3). Vários estudos têm demonstrado que o agente mediador é o hormônio colecistoquinina (CCK). O hormônio CCK é liberado pelas células endócrinas do jejuno sempre que o nível de tripsina é reduzido (LIENER, 1995; LU et al, 1995).

Até recentemente não se sabia como a inativação da tripsina pelo inibidor estimulava a produção de CCK. Já foi isolado de suco pancreático de ratos, um “peptídeo monitor”, ou seja, um peptídeo sensível à tripsina, que contém 61 resíduos de aminoácidos. Este peptídeo age como um sinal para liberação do hormônio CCK na mucosa intestinal. A inativação deste peptídeo pela tripsina leva ao bloqueamento da liberação do hormônio CCK, porém, quando a tripsina está complexada com o inibidor, o peptídeo está livre para induzir a liberação de CCK (Figura 4). O efeito é o aumento do pâncreas com o aumento da secreção de enzimas digestivas (LIENER, 1994).



Fonte: LIENER (1994).

Figura 3 – Mecanismo de “feedback” negativo no controle da secreção de tripsina pelo pâncreas.



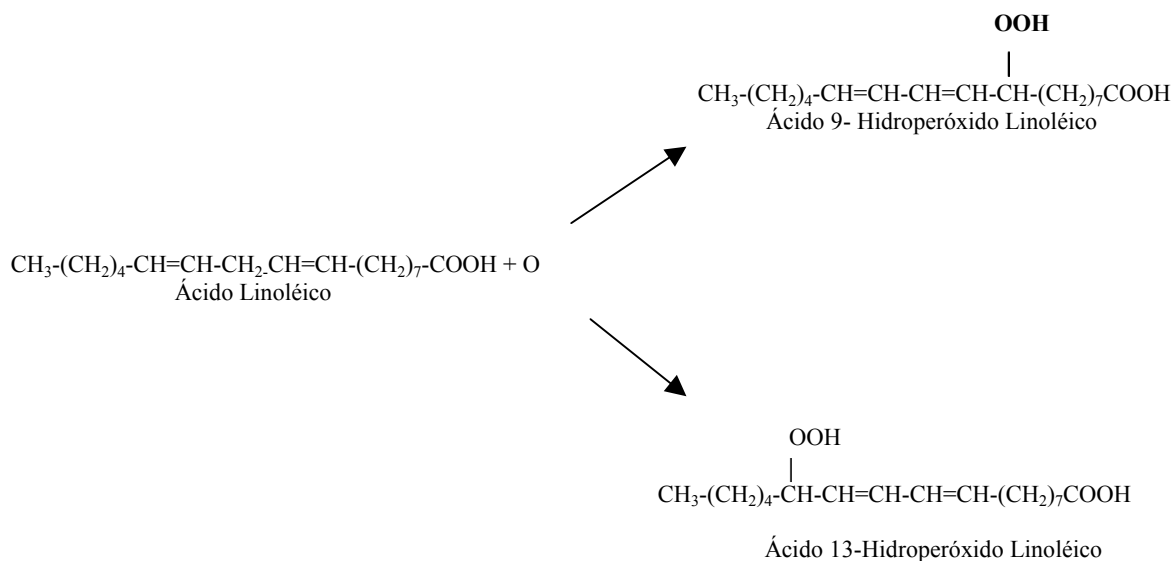
Fonte: LIENER (1994).

Figura 4 – Ação do “peptídeo monitor” no mecanismo de “feedback” negativo.

CALAM et al (1987) estudaram os efeitos dos inibidores de proteases de soja em humanos. Esses estudos foram realizados com homens de 24 a 37 anos de idade que ingeriam uma dieta contendo farinha de soja crua alternada com dieta contendo farinha de soja tratada termicamente. Os teores de CCK no plasma sanguíneo desses indivíduos foram analisados. Observou-se que o teor de CCK era maior quando os indivíduos recebiam dieta contendo farinha de soja crua do que quando ingeriam dieta contendo farinha de soja tratada termicamente.

2.2. Lipoxigenases de grãos de soja

Lipoxigenases (linoleato oxigênio oxidoreductase) são oxireductases que catalisam a adição de oxigênio molecular a moléculas poliinsaturadas contendo o grupo cis,cis-1,4-pentadieno formando hidroperóxidos. Essas isoenzimas contêm ferro não-heme, o qual é necessário para atividade enzimática (BUNKER et al, 1995 e MARCZY et al, 1995). Este sistema (cis,cis-1,4-pentadieno) comumente ocorre nos ácidos graxos di- e tri-insaturados, como o ácido linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3), os quais são os principais substratos para as lipoxigenases de plantas superiores. O ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo na maioria dos tecidos de plantas, e o ácido linoléico é encontrado em maior concentração em sementes, sendo o mais utilizado como substrato nas determinações de atividade de lipoxigenases (HILDEBRAND et al, 1988). Nas sementes de soja, o ácido linoléico representa em torno de 57% dos ácidos graxos, enquanto que o ácido linolênico corresponde 7 a 9% (KITAMURA et al, 1983). Os produtos da reação das lipoxigenases sobre o ácido linoléico são os ácidos 9- e 13- hidroperóxido linoléico (Figura 5).



Fonte: SIEDOW (1991).

Figura 5 - Reação primária catalisada pela lipoxigenase usando ácido linoléico (ácido cis,cis-9,12-octadecadienóico) como substrato: indicando os dois possíveis produtos da reação: ácido 9- e 13- hidroperóxido linoléico.

Com relação ao papel fisiológico dessas enzimas em plantas, FARMER e RYAN (1992) relatam que em folhas de tomate os hidroperóxidos, produtos da atuação das lipoxigenases sobre o ácido linolênico, são considerados precursores de ácido jasmônico e esse ativa a transcrição dos genes responsáveis pela síntese de inibidores de proteases. Os inibidores de proteases teriam funções de defesa da planta contra ataque a insetos. Tem sido proposto que ácido jasmônico é indutor da síntese de inibidores de protease em folhas de tomate, tabaco e alfafa. Assim, tem sido proposto que uma das funções fisiológicas de lipoxigenases está relacionada com a síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimentos causados por insetos e patógenos nos mecanismos bioquímicos de defesa da planta .

Um dos maiores obstáculos do uso da soja como alimento é o desenvolvimento do flavor “grassy-beany” e gosto amargo. Constituintes voláteis produzidos pela hidroperoxidação de ácidos graxos catalisada pelas lipoxigenases presentes na soja, são responsáveis por esse “off-flavor (FURUTA et al, 1996). Os compostos voláteis são constituídos de aldeídos e cetonas, onde o principal composto carbonílico volátil que limita a utilização de

produtos de soja é o hexanal (MARCZY et al, 1995). As enzimas lipoxigenases e hidroperóxido-liase são responsáveis pela formação de hexanal em produtos de soja (HILDEBRAND et al, 1989; MARCZY et al, 1995).

Quando os grãos de soja são triturados, as isoenzimas lipoxigenases entram em ação rapidamente, catalisando a reação de oxidação dos ácidos graxos insaturados e, conseqüentemente a formação de hexanal (FURUTA et al, 1996). Um número grande de métodos empíricos para prevenir, remover ou mascarar esse flavor desagradável dos produtos de soja tem sido utilizados, dentre eles o tratamento térmico, que tem como desvantagem a redução da solubilidade das proteínas (ZOUGARI et al, 1995). Dessa forma, a eliminação genética de lipoxigenase de sementes de soja tem se destacado como uma alternativa genética para diminuir o “off-flavor” dos produtos de soja, tendo a vantagem da não desnaturação das proteínas (ZOUGARI et al, 1995; FURUTA et al, 1996).

As lipoxigenases de sementes de soja, bastante conhecidas já em suas formas purificadas (AXELROD et al, 1981), as quais foram designadas como lipoxigenases 1, 2 e 3. As lipoxigenases de sementes de soja (LOX 1, 2 e 3), diferem com relação à especificidade pelo substrato, pH ótimo para atividade catalítica, ponto isoelétrico e estabilidade térmica (MARCZY et al, 1995; FURUTA et al, 1996; SUDA et al, 1995), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Principais propriedades das isoenzimas lipoxigenases de sementes de soja

Propriedades	Lipoxigenase-1	Lipoxigenase-2	Lipoxigenase-3
PM	94.000	97.000	96.000
Resíduos de aas	838	865	859
PI	5,68	6,25	6,15
PH (ótimo)	9,5	6,5	5,0-9,0
Produto da reação	95:5 (13-HPO:9-HPO)	50:50 (13-HPO:9-HPO)	65:35 (9-HPO:13-HPO)
Especificidade	Ácidos graxos ionizados	Ácidos graxos não-ionizado	Ácidos graxos não-ionizados
Km μ M (ácido linoléico)	85	16	340

As três isoenzimas são proteínas globulares, solúveis em água e consistem de uma única cadeia polipeptídica (SIEDOW, 1991). Todas mostram um alto grau de homologia (no mínimo 70% na sequência de aminoácidos) sendo que as lipoxigenases 1 e 2 apresentam homologia de 81% na sequência de aminoácidos (HILDEBRAND et al, 1988).

Estudos da estrutura da lipoxigenase 1 com raio x identificou que esta enzima contém 2 domínios. O domínio 1 contém 146 resíduos de aminoácidos na parte amino-terminal. Este domínio possui 8 fios polipeptídicos com estrutura β -cilíndrica antiparalela. Esta porção da enzima pode ser removida por proteólise sem perda da atividade (NELSON e SEITZ, 1994). O domínio II consiste de 693 resíduos de aminoácidos e contém o sítio ativo da enzima. Este tem uma estrutura complexa com 23 α -hélices e 2 estruturas β cilíndricas antiparalelas. O domínio catalítico contém duas cavidades, sendo a cavidade I (hidrofóbica) mais curta e por isso mais próxima ao ferro, o que atrai o dioxigênio e a cavidade II mais comprida e é onde se liga o substrato (NELSON e SEITZ, 1994).

A estrutura ao redor do átomo de ferro é controversa. Segundo NELSON e SEITZ (1994) essas ligações são compostas por His₄₉₉, His₅₄₀, His₆₉₀ e no carboxi-terminal Ile₈₃₉. Com relação ao mecanismo da reação envolvendo o átomo de ferro, duas hipóteses têm sido sugeridas. A primeira envolve a ativação pelo produto, no qual o produto 13-hidroperóxido é requerido para ativação da enzima promovendo a oxidação do íon ferroso (Fe^{+2}) a íon férrico (Fe^{+3}). Neste modelo somente a enzima contendo a forma férrica seria ativa. No segundo modelo as duas formas, ou seja, contendo íon ferroso e férrico seriam ativas e seriam inibidas pela ligação do substrato a outro sítio não-catalítico (NELSON e SEITZ, 1994).

2.3. Lectinas

LIS e SHARON (1981) observaram que proteínas extraídas de certas plantas tinham capacidade de aglutinar eritrócitos. Estas proteínas extraídas de “Jack bean” foram denominadas de concanavalina A. Esses mesmos autores

sugeriram que a aglutinação promovida pela concanavalina A pode ser consequência da reação da proteína com carboidratos na superfície dos eritrócitos.

Segundo HERZIG et al (1997), lectinas são glicoproteínas que têm capacidade de reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos. Elas são usualmente detectadas pela suas capacidade de aglutinar eritrócitos, mas podem agregar outras células.

Dentre as lectinas de plantas as mais estudadas são as lectinas dos grãos de leguminosas. Essas lectinas são glicoproteínas constituídas de subunidades com massa molecular na faixa de 25 a 35 KDa organizadas em dímeros ou tetrâmeros. As lectinas dos grãos de leguminosas correspondem a 10% do total de proteínas das sementes. As lectinas acumulam nos vacúolos dos cotilédones e são degradadas durante a germinação das sementes. Lectinas também são encontradas em outras partes da planta como folhas, caule, raízes e casca, porém em menor quantidade que nas sementes (SPILATRO et al, 1996).

Lectinas de grãos de soja “SBA” (soybean agglutinin) são glicoproteínas de 120 KDa contendo quatro subunidades idênticas, sendo que cada subunidade é capaz de se ligar especificamente a N-acetil-D-galactosamina ou D-galactose (JORDINSON et al, 1996). Essas proteínas são consideradas um dos fatores responsáveis pelo baixo valor nutricional de soja crua. SBA pode subsistir à passagem pelo intestino e se ligar aos enterócitos da mucosa do intestino delgado. Podem ser endocitadas pelos enterócitos e serem liberadas na circulação sistêmica, tornando-se tóxica para muitos animais (GRANT et al, 1997; BENJAMIN et al, 1997). Tem sido sugerido que a ligação das lectinas de soja nas paredes da mucosa intestinal resulta em danos às células do epitélio intestinal, formando uma “barreira” na mucosa que promove decréscimo na absorção de nutrientes (VIOLA, 1999).

As lectinas diminuem a disponibilidade dos aminoácidos da dieta em função da menor área de absorção no intestino devido a lesões na mucosa. Dessa maneira, assim como para os inibidores de tripsina, o tratamento pelo calor, é o método mais freqüentemente usado para reduzir a atividade das lectinas nos grãos de soja. Os resultados têm mostrado que as lectinas são mais sensíveis ao calor do que os inibidores de proteases (VIOLA, 1999).

Anormalidades na secreção do hormônio colecistoquinina (CCK) estão relacionadas com várias doenças como pancreatites e câncer do pâncreas (CALAM et al, 1987). Prolongadas e excessivas liberações de CCK levam ao aumento do pâncreas e pode promover neoplasias pancreáticas. Este efeito foi relatado pela primeira vez em animais que ingeriam grãos de soja crua e foi inicialmente atribuído à presença de inibidores de tripsina, que interferem no mecanismo de “feedback” da liberação do CCK pelo pâncreas. Tem sido demonstrado que SBA estimula a liberação de CCK e proteases pelo pâncreas em ratos (JORDINSON et al, 1996). Além disso, ratos ingerindo SBA por tempo prolongados desenvolvem hipertrofia pancreática (GRANT et al, 1989). No entanto, os mecanismos que estimulam a liberação do CCK pela SBA ainda não foram elucidados (JORDINSON et al, 1998).

Segundo JORDINSON et al (1996), ratos alimentados com farinha de soja crua desenvolveram hipertrofia pancreática, levando ao aparecimento de nódulos hiperplásicos, adenomas e carcinomas. Este efeito anteriormente era atribuído somente aos inibidores de proteases presentes na soja crua, porém GRANT et al (1989) mostraram que a administração de inibidor de tripsina na forma pura exerce menos efeito sobre o aumento da liberação de CCK em ratos do que administração de quantidades equivalentes de farinha de soja crua. Isso sugere que farinha de soja crua além de possuir inibidor de proteases também possui outros fatores que estimulam a liberação de CCK que, possivelmente, são as lectinas.

