

LUCIANA RESENDE CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO BROMATOLÓGICA E DIGESTIBILIDADE
IN VITRO E IN VIVO DE PROTEÍNAS DE FARINHAS DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2003

LUCIANA RESENDE CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO BROMATOLÓGICA E DIGESTIBILIDADE
IN VITRO E IN VIVO DE PROTEÍNAS
DE FARINHAS DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

APROVADA: 31 de março de 2003.

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Conselheiro)

Prof^a. Maria Helena Nasser Brumano

Prof^a. Neuza Maria Brunoro Costa

Prof. José Humberto de Queiroz

Prof^a. Maria Goreti Almeida de Oliveira
Orientadora

A Deus, pelo dom da vida, a todos meus familiares, pelo apoio, ao Betinho pelo amor e a todos meus amigos pela constante presença.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela presença constante em minha vida e o qual agradeço por mais esta conquista;

À Universidade Federal de Viçosa, aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos, Nutrição, Química e Bioquímica, pela oportunidade de realização do curso;

À CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo;

À secretária do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Marisa, e o secretário da Bioquímica, Eduardo pela disponibilidade;

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, pelos ensinamentos e, sobretudo pela amizade;

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, pelos ensinamentos e toda a dedicação prestada;

Aos professores, José Humberto, Sebastião, Maria Helena, e Paulo Cecom, pela disponibilidade e ensinamentos transmitidos;

À Minha mãe, Maria das Graças, pela dedicação e ao meu pai Aloísio, pela insistência;

Aos meus irmãos Adriano, Rodrigo, Priscila e Carine, pelo carinho;

Ao meu tio Eduardo, pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos demais membros da minha Família, pelo apoio;

Ao Betinho pelo amor, carinho, assistência, paciência e dedicação;

Ao Cristiano, pela grande ajuda e conhecimentos transmitidos;

À estagiária Isabela, pela grande ajuda e amizade;

À grande amiga Martha Elisa, por tudo;

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia: Luciana Xavier, Agenor, Inês, Carina, Gal, Isaura, pelo tempo de convívio e amizade;

Aos colegas do BIOAGRO, José Fausto, Aloísio, Jander, Tadeu, Gláucia e Sandra pela disponibilidade e amizade;

A todos os amigos da Igreja Nossa Senhora de Fátima;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANA RESENDE CARDOSO, filha de Aloísio de Castro Cardoso e Maria das Graças Pereira Cardoso, nasceu em 30 de Março de 1976, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Em agosto de 1995, iniciou o Curso de Nutrição na Universidade Federal de Ouro Preto, concluindo-o em fevereiro de 2000.

Em março de 2001, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Proteínas de soja	4
2.2. Os inibidores de proteases	7
2.2.1. Efeito dos inibidores de proteases sobre a digestibilidade protéica	14
2.3. Processamento térmico	16
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20

4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Material genético	22
4.2. Obtenção da farinha de soja integral	23
4.3. Caracterização das farinhas	23
4.3.1. Análise eletroforética de KTI	24
4.3.2. Detecção qualitativa de lipoxigenase	24
4.4. Determinação da composição centesimal	25
4.4.1. Determinação do teor de proteínas	25
4.4.2. Determinação do teor de cinzas	26
4.4.3. Determinação do teor de umidade	26
4.4.4. Determinação do teor de lipídios	27
4.4.5. Determinação do teor de carboidratos	28
4.4.6. Determinação do teor de minerais	28
4.5. Tratamento térmico	28
4.6. Determinação da atividade dos inibidores de proteases	29
4.6.1. Determinação da atividade de tripsina	30
4.6.2. Determinação do fator de tripsina	32
4.6.3. Determinação da atividade da quimotripsina	32
4.6.4. Determinação do fator da quimotripsina (C)	33
4.7. Teste de urease	34
4.8. Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i>	34
4.8. Determinação da digestibilidade <i>in vivo</i>	35
4.10. Análise estatística	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Caracterização das farinhas de soja	41
5.2. Caracterização da composição centesimal das farinhas	43
5.3. Análise dos fatores de tripsina e quimotripsina	46
5.4. Caracterização das farinhas integrais de soja <i>in natura</i> quanto à presença de inibidores de proteases (KTI e BBI)	47
5.5. Caracterização das farinhas integrais de soja processadas quanto à presença do inibidor de tripsina (KTI)	52
5.6. Teste de urease	55

5.7. Determinação da qualidade protéica das farinhas integrais de soja ..	56
5.7.1. Consumo alimentar e ganho de peso	57
5.7.2. Análise do NPR e PER	59
5.7.3. Análise da digestibilidade <i>in vivo</i>	61
5.7.4. Digestibilidade <i>in vitro</i>	63
6. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE	75

RESUMO

CARDOSO, Luciana Resende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2003. **Caracterização bromatológica e digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de farinhas de soja.** Orientadora: Maria Goreti Almeida de Oliveira. Conselheiros: Sebastião Tavares de Resende e Maurílio Alves Moreira.

A soja é uma leguminosa de alta qualidade protéica, porém o elevado conteúdo de fatores antinutricionais no grão, sobretudo os inibidores de proteases KTI e BBI, reduz seu valor nutricional. Contudo com o avanço das pesquisas, linhagens de soja têm sido desenvolvidas de maneira a apresentar atividade reduzida e/ ou completa ausência dos inibidores de proteases e lipoxigenase. No presente estudo quatro variedades de soja, com ausência e/ou presença de KTI e LOX sendo derivadas em farinhas integrais foram submetidas às análises da composição centesimal, determinação da atividade inibitória de tripsina e quimiotripsina quando *in natura* e quando processada à temperatura de 120 °C por 9, 12, 15, e 18 minutos e determinação da qualidade protéica através de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Estas análises tiveram como objetivo avaliar se o melhoramento genético afeta a qualidade nutricional das farinhas de soja. Os resultados obtidos quanto à análise bromatológica para as quatro linhagens foram os seguintes: cinzas variaram de 5,86

a 5,95%, proteínas de 42,49% a 44,07%, lipídeos de 23,53% a 25,30% e carboidratos de 14,65% a 17,33%. Para os minerais, os teores obtidos em mg/100 g de amostra foram: Fe variou de 4,41mg a 5,21mg, Zn de 4,43mg a 4,88mg, Mn de 1,99mg a 2,29mg, Mg de 223,46mg a 235,01mg, Ca de 168,01mg a 211,29mg e K de 2146,63mg a 2280,61mg. Demonstrando que as linhagens de soja modificadas geneticamente possuem em sua constituição nutrientes equivalentes em proporção ao grão de soja convencional, sem, contudo, apresentar os efeitos negativos da presença do KTI e LOX. A atividade inibitória de tripsina, em mg/g de proteína, obtida para as linhagens in natura foram bastante elevadas variando de 900 a 1300. Contudo, as farinhas de soja isentas de KTI foram as que apresentaram menor atividade inibitória. Com o processamento térmico a 120°C a atividade inibitória de tripsina reduziu bruscamente sendo que o tempo de 9 minutos foi suficiente para a completa inativação dos inibidores nas variedades isentas de KTI. Porém para as linhagens com KTI, a completa inativação dos inibidores só foi conseguida com o tempo de 18 minutos de autoclave. Em relação à qualidade protéica verifica-se, através de ensaio biológico com ratos, valores de PER variando de 1,83 a 2,75, NPR de 3,036 a 4,08 e a digestibilidade verdadeira de 79,02 a 83,17 para farinhas de soja processadas, sendo que não foi verificada diferença estatística entre as farinhas com KTI processadas por 18 minutos daquelas processadas por 12 minutos. Isto sugere, que a farinha de soja isenta em KTI necessita de um tempo menor de exposição ao calor, o que é bastante favorável em termos de qualidade nutricional. Quanto a digestibilidade *in vitro* os valores encontrados variaram de 5,28 a 36,43%, não tendo boa correlação com a digestibilidade *in vivo*.

ABSTRACT

CARDOSO, Luciana Resende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2003. **Caracterização Bromatológica e digestibilidade in vitro e in vivo de proteínas de farinha de soja.** Adviser: Maria Gorete Almeida de Oliveira. Committee members: Sebastião Tavares de Resende and Maurílio Alves Moreira.