JORDINSON et al (1996) observaram que lectinas quando administrada a ratos, na forma pura ou na forma de farinha de soja tratada termicamente, não exercem efeito sobre a liberação de CCK. Porém, quando ela é oferecida na dieta de ratos na forma de farinha de soja crua, ocorre aumento da secreção de CCK nesses animais. Esse aumento de secreção do CCK é justificado pela presença de inibidores de proteases e lectinas na farinha de soja crua.

Tratamento térmico de 120°C por 30 minutos anula o efeito dos fatores antinutricionais presentes na farinha de soja crua sobre a liberação de CCK e sobre o pâncreas, através da destruição da lectina bem como dos inibidores de proteases (CALAM et al, 1987). No entanto, cerca de 10 a 20 % da atividade dos inibidores de proteases permanece após o tratamento térmico,

possivelmente devido ao inibidor Bowman-Birk que é mais resistente ao calor (KROGDAHL e HOLM, 1981).

DOUGLAS et al (1999) compararam, em experimentos com frangos, o valor nutricional de farelos de soja de linhagens sem lectina em comparação com linhagens sem o inibidor de tripsina Kunitz. Neste estudo foi avaliado ganho de peso e digestibilidade verdadeira, utilizando-se grãos de soja crua e processados termicamente. Demonstrou-se que o valor nutricional da soja crua sem lectina é superior ao da soja crua convencional, mas é inferior ao da soja crua sem inibidor Kunitz e ao da soja convencional tratada termicamente.

2.4. Digestibilidade

A qualidade da proteína refere-se à sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais e nitrogênio não-essencial, para fins de síntese protéica. Isso pode ser avaliado pela composição aminoacídica e, também, pela digestibilidade da proteína (BLANCO e BRESSANI, 1991). Para a síntese de proteína é necessário que todos os aminoácidos estejam presentes, simultaneamente, e em proporções adequadas, e que, nesse momento, todas as exigências bioquímicas e energéticas do processo tenham sido satisfeitas (TAGLE, 1981).

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fração do nitrogênio ingerido que o animal absorve. O nitrogênio absorvido é obtido pela diferença entre o nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes. Considera-se a digestibilidade, assim calculada, como aparente, por não levar em conta o nitrogênio eliminado nas fezes como resultado de descamação do tubo digestivo, dos sucos e das secreções da flora intestinal, que se constituem em perdas inevitáveis de nitrogênio (TAGLE, 1981). Assim, para determinar a digestibilidade verdadeira, é necessário corrigir a quantidade de nitrogênio fecal excretado, quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (FAO, 1991).

O conceito de qualidade protéica continua sendo, essencialmente, o mesmo como definido por MITCHEL (1923) que é a quantidade de nitrogênio que o organismo é capaz de reter a partir da proteína consumida. BODWELL

et al (1980) usaram digestibilidade *in vitro* para estimar a digestibilidade verdadeira de diversas fontes de proteínas. Para a maior parte das fontes estudadas, houve uma boa correlação ($r = 0,90$) quando se comparou a digestibilidade *in vitro* com a digestibilidade verdadeira determinada em ratos.

Para avaliar a qualidade nutricional de uma proteína é importante conhecer a sua composição aminoacídica e a biodisponibilidade dos aminoácidos presentes nessa proteína. A biodisponibilidade dos aminoácidos de uma proteína é medida pela percentagem da proteína ingerida que foi absorvida, através da digestibilidade e dos índices de qualidade protéica que medem quanto dos aminoácidos absorvidos vão ser utilizados para síntese protéica.

A digestibilidade das proteínas é considerada uma condicionante de sua qualidade. Os alimentos de origem animal apresentam maior digestibilidade que os de origem vegetal. O fato dos alimentos de origem animal não conterem fibra alimentar e fatores antinutricionais faz com que a velocidade de trânsito intestinal seja mais lenta e, em consequência, obtenha-se maior absorção dos nutrientes (HERNANDEZ et al, 1984).

Digestibilidade protéica é definida como sendo a porcentagem da proteína ingerida que vai ser absorvida. Isso está relacionado com biodisponibilidade de aminoácidos. Digestibilidade da proteína é o principal índice de qualidade protéica, pois, um dado aminoácido pode estar presente na proteína, mas não estar necessariamente disponível para o organismo. Em outras palavras, proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo sem serem digeridas pelo mesmo. Vários fatores têm sido identificados que interferem na digestibilidade, dentre esses se inclui a presença de componentes biologicamente ativos, tratamento térmico e estrutura química da proteína. Esses fatores afetam a digestibilidade da proteína diminuindo a hidrólise da proteína, tornando os aminoácidos menos disponíveis para serem absorvidos pelo organismo (LIU, 1997).

Os inibidores de proteases presentes na soja crua são considerados os principais fatores responsáveis pela diminuição da digestibilidade dessa proteína, pois estes inibem a ação das enzimas tripsina e quimotripsina sobre a hidrólise das proteínas da dieta. Este efeito é evidenciado pela relação entre o aumento da qualidade protéica, medida pelo PER, em ratos alimentados com

soja tratada termicamente, cujos inibidores de proteases foram destruídos (LIU, 1997).

Embora os efeitos nutricionais dos inibidores de proteases sejam bastante conhecidos em ratos, em humanos persiste obscura a relação da qualidade da proteína e os níveis de inibidores presentes (LIENER, 1994). Primeiramente, tem sido sugerido que proteínas de soja na forma natural ou não desnaturada são mais resistentes ao ataque enzimático do que a proteína desnaturada pelo calor (LIENER, 1994).

Segundo KROGDAHL e HOLM (1981), os inibidores de proteases de grãos de soja são inativados por digestão com pepsina ou quando incubados com suco gástrico humano. Cerca de 80% da atividade do inibidor de tripsina Kunitz e 23% da atividade do inibidor Bowman-Birk desapareceram pela digestão com pepsina, quando esses inibidores, na forma purificada, foram incubados com suco gástrico humano.

LIU (1997) observou que existe uma variação significativa na digestibilidade da proteína de soja em humanos de acordo com o alimento de soja. Soja tostada 78%, natto (soja cozida fermentada com *Bacillus natto*) 90%, tofu resfriado 91%, grãos de soja cozidos 92%, tofu congelado 93%, yuba (película que se forma na superfície do leite de soja quando esse é fervido) 100% de digestibilidade. A proteína de yuba é desnovelada, tem uma estrutura estirada por meio de ligações hidrofóbicas com lipídeos. Concluiu-se que a conformação das proteínas nos produtos de soja pode exercer um importante papel na digestibilidade destas (LIU, 1997).

Outras substâncias biologicamente ativas presentes na soja, como fenóis e fitatos, são também conhecidas por reduzir a qualidade da proteína. RITTER et al (1987) relataram que a redução de compostos fenólicos e fitatos em isolado protéico de soja torna a proteína mais digerível que o controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG.

3.1. Seleção do material genético

Neste trabalho foram usados grupos de sementes (bulks) de linhagens de soja (*Glycine max (L.) Merrill*) na geração RC1F5 (geração F5 do primeiro ciclo de retrocruzamento) do cruzamento entre linhagens derivadas da variedade Itamarati com ausência completa de lipoxigenase (LOX⁻) e a linhagens derivadas da variedade Itamarati com ausência completa do inibidor de tripsina kunitz (KTI⁻). Do cruzamento dessas linhagens foi obtida a geração F1. Em seguida, foram realizados dois ciclos de autofecundação e obtida a geração F3. Sementes F3 foram analisadas para LOX (pela determinação da atividade enzimática) e para KTI (por eletroforese em gel de poliacrilamida) com o objetivo de selecionar os seguintes genótipos: (a) linhagens com ausência completa de LOX e KTI (LOX⁻ KTI⁻), (b) linhagens com ausência completa de LOX e presença de KTI (LOX⁻ KTI⁺), (c) linhagens com presença de LOX e ausência de KTI (LOX⁺ KTI⁻) e (d) linhagens com presença de LOX e

presença de KTI (LOX⁺ KTI⁺). As sementes selecionadas foram novamente multiplicadas, obtendo-se a geração F4. Nas sementes oriundas de plantas F4 foram feitos testes colorimétricos e eletroforese em gel de poliacrilamida com objetivo de confirmar os genótipos das linhagens. Sementes das plantas F4 foram multiplicadas no campo. Portanto, sementes RC1F5 foram utilizadas para a confecção dos "bulks" conforme mostrado no fluxograma na Figura 6.

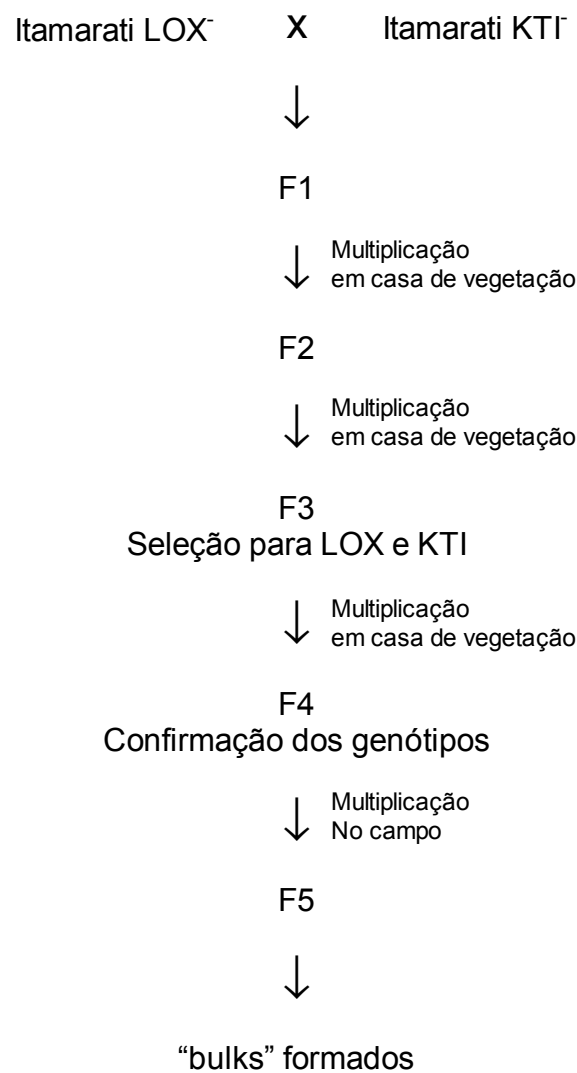


Figura 6 – Fluxograma de obtenção do material genético utilizado no presente trabalho para preparo das farinhas de soja.

Para obtenção dos quatro genótipos citados acima foram realizadas análises de atividade enzimática de LOX 1 nas sementes RC1F3 para

identificação de sementes homozigotas dominantes e recessivas para LOX1.

Nas sementes homozigotas dominantes e recessivas para LOX1 foram feitas determinação da atividade enzimática para LOX 3. Foram identificadas as sementes homozigotas dominantes e recessivas para LOX 3. Uma vez selecionadas as sementes homozigotas dominantes e recessivas para LOX 1 e 3, o próximo passo foi a análise de KTI nestas sementes por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida. Com este procedimento foram selecionadas sementes de cada um dos quatro genótipos (a) LOX⁻ KTI⁻, (b) LOX⁻ KTI⁺, (c) LOX⁺ KTI⁻ e (d) LOX⁺ KTI⁺. Nas sementes RC1F4 foram realizados testes colorimétricos para LOX e análise eletroforética em géis de poliacrilamida para KTI, com objetivo de confirmar os genótipos previamente selecionados.

As sementes RC1F3 foram plantadas na casa de vegetação em março/98 e as sementes RC1F4 colhidas em agosto/98. Essas sementes RC1F4 foram plantadas no campo para multiplicação em setembro/98 e as sementes RC1F5 colhidas em março/99. Sementes RC1F5 de cada um dos quatro “bulks”, que distinguem entre si com relação à presença de LOX e/ou KTI, foram processadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 6 para obtenção das farinhas integrais derivadas. Essas farinhas foram usadas em dietas de ratos para avaliar o valor nutritivo das linhagens, por meio da determinação da sua qualidade protéica e digestibilidade “*in vivo*”.

3.1.1. Determinação da atividade enzimática de LOX 1 e 3

A atividade de LOX foi determinada em sementes para seleção inicial das linhagens na geração RC1F3. Para isto, 10 mg foram retiradas de sementes e maceradas em gral, previamente mantido em freezer “over night” para manter a atividade da lipoxigenase, e homogeneizadas com 600 µL de tampão Tris 60 mM pH 8,2, contendo CaCl₂ 15 mM e sacarose 13% (p/v). O homogenato foi centrifugado a 13.600 x g por 20 minutos a 4°C para posterior utilização do sobrenadante (extrato enzimático).

As atividades de LOX 1 e 3 foram determinadas espectrofotometricamente de acordo com OLIVEIRA et al (1998). A

determinação da atividade dessas enzimas foi realizada medindo-se a absorvância, após 2 minutos, a 234 e 280 nm para LOX1 e 3, respectivamente. Para LOX 1, as amostras eram constituídas de 1 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 9,5, 6 µL de linoleato de sódio 10 mM e 2,5 µL do extrato enzimático. Para LOX 3, as amostras eram constituídas de 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8, 35 µL de linoleato de sódio 10 mM e 15 µL do extrato enzimático.

3.1.2. Análise eletroforética de KTI

As sementes homozigotas dominantes e recessivas para LOX foram analisadas para KTI por eletroforese em géis de poliacrilamida. Para isso, foram utilizados géis de poliacrilamida contendo SDS, com base no sistema descontínuo descrito por LAEMMLI (1970). A separação das proteínas foi realizada em um sistema que envolveu dois géis: (a) O gel de concentração contendo 6% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,15 M, pH 6,8, e 0,1 % de SDS. (b) O gel de separação contendo 14% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,9 M, pH 8,8, e 0,1 % de SDS. A corrida do gel foi realizada a 120 Volts por 4 horas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,3, glicina 0.192 M, contendo 0,1% SDS.