Soybean is a leguminosae of high proteic quality but the high contents of anti-nutritional factors in the grain, especially the inhibitors of proteases KTI and BBI, reduces its nutritional value. With the advance of researchs, soy lineages have been developed in a way to show reduced activity and / or complete absense of proteasis inhibitors and lipoxigenases. In this study, four different varieties of soy, with absense and or presence of KTI and LOX, being derived from whole flours were taken to analyse the centesimal composition, determination of the inhibitor activity of trypsin and chymotrypsin when in natura and when processed under the temperature of 120°C for 9, 12, 15, and 18 minutes and the proteic quality through tests *in vivo* and *in vitro*. These analisis had as their objective evaluate if the genetic improvement affects the nutritional quality of the soy flours. The obtained results for the bromatologic analisis for the four lineages were the following: gray varied from 5,86 to 5,95%, proteins from 42,49% a 44,07% lipids from 23,53 to 25,30%

and carbohydrates from 14,65% a 17,33%. To the minerals, the obtained contents in mg/100g of sample were: Fe varied from 4,41mg to 5,21 mg, Zn from 4,43 mg to 4,88 mg, Mn from 1,99 mg to 2,29 mg, Mg from 223,46 mg to 235,01 mg, Ca from 168,01 mg to 211,29 mg and K from 2146,63 mg to 2280,61 mg. Showing that the genetically modified soy lineages have in their constitution nutrients equivalent in proportion to the conventional soy grains, without showing negative effects of the KTI and LOX presence. The trypsin inhibitor activity, in mg/g of protein, obtained for the *in natura* lineages were highly elevated, varying from 900 to 1300. However, the soy flours free from KTI were the ones that showed a minor inhibitor activity. With the thermal processing at 120°C, the trypsin inhibitor activity reduced roughly, the time of 9 minutes was enough for the complete inactivation of the inhibitors in the varieties free from KTI. However, for the lineages with KTI, the complete inactivation of the inhibitors was only taken with the time of 18 minutes of autoclave. In relation to the proteic quality, it is found through the biologic test with rats, values of PER virying from 1,83 to 2,75, NPR from 3,036 to 4,08 and a true digestibility of 79,02 to 83,17 to the processed soy flours, but it wasn't verified the statistical difference among the flours with KTI processed for 18 minutes from the ones processed for 12 minutes. It suggests that the soy flour free from KTI needs a shorter time of exposition to heat, what is highly favourable in terms of nutritional quality. About the digestibility *in vitro*, the obtained values varied from 5,28 to 36,43%, not having a good co-relation with the digestibility *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

A soja possui em sua constituição além de vitaminas, minerais, fibras e carboidratos, grande quantidade de proteínas (30 a 46%) e lipídios (12 a 24%). Isto tem despertado cada vez mais o interesse comercial, devido a crescente utilização da soja na alimentação animal e humana e também na indústria de alimentos (SEDIYAMA, 1989). Desta forma, pesquisas na área de melhoramento têm sido incentivadas de modo a desenvolver cultivares que atendam às indústrias de óleo e farelo, de produtos alimentícios em geral, bem como linhagens para consumo humano (BORÉM, 1999).

As proteínas da soja são de grande interesse econômico por estarem presentes em grande quantidade no grão e por apresentarem alto valor biológico. Além disto, apresentam produção relativamente de baixo custo, com rendimento de proteína por hectare maior do que qualquer outro produto vegetal (CADWELL, 1981). Além das proteínas da soja apresentarem alto valor biológico, ou seja, possuir em sua composição todos os aminoácidos essenciais contém também propriedades funcionais, tornando-a ingrediente indispensável para uso na ração animal e na composição de uma série de alimentos (SEDIYAMA, 1989).

Apesar da soja ser uma fonte de proteínas, o seu uso na alimentação ficou restrito, devido à presença, no grão, de substâncias consideradas antinutricionais que atuam diminuindo sua aceitação como alimento e também comprometendo a disponibilidade de suas proteínas ao nível do trato gastrointestinal. Estes fatores compreendem os termolábeis (inibidores de tripsina, hemaglutininas, bocígenos, antivitaminas e fitatos) e os termorresistentes (estrogênio, saponinas, fatores de flatulência, lisinoalanina e alergênicos). A presença destes fatores na soja afeta a biodisponibilidade de seus nutrientes e a qualidade nutricional de seus produtos, além da digestibilidade protéica ficar comprometida (SILVEIRA et al., 1989).

Destes fatores, os inibidores de tripsina são os mais bem estudados por afetarem a digestibilidade das proteínas da soja. Vários inibidores têm sido isolados do grão de soja, porém dois deles Kunitz (KTI) e Bowman Birk (BBI) têm sido mais bem definidos (KONAREV et al., 2002). O KTI e o BBI atuam inibindo enzimas proteolíticas específicas no trato gastro intestinal prejudicando a digestibilidade protéica o que indisponibiliza o fornecimento de aminoácidos para o organismo, acarretando grandes prejuízos para o crescimento e desenvolvimento animal (WHITAKER, 1994). A presença destes inibidores pode causar estímulo da secreção pancreática causando hipertrofia do órgão e inibir o crescimento, além de causar câncer em ratos alimentados com soja crua (ROEBUCK, 1987).

A fim de combater os problemas relacionados com os fatores antinutricionais da soja, sobretudo a presença dos inibidores de tripsina, vários processos vêm sendo desenvolvidos, porém muitos deles são de elevado custo o que acaba por inviabilizar o uso da soja na alimentação. Destes processos, o que ainda vem sendo muito utilizado é o tratamento térmico. Este visa a inativação ou destruição dos fatores antinutricionais de forma a melhorar a digestibilidade da proteína da soja. Porém, não é um método satisfatório, pois não elimina completamente a atividade biológica do inibidor. Além disto, se seu uso for inadequado proporcionará a perda da qualidade nutritiva da soja, pois o uso de

temperaturas elevadas pode destruir aminoácidos importantes diminuindo o valor nutritivo do alimento podendo também, afetar sua solubilidade (ROEBUCK, 1987).

Desta forma, a fim de se conseguir uma melhora na qualidade nutricional do grão de soja, no que se refere á sua aceitação e sua melhor digestibilidade, sem, contudo afetar suas propriedades nutricionais, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas ao nível de melhoramento genético de forma a se obter variedades com alto teor de proteína, atividade reduzida e até mesmo completa ausência da atividade biológica de inibidores de tripsina e da enzima lipoxigenase. Assim, as linhagens desenvolvidas de soja têm sido investigadas para uma possível substituição da soja convencional pela agroindústria.

Assim, o presente trabalho avaliou a digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas de diferentes linhagens de soja obtidas do programa de melhoramento da soja – BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia e Agropecuária), que diferem quanto à presença de KTI e/ou lipoxigenases, submetidas ou não ao tratamento térmico. O objetivo foi de avaliar se o melhoramento genético afetou a digestibilidade protéica das linhagens de soja submetidas ou não ao tratamento térmico, bem como verificar o efeito deste tratamento sobre a atividade dos inibidores de proteases e sobre a digestibilidade *in vivo* e *in vitro* destas linhagens.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas da soja

A soja é uma leguminosa que teve sua origem na china, se expandindo por todo o oriente sendo utilizada, sobretudo na alimentação humana. Por volta em 1908 a primeira carga de soja chegou ao ocidente, Inglaterra, e foi processada para obtenção do óleo e farinha, sendo que esta última foi utilizada para ração animal. Nos estados Unidos a produção da soja em grandes quantidades começou em 1924. Atualmente este país é o seu maior produtor (CADWELL, 1981).

O avanço das pesquisas com o grão de soja levou à tona também, suas propriedades nutricionais despertando assim, o interesse para seu uso na alimentação humana. Seu uso na alimentação humana no Brasil teve início por volta de 1908, com a chegada dos primeiros imigrantes japoneses a São Paulo. Porém, o cultivo limitava-se ao consumo próprio, entretanto, atualmente o Brasil se destaca como sendo o segundo lugar em sua produção mundial (CADWELL, 1981).

As proteínas da soja constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidades de carga e estruturas diferentes. As diferenças de tamanho ou peso molecular podem ser demonstradas por ultracentrifugação ou

ultrafiltração em gel. A ultracentrifugação separa as proteínas de soja em 4 frações com velocidades de sedimentação equivalentes a 2S, 7S, 11S e 15S, sendo a maior parte, as globulinas (SGARBIERI,1996).

Embora estas proteínas sejam de grande interesse econômico por estarem em grande quantidade no grão, existe uma limitação com relação à sua utilização por apresentar deficiência em aminoácidos sulfurados (SILVEIRA et al., 1989).

Além das propriedades nutritivas das proteínas de soja, estas são de interesse também por conferirem a uma variedade de alimentos, nos quais são adicionadas, propriedades funcionais desejáveis tais como emulsificação, absorção de gordura, retenção de umidade, espessamento e capacidade de formar espuma. Porém, estas propriedades podem ser influenciadas por outros componentes da soja (SEDIYAMA, 1989).

A proteína é um dos elementos indispensáveis na alimentação, pois exerce funções importantes como na, defesa, transporte de nutrientes e outras substâncias no sangue, além do desenvolvimento e crescimento do organismo. Assim, o corpo necessita da ingestão diária de proteína sendo que a quantidade ingerida para um adulto normal é de aproximadamente 0,8g/Kg de peso corporal, porém em condições especiais como crianças, gestantes, lactantes e alguns tipos de patologia esta relação deve ser aumentada. (CADWELL, 1981).

Fração protéica	Porcentagem do total de proteínas	Componentes	Peso molecular
2S	22	Inibidores de tripsina	8.000
			21.500
		Citocromo C	12.000
		Globulina 2,3S	18.200
		Globulina 2,8S	32.000
		Alantoinase	50.000
7S	37	Beta-amilase	61.700
		Lectina	110.000
		(Hemaglutinina)	108.000
		Lipoxigenase	180.000
		Globulina 7s	
11S	31	Globulina 11s	210.000
		(glicina)	
15S	11	-----	600.000

Do total de 40% das proteínas constituintes do grão de soja, encontram-se os inibidores de proteases, aproximadamente 6% e as enzimas lipoxigenases, aproximadamente 1%. Contudo, os teores de proteína e também de óleo na soja podem ser influenciados por condições ambientais e práticas agronômicas, além do melhoramento genético (KROGDAHL, 1981; SILVEIRA, 1989).

O valor nutritivo de uma proteína depende não somente do seu teor quantitativo, mas também da qualidade de seus aminoácidos, da disponibilidade destes aminoácidos e, portanto, de sua digestibilidade. A digestibilidade pode ser entendida como sendo a hidrólise das proteínas pelas enzimas digestivas até aminoácidos os quais estariam sendo biologicamente disponíveis, desde que não houvesse interferência na absorção dos mesmos pelo organismo. É avaliada pelo quociente do nitrogênio absorvido pelo nitrogênio ingerido com a dieta, expresso em porcentagem. Porém, o valor nutritivo dos alimentos é comumente afetado pelos vários tipos de tratamentos a que a fração protéica dos alimentos é submetida durante o armazenamento e preparo (SGARBIERI, 1996).

Apesar da soja ser rica em vários micro e macronutrientes, o que aumenta seu valor nutritivo, possui também em sua composição compostos biologicamente ativos que comprometem sua qualidade e que são denominados de fatores antinutricionais, nos quais compreendem os termolábeis tais como os inibidores de tripsina, hemaglutininas, bocígenos, antivitaminas e fitatos e os termorresistentes, ou seja, estrogênio, saponinas, fatores de flatulência, lisinoalanina e alergênicos. Estes fatores atuam no sentido de diminuir a eficiência do metabolismo interferindo com a eficiência de utilização dos nutrientes, como é o caso dos inibidores de proteases e das lectinas. Embora esses fatores não sejam considerados tóxicos, podem provocar respostas fisiológicas adversas aos animais e se não forem destruídos podem reduzir o potencial nutricional da soja. Devido a estes fatores, se verifica um índice de digestibilidade para as proteínas de origem animal maior que 95%, sendo, portanto, maior que o índice de digestibilidade de proteínas de origem vegetal, que é menor que 80% (SGARBIERI, 1996).

Grande quantidade de proteína isolada de soja e concentrados são usados como ingredientes funcionais e nutricionais pela indústria de alimentos. Assim, um alto grau de digestibilidade protéica é desejável. Portanto, vários processos têm sido desenvolvidos no sentido de remover frações que dificultam a digestibilidade das proteínas de soja, além dos inibidores e compostos como os fitatos e polifenólicos (RITTER,1987).

RITTER et al., (1987), estudando a digestibilidade *in vitro* de isolado de proteína de soja com teores reduzidos de fitatos e compostos fenólicos, verificaram que a fração 11S da proteína de soja é mais digerível que a fração 7S. Isto pode ser possível devido à baixa concentração de fitatos, 0,07% na fração 11S, comparado com 1,41% na fração 7S. Verificaram ainda que fitatos e compostos fenólicos tendem a diminuir a digestibilidade das proteínas. Tem sido proposto que esta ação inibitória pode ser devido à ligação de fitatos e compostos fenólicos próximo ao centro ativo das enzimas digestivas.

2.2. Os inibidores de proteases

Os inibidores de proteases estão presentes em microorganismos, tecidos e fluidos animais e no trato gastro intestinal, mas é no reino vegetal que eles se encontram largamente distribuídos, principalmente nas leguminosas (feijão, soja, etc.), gramíneas (grãos de cereais) e nas solanáceas (batata, berinjela, etc.) (FILHO, 1989).

Há aproximadamente de 7 a 10 inibidores de proteases na soja. Vários já foram isolados, porém dois deles, fazem parte da fração de proteínas solúveis, o inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e o inibidor Bowman Birk (BBI), presentes no grão. Estes têm sido bastante estudados e caracterizados. Ambos inibem enzimas digestivas pertencentes à classe de serino-proteases tais como tripsina e quimiotripsina (LASKOWSKI, 1980).

Algumas pesquisas têm relacionado os níveis de inibidores de proteases em sementes de soja com a presença da enzima lipoxigenase (LOX), pelo fato

destas participarem da biossíntese de jasmonato, o qual ativa o gene para a síntese de inibidores de proteases. Com isto, a LOX também, tem sido relacionada com a resposta ao dano nas plantas. Assim, CARVALHO et al., (1999), estudando o efeito das lipoxigenases sobre os níveis dos inibidores de proteases em sementes de soja verificaram que as linhagens destituídas de LOX apresentaram uma redução na inibição de tripsina de 81 para 32% e de quimiotripsina de 28% para 15%. Os dados obtidos sugeriram que a completa eliminação genética de LOX nas sementes reduziu os níveis de KTI e BBI em sementes de soja. Estes dados sugeriram que com a eliminação genética de LOX ocorre também queda nos níveis de inibidores de proteases nas sementes.

Entretanto, o teor de inibidores na planta irá depender de uma série de fatores como da variedade e do estado fisiológico. Conseqüentemente, a atividade destes inibidores encontrado nas sementes e turbéculos irá variar com o tempo e condições de colheita, com a variedade e com a duração e condições de armazenamento (BURNS, 1987).

Desta forma, o papel biológico dos inibidores de proteases nos vegetais tem sido relacionado à defesa da planta contra insetos ou invasão bacteriana ou na regulação e na proteção contra proteólise não desejada, por endopeptidases, em tecidos de planta. As enzimas proteolíticas permaneceriam inativas até a germinação, quando então as proteínas armazenadas devem ser metabolizadas. Ressalta-se que os inibidores são ricos em aminoácidos Cys, e que após terem exercido seu papel primário, podem ter seus constituintes sendo disponibilizados para a síntese de novas proteínas (FILHO, 1992).

Na molécula de cada inibidor existe um sítio reativo o qual interage especificamente com o sítio ativo da enzima. Assim, o inibidor reage com a enzima como um substrato formal, que ao invés da dissociação, da cisão química da molécula, eles permanecem ligados em um complexo covalente forte através de aminoácidos específicos no sítio reativo. Este complexo resultante se ajusta tão firmemente que a água é excluída do sítio ativo da enzima impedindo a hidrólise e liberação do inibidor (RACKIS et al., 1986). A constante de

equilíbrio para a associação é extremamente alta, na ordem de 10^7 a 10^{13}M^{-1} , sendo que esta é do tipo competitiva (LASKOWSKI, 1980).