3.1.3. Detecção qualitativa das lipoxigenases 1 e 3

Para confirmação das linhagens de soja selecionadas na geração RC1F4 utilizaram-se métodos colorimétricos a fim de se detectar LOX nas sementes destas linhagens, conforme método descrito a seguir. Cerca de 10 mg de semente de soja raspada envolvendo tegumento e cotilédones foram colocados em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 0,5 mL de água deionizada e deixou em repouso por 5 min. Separadamente, foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão borato de sódio 200 mM (pH 9,5), 2 mL de azul de metileno 100 mM, 3 mL de substrato linoleato de sódio 10 mM e 5 mL de água deionizada (solução suficiente para análise de 90 amostras). Para detecção da LOX 1 adicionou-se em cada tubo de ensaio, contendo a soja raspada em água

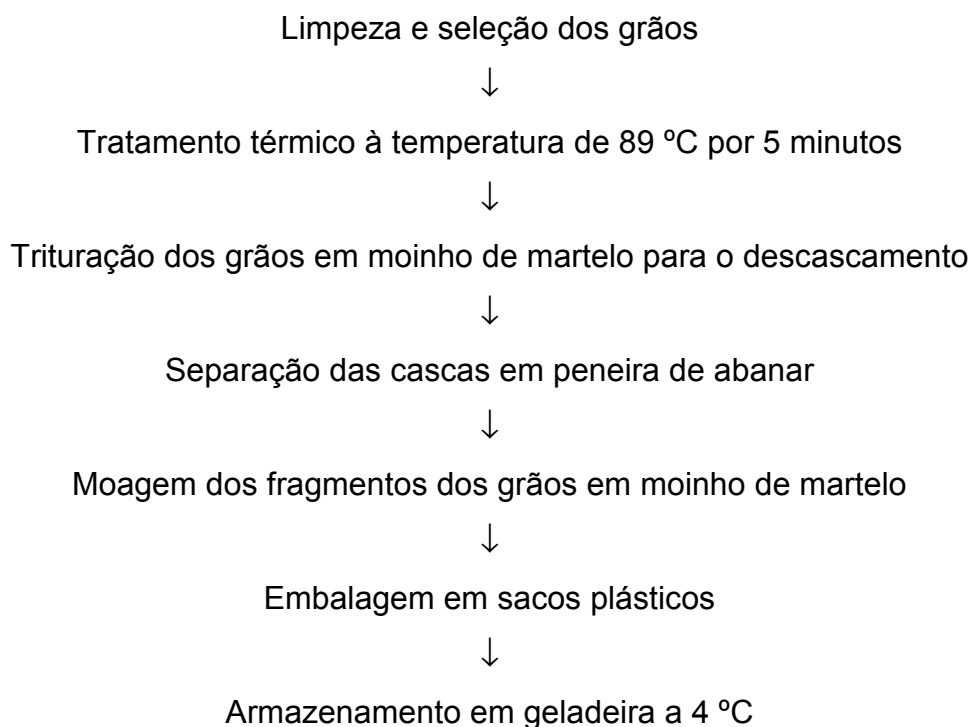
deionizada, 0,4 mL desta solução, esperando, aproximadamente, 3 minutos para leitura visual. O descoramento da solução indica presença de LOX 1 e a permanência da cor azul da solução indica ausência de LOX 1.

A detecção colorimétrica de LOX 3 foi feita colocando-se de 5 a 10 mg de semente de soja raspada envolvendo tegumento e cotilédones em tubo de ensaio. Adicionou-se a esse tubo 0,5 mL de extrato de soja contendo somente a isoenzima LOX 2. O extrato enzimático contendo apenas LOX 2 foi obtido de sementes da linhagem CR 1,3 (sem LOX 1 e 3) por centrifugação a 13.000 x g por 15 minutos de extrato contendo 1 mg/ml em água deionizada. Separadamente, foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 6,8), 2 mL de β -caroteno com 50% de saturação em acetona, 3 mL do substrato linoleato de sódio 10 mM e 5 mL de água deionizada (solução suficiente para análise de 90 amostras). A detecção da LOX 3 consistiu em colocar em cada tubo de ensaio, contendo a soja raspada e extrato com LOX 2, 0,4 mL da solução preparada. O descoramento da solução indica presença LOX 3 e a permanência da cor alaranjada do β -caroteno da solução indica ausência de LOX 3.

3.2. Obtenção da farinha de soja integral

A partir de grãos dos quatro genótipos de soja selecionados na geração RC1F5 para LOX e KTI, foram obtidas as farinhas integrais. O procedimento para a obtenção dessas farinhas foi o seguinte: As sementes selecionadas após serem lavadas sofreram um tratamento térmico em calor seco para facilitar a retirada da casca. O aquecimento dos grãos causou uma ligeira perda de água do cotilédone, havendo um encolhimento deste. Com isto, a casca despreendeu-se mais facilmente. A temperatura deste tratamento térmico foi de 89°C por 5 minutos, sendo suficiente para eliminar as cascas (GOMES e COELHO, 1989). Após o tratamento térmico, os grãos foram quebrados em moinho de martelo, de forma a resultar em pedaços grandes, promovendo, assim, a separação das cascas secas. Esta separação foi feita usando peneira de abanar para limpar os grãos. As cascas foram descartadas

e os grãos em pedaços foram moídos em moinho de martelo e embalados em sacos plásticos e mantidos sob refrigeração (Figura 7).



Fonte: GOMES e COELHO (1989)

Figura 7 – Fluxograma de obtenção das farinhas de soja integrais.

3.3. Determinação de inibidor de proteases em sementes e farinhas de soja

A presença de inibidores de proteases foi determinada em sementes e farinhas de soja derivadas dos quatro “bulks” de linhagens que diferem entre si com relação à presença de LOX e/ou KTI. Para isto, procedeu-se a determinação da atividade de tripsina, que é inibida tanto por KTI como BBI, e de quimotripsina, que é inibida somente por BBI, na presença de extratos protéicos obtidos das sementes e das farinhas. Cerca de 100 mg da amostra de semente ou farinha (triplicata) foi extraída com 15 mL de tampão Tris-HCl

0,1 M, pH 8,2. Esta suspensão foi mantida sob agitação por 1 hora para extração dos inibidores. Após este período, a suspensão foi centrifugada a $35.600 \times g$ por 20 min. Alíquotas do sobrenadante obtidas foram utilizadas para a determinação da atividade das enzimas tripsina e quimotripsina.

Os reagentes utilizados para essas determinações foram: Tripsina pancreática bovina (tipo III), quimotripsina bovina (tipo II) e os substratos sintéticos N-benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilida (D,L-BApNA) e N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida (L-BTpNA) obtidos da Sigma Chemical Co. Soluções estoque de tripsina e quimotripsina foram preparadas em HCl 0,001 M e armazenadas a -20°C . Durante a realização das atividades as enzimas foram mantidas em banho de gelo.

Solução estoque de D,L-BApNA 60 mM foi preparada a partir de 130,47 mg de substrato em 5 mL de dimetilsulfóxido e armazenada a -20°C . A concentração da solução utilizada nos experimentos foi de 1,2 mM, sendo preparada a partir de 200 μl da solução estoque diluída em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM. A solução de trabalho era preparada na hora do uso, mantendo-se estável por cerca de duas horas.

Solução estoque de L-BTpNA 6 mM foi preparado a partir de 12,16 mg do substrato dissolvidos em 5 mL de dimetilsulfóxido e armazenado a -20°C . A concentração da solução utilizada nos experimentos foi de 0,12 mM, sendo preparada a partir de 200 μl da solução estoque diluída em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 5% (v/v) de dimetilformamida. A solução de trabalho era preparada na hora do uso, mantendo-se estável por cerca de duas horas.

Determinação da atividade de tripsina: A determinação da atividade de tripsina na presença dos extratos protéicos das sementes e das farinhas de soja foi feita pelo método descrito por ERLANGER et al (1961). Para o procedimento analítico, foram pipetados 400 μl de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM, 50 μl da solução de tripsina ($1,67 \times 10^{-5}$ M) e 150 μl do extrato ($1,2 \times 10^{-3}$ M). Os controles da atividade da enzima foram preparados substituindo-se o extrato por tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM. Esta mistura foi agitada lentamente e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, 500 μl dessa mistura

foram retirados e transferidos para outro tubo já contendo 500 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, com CaCl₂ 20 mM e 500 µl da solução de D,L-BApNA. A absorvância da solução foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm por cinco minutos (Figura 8).

A atividade da tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato D,L-BApNA, sob condições controladas. Durante a hidrólise, o produto p-nitroanilida liberado é determinado espectrofotometricamente a 410 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 8.800 M⁻¹.cm⁻¹ (ERLANGER et al, 1961).

Durante a adaptação do protocolo vários testes preliminares foram feitos usando diversas concentrações de enzima, substrato e extratos protéicos, visando otimizar a análise de inibidores de proteases nos extratos obtidos de grãos de soja e de farinha. A Figura 8 mostra o fluxograma utilizado nas análises de inibidores de proteases nos extratos protéicos.

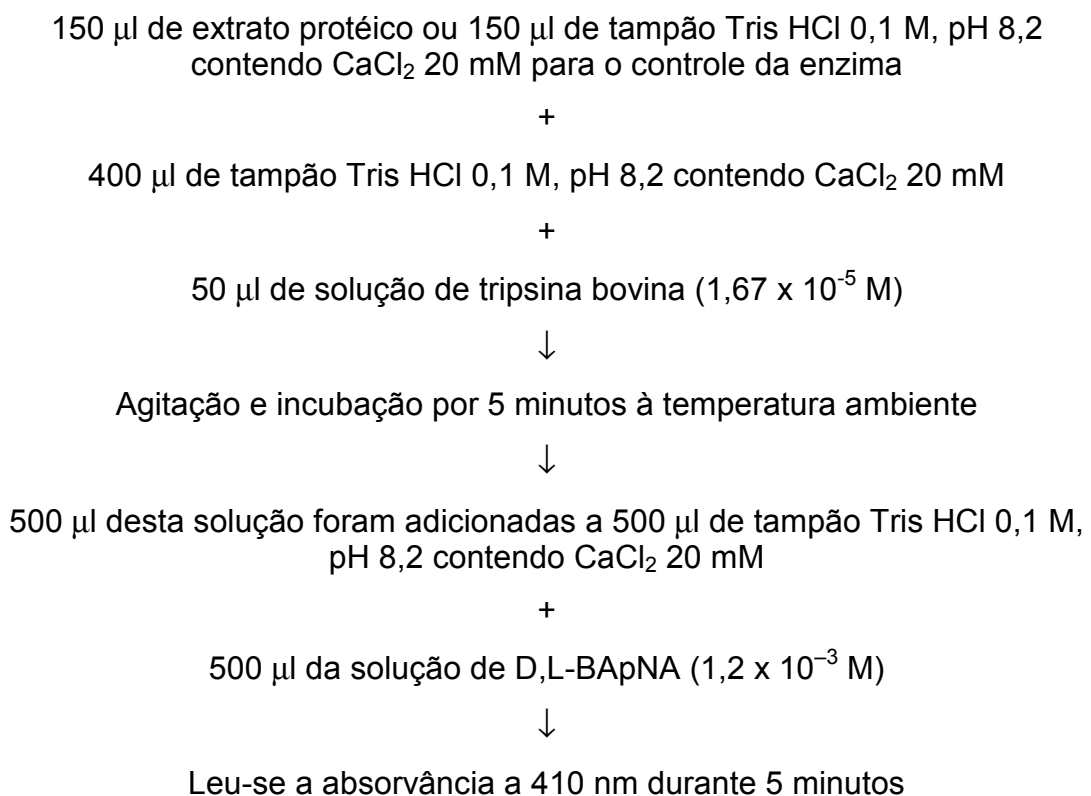


Figura 8 – Fluxograma do protocolo usado na determinação da atividade de tripsina na presença de extratos protéicos de sementes e de farinhas de soja.

Durante a reação, a concentração de enzima foi de $1,39 \times 10^{-6}$ M e de substrato foi de $4,0 \times 10^{-4}$ M. O volume de extrato utilizado nas análises, 150 μ l, ajustou-se na faixa linear para todos os materiais analisados.

Os resultados foram convertidos em mg tripsina pura inibida por g de proteína por meio da equação (KAKADE et al, 1974):

$$\text{mg de tripsina inibida / g de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P}$$

Em que:

A = absorvância do controle enzimático (410 nm) – absorvância da solução contendo extrato protéico (410 nm)

B = fator de correção da amostra;

C = fator de tripsina. Esse fator corresponde a absorvância em 410 nm do produto da atuação de 1 μ g de tripsina sob o substrato D,L-BapNA dá uma leitura a 410 nm de 0,019, nas condições do ensaio (KAKADE et al, 1974).

P = concentração de proteína em g/g da amostra; determinado pelo método semimicro Kjeldahl.

Determinação da atividade de quimotripsina: A determinação da atividade de quimotripsina na presença dos extratos protéicos das sementes e das farinhas de soja foi feita pelo método descrito por ERLANGER et al (1961). Para o procedimento analítico, foram pipetados 150 μ l de extrato ou 150 μ l de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, no caso do controle da enzima; 400 μ l de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2; e 50 μ l da solução de quimotripsina em um tubo de ensaio. A mistura foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Após esse período, 500 μ l dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo, já contendo 500 μ l de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, com 5% de dimetilformamida e 500 μ l da solução de L-BTpNA. A mistura foi agitada rapidamente e foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 410 nm durante cinco minutos (Figura 8). Cada amostra foi analisada em triplicata.

Determinou-se a diferença de absorvância a 410nm, entre os testes e os respectivos controles. Nessas condições de incubação a liberação de p-

nitroanilida foi linear com o tempo.

A atividade da quimotripsina foi determinada pela hidrólise do substrato L-BTpNA, sob condições controladas. Durante a hidrólise, o produto p-nitroanilida liberado foi determinado espectrofotometricamente em 410 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $8.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ERLANGER et al, 1961). A metodologia empregada para a análise da inibição de quimotripsina está representada no fluxograma mostrado na Figura 9.

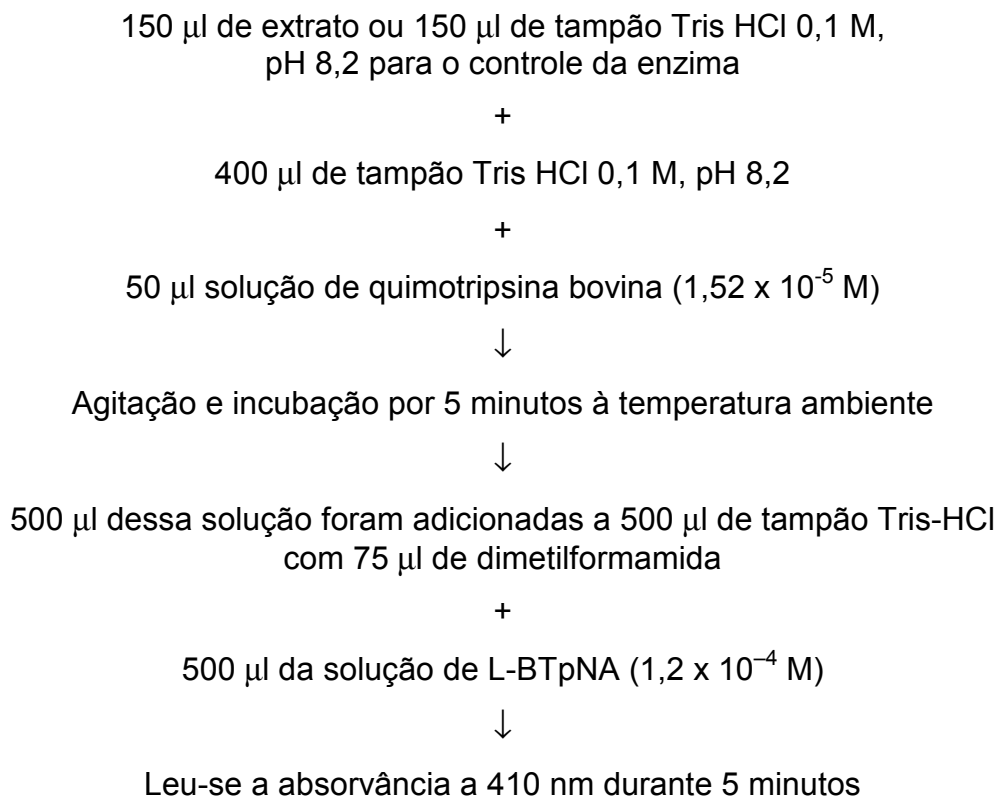


Figura 9 – Fluxograma do protocolo usado na determinação da atividade da quimotripsina em extratos obtidos de sementes e de farinhas

A concentração de enzima e de substrato durante a reação foi de $1,27 \times 10^{-6} \text{ M}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, respectivamente.

Os resultados foram convertidos em mg de quimotripsina pura inibida por g de proteína, de acordo com a fórmula abaixo :

$$\text{mg de quimotripsina inibida / g de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P}$$

Em que:

A = absorvância do padrão (410nm) – absorvância da amostra (410nm)
(corrigida pela absorvância do branco da amostra);

B = fator de correção da amostra;

P = concentração em g/g de proteína determinada nas amostras;

C = fator de quimotripsina. Esse fator corresponde a absorvância em 410 nm do produto da atuação de 1 µg de quimotripsina sob o substrato L-BTpNA dá uma leitura à 410 nm de 0,013, nas condições do ensaio (KAKADE et al, 1974).

3.4. Detecção da atividade hemaglutinante das sementes e das farinhas de soja

Para determinação da atividade hemaglutinante nas sementes e nas farinhas de soja foi utilizado sangue de coelhos como fonte de hemácias, com base no conhecimento de que lectinas de soja tem capacidade de aglutinar hemácias (HERZIG et al, 1997).

Os extratos protéicos de farinhas e de sementes foram obtidos extraíndo-se 100 mg da amostra (farinha ou semente) adicionou-se 15 mL de NaCl 0,15 M contendo MnCl₂ 5 mM e CaCl₂ 5 mM. Essa suspensão ficou sob agitação por três horas para extração das lectinas. A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 7°C (MONTEIRO et al, 1998). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas em duplicata e feitas diluições em séries em placas de ELISA, de 1:9 até 1:99 para extratos de sementes e de 1:5 a 1:80 para extratos de farinhas. A essas diluições foram adicionadas 40 µl de uma suspensão de hemácias a 2%. A mistura foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. A aglutinação positiva foi determinada a olho nu. Controles para hemaglutinação das farinhas foram realizados pela incubação de hemácias com NaCl 0,15 M e PBS 0,01 M (GOLDSTEIN e PORETZ, 1986). Os controles na hemaglutinação das sementes foram feitos utilizando-se duas variedades supostamente com presença de lectinas (CAC) e outra com ausência de lectina (Columbia).

A suspensão de hemácias a 2% foi obtida de sangue de coelho, da seguinte forma: em um tubo contendo 6 mL de PBS (0,01 M, pH 7,4) gelado, foi adicionado 2 mL de sangue. Em seguida, essa solução foi centrifugada a 3.000 x g por 10 min à temperatura ambiente. Eliminou-se o sobrenadante e utilizou-se o precipitado. Adicionou-se ao precipitado 6 mL o tampão PBS e centrifugou-se novamente, descartando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes com o objetivo de lavar as hemácias. Ao final, obteve-se a suspensão de hemácias. Dessa suspensão retirou-se 0,2 mL e o volume foi completado para 10 mL de tampão PBS 0,01 M, pH 7,4.

3.5. Determinação do teor de proteína nas sementes de soja

A determinação do teor de proteína nas sementes de soja foi feita pelo método semimicro Kjeldhal, segundo (A.O A.C, 1984). No cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

3.6. Caracterização físico-química das farinhas de soja integrais

A determinação do teor de proteína, nas farinhas de soja e nas dietas utilizadas no ensaio biológico, foi realizada pelo método semimicro Kjeldhal, usando-se o fator 6,25 para conversão do teor de N em teor de proteína.

O teor de lipídios foi determinado conforme procedimento descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), em aparelho extrator tipo Soxhlet. A análise se baseou na extração da fração lipídica com éter de petróleo. Após a extração e remoção do solvente, determinou-se gravimetricamente a quantidade de lipídeos presente.

Para a determinação do teor de umidade utilizou-se o método da secagem em estufa com circulação de ar a 105°C, até que o produto manteve o seu peso constante, conforme descrito pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC (1984).

O teor de cinzas foi determinado por meio da calcinação da amostra

em mufla entre 550 a 600°C por seis horas, segundo método descrito pela AOAC (1984).

As concentrações de carboidratos foram obtidos por diferença em relação aos demais componentes, ou seja, ao valor 100 foi subtraído a soma dos valores obtidos para proteínas, lipídios, umidade e cinzas.

3.7. Avaliação biológica das farinhas de soja

As farinhas de soja integrais derivadas dos quatro genótipos para presença de LOX e/ou KTI foram utilizadas como fonte de proteína nas dietas experimentais.

A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaios biológicos, durante 14 dias, utilizando-se 36 ratos machos, raça Wistar, recém desmamados com 23 dias de idade.

Os animais foram divididos em grupos de seis, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse 10 gramas, conforme recomendação da AOAC (1984), e foram distribuídos em gaiolas individuais, onde receberam água e alimento “*ad libitum*”, durante o período experimental.

A composição das dietas foi baseada na dieta AIN-93G (REEVES et al, 1993), porém com teor de proteína de 9 a 10%, conforme Quadro 1. Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta, pelo método semimicro Kjeldhal, com amostras em triplicata (AOAC, 1984). A composição das misturas de vitaminas e de minerais está mostrada nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Os animais foram mantidos nas dietas experimentais durante 14 dias. Neste período, determinaram-se digestibilidade verdadeira, PER (Coeficiente de Eficiência Protéica), NPR (Razão Protéica Líquida) e NPU (Utilização Protéica Líquida).

Quadro 1 – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura)

Ingredientes	Dietas					
	Aprotéica	Caseína	D1	D2	D3	D4
Caseína	----	17,28	----	----	----	----
Farinha de soja	----	----	33,57	37,19	34,17	36,03
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Fibra	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Amido de milho	59,75	42,47	26,18	22,56	25,58	23,72
% de proteína	Nd	9,54	9,56	9,26	9,74	9,96

Fonte: REEVES et al (1993).

D1 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, sem KTI;

D2 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, com KTI;

D3 - dieta de farinha de soja integral com LOX, sem KTI;

D4 - dieta de farinha de soja integral com LOX, com KTI.

Quadro 2- Mistura vitamínica utilizada nos experimentos

Vitaminas	g/kg de mistura
Ácido nicotínico	3,0
Pantotenato de cálcio	1,6
Piridoxina HCl (B6)	0,7
Tiamina HCl (B1)	0,6
Riboflavina (B2)	0,6
Ácido fólico	0,2
D-biotina	0,02
Cianocobalamina (B12)	2,5
DL-alfa tocoferol acetato (E)	15,0
Retinil palmitato (A)	0,8
Colecalciferol (D)	0,25
Menaquinona (K)	0,075
Sacarose	q.s.p.

Fonte: REEVES et al (1993).

Quadro 3 – Mistura salina utilizada nos experimentos com ratos

Sais minerais	g/Kg de mistura
Elementos Minerais Essenciais	
Carbonato de cálcio anidro (40,04% Ca)	357,0
Fosfato de potássio monobásico (22,76% P; 23,73% K)	196,0
Citrato de potássio, tri-potássio, (36,16% K)	70,78
Cloreto de sódio (39,34% Na; 60,66% Cl)	74,0
Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S)	46,6
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24,0
Citrato férrico (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47,79% Mn)	0,63
Carbonato cúprico (57,47% Cu)	0,3
Iodato de potássio (59,35 I)	0,01
Selenato de sódio anidro (41,79% Se)	0,01
Paramolibdato de amônio (54,34% Mo)	0,01
Elementos Minerais Potencialmente Benéficos	
Meta Silicato de Sódio 9 hidrato (9,88% Si)	1,45
Sulfato de Cromo e Potássio (10,42% Cr)	0,27
Cloreto de Lítio (16,38% Li)	0,02
Ácido Bórico (17,5% B)	0,08
Fluoreto de Sódio (45,24% F)	0,06
Carbonato de Níquel (45% Ni)	0,03
Vanadato de Amônio (43,55% V)	0,01
Sacarose	q.s.p.

Fonte: REEVES et al (1993).

Para o cálculo da digestibilidade, as dietas foram marcadas com óxido de cromo a 0,1% e as fezes coletadas do 7º ao 14º dia do experimento, sendo acondicionadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração. Após o período de coleta, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar, a 105°C durante 24 horas. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e moídas em moinho de navalha para determinação do teor de nitrogênio. Para este fim, foi utilizado o método semimicro Kjeldhal das amostras em triplicatas, segundo AOAC (1984).

A determinação da digestibilidade verdadeira foi possível pelo emprego de um grupo de seis animais com dieta aprotéica. O cálculo foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

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

em que:

D = digestibilidade;

I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste; e

FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

O NPR foi determinado no 14º dia do experimento, tomando-se o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo de dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, seguindo o método de BENDER e DOELL (1957). Para isto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$NPR = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo teste} + \text{perda de peso (g) do grupo aprotéico}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo teste}}$$

O PER foi determinado tomando-se o ganho de peso do grupo teste em relação ao consumo de proteína do grupo teste. Para isto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$PER = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo teste}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo teste}}$$

Com relação ao NPU, a determinação foi feita pelo método da carcaça, segundo MILLER e BENDER (1955) no 14º dia do experimento.

Os animais foram sacrificados em dessecador, contendo éter etílico. Em seguida, foram abertos e as carcaças, colocadas em recipientes de alumínio para secar. Após o período de 24 horas de secagem em estufa a 105°C, com circulação de ar, as carcaças foram resfriadas, pesadas, trituradas, desengorduradas em extrator Soxhlet, durante 4 a 5 horas com éter de petróleo, e pulverizadas em liquidificador para determinação do teor de nitrogênio, retido na carcaça. Para isto, foi utilizado o método semimicro Kjeldhal das amostras em triplicatas (AOAC, 1984).

No cálculo do NPU, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{NPU} = \frac{\text{B} - \text{BK}}{\text{I}} \times 100$$

em que:

B = nitrogênio corporal dos animais em dieta-teste;

BK = nitrogênio corporal dos animais em dieta aprotéica; e

I = nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

3.8. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS)

A determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi realizada nas farinhas de soja. Os valores de PDCAAS têm sido considerados um parâmetro recomendado pela FAO (1991) para avaliar a qualidade da proteína em humanos (SARWAR, 1997). Para o cálculo do PDCAAS, procedeu-se da seguinte forma:

- Determinou-se o teor de nitrogênio;
- Calculou-se o conteúdo protéico (N x 6,25);
- Determinou-se o perfil de aminoácidos;
- Determinou-se o escore de aminoácidos, como se segue (a proteína de referência utilizada foi o requerimento de aminoácidos para crianças de 2 a 5 anos conforme FAO/WHO, 1985):

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

- Determinou-se a digestibilidade por ensaio biológico, conforme descrito anteriormente.
- Calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade da proteína.

Convencionou-se que a proteína cujo PDCAAS for igual ou superior a 1,0 é considerada de boa qualidade (HENLEY e KUSTER, 1994).

Para se obter o perfil aminoacídico, as farinhas de soja foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 6 N a 110 °C por 22 horas para determinação dos aminoácidos com exceção do triptofano e aminoácidos sulfurados, segundo metodologia descrita por AOAC (1990). Para recuperação dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) as amostras foram oxidadas com ácido perbórmico e depois hidrolisadas com HCl 6N. Posteriormente, as amostras hidrolisadas foram filtradas e injetadas em aparelho previamente calibrado com padrão externo. A determinação foi feita por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). O princípio da detecção dos aminoácidos foi por derivatização dos aminoácidos com ninidrina, formando um complexo colorido que foi quantificado espectrofotometricamente a 440 nm (leitura da prolina) e 580 nm (para leitura dos demais aminoácidos). O aparelho utilizado foi o Amino Acid Analyzer, modelo Hitachi L-8500 A, exclusivo para análises de aminoácidos.

3.9. Delineamento estatístico

Procedeu-se à análise estatística (ANOVA), para determinação do valor de “F”. Para “F” significativo, utilizou-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias. A dispersão da média foi expressa nas tabelas de resultados como desvio-padrão da média.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da matéria prima por SDS-PAGE

A Figura 10 mostra os resultados da eletroforese SDS-PAGE dos extratos protéicos obtidos de sementes e das farinhas de soja integrais utilizadas no presente trabalho.