O inibidor Kunitz foi descoberto pelo pesquisador de mesmo nome em 1946. Formado por um único polipeptídeo apresenta massa de 21500 Dalton e ponto isoelétrico a pH 4,5. É constituído de 181 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto possuindo 2% de cisteína na molécula. O centro de ligação deste inibidor com a tripsina está localizado nos resíduos de Arg 63 e Ile 64 (Figura 1) (FILHO, 1989).

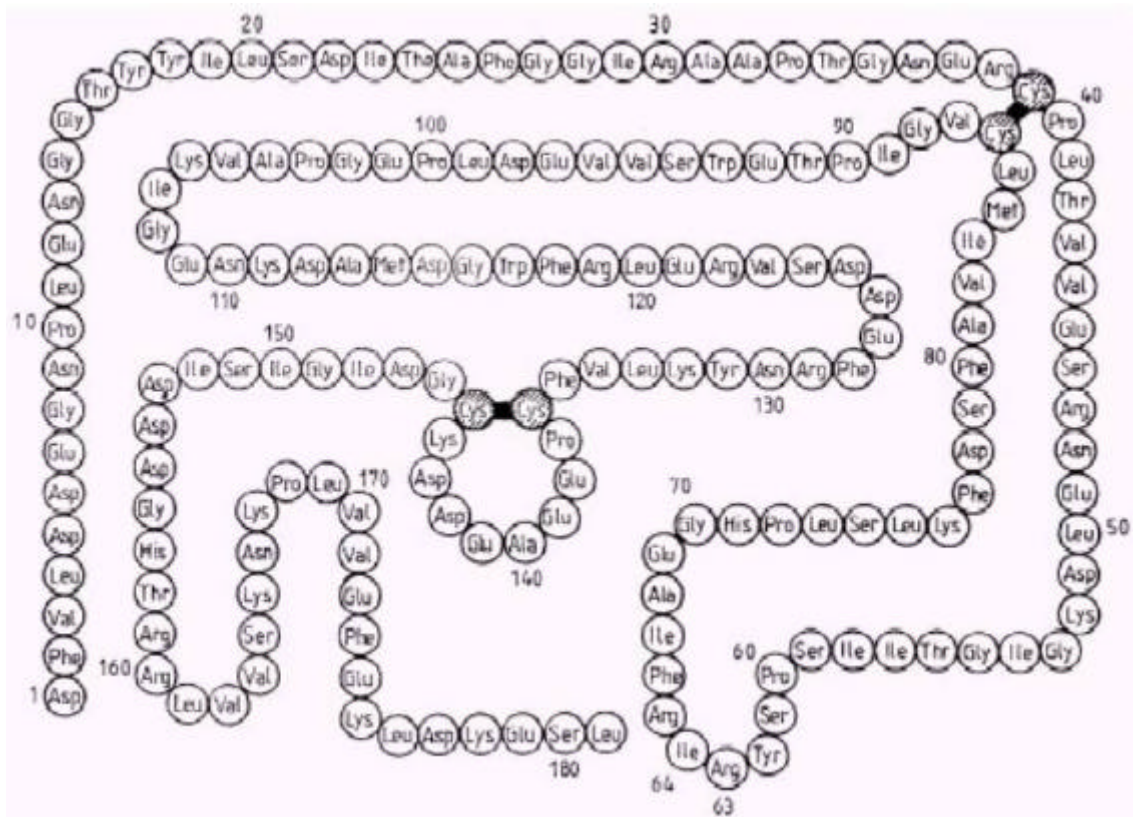


Figura 1 - Seqüência linear aminoacídica do inibidor de tripsina Kunitz (LIENER, 1994)

Este inibidor combina-se estequiometricamente com a tripsina formando complexo irreversível na proporção molar 1:1 muito estável com uma constante de inibição (K_i) da ordem de 10^{-10}M . O KTI é responsável por aproximadamente 80% da atividade de inibição trípica

presente nas sementes (BRANDON, 1987). Possui ação inibitória bem mais fraca sobre a α -quimiotripsina bovina e é parcialmente inativado pela ação de pepsina e inativado pela ação do calor em presença de água, condições normais de aquecimento no preparo dos alimentos (SGARBIERI, 1996).

Ao examinar a organização genética e o desenvolvimento da regulação da expressão de KTI, estimou-se que o genoma da soja contém pelo menos 10 genes distintos de KTI, três dos quais (KTI 1, KTI 2 e KTI 3) têm sido clonados e seqüenciados. A análise da seqüência dos nucleotídeos revelou que os genes KTI 1, KTI 2 e KTI 3 não contêm introns. O KTI 3 codifica o inibidor de tripsina predominante em sementes de soja. A seqüência de nucleotídeos do KTI 3 divergiu aproximadamente 20% daqueles de KTI 1 e KTI 2. Além das sementes de soja, os mRNAs de kTI 1 e KTI 2 estão expressos em outros órgãos como folhas, talo e raiz, em quantidades muito menores. Em contraste, o mRNA de KTI 3 não foi detectado nos talos ou raízes de plantas de soja (KRISHNAN, 2001). O gene para o KTI em sementes de soja contém 3 formas alélicas (Ti^a , Ti^b e Ti^c) codificando proteínas que diferem por uns poucos aminoácidos.

Ti^a :	Glu ¹²	Gly ⁵⁵	Try ⁶²	His ⁷¹	Ser ⁷⁴	Met ¹¹⁴	Leu ¹¹⁰	Pro ¹³⁷	Leu ¹⁷⁶	$K_i = 1,5 \times 10^{-10}$ M
Ti^b :	Ser		Phe	Asn	Arg	Val	Ile	Thr	Val	$K_i = 1,0 \times 10^{-8}$ M
Ti^c :	Glu									$K_i = 2,0 \times 10^{-10}$ M

Todas as 3 isoformas são codificadas por uma série alélica, e possuem 181 resíduos de aminoácidos e o mesmo sítio de ligação para tripsina. Ti^a difere de Ti^c em apenas um resíduo de aminoácido na posição 55, onde ocorre a mudança de glicina para ácido glutâmico, enquanto, Ti_b possui o resíduo de glicina na posição 55, mas difere de Ti_a em outras oito posições (KRISHNAN, 2001).

O produto do gene de KTI 3 é responsável pelo inibidor de tripsina encontrado em sementes de soja que corresponde ao gene Ti^a . Os produtos dos

genes de KTI 1 e KTI 2 contribuem pouco para a atividade total do inibidor de tripsina, já que eles não possuem Arg-63 e Ile-64, aminoácidos requeridos para a inibição da mesma. Já que sementes de soja contêm alta quantidade de KTI, a maioria da qual é codificada por KTI 3, mutantes no qual o gene KTI 3 não é expresso seria esperado que tivesse baixa atividade global de inibição de tripsina (KRISHNAN, 2001).

KRISHNAN (2001) estudando uma cultura de soja mutante para KTI (PI 196168), verificou que esta acumulou níveis muito baixos de mRNA para KTI 3 quando comparado ao não mutante (Amsoy 71), na ordem de 100 vezes maior. Apesar da redução substancial no acúmulo de KTI, PI 196168 ainda apresentou níveis altos de atividade inibitória de tripsina. Esta atividade pode ser atribuída a outros genes de KTI e também inibidores da classe Bowman-Birk.

O inibidor BBI possui 71 resíduos de aminoácidos, massa de 7.975 Da e elevado número de resíduos de cisteína, formando de 8 a 9 pontes dissulfeto por molécula de inibidor. Isto confere ao inibidor estrutura compacta, bastante resistente à desnaturação e à inativação tanto térmica quanto química (Figura 2).