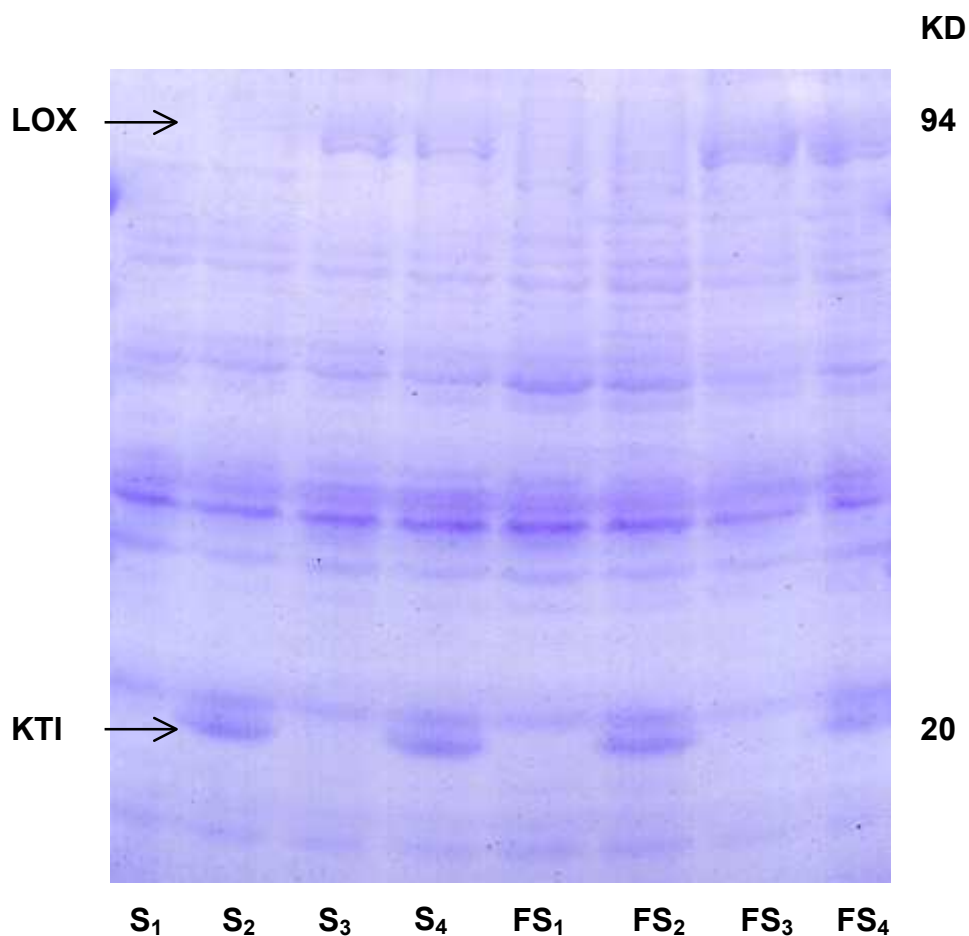


Figura 10 – Análise de KTI por eletroforese SDS-PAGE em sementes de soja e farinha de soja integral. Da esquerda para a direita as canaletas mostram a composição polipeptídica das sementes sem KTI e sem LOX (S₁), com KTI e sem LOX (S₂), sem KTI e com LOX (S₃) e com KTI e com LOX (S₄). Na seqüência, as canaletas mostram a composição polipeptídica das farinhas integrais obtidas de grãos de soja de linhagens sem KTI e sem LOX (FS₁), com KTI e sem LOX (FS₂), sem KTI e com LOX (FS₃) e com KTI e com LOX (FS₄).

Pode ser observado na Figura 10 que houve confirmação dos genótipos das sementes e das farinhas utilizadas no presente trabalho para presença de LOX e/ou KTI.

4.2. Caracterização das farinhas com relação a sua composição química centesimal

O Quadro 4, apresenta o resumo da composição química centesimal das farinhas de soja integrais utilizadas neste trabalho. Pode ser observado que o teor de proteína variou de 38 a 42%, lipídios de 21 a 23%, umidade de 10 a 12%, cinzas de 6 a 7% e carboidratos de 17 a 20%.

Quadro 4 –Composição química centesimal das farinhas de soja integrais (g/100g)

Amostras	Umidade	Lipídios	Cinzas	Proteínas	Carboidratos
FS1	11,22	21,10	6,45	42,44	18,77
FS2	11,73	22,61	6,72	38,32	20,62
FS3	10,54	22,86	7,05	41,70	17,85
FS4	12,81	23,74	6,54	39,55	17,36

FS1 = farinha de soja LOX⁻ KTI⁻

FS2 = farinha de soja LOX⁻ KTI⁺

FS3 = farinha de soja LOX⁺ KTI⁻

FS4 = farinha de soja LOX⁺ KTI⁺

Os valores mostrados no Quadro 4 caracterizam uma farinha de soja integral e estão de acordo com os valores médios encontrados por LIMA et al (1999) para farinha de soja com teor de proteína = < 45%.

4.3. Caracterização das sementes e das farinhas integrais de soja para presença de inibidores de proteases (KTI e BBI)

Foram estimados os teores de inibição triptica e quimotriptica nas sementes e nas farinhas de soja integrais derivadas pela análise desses inibidores em extratos protéicos. Nessas análises utilizou-se o método de inibição da atividade de tripsina e quimotripsina na presença dos seus respectivos substratos, de acordo com metodologia citada por ERLANGER et

al (1961).

Os conteúdos estimados de inibição de tripsina expresso em mg de tripsina inibida por grama de proteína das sementes e das farinhas estão mostrados no Quadro 5 e na Figura 11.

Quadro 5 - Inibição da tripsina por extratos protéicos obtidos de sementes e de farinhas de soja

Extratos	Semente	Farinha de soja
	mg de tripsina inibida por g de proteína ¹	mg de tripsina inibida por g de proteína ¹
1 (LOX ⁻ KTI ⁻)	82,14 ± 4,19 ² B ³	115,25 ± 11,47 ² B ³
2 (LOX ⁻ KTI ⁺)	171,06 ± 1,40 A	158,47 ± 2,16 A
3 (LOX ⁺ KTI ⁻)	101,82 ± 3,16 B	117,72 ± 2,62 B
4 (LOX ⁺ KTI ⁺)	169,50 ± 0,31 A	147,70 ± 7,38 A

¹ O conteúdo de proteínas foi determinado nas sementes e nas farinhas pelo método semicro Kjeldhal.

² Valores são média ± desvio padrão.

³ As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

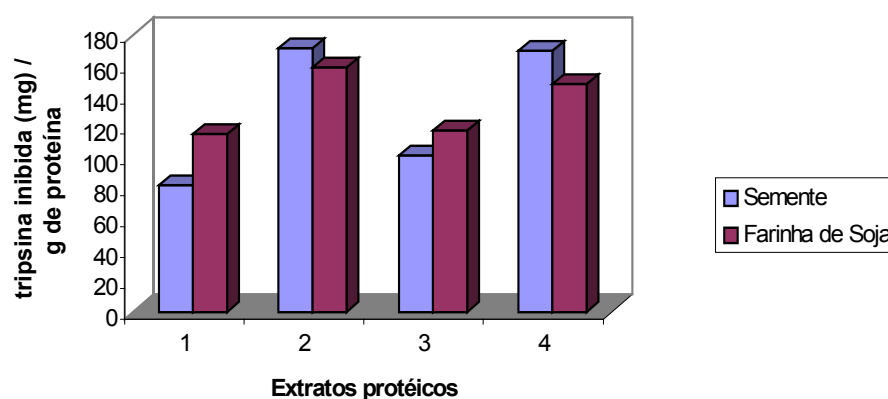


Figura 11 – Teores estimados de inibidores de tripsina (mg/g proteína) para extratos protéicos de sementes e de farinhas de soja. Extrato protéico 1 - sem LOX e sem KTI, extrato protéico 2 - sem LOX e com KTI, extrato protéico 3 - com LOX e sem KTI e extrato protéico 4 - com LOX e com KTI.

Pode ser observado no Quadro 5 e na Figura 11 que extratos protéicos obtidos de sementes e das farinhas sem KTI (**1 e 3**) apresentaram os menores valores de inibição de tripsina comparados com os valores dos extratos de sementes e das farinhas com KTI (**2 e 4**) e, não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram dos demais. Observa-se também que a inibição trípica dos extratos protéicos das sementes e das farinhas **2 e 4** foi maior, porém não diferiram estatisticamente entre si.

Conforme mostra os resultados do Quadro 5 tanto as sementes como as farinhas derivadas de linhagens com ausência de KTI (**1 e 3**) apresentaram inibição trípica. Portanto, já que nessas linhagens foi eliminado geneticamente KTI, esses valores estimados encontrados para inibição de tripsina possivelmente possam ser devido à presença dos inibidores BBI, que estão livres para exercer inibição sobre as proteases, ou seja, o KTI quando presente ele ganha a competição pela inibição das proteases por ser uma molécula bem maior que o BBI, e quando o BBI está sozinho não há competição entre inibidores. Porém, não se exclui a possibilidade da ocorrência, nos extratos protéicos, de compostos que, possivelmente, estão ativos e causam inibição de tripsina como fitatos e taninos (DOMAGALSKI et al, 1992).

Os resultados apresentados no Quadro 5 mostram também que os valores estimados de inibição trípica variaram de cerca de 80 a 170 mg de tripsina inibida por g de proteína nas sementes. Esses valores estão próximos aos valores encontrados por KAKADE et al (1974), que analisaram a presença de inibidores de proteases em 108 cultivares de soja e obtiveram valores que variaram de 35 a 123 mg de tripsina inibida por g de proteína nos extratos.

A inibição trípica estimada nas farinhas de soja integrais de linhagens com KTI (**2 e 4**) foram em média 155 mg de tripsina inibida por g de proteína (Quadro 5). Esses valores estão acima daqueles encontrados por RACKIS et al (1986) para farinha de soja desengordurada crua que foi de 83 mg tripsina inibida/g proteína. Porém, fica difícil a comparação entre esses dados por se tratarem de produtos resultantes de matérias-primas e processamentos diferentes. Os valores estimados para inibidores de proteases no presente trabalho também estão acima dos encontrados por LIENER (1995) para farinha de soja crua que foi de 52,1 mg de inibidor de tripsina/g de amostra, porém no presente trabalho o resultado foi expresso em mg de inibidor de tripsina/g de

proteína.

Da mesma forma os níveis de inibição de quimotripsina foram obtidos em extratos de sementes e das farinhas de soja. Os níveis de inibição quimotríptica expresso em mg de quimotripsina inibida por g de proteína das sementes e das farinhas estão mostrados no Quadro 6 e na Figura 12.

Quadro 6 - Inibição da quimotripsina por extratos protéicos obtidos de sementes e de farinhas de soja

Extratos	Semente	Farinha de soja
	mg quimotripsina inibida por g de proteína ¹	mg quimotripsina inibida por g de proteína ¹
1 (LOX ⁻ KTI ⁻)	12,45 ± 3,04 ² B ³	9,24 ± 1,21 ² B ³
2 (LOX ⁻ KTI ⁺)	45,02 ± 1,05 A	18,37 ± 0,58 A
3 (LOX ⁺ KTI ⁻)	11,30 ± 1,33 B	10,15 ± 0,66 B
4 (LOX ⁺ KTI ⁺)	43,50 ± 0,69 A	19,47 ± 0,48 A

¹ O conteúdo de proteínas foi determinado nas sementes e nas farinhas pelo método semicro Kjeldhal.

² Valores são média ± desvio padrão.

³ As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

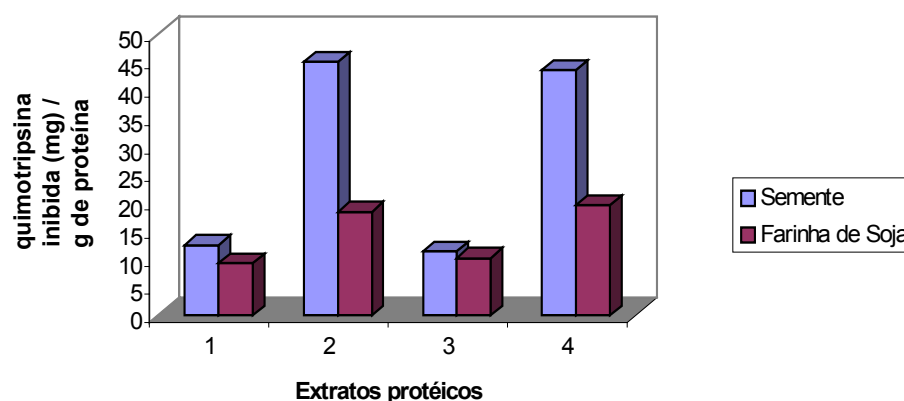


Figura 12 – Teores estimados de inibidores de quimotripsina (mg/g proteína) para extratos protéicos de sementes e de farinhas de soja. Extrato protéico 1 - sem LOX e sem KTI, extrato protéico 2 - sem LOX e com KTI, extrato protéico 3 - com LOX e sem KTI e extrato protéico 4 - com LOX e com KTI.

Pode ser observado no Quadro 6 e na Figura 12 que extratos protéicos das sementes e das farinhas sem KTI (**1 e 3**) apresentaram os menores valores de inibição de quimotripsina comparado aos extratos com KTI (**2 e 4**) e não diferiram estatisticamente entre si. O nível de inibidores de quimotripsina dos extratos protéicos de sementes com KTI (**2 e 4** no Quadro 6) foram maiores e não diferiram estatisticamente entre si.

Observa-se no Quadro 6 que quimotripsina inibida (mg/g proteína) em extratos de sementes sem KTI (cerca de 12 mg/g) foram bem inferiores aos obtidos para extratos de sementes com KTI (em torno de 45 mg/g). Isto sugere que linhagens sem KTI apresentam também baixos níveis de BBI ou de outros fatores que inibem quimotripsina.

Os valores estimados para inibição de quimotripsina em extratos das farinhas sem KTI foram cerca de 10 mg/g proteína e para extratos das farinhas com KTI esses valores foram em torno de 19 mg/g proteína (Quadro 6). Esses valores foram superiores ao valor encontrado por FRIEDMAN et al (1991) para farinha de soja aquecida a 121°C em autoclave por 10 min que foi de 4,2 mg de quimotripsina inibida / g de proteína. No entanto, os valores maiores encontrados no presente trabalho podem ser explicados pelo menor binômio tempo x temperatura aplicados durante o processo de obtenção das farinhas.

Ainda de acordo com o Quadro 6, observa-se que os valores de quimotripsina (mg/g proteína) de extratos das farinhas de linhagens com KTI (**2 e 4**) e das farinhas de linhagem sem KTI (**1 e 3**) estão bem abaixo dos valores encontrados por BRANDON et al (1991) para farelos provenientes de linhagem com e sem KTI, que foram de 144 e 113 unidades de inibidor de quimotripsina/g de proteína. Estes autores consideraram tais valores elevados, levando-se em consideração que a inibição é promovida apenas por BBI. No entanto, atribuem a alta inibição de quimotripsina encontrada à presença de inibidores não específicos da enzima nos farelos de soja analisados, como fitatos e taninos (DOMAGALSKI et al, 1992).

Conforme mostra a Figura 12 os teores estimados de inibição de quimotripsina dos extratos protéicos de sementes com KTI foram bem superiores aos encontrados para os respectivos extratos das farinhas (**2 e 4**). Esses menores teores estimados de inibição de quimotripsina encontrados nas farinhas **2 e 4** demonstram que o BBI e/ou outros fatores que inibem

quimotripsina, presentes na semente, foram parcialmente inativados pelo tratamento térmico aplicado no processo de obtenção das farinhas. Segundo LIENER (1995), uma maior inativação do BBI em comparação com o KTI, pode ser explicada pela formação de pontes de enxofre entre resíduos de cisteína do BBI com cisteína da matriz protéica da soja. Esta reação é acelerada pelo calor.

4.4. Detecção da atividade hemaglutinante

As Figuras 13 e 14 mostram os resultados obtidos da atividade hemaglutinante determinada em sementes e nas farinhas de soja. Na Figura 13 encontram-se os valores da atividade hemaglutinante de extratos de sementes de soja derivadas de linhagens sem LOX e sem KTI (poços A), sem LOX e com KTI (poços B), com LOX e sem KTI (poços C) e com LOX e com KTI (poços D). A Figura 14 corresponde aos extratos protéicos de farinhas de soja de linhagens sem LOX e sem KTI (poços A), sem LOX e com KTI (poços B), com LOX e sem KTI (poços C) e com LOX e com KTI (poços D).

A atividade de lectina é, normalmente, medida pela técnica de diluição em série, no qual o ponto final é determinado visualmente ou espectrofotometricamente. A atividade é expressa como sendo a menor concentração de lectina (maior diluição) necessária para aglutinar células vermelhas do sangue de animais. Para detecção da atividade de lectina de soja, sangue de coelho tem se mostrado o mais sensível (LIU, 1997).

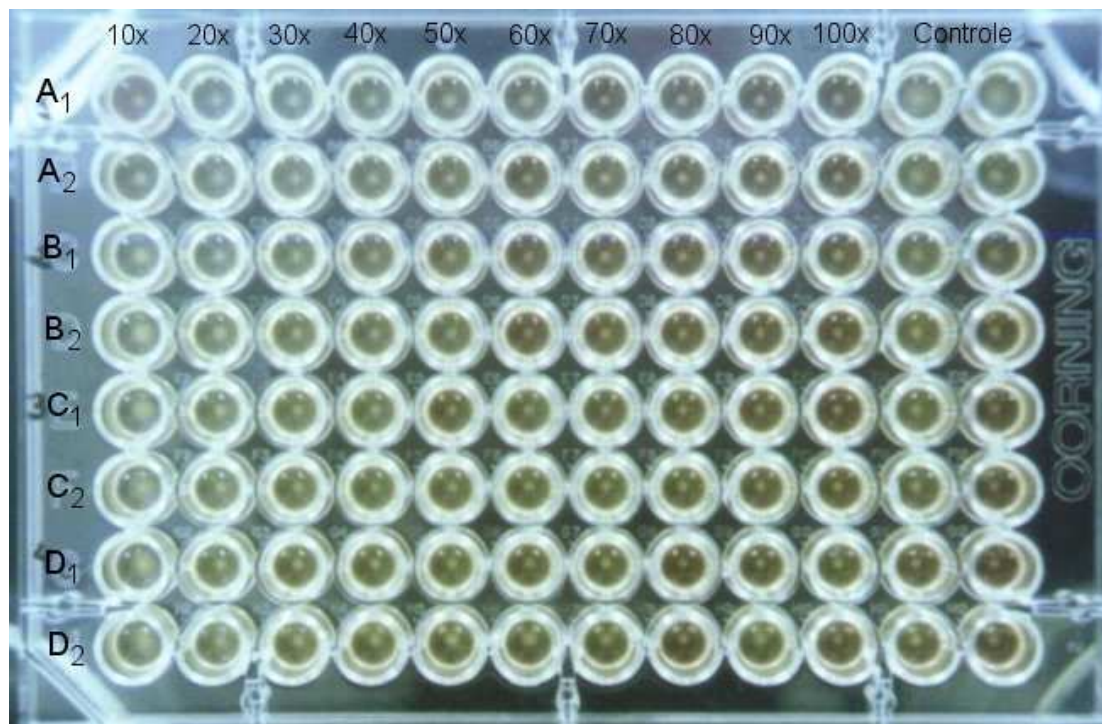


Figura 13 –Detecção da atividade hemaglutinante de sementes de soja. Nas linhas da placa de Elisa encontram-se as amostras com suas respectivas repetições, ou seja, extratos protéicos obtidos de sementes sem LOX e sem KTI (A₁ e A₂), extratos protéicos obtidos de sementes sem LOX e com KTI (B₁ e B₂), extratos protéicos obtidos de sementes com LOX e sem KTI (C₁ e C₂) e extratos protéicos obtidos de sementes com LOX e com KTI (D₁ e D₂). Nas colunas encontram-se as diluições das amostras que foi de 10x a 100x. Nas duas últimas colunas estão os controles negativo com a variedade Columbia e positivo com variedade CAC, sendo que nas respectivas linhas se encontram as diluições de 10x a 80x.

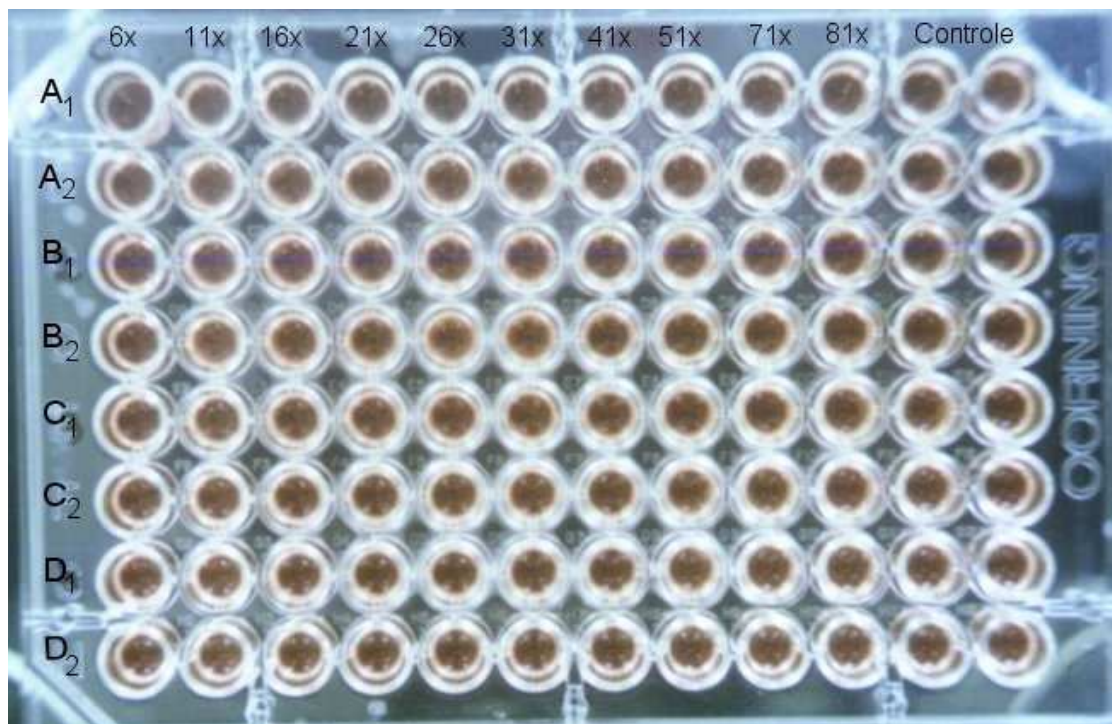


Figura 14 – Detecção da atividade hemaglutinante em farinhas de soja. Nas linhas da placa de Elisa encontram-se as amostras com suas respectivas repetições, ou seja, extratos protéicos obtidos de farinhas sem LOX e sem KTI (A₁ e A₂), extratos protéicos obtidos de farinhas sem LOX e com KTI (B₁ e B₂), extratos protéicos obtidos de farinhas com LOX e sem KTI (C₁ e C₂) e extratos protéicos obtidos de farinhas com LOX e com KTI (D₁ e D₂). Nas colunas se encontram as diluições das amostras que foi de 6x a 81x, sendo que nas últimas colunas encontram-se os controles (hemácias + PBS)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 13, extratos de sementes de soja deram reação de hemaglutinação positivas para todas as diluições desde 1:90 até 1:99, o que era esperado pois as sementes não sofreram nenhum tipo de tratamento térmico e as lectinas estão ativas.

Conforme mostra os resultados apresentados na Figura 14, extratos de farinhas de soja deram reações negativas para todas as diluições (1:5 a 1:80), o que comprova a facilidade de inativação das lectinas pelo calor, pois, tratamento térmico de apenas 89°C por 5 minutos, aplicado no processamento das farinhas, foi suficiente para inativar as lectinas presentes. Esse resultado está de acordo com GRANT et al (1997) e CALDERON de la BARCA et al (1991), que relatam que grãos de soja possuem lectinas que são facilmente inativadas pelo calor.

4.5. Determinação da qualidade protéica das farinhas de soja

4.5.1. NPR, NPU e PER

A qualidade protéica das farinhas foi determinada através de ensaios biológicos com ratos, por meio de NPR, NPU, PER e a digestibilidade verdadeira.

As realizações de bioensaios são importantes porque mostram essencialmente a medida de aminoácidos limitantes utilizáveis pelo animal, ou seja, a biodisponibilidade dos aminoácidos das proteínas dos alimentos (McLAUGULAN e KEITH, 1975).

Observa-se no Quadro 7 os valores encontrados para NPR relativo à caseína que variaram de 49 a 56% para as dietas a base de farinha de soja.

Quadro 7 – Valores de NPR das dietas de caseína e das farinhas de soja determinados em experimentos com ratos

Dieta	NPR*	RNPR (%)**
Caseína	4,44 ± 0.19 A	100,00
D1	2,34 ± 0.24 B	52,70
D2	2,27 ± 0.23 B	51,13
D3	2,52 ± 0.27 B	56,76
D4	2,21 ± 0.45 B	49,77

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

** RNPR = NPR relativo.

D1 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, sem KTI;

D2 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, com KTI;

D3 - dieta de farinha de soja integral com LOX, sem KTI;

D4 - dieta de farinha de soja integral com LOX, com KTI.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 7, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos valores de NPR da dieta com caseína das demais dietas e não houve diferença significativa entre os valores de NPR das dietas a base de farinha de soja. Isto demonstra que a qualidade da proteína da farinha de soja é inferior à caseína para promover crescimento e manutenção de peso de ratos.

Os valores de NPR relativos para as farinhas integrais de soja encontrados neste trabalho (Quadro 7), foram superiores aos valores encontrados por BUASSI et al (1983) para farinha de soja integral que foi de 40,85% em relação ao da caseína.

No Quadro 8 encontram-se os valores de PER e de PER relativo para as dietas a base de caseína e das farinhas de soja.

Quadro 8 – Valores de PER das dietas de caseína e das farinhas de soja determinados em experimentos com ratos

Dieta	PER*	RPER (%)**
Caseína	3,76 ± 0.21 A	100,00
D1	1,25 ± 0.27 B	33,24
D2	1,16 ± 0.32 B	30,85
D3	1,49 ± 0.35 B	39,63
D4	1,33 ± 0.45 B	35,37

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

** RPER = PER relativo.

D1 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, sem KTI;

D2 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, com KTI;

D3 - dieta de farinha de soja integral com LOX, sem KTI;

D4 - dieta de farinha de soja integral com LOX, com KTI.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 8, observa-se que houve diferença significativa entre os valores de PER da dieta com caseína das demais dietas e não houve diferença significativa entre os valores de PER das dietas a base de farinha de soja. Esse fato demonstra que a qualidade da proteína da farinha de soja é inferior a caseína para promover crescimento dos animais pois, PER estima quanto da proteína ingerida é usada para promover crescimento do animal. No Quadro 8 observa-se que os valores de PER relativo para as dietas, tendo como fonte de proteína farinha de soja, variaram de 30,85 a 39,63%, sendo que o valor de PER para a dieta a base de caseína foi de 3,76. Esses valores são inferiores aos encontrados por RACKIS et al (1985), que foi de 47,28% para dieta a base de farinha de soja desengordurada crua em experimentos com ratos. No entanto fica difícil a comparação já que no presente trabalho foi utilizada farinha de soja integral.

De acordo com os valores encontrados nos Quadros 7 e 8, nota-se que os valores de PER relativo foram inferiores aos valores de NPR relativo, o que demonstra que a proteína da farinha de soja presta-se melhor para manutenção do peso dos ratos do que para promover o crescimento dos mesmos.

No Quadro 9 se encontram valores de NPU para as dietas a base de

caseína e das farinhas de soja bem como os valores de NPU relativo.

Quadro 9 – Valores de NPU das dietas de caseína e das farinhas de soja determinados em experimentos com ratos

Dieta	NPU*	RNPU (%)**
Caseína	70,57 ± 3,53 A	100,00
D1	38,06 ± 9,05 B	53,93
D2	34,73 ± 2,30 B	49,21
D3	36,52 ± 5,74 B	51,75
D4	31,25 ± 6,14 B	44,28

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

** RNPU = NPU relativo.

D1 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, sem KTI;

D2 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, com KTI;

D3 - dieta de farinha de soja integral com LOX, sem KTI;

D4 - dieta de farinha de soja integral com LOX, com KTI.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 9, pode ser observado que houve diferença significativa entre os valores de NPU da dieta de caseína das demais dietas e, que não houve diferença significativa entre os valores de NPU das dietas a base de farinha de soja. Esse resultado demonstra que a qualidade da proteína das farinhas de soja é inferior à caseína para promover síntese protéica pois, NPU mede o quanto da proteína ingerida fica retida no organismo. A proteína da soja apresenta deficiência em alguns aminoácidos essenciais, resultando em uma eficiência inferior para síntese protéica comparado à caseína, que é uma proteína que possui todos aminoácidos essenciais em quantidades adequadas.