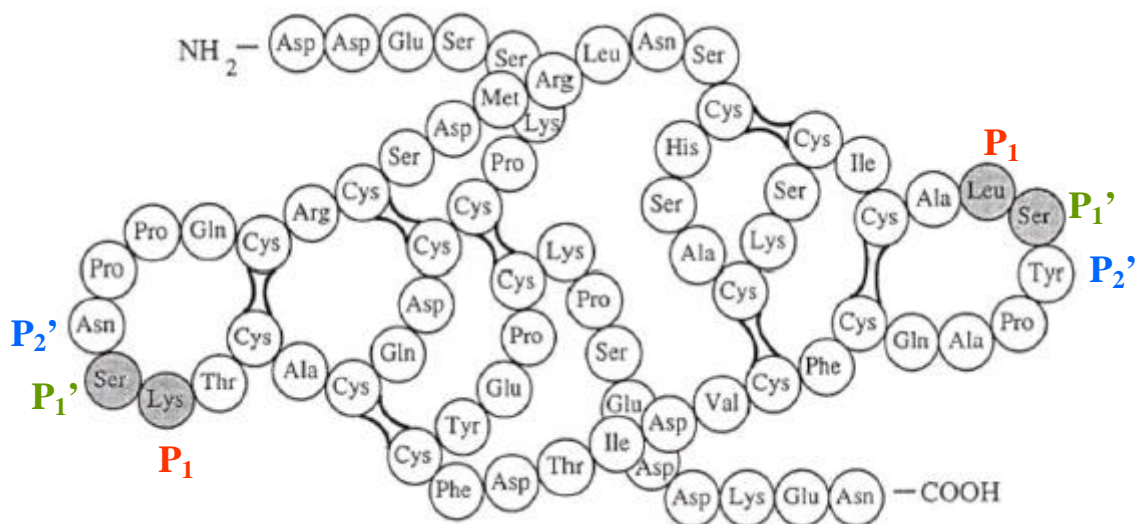


Figura 2 - Sequência linear aminoacídica do inibidor Bowman-Birk (Kennedy, 1998)

O BBI inibi estequiometricamente 1 mol de tripsina e 1 mol de quimiotripsina de maneira independente e simultânea formando um complexo ternário. Possui dois sítios de ligação, um de ligação da tripsina envolvendo os resíduos de Lys 16 e Ser 17 e outro centro de ligação da quimiotripsina envolvendo os resíduos Leu-43 e Ser-44 (Fig. 3) (SGARBIERI, 1996).

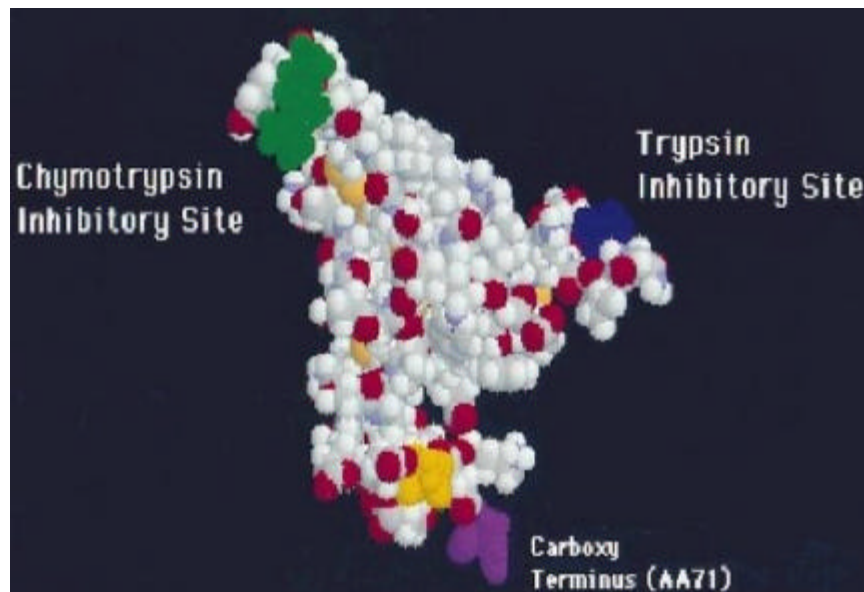


Figura 3 - Localização dos sítios inibitórios na estrutura tridimensional do BBI (KENNEDY,1998)

O BBI é uma proteína bastante pequena com massa molecular de aproximadamente 8000 Da, no qual existem dois *loops* de nove resíduos de aminoácidos cada, incluindo duas cisteínas, responsáveis pela atividade inibitória de uma ampla variedade de proteases (Figura 4). A presença destes dois *loops* permite a proteína interagir simultaneamente com duas proteases, tripsina e quimiotripsina. Os *loops* do sítio reativo, seguindo a nomenclatura de SCHECHTER E SCHOENBERGER (1989), abrange os sub-sítios P3 a P6' de uma cisteína a outra (Figura 2) (SCARPI, 2001).

No BBI, uma seqüência típica para o *loop* é Cys-Thr-X-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Cys, onde o resíduo P1 (X) muda dependendo da protease para qual o

inibidor pode ser ativo. A partir da ligação dissulfeto entre os dois resíduos de cisteína, se considerarmos a seqüência de várias proteínas BBI na região P4 - P7', existem muitas características conservadas que são importantes para a estrutura ou atividade. Em quase todos os casos existe uma treonina no P2 e uma serina em P1'; Estes, estão envolvidos em ligações de hidrogênio interna dentro do *loop* para criar uma estrutura organizada estável (SCARPI, 2001).

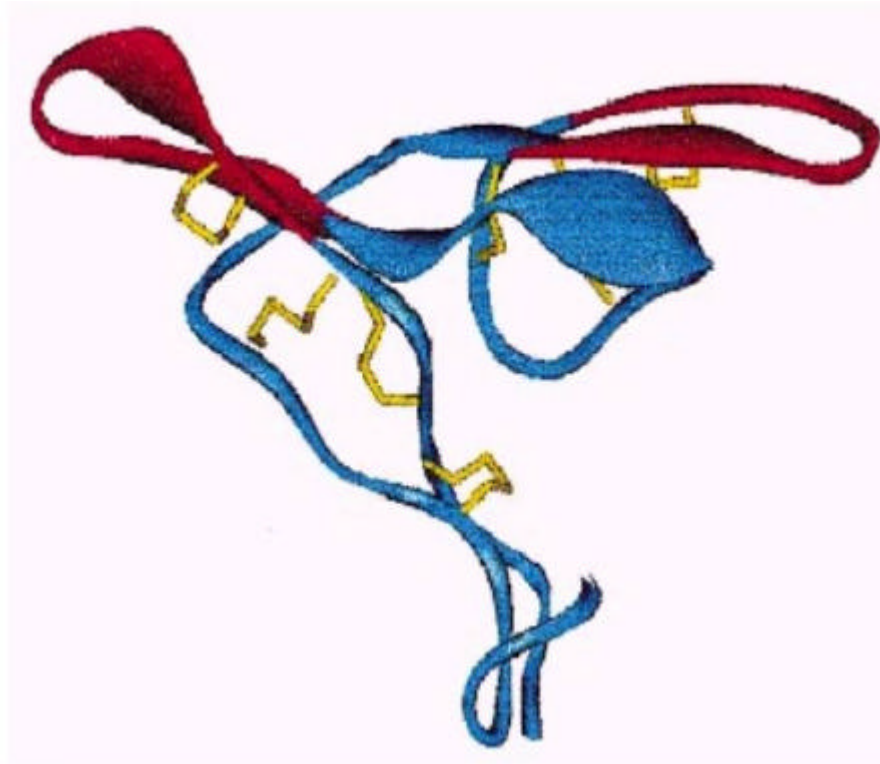


Figura 4 - Estrutura do BBI mostrando os dois loops em vermelho e em amarelo as pontes dissulfeto (SCARPI, 2001).

Embora os *loops* reativos sejam altamente conservados, BBI podem ser divididos dentro de 4 grupos (I-IV) dependendo na variação nos resíduos P1, o qual confere especificidade primária e P2'. O PI-I possui 71 resíduos de aminoácidos (GARIANI, 1999).

As diferentes isoformas possuem diferentes massas moleculares e acredita-se que sejam originadas por proteólise após 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).

Inibidores que ocorrem naturalmente possuem os seguintes resíduos em P1: fenilalanina (-quimiotripsina); alanina (elastase pancreática); Arginina ou lisina (Tripsina) (GARIANI, 1999).

GARIANI et al, (1999), em seu estudo sob o efeito da variação de P2' nos valores de K_i (constante de inibição) e na taxa de hidrólise, encontraram que variação no resíduo P2' leva a mudanças dramáticas nos valores de K_i (constante de inibição) e na taxa de hidrólise dos inibidores peptídeos. Este fato confirma a influência significativa do resíduo P2' na ligação com a enzima. O valor mais baixo de K_i (constante de inibição) foi verificado com P2'-Ile (resíduo mais freqüente na seqüência natural de BBI). Os melhores inibidores são aqueles que possuem aminoácidos apresentando cadeia lateral com resíduos alifáticos. Resíduos carregados positivamente (Arg, Lys) são tolerados em P2', e tem relativamente alto K_i . Porém, cadeias laterais carregadas negativamente dão inibidores fracos, como com P2'-Glu que não promoveu nenhuma inibição mensurável. Dois outros peptídeos também não mostraram nenhuma inibição mensurável: P2'-Gly (enorme flexibilidade conformacional) e P2'-Pro (restrita flexibilidade conformacional) resultando em inibidores inativos. Quanto a constante de hidrólise verificaram que o peptídeo com P2'-Ile foi hidrolisado mais lentamente e o P2'-Trp foi hidrolisado mais rapidamente. Os peptídeos que não demonstraram atividade inibitória (Gly e Glu) para tripsina foram mais rapidamente hidrolisados. Já para a Pro nenhuma hidrólise foi verificada.

2.2.1. Efeitos dos inibidores de proteases sobre a digestibilidade protéica

A descoberta de inibidores de tripsina na soja levou á hipótese deles serem os responsáveis pelo efeito da reduzida taxa de crescimento de animais alimentados com soja crua pela diminuição da proteólise intestinal. Desde então, vários estudos têm sido dirigidos de forma a verificar quais os efeitos nutricionais dos inibidores de tripsina da soja e também de outros inibidores de

proteases de várias outras espécies de plantas sobre os animais. Atualmente, com o crescente aumento do uso da soja e seus produtos protéicos na alimentação humana vêm se tornando importante avaliar os efeitos fisiológicos e nutricionais da ingestão de preparações com soja.

A soja crua contém cerca de 6% de inibidores que atuam sobre as enzimas proteolíticas ao nível do trato gastrointestinal, sobretudo tripsina e quimiotripsina, prejudicando a digestibilidade protéica o que indisponibiliza o fornecimento de aminoácidos para o organismo. Este fato acarretará grandes prejuízos para o animal (WHITAKER,1994). Isto acontece pelo fato dos inibidores formarem complexo extremamente estável com as enzimas, sendo então excretados nas fezes, o que aumenta a excreção de nitrogênio fecal (BURNS,1987). Assim, perde-se grande quantidade de aminoácidos sulfurados, importantes do ponto de vista nutricional (HOLM, 1992). Desta maneira, a incapacidade de utilização desta fonte protéica da soja pelo organismo, compromete seu uso na alimentação. Porém, existem divergências quanto à quantidade de inibidores de tripsina, cuja presença na soja permite um crescimento normal de animais (TROMP, 1995).

Vários pesquisadores têm estudado os inibidores de proteases de soja de forma a conseguir detectar em sua própria estrutura e mecanismo de ação uma melhor maneira de inativá-los. KROGDAHL et al. (1981), em seu estudo com suco gástrico humano, verificaram que o KTI ao passar pelo estômago sofre inativação pela pepsina em pH entre 1,5 a 2,0. Após uma hora de incubação com suco gástrico, 45% da atividade inibitória do KTI foi perdida. O mesmo não foi observado com o BBI. Este foi pouco afetado pela incubação, devido à sua estrutura rígida e compacta oferece à molécula estabilidade à hidrólise péptica e à desnaturação pelo HCl, além de estabilidade térmica. Por esta razão o BBI e seus homólogos presentes na soja merecem atenção sob o aspecto nutricional. Os autores concluíram que somente limitada inativação dos inibidores é esperada durante a passagem destes, através do estômago. A maioria deles podem alcançar o duodeno e inibir as proteases pancreáticas. Entretanto, é importante destacar que a medida da atividade inibitória dos inibidores de proteases varia com a

variedade de soja e suas condições de colheita, armazenamento e com a espécie na qual se tem a fonte de proteases (BURNS, 1987). Normalmente, a atividade inibitória é medida através de preparações enzimáticas de boi e porco, pois o suco pancreático humano é inviável para ensaios de rotina. Devido a isto, extrapolações dos dados devem ser cuidadosamente avaliadas (HOLM, 1982).

KROGDAHL, et al. (1981), mencionam também, um estudo realizado por Anderson et al (1980) em que medindo a atividade de inibidores de proteases em produtos de soja manufaturados comercialmente constatou atividade inibitória de tripsina acima de 30%. Concluindo, portanto que a chance de ingerir inibidores de proteases está presente.

BARBOSA (1997), determinando a concentração de inibidores em alguns produtos comercializados derivados de soja, constatou que existem variações nos níveis de inibição de tripsina entre os diferentes produtos, provavelmente devido a diferenças no processamento e nas quantidades de inibidores de tripsina presente nas diversas fontes de grãos de soja usados como matéria prima.

Assim, vários processos têm sido desenvolvidos de modo a se conseguir o máximo de inativação dos inibidores de proteases, sem, contudo alterar as propriedades funcionais da soja, dentre eles pode-se citar o processamento térmico, a fermentação, o tratamento químico, o fracionamento de proteínas e o melhoramento genético, porém alguns se tornam inviáveis economicamente.

2.3. Processamento térmico

O tratamento térmico é um dos métodos mais utilizados para destruir total ou parcialmente a maioria das substâncias antinutricionais presentes na soja, sobretudo os inibidores de proteases. Embora hoje com o avanço da engenharia genética já existam variedades com atividade reduzida e até mesmo completa ausência dos inibidores e da enzima lipoxigenase.

OSBORNE E MENDEL (1917) foram os primeiros a relatar que o tratamento térmico melhora o valor nutricional das proteínas de soja. Desde então, tal tratamento tem sido usado para reduzir os níveis de inibidores de proteases melhorando a qualidade nutricional dos alimentos. A inativação pelo calor dos inibidores de proteases em sementes de leguminosas tem sido mostrado ser uma função de uma série de variáveis, incluindo o tamanho das partículas, a temperatura, o conteúdo da mistura e a duração do tratamento térmico (HERKELMAN,1992).

O tratamento térmico, além de contribuir para a melhor aceitação dos produtos de soja, aumenta a digestibilidade protéica dos mesmos, parte pela desnaturação da estrutura nativa das proteínas e parte pela destruição dos fatores antinutricionais, aumentando a disponibilidade dos aminoácidos e desta forma melhorando o valor nutricional da soja (HERKELMAN,1992).

Porém, a intensidade do calor aplicado deve ser controlada, pois o excesso causa a perda de vários nutrientes, principalmente os aminoácidos essenciais, diminuindo assim o valor nutritivo da soja, além de diminuir a solubilidade das proteínas (MONTEIRO, 2000).

Durante o processamento dos alimentos, as fontes de proteínas podem ser tratadas com calor, agentes oxidantes, solventes orgânicos dentre outros. Contudo, tais processamentos podem causar a formação de fatores antinutricionais como, compostos de Maillard, formas oxidadas de aminoácidos sulfurados, D-aminoácidos, ligações peptídicas cruzadas entre cadeias (como lisinoalanina e lantionina), resultando em baixa biodisponibilidade dos aminoácidos e baixa qualidade protéica (SARWAR, 1997).