No Quadro 9 observa-se também que os valores de NPU relativo para as dietas das farinhas de soja variaram de 44,28 a 53,93% e o NPU para a dieta de caseína foi de 70,57. Esses valores são superiores ao valor encontrado por MORALES de LEON et al (1985) para grãos de soja descascados e crus que foi de 36,7%. Também foram superiores ao valor de NPU relativo encontrado por GUTIERREZ et al (1987) para dieta contendo mistura de sorgo e soja moída na proporção de 70:30, que foi de 34,22%.

Observou-se que os resultados obtidos para PER, NPR e NPU (Quadros 7, 8 e 9) não foram estatisticamente diferentes entre as farinhas derivadas de linhagens com presença e ausência de KTI. Isso indica que a ausência de KTI não alterou a qualidade protéica da farinha de soja.

4.5.2. Digestibilidade *in vivo*

Os valores da digestibilidade “in vivo” para as dietas a base de caseína e das farinhas de soja encontrados, no presente trabalho, estão expressos no Quadro 10.

Quadro 10 – Valores de digestibilidade das dietas de caseína e das farinhas de soja determinados em experimentos com ratos

Dieta	Digestibilidade*	R Digestibilidade** (%)
Caseína	97,96 ± 0.41 A	100,00
D1	90,59 ± 1.93 B	92,48
D2	87,98 ± 0,56 C	89,81
D3	91,50 ± 1,30 B	93,40
D4	86,36 ± 0,89 C	88,16

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

** R = digestibilidade relativa em %.

D1 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, sem KTI;

D2 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, com KTI;

D3 - dieta de farinha de soja integral com LOX, sem KTI;

D4 - dieta de farinha de soja integral com LOX, com KTI.

A medida da digestibilidade indica o quanto das proteínas são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo (BRESSANI e ELIAS, 1983), constituindo o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização protéica da dieta. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes, ou metabolizada pelos microrganismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1987).

O Quadro 10 mostra que a digestibilidade da dieta de caseína foi

superior (97,96) e estatisticamente diferente, à nível de 5% de probabilidade, as demais dietas, cujos valores variaram de 88,16 a 93,4% para digestibilidade relativa. Observa-se também que houve diferença estatística entre as dietas a base de farinha de soja. As dietas à base de farinhas de soja derivadas de linhagens com ausência de KTI (D1 e D3) deram valores de digestibilidade superiores (92,48 e 93,40%), com diferença estatisticamente significativa em relação às dietas à base de farinhas de soja derivadas de linhagem contendo KTI, cujos valores foram de 88,16 (D4) e 89,81% (D2). Esses resultados mostram que a eliminação genética do inibidor de tripsina “Kunitz” dos grãos de soja promove melhoria significativa na digestibilidade da proteína de soja. Isto pode ser explicado com base na observação de que KTI representa cerca de 80% dos inibidores de tripsina dos grãos de soja.

Os resultados apresentados no Quadro 10 indicam que a digestibilidade relativa das farinhas de soja com KTI (89,81 e 88,16%) estão próximos aos valores encontrados por RACKIS et al (1985) para farinha de soja desengordurada tostada (89,52%) e as digestibilidades relativas das farinhas de soja sem KTI (92,48 e 93,40%) foram superiores. Também, os valores de digestibilidade das farinhas de soja sem KTI foram superiores aos valores encontrados por FRIEDMAN e GUMBMANN (1986) que foi de 84,19% para farinha de soja integral crua e de 88,06% para farinha de soja aquecida.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que as dietas contendo farinha de soja como única fonte de proteínas derivadas de linhagens com ausência de KTI apresentam melhor digestibilidade do que dietas contendo farinha de soja de linhagens com KTI. HERKELMAN et al (1992), estudaram o efeito de cultivar (com teor normal x baixo teor de KTI) e do tratamento térmico sobre a digestibilidade aparente da proteína da soja em suínos. Estes autores observaram que animais que receberam dietas contendo soja convencional apresentaram desempenho inferior a animais que receberam dietas contendo soja com baixo teor de KTI, porém um adequado tratamento térmico é requerido para melhorar o valor nutricional de ambos tipos de soja.

4.6. Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS)

Para o cálculo do PDCAAS foi realizada primeiramente a determinação da composição aminoacídica das farinhas de soja integrais que pode ser observada no Quadro 11. O Quadro 11 fornece a composição aminoacídica das farinhas expressa em mg do aminoácido por g de proteína e também fornece comparações da composição aminoacídica das farinhas de soja do presente trabalho com outras variedades.

Quadro 11 – Composição aminoacídica de diferentes farinhas de soja

Aminoácidos	Farinha de soja integral				USDA, 1998	Farinha de soja desengordurada	
	Itamarati LOX ⁻ / KTI ⁻	Itamarati LOX ⁻ / KTI ⁺	Itamarati LOX ⁺ / KTI ⁻	Itamarati LOX ⁺ / KTI ⁺		OCEPAR-19	UFV 116
(g aminoácido / 100g amostra)							
Essenciais							
Fenil + Tirosina	3,00	2,98	3,08	3,00	3,10	4,42	5,09
Histidina	1,01	0,98	1,04	1,01	0,93	1,34	1,34
Isoleucina	1,61	1,63	1,69	1,66	1,67	2,32	2,66
Leucina	3,14	3,14	3,26	3,22	2,81	4,03	4,26
Lisina	2,05	2,05	2,10	2,06	2,29	2,94	3,25
Met. + Cisteína	1,12	1,13	1,18	1,12	1,01	1,55	1,71
Treonina	1,53	1,51	1,59	1,54	1,50	1,99	2,20
Triptofano	nd	nd	nd	nd	0,50	0,86	0,73
Valina	1,62	1,73	1,79	1,78	1,72	2,32	2,55
Não essenciais							
Alanina	1,43	1,93	1,77	1,83	1,62	2,21	2,36
Arginina	3,18	2,99	3,10	2,98	2,67	3,78	4,35
Ácido aspártico	4,72	4,69	4,78	4,72	4,34	5,62	6,24
Ácido glutâmico	8,15	7,95	8,07	7,80	6,68	9,28	10,51
Glicina	1,62	1,68	1,65	1,67	1,59	2,03	2,24
Prolina	2,24	2,22	2,27	2,24	2,02	2,51	2,64
Serina	2,12	2,11	2,16	2,11	2,02	2,44	2,51

Pode ser observado no Quadro 11 que os teores de aminoácidos das quatro farinhas integrais estudadas neste trabalho, praticamente não diferem entre si, ou seja, a composição de aminoácidos essenciais e não essenciais das farinhas é praticamente a mesma. Isso demonstra que a retirada do KTI e LOX parece não ter alterado a composição aminoacídica dessa soja.

No Quadro 11 encontra-se ainda a composição aminoacídica de farinhas obtidas de diferentes variedades de soja como UFV 116, OCEPAR-19 e variedades de soja americanas (USDA,1998). Quando comparamos as farinhas integrais do presente trabalho com as farinhas desengorduradas da variedade UFV 116 e OCEPAR-19, observa-se que nas farinhas integrais os teores dos aminoácidos tanto essenciais como não essenciais são inferiores em relação as outras duas. Porém, quando compara-se as farinhas Itamarati com a farinha USDA (1998) nota-se que os valores são bastante similares, sendo o teor de aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) superior e o teor de lisina um pouco inferior nas farinhas do presente trabalho. Isto parece demonstrar que o teor de sulfurados na soja melhorada geneticamente do presente trabalho aumentou e que lisina diminuiu.

Os resultados do escore químico e do cálculo do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) para as quatro farinhas de soja encontram-se no Quadro 12.

Quadro 12 – Valores de PDCAAS das farinhas de soja integrais

I AA essencial	II mg/g proteína				III Padrão FAO/WHO 2-5 anos mg/g prot.	IV Escore AA ¹				V PDCAAS ²			
	FS1	FS2	FS3	FS4		FS1	FS2	FS3	FS4	FS1	FS2	FS3	FS4
Fenil + Tirosina	70,81	77,87	73,90	75,98	63	1,12	1,24	1,17	1,21				
Histidina	23,74	25,73	24,95	25,44	19	1,25	1,35	1,31	1,34				
Isoleucina	37,97	42,64	40,58	41,99	28	1,36	1,52	1,45	1,50				
Leucina	74,01	81,92	78,17	81,53	66	1,12	1,24	1,18	1,23				
Lisina	48,42	53,64	50,47	52,20	58	0,83	0,92	0,87	0,90	0,75 ³	0,81 ³	0,80 ³	0,78 ³
Met + Cisteína	26,31	29,50	28,24	28,25	25	1,05	1,18	1,13	1,13				
Treonina	36,13	39,38	38,04	39,00	34	1,06	1,16	1,12	1,15				
Triptofano	nd	nd	nd	nd	11	nd	nd	nd	nd				
Valina	38,20	45,05	43,00	44,97	35	1,09	1,29	1,23	1,28				

¹ Escore de AA = coluna II / coluna III.

² PDCAAS = 1º. aminoácido limitante (coluna IV) x digestibilidade verdadeira do experimento com ratos.

³ PDCAAS: FS1 = 0,75 ou 75%; FS2 = 0,81 ou 81%; FS3 = 0,80 ou 80% e FS4 = 0,78 ou 78%.

Digestibilidade verdadeira: FS1=90,59 ou 0,9059; FS2=87,98 ou 0,8798; FS3=91,50 ou 0,915 e FS4=86,36 ou 0,8636.

De acordo com valores apresentados no Quadro 12, os valores de PDCAAS para FS1 (75,19%), FS2 (80,94%), FS3 (79,60%) e FS4 (77,72%) foram inferiores aos encontrados para digestibilidade verdadeira que foram para FS1 90,59%, FS2 87,98, FS3 91,50 e FS4 86,36%. Pelos valores da digestibilidade verdadeira foi possível detectar diferença entre farinhas derivadas de linhagens sem KTI de linhagens com KTI. Conclui-se, portanto, que os valores de digestibilidade verdadeira foram mais eficientes para detectar o efeito da eliminação genética do KTI na farinha de soja do que os valores de PDCAAS. Os valores de PDCAAS encontrados neste trabalho foram próximos ao valor encontrado por SARWAR (1997) para farelo de soja crua desengordurado (80%)

Os resultados apresentados no Quadro 12 demonstram ainda, que o aminoácido limitante para as farinhas de soja analisadas foi lisina e não metionina + cisteína, 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 apresentarem como fator limitante o aminoácido lisina ao invés de metionina + cisteína pode ser explicado por alterações que ocorreram na composição protéica desta linhagem pelo melhoramento genético.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar o efeito da eliminação genética do inibidor de tripsina “Kunitz” e das isoenzimas lipoxigenases de grãos de soja com relação à melhoria do valor nutricional da proteína de farinhas integrais derivadas.

Para obtenção das farinhas integrais, sementes selecionadas foram lavadas e submetidas a tratamento térmico para retirada da casca (89°C por 5 minutos). Após o tratamento térmico, os grãos foram quebrados em moinho com maior abertura para separação das cascas, que foram abanadas em peneiras e os grãos parcialmente quebrados foram finalmente moídos e as farinhas obtidas dessa moagem foram embaladas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração.

Realizaram-se análises de lipoxigenases, de inibidores de tripsina e de quimotripsina, composição centesimal e de atividade hemaglutinante nas farinhas de soja integrais obtidas. O valor nutricional das farinhas foi estimado pelos valores de PER, NPR, NPU e digestibilidade verdadeira, em experimentos com ratos. Ainda determinou-se a composição aminoacídica das farinhas e procedeu-se o cálculo do PDCAAS. Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- A composição química centesimal das farinhas de soja está dentro dos valores encontrados por outros autores.
- A eliminação genética do KTI promove melhora acentuada na digestibilidade da proteína de soja, o que comprova que esse inibidor é o

principal fator antinutricional responsável pela diminuição da digestibilidade da proteína de soja e, conseqüentemente, pela menor absorção desta pelo organismo animal. Os valores de digestibilidade das farinhas de soja com ausência de KTI foram bem próximos ao da caseína.

- Apesar da eliminação genética de KTI, os valores de inibição de tripsina e quimotripsina nas farinhas continuam altos. Sugerindo-se que isso pode ser devido a outros fatores presentes na soja que também exercem inibição sobre tripsina e quimotripsina como fitatos e taninos. Ainda, pode ser explicado pelo fato de que com a retirada do KTI, o BBI fica sozinho para inibir a tripsina e quimotripsina, ou seja, não tem competição entre inibidores.
- A temperatura de 89°C por 5 minutos foi suficiente para inativar as lectinas presentes nos grãos de soja.
- Com relação à avaliação da qualidade protéica das farinhas de soja, observou-se que os índices PER, NPR e NPU tiveram desempenho inferior ao da proteína-padrão caseína. Estes resultados já eram esperados, tendo em vista que a proteína de soja, reconhecidamente, é deficiente em alguns aminoácidos essenciais, o que limita a sua utilização para síntese protéica.
- Os aminoácidos sulfurados são considerados limitantes na soja, porém constatou-se através da análise da composição de aminoácidos nessas farinhas que o limitante nessa variedade em estudo é o aminoácido lisina.
- A ausência de KTI, embora tenha promovido melhoria na digestibilidade da proteína, não afetou seu desempenho para promover retenção de N e crescimento de ratos recém-desmamados.
- Os resultados do PDCAAS para as farinhas de soja estão de acordo com os resultados encontrados por outros autores porém, esse índice não foi eficiente para detectar a melhoria da retirada genética do KTI na soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, n. 3,p. 581-587, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS- AOAC **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14. ed.** Washington, D.C: 1984. 1141p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS- AOAC **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 15 ed. Washington, D.C: 1990. p.1105-1106.
- AXELROD, B. CHEESBROUGH, T. M., LAAKSO, S. Lipoxygenases in soybean. **Methods Enzymology**, v. 71, p.441-451, 1981.
- BARBOSA, M. C. A. **Determinação de inibidores de proteases em soja e seus derivados protéicos.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- BENDER, A. E., DOELL. B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal Nutrition**, v. 11; p.138-143, 1957.
- BENJAMIN, C. F., FIGUEIREDO, R. C., HENRIQUES, M . G. M. O., BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean aagglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 873-881, 1997.
- BLANCO, A., BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Plhaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.