O calor excessivo além de levar á destruição de alguns aminoácidos, principalmente lisina, arginina e metionina, pode induzir a formação de complexos entre aminoácidos e carboidratos, tornando-os indisponíveis biologicamente. A perda da lisina tem sido atribuída à reação de Maillard, entre este aminoácido e um açúcar redutor (CHANG, 1987). O calor também pode resultar na formação de ligações peptídicas não naturais (isopeptídeos) entre o grupo amino livre da lisina e o grupo carboxil do ácido aspártico e do ácido

glutâmico ou com o grupo amida de glutamina ou asparagina. Os aminoácidos interagindo em tais ligações isopeptídicas são dificilmente liberados pela digestão enzimática. Além disto, se não hidrolisáveis, a presença de isopeptídeos pode causar secreção excessiva das enzimas digestivas. Estudos têm revelado que os isopeptídeos e outros complexos de aminoácidos resistentes às enzimas digestivas são metabolicamente inertes, e conseqüentemente, se absorvidos são principalmente excretados inalterados na urina (MARTY, 1995).

MARTY et al. (1995) estudando a digestibilidade ileal e perda urinária em porcos alimentados com soja processada, verificaram que os tratamentos térmicos comercialmente usados para soja poderiam induzir mudanças nos aminoácidos que afetariam não somente sua digestão, mas também sua utilização pós-absorção. Temperatura alta por longo período aumentou o conteúdo de nitrogênio insolúvel pela reação de Maillard ocasionando uma diminuição da digestibilidade (Mc NIVEN, 2002).

Contudo, a taxa de tratamento térmico que efetivamente destrói os fatores antinutricionais sem danificar o valor nutricional da farinha de soja não é bem definida. Por isto, muitos produtos comerciais à base de soja retêm de 5 a 20% da atividade inibitória de tripsina (HASDAI, 1983).

OSMAN et al. (2002), estudando a inativação térmica de diferentes inibidores de proteases constatou que os inibidores em sua forma purificada possuem maior estabilidade térmica que os inibidores de tripsina no extrato. Constata também a alta estabilidade térmica do BBI em comparação ao KTI, devido á presença, em sua estrutura, de maior quantidade de pontes de enxofre. Após 60 minutos de autoclave (121 °C e 15 psi), em pH neutro, o BBI purificado apresentou 50% de atividade antitriptica, enquanto que o KTI purificado perdeu-se quase todo, ou seja, 96% de sua atividade inibitória. Devido ao fato do BBI ser mais estável que o KTI acredita-se que a atividade residual de inibição de proteases encontrada nos produtos de soja seja devido ao BBI.

Neste mesmo trabalho, OSMAN et al. (2002), menciona um estudo de Kapoor e Gupta realizado em 1978 mostrando que autoclavando sementes de soja a 100 °C por 30 minutos ou cozinhando sob pressão por 60 minutos inativa

completamente a atividade do inibidor, porém ao deixar a semente em água por 8 horas antes do cozimento, reduz o tempo deste, para 15 minutos.

FRIEDMAN (1984) mencionou que o tratamento da soja com certas substâncias, que induzem mudanças nas pontes dissulfeto, parece contribuir para a desnaturação dos inibidores e aumentar assim, a eficiência do tratamento térmico.

O uso de linhagens de soja isenta de KTI, como uma alternativa para eliminar os efeitos indesejáveis dos inibidores de tripsina, têm sido investigados para possível substituição da soja convencional na alimentação animal. Assim, numerosos processos têm sido propostos de maneira a determinar sua digestibilidade e com isto verificar sua qualidade nutricional (RITTER et al.,1987). Por outro lado, estudos com a soja modificada geneticamente, têm apresentado maior digestibilidade, porém alguns autores afirmam que mesmo para a soja isenta de KTI é necessário a aplicação do tratamento térmico para se obter uma melhor eficiência digestiva (HAFERMAN, 1992).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas de linhagens de soja obtidas do Programa de Melhoramento da Soja – BIOAGRO, que diferem quanto à presença de KTI e/ou lipoxigenases. Avaliar se o melhoramento genético afetou a digestibilidade protéica das linhagens de soja submetidas ou não a tratamento térmico, bem como verificar o efeito deste sobre a atividade dos inibidores de proteases e sobre a digestibilidade *in vivo* e *in vitro* destas linhagens.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar as características bromatológicas das farinhas obtidas das sementes de linhagens de soja que diferem quanto á presença e/ou ausência de KTI e lipoxigenase;

- 3.2.2. Determinar a atividade dos inibidores de proteases nas farinhas integrais derivadas de sementes das linhagens de soja, através da atividade de tripsina e quimiotripsina, *in natura* e após a aplicação do tratamento térmico;
- 3.2.3. Determinar o índice de urease e comparar com os índices de inibidores de tripsina;
- 3.2.4. Determinar o grau de digestibilidade protéica *in vivo* e *in vitro* das farinhas integrais de soja após o processamento térmico;
- 3.2.5. Avaliar o efeito do tratamento térmico na digestibilidade das proteínas destas linhagens;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Enzimologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no laboratório de Nutrição Experimental do departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa -MG (UFV).

4.1. Material genético

Neste trabalho foram utilizadas sementes de linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) obtidos do programa de melhoramento da soja – BIOAGRO, com as seguintes características genotípicas:

- (a) (CAC-1 TN KTI⁻) Linhagens com ausência completa de LOX e KTI (LOX⁻ e KTI⁻);
- (b) (CAC-1 TN) Linhagens com ausência completa de LOX e presença de KTI (LOX⁻ e KTI⁺);
- (c) (CAC-1 KTI⁻) Linhagens com presença de LOX e ausência de KTI (LOX⁺ e KTI⁻) e

- (d) (CAC-1) Linhagens com presença de LOX e presença de KTI (LOX⁺ e KTI⁺).

4.2. Obtenção da farinha de soja integral

A partir de grãos dos quatro genótipos de soja selecionados foram obtidas as farinhas integrais. Os grãos selecionados após serem lavados sofreram um tratamento térmico em calor seco para facilitar a retirada da casca. O aquecimento dos grãos causa uma ligeira perda de água do cotilédone, havendo um encolhimento deste. Com isto, a casca se desprende mais facilmente. A temperatura deste tratamento térmico foi de 55 °C por 3 minutos, sendo este, suficiente para eliminar grande parte das cascas. 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 realizada usando peneira de abanar para limpar os grãos. As cascas foram descartadas e os grãos em pedaços foram novamente moídos em moinho de martelo e as farinhas obtidas embaladas em sacos plásticos e mantidas a - 20 °C.

4.3. Caracterização das farinhas

As farinhas das diferentes linhagens de soja foram caracterizadas quanto à presença de KTI e LOX, através de análises eletroforética e colorimétrica respectivamente, seguindo os procedimentos abaixo.

4.3.1. Análise eletroforética de KTI

As farinhas foram analisadas quanto à presença de KTI por eletroforese em gel 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 foi realizada a 120 Volts por 4 horas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,3, glicina 0,192M, contendo 0,1% SDS. No preparo da amostra foram utilizados 30 μ L de tampão (0,1875 M Tris, 30% glicerol, 6,9% SDS pH 6,8), 60 μ L de sobrenadante, 20 μ L de azul de bromofenol, 20 μ L de -mercaptoetanol, que foram fervidos por 3 min. a 100 °C. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e cerca de 35 a 30 μ L foi aplicado no gel para efetuar a eletroforese.

4.3.2. Detecção qualitativa de lipoxigenase

A fim de se detectar LOX nas farinhas das diferentes linhagens de soja, métodos colorimétricos foram utilizados conforme a descrição a seguir. Cerca de 10 mg de farinha foram colocadas em um tubo de ensaio, adicionado 0,5 mL de água deionizada e deixada em repouso por 5 min. Separadamente, foi preparada uma solução reagente 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. Para a detecção da LOX 1 foi adicionado em cada tubo de ensaio, 0,4 mL da solução reagente e após 3 minutos foi visualmente identificada. O descoramento da solução indica presença de LOX 1 e

a permanência da cor azul da solução indica ausência de LOX 1. Para LOX 3, 10 mg da farinha foi colocada em tubo de ensaio e em seguida adicionado ao tubo 0,5 mL de extrato de soja contendo somente a isoenzima LOX 2. Este, foi obtido de sementes da linhagem CR 1,3 (sem LOX 2 e 3) por centrifugação a 13000 x g por 15 minutos de extrato contendo 1 mg/mL em água deionizada. Em seguida, 0,4 mL de solução reagente contendo 25 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM pH 6,8, 5,0 mL de β -caroteno, 5,0 mL de linoleato de sódio 10 mM e 5,0 mL de água deionizada, foi adicionado em cada tubo, contendo a farinha e o extrato com LOX 2. Após 1 minuto de reação o descoramento da solução indica presença de LOX 3 e a permanência da cor do β -caroteno da solução indica ausência de LOX 3.

4.4. Determinação da composição centesimal

4.4.1. Determinação do teor de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada em triplicata segundo o método de KJELDAHL, para a quantificação de nitrogênio total, descrito pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Para isto, 80 mg da farinha obtida foram digeridas com H₂SO₄ concentrado e catalisadores (selênio e sulfato de cobre), formando sulfato de amônia. Na fase de digestão, após obtenção do material aparentemente digerido, foi adicionado peróxido de hidrogênio 30%, levando a mistura ao aquecimento por 60 minutos. Na fase de destilação a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. O material recolhido foi titulado com HCl 0,05 M. Para a conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

4.4.2. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado em triplicata por meio de incineração da amostra, segundo método da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). A amostra foi colocada em um cadinho previamente seco e pesado. Este cadinho foi levado a mufla a uma temperatura entre 550 °C a 600 °C por aproximadamente 6 horas de forma a ocorrer a incineração da amostra e em seguida pesado as cinzas. O cálculo do teor de cinzas foi realizado como a seguir:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{C}{A} \times 100$$

Onde:

C = peso das cinzas.

A = peso da amostra.

4.4.3. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi estimado através da perda de peso que ocorreu no produto quando este foi aquecido em condições nas quais somente a água é removida. A determinação de umidade foi realizada em triplicata pelo método gravimétrico segundo AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Uma quantidade de amostra de 5 g de farinha de soja foi pesada e colocada para secar em estufa por 5 horas a uma temperatura de 105°C até peso constante. Após secagem a amostra foi retirada da estufa e colocada em dessecador para esfriar, sendo posteriormente pesada. O cálculo do teor de umidade foi realizado pela diferença de peso da amostra antes e depois de seca.

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_2 - P_1}{P_2} \times 100$$

Onde:

P_2 = peso da amostra úmida.

P_1 = peso da amostra seca.

4.4.4. Determinação do teor de lipídios

A determinação de lipídios foi realizada segundo o método da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984), com modificações. Uma amostra de 15 gramas de farinha de soja foi colocada em um cartucho de papel de filtro. Este cartucho foi colocado em um extrator Soxlet, conectado a um balão previamente seco e pesado, contendo em torno de 200 mL de éter de petróleo. Todo o conjunto foi colocado em uma chapa aquecedora conectada a um sistema de refrigeração. Após 16 horas a chapa foi desligada e o solvente recuperado sendo o balão colocado para secar em estufa a 105° C por um período de 5 horas. Após resfriar, o balão foi novamente pesado, e a determinação da porcentagem de lipídios calculada da seguinte forma.

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_2 - P_1}{P_2} \times 100$$

Onde:

P_2 = peso do balão após extração e secagem.

P_1 = peso do balão vazio.

4.4.5. Determinação do teor de carboidratos

A determinação de carboidratos foi realizada por diferença em relação aos demais componentes. Sendo subtraído de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas.

4.4.6. Determinação do teor de minerais

A determinação do teor de minerais foi realizada de acordo com o método de FICK et al. (1980). Para 1,0 g da farinha de soja foram adicionados 10 mL de solução nitroperclórica na razão 3: 1(v/v). As amostras foram colocadas em bloco digestor com aquecimento e exaustão, sendo mantidas nesta condição até a formação de uma solução límpida, sem coloração amarela. Após a digestão o material foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e o volume completado com água deionizada.

As leituras das absorbâncias dos minerais Fe, Ca, Mn, Mg, Cu, Zn e P foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica. A concentração dos elementos foi calculada utilizando-se uma curva padrão com concentração conhecida para cada elemento analisado.

4.5. Tratamento térmico

A farinha de soja obtida foi tratada termicamente segundo o método aplicado por HERKELMAN et al. (1992) com algumas modificações. As farinhas foram autoclavadas a temperatura de 120°C por 9, 12, 15 e 18 minutos.

As amostras foram introduzidas na autoclave e o tempo de aquecimento iniciou, quando o interior da mesma atingiu 120°C. Ao atingir o tempo definido, a autoclave foi desligada, as amostras deixadas esfriar a temperatura ambiente e armazenadas em sacos plásticos e mantidas a -20°C.

4.6. Determinação da atividade dos inibidores de proteases

A determinação da atividade dos inibidores de proteases nas sementes de soja moídas foi realizada antes e após a aplicação do tratamento térmico. Para isto, determinou-se a atividade de tripsina e quimotripsina nos extratos.

Reagentes

Tripsina pancreática bovina (tipo III) e o substrato sintético n-benzoil-D,L-arginina- -nitroanilida (D,L-BApNA) foram obtidos da Sigma Chemical Co. Soluções estoque de tripsina foram preparadas em HCl 10^{-3} M e armazenadas a -20 °C. Durante a realização da atividade a enzima foi mantida 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 1,2 mM, sendo preparada a partir de 200 μ L do estoque diluídos em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM. A solução deve ser preparada na hora do uso mantendo-se estável por cerca de 2 horas.

Quimiotripsina bovina (tipo II) e n-benzoil-L-tirosina- -nitroanilida (L-BTpNA) foram obtidos da Sigma Chemical Co. As soluções de quimiotripsina foram preparadas em HCl 10^{-3} M e armazenadas a -20 °C. Durante a realização da atividade a enzima foi mantida em banho de gelo.

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

Extração dos inibidores

Foi utilizado o método descrito por BRANDON et al. (1988) e adaptado por BARBOSA (1997). A 100 mg da amostra foram adicionados 15 mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM. Esta suspensão foi agitada por 3 horas a temperatura ambiente. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 35600 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas tripsina e quimotripsina.

4.6.1. Determinação da atividade de tripsina

A determinação da atividade de tripsina foi realizada, na presença e ausência de inibidores, através do método descrito por ERLANGER et al. (1961). Foram adicionados 400 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, 50 μ L da solução de tripsina e 150 μ L do extrato em um tubo de ensaio. Essa mistura foi agitada lentamente e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Os controles da atividade da enzima foram preparados substituindo-se o extrato por tampão Tris-HCl e o branco preparado adicionando ácido acético antes de adicionar D-L-BApNA. Após 5 minutos, 500 μ L dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM e 500 μ L da solução D,L-BApNA. Esta mistura foi agitada e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Logo em seguida, a reação foi interrompida com adição de 300 μ L de ácido acético 60% (v/v).

A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro a 410 nm. A análise foi efetuada em triplicata. Os resultados foram convertidos em mg de tripsina pura inibida por grama de proteína, por meio da equação:

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

Onde:

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

B = fator de diluição da amostra.

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

P = concentração de proteína em g/g da amostra (quantidade de proteína determinada nos extratos).

Determinação da concentração de tripsina e quimotripsina em solução.

A determinação das concentrações de tripsina e quimotripsina nas soluções estoque em HCl 10^{-3} M foi realizada através da absorvância a 280 nm e calculada por meio das seguintes equações:

$$[\text{Tripsina}] = \frac{A_{280} \times f}{25000} \qquad [\text{Quimotripsina}] = \frac{A_{280} \times f}{24000}$$

Nestas, f é um fator de conversão da absorvância de 280 nm em mg/mL, sendo 0,694 para tripsina comercial (DAVIE e NEURATH, 1955) e 0,490 para quimotripsina também comercial (MELOUN et al., 1966). A massa molecular da tripsina bovina é 24000 Da, e a massa molecular da quimotripsina bovina é 25000 Da. Em seguida, as enzimas tiveram suas concentrações corrigidas através da titulação do centro ativo com p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato (NPGb), segundo método descrito por CHASE e SHAW (1967).

4.6.2. Determinação do fator de tripsina (C)

Para determinação dos fatores de tripsina e quimotripsina foi utilizada uma farinha de soja com teor de proteína de 54,11%, submetida ao tratamento térmico, a fim de eliminar os inibidores de proteases.

Solução