- BODWELL, C. E., SATTERLEE, L. D., HACKLER, L. R. Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by *in vitro* enzymic digestion methods. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 33, p. 677-686, 1980.
- BRANDON, D. L., BATES, A. H. Definition of functional and antibody-binding sites on Kunitz soybean trypsin inhibitor isoforms using monoclonal antibodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 1336-1341, 1988.
- BRANDON, D. L., BATES, A. H., FRIEDMAN, M. Elisa analysis of soybean trypsin inhibitors in processed foods. In: **Nutritional And Toxicological Consequences Of Foods Processing**, FRIEDMAN, M. (Ed.). New York: Plenum Press, 1991. p. 321.
- BRANDON, D. L., BATES, A. H., FRIEDMAN, M. Antigenicity of soybean protease inhibitors. In: **Protease Inhibitors As Cancer Chemopreventive Agents**, TROLL, W., KENNEDY, A. R. (Eds.). New York: Plenum Press, 1993. p.107.
- BRANDON, D. L., HAQUES, S.L., FRIEDMAN, M. Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 195-200, 1987.
- BRESSANI, R., ELIAS, L. G. All vegetable protein mixtures for human feeding. **Journal of Food Science**, v. 31, p. 626-630, 1983.
- BUASSI, N., SILVA, R. S., SAMBASIVA RAO, C., PEREIRA, A. D. Integral soybean flour, use of a methodology of response for the study of nutritional aspects. **Archivos Latinoamericano Nutrición**, v.33, p.557-572, 1983.
- BUNKER, T. W., KOETSE, D. S., STEPHENSON, L. C., CREELMAN, R. A., MULLET, J. E., GRIMES, H. D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **The Plant Cell**, v. 7; p. 1319-1331, 1995.
- BURNS, R. A. Protease inhibitors in processed plant foods. **Journal of Food Protection**, v. 2, n.50, p. 161-166, 1987.
- CALAM, J., BOJARSKI, J. C., SPRINGER, C. J. Raw soybean flour increases cholecystokinin release in man. **British Journal Nutrition**, v. 56, p. 175-179, 1987.
- CALDERON DE LA BARCA, A. A., BAZQUEZ MORENO, E. L., ROBLES-BURGUENO, M. R. Active soybean lectin in foods: isolation and quantitation. **Food Chemistry**, v. 39, p. 321, 1991.
- DOELL, B. H., EBDEN, C. J., SMITH, C. A. Trypsin inhibitor activity of conventional foods which are part of the British diet and some soya products. **Quality Plant Food Human Nutrition**, v. 31, p. 139-150, 1981.

- DOMAGALSKI, J. M., KOLLIPARA, K. P., BATES, A. H., BRANDON, D. L., FRIEDMAN, M., HYMOWITZ, T. Nulls for the major soybean Bowman-Birk protease inhibitor in the genus *Glycine*. **Crop Science**, v. 32, p. 1502-1505, 1992.
- DOUGLAS, M. W., PARSONS, C. M., HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. **Poultry Science**, v. 78, p. 91-95, 1999.
- ERLANGER, B. F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archivos Biochemistry Physiology**, v. 95, p. 271-278, 1961.
- FARMER, E. E., RYAN, C. A. Octadenoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, v. 4, p. 129-134, 1992.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Energy and protein requirements**. Geneva: 1985. 724 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO. **Protein quality evaluation**. Rome: 1991. 66p. (FAO Food and Nutrition Paper, 51).
- FRIEDMAN, M., BRANDON, D. L., BATES, A. H., HYMOWITZ, T. Comparison of a commercial soybean cultivar and an isolate lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effects of heating. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 39, p. 327-335, 1991.
- FRIEDMAN, M., GUMBMAN, M. R. Nutritional improvement of soy flour through inactivation of trypsin inhibitors by sodium sulfite. **Journal of Food Science**, v.51, p. 1239-1241, 1986.
- FURUTA, S. L., NISHIBA, Y., HAJIKA, M., IGITA, K., SUDA, I. DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids an extracts prepared from soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1; p.236-239, 1996.
- GOLDSTEIN, I. J., PORETEZ, R. D. Isolation, physiochemical characteristics, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I. J. (Eds.). **The lectins properties, functions and applications in biology and medicine**. Orlando: Academic Press, 1986. p. 33-247.
- GOMES, J. C., COELHO, D. T. **Leite de soja na alimentação humana**. Viçosa, MG: UFV, 1989. 25p.
- GRANT, G. Anti-nutritional effects of soybean: a review. **Progress in Food and Nutritional Science**, v. 13, p. 317-348, 1989.
- GRANT, G., HENDERSON, L. T., EDWARDS, J. E., EWAN, E. C., BARDOCZ, S., PUSZTAI, A. Kidney bean and soybean lectins cause enzyme secretion by pancreatic acini in vitro. **Life Sciences**, v. 60, n. 18, p. 1589-1595, 1997.

- GUTIERREZ, R. R., ROMANO, M. A., GOMEZ, M. H. Evaluación nutricional y de estabilidad durante el almacenamiento de mezclas extruidas con sorgo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 37, n. 3, p. 503-514, 1987.
- HAWRYLEWICZ, E. J., ZAPATA, J. J., BLAIR, W. H. Soybeans and experimental cancer: animal studies. **Journal of Nutrition**, v. 3, n. 125, p. 698-708, 1995.
- HENLEY, E. C., KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 4, p. 74-77, 1994.
- HERKELMAN, K. L., CROMWELL, G. L., PFEIFFER, T. W., KNABE, D. A. Apparent digestibility of amino acids in raw and heated conventional and low trypsin inhibitor soybeans for pigs. **Journal of Animal Science**, v.70, p.818-826, 1992.
- HERNANDEZ, M., LAVEJA, A., SOTLO, A. Determinacion de la digestibilidad proteinica in vitro e in vivo en cereales y leguminosas crudos y cocidos. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 34, n. 3, p. 514-522, 1984.
- HERZIG, K. H., BARDOCZ, S., GRANT, G., NUSTEDE, R., KöLSCH, U. R., PUSTAI, A. Red kidney bean lectin is a potent cholecystokinin releasing stimulus in the rat inducing pancreatic growth. **Gut**, v. 41, p. 333-338, 1997.
- HILDEBRAND, D. F, HAMILTON-KEMP, T. R., LEGG, C. S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: ocurrence, properties and possible functions. **Current Topics Plant Biochemistry Physiology**, v. 7, p. 201-219, 1988.
- HILDEBRAND, D. F. Lypoxigenases. **Physiology Plant**, v. 76, p. 249-253, 1989.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3.ed., São Paulo: 1985. v. 1, 533p.
- JORDINSON, M., DEPREZ, P. H., PLAYFORD, R. J., HEAL, S., FREEMAN, T. C., ALISON, M., CALAM, J. Soybean lectin stimulates pancreatic exocrine secretion via CCK-A receptors in rats. **The American Physiology Society**, v. 96, p. G653-G659, 1996.
- JORDINSON, M., BEALES, I. L. P., CALAM, J. Soybean agglutinin stimulated cholecystokinin release from cultured rabbit jejunal cells requires calcium influx via L- type calcium channels. **Peptides**, v. 19, n. 9, p. 1541- 1547, 1998.
- KAKADE, M. L., RACKIS, J. J, McGHEE, J. E., PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p. 376-382, 1974.

- KIM, S., HARA, S., HASE, S., IKENAKA, T., TODA, H., KITAMURA, K., KAIZUMA, N. Comparative study on amino acid sequence of Kunitz-type soybean trypsin inhibitors, Ti^a, Ti^b, Ti^c. **Journal Biochemistry**, v. 98, p. 435-448, 1985
- KITAMURA, K., DAVIES, C. S., KATZUMA, N., NIELSEN, N. C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seed. **Crop Science**, v. 23, p. 924-927, 1983.
- KROGDAHL, A., HOLM, H. Soybean proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. **Journal of Nutrition**, v. 111, p. 2045, 1981.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIENER, I. E. Trypsin inhibitors: concern for human nutrition or not? **Journal of Nutrition**, v. 116, p. 920-923, 1986.
- LIENER, I. E. From soybeans to lectins: a trail of research revisited. **Carbohydrate Research**, v. 213, p. 1-5, 1991.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 34, p. 31-67, 1994.
- LIENER, I. E. Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 744-750, 1995.
- LIMA, G. J. M. M. Importância da qualidade nutricional da soja e de seus subprodutos no mercado de rações: situação atual e perspectivas futuras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 1999. 533p. (Embrapa Soja Documentos, 124).
- LIS, H., SHARON, N. Lectins in higher plants. **The Biochemistry of Plants**, v. 6, p. 371-447, 1981.
- LIU, K. **Soybeans; chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532p.
- LU, L. J. W., ANDERSON, K. E., GOMEZ, G., NEALON, W. H. Decreased plasma levels of cholecystokinin in healthy males after chronic ingestion of a heat treated soya product. **Cancer Letters**, v. 90, p. 149-155, 1995.
- MARCZY, J. S., SIMON, M. L., MÓZSIK, L., SZAJÁNI, B. Comparative study on the lipoxygenase activities of some soybean cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 313-315, 1995.
- McLAUGAULAN, J. M., KEITH, O. M. Biossays for protein quality. In: FRIEEDMAN, M. (Ed.). **Protein nutritional quality of foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1975. p. 79-85.

- MILLER, D. S., BENDER, A. E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **British Journal Nutrition**, v. 9; p. 382-388, 1955.
- MITCHELL, H. A. A method of determining the biological value of proteins. **Journal Biology Chemistry**, v. 58, p. 873-922, 1923.
- MONTEIRO, A. C. O., MUNIZ-FILHO, W. E., HORTA, A. C. G., BELTRAMINI, L. M., MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Canacalia dictyota* seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 3, p. 167-172, 1988.
- MORALES DE LEÓN, J. C., RODRIGUEZ, H. B., ZARDAIN, M. I. Cooking procedures for direct consumption of whole soybeans. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 35, n. 2, p. 326-336, 1985.
- NELSON, M. J., SEITZ, S. P. The structure and function of lipoxygenase. **Current Biology**, v. 4, p. 878-884, 1994.
- OLIVEIRA, D. A., PIOVESAN, N. D., MORAES, R. M. A., ROCHEBOIS, G. B., OLIVEIRA, M. G. A., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Identification of the three genotypic classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques**, v.12, p.71-74, 1998.
- 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.
- RACKIS, J. J., GUNBMANN, M. R., LIENER, I. E. The USDA trypsin inhibitor study. I. background, objectives and procedural details. **Quality Plant Food Human Nutrition**, v. 35, p. 213-242, 1985.
- RACKIS, J. J., WOLF, W. J., BAKER, E. C. Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 199, p. 299-347, 1986.
- RACKIS, J. J., SESSA, D. J., HONIG, D. H. Flavor problems of vegetable food proteins. **Journal American Oil Chemistry**, v. 56; p. 262-271. 1979.
- 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**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. **Phytochemistry**, v. 16, p. 159-169, 1977.
- RITTER, M. A., MORR, C. V., THOMAS, R. L. In vitro digestibility of phytase-reduced and phenolics-reduced soy protein. **Journal Food Science**, v. 52, n. 2, p. 325-341, 1987.

- ROEBUCK, B. Trypsin inhibitors: potential concern for humans? **Journal of Nutrition**, v.117, p. 398-400, 1987.
- RYAN, C. A. Proteinase inhibitors. In: **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1981.351p.
- SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 758-764, 1997.
- SAVAGE, W. D., WEI, L.S., SUTHERLAND, J. W., SCHMIDT, S. J. Biologically active components inactivation and protein insolubilization during heat processing of soybeans. **Journal Food science**, v. 60, n. 1, p. 164-180, 1995.
- SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição; fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, 1987. 387 p.
- SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Reviews Plant Molecular Biology**, v. 42, p.145-188, 1991.
- SPILATRO, S. R., COCHRAN, G. R., WALKER, R. E., CABLISH, K. L., BITTNER, C. C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v.110, p. 825-834, 1996.
- STAHLHUT, R. W., HYMOWITZ, T. Variation in the low molecular weight proteinase inhibitors of soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 766-769, 1983.
- SUDA, I., HAJIKA, M., NISHIBA, Y., FURUTA, S., IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Journal of Agricultural**, v. 43, p. 742-747, 1995.
- TAGLE, M. A. **Nutrição**. São Paulo: Artes Médicas, 1981. 234p.
- TAN-WILSON, A. L., COSGRIFF, S. E., DUGGAN, M. C., OBACH, R. S., WILSON, K. A. Bowman-Birk proteinase isoinhibitors complements of soybeans strains. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 33, p. 389-393, 1985.
- TAN-WILSON, A. L. Subclassification of soybean Bowman-Birk isoinhibitors. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 65, p. 1475-1478, 1988.
- 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.
- USDA – United States Department of Agriculture. **Nutrient Database for Standard Reference**. Food Group 16: Legumes and Legume products. Release 12. 1998. Disponível na URL: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

VIOLA, E. S. Uso de soja integral em dietas de suínos e aves: oportunidades e entraves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais**...Londrina: Embrapa Soja, 1999.

ZOUGARI, A., GUY, S., PLANCHON, C. Genotypic lipoxygenase variation in soybean seeds and response to nitrogen nutrition. **Plant Breeding**, v. 114; p. 313-316, 1995.

APÊNDICE

Quadro 1A – Dados obtidos das variáveis ganho de peso, ingestão total de alimentos e proteína ingerida, para avaliação da qualidade protéica das dietas, experimento com ratos

Dieta	Rato	Ganho de peso (g)	Ingestão total de alimentos (g)	Proteína ingerida (g)
Caseína	1	77	209,79	20,01
	2	67	208,40	19,88
	3	82	233,59	22,28
	4	83	226,38	21,59
	5	92	249,19	23,77
	6	86	227,69	21,72
Aprotéica	1	-14	-	-
	2	-12	-	-
	3	-14	-	-
	4	-15	-	-
	5	-14	-	-
	6	-18	-	-
D1	1	13	126,99	12,14
	2	26	163,77	15,66
	3	13	122,36	11,70
	4	15	143,27	13,70
	5	15	151,48	14,48
	6	20	136,16	13,02
D2	1	23	156,61	14,50
	2	11	138,52	12,83
	3	20	159,04	14,73
	4	18	142,87	13,23
	5	09	121,34	11,24
	6	13	138,58	12,83
D3	1	13	115,32	11,23
	2	18	121,72	11,85
	3	10	120,58	11,74
	4	26	157,48	15,34
	5	28	153,77	14,98
	6	22	157,45	15,33
D4	1	29	164,97	16,43
	2	29	155,78	15,51
	3	15	133,32	13,28
	4	02*	103,21	10,28
	5	14	140,04	13,95
	6	13	143,07	14,25

*eliminado dos cálculos.

D1 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, sem KTI;

D2 - dieta de farinha de soja integral sem LOX, com KTI;

D3 - dieta de farinha de soja integral com LOX, sem KTI;

D4 - dieta de farinha de soja integral com LOX, com KTI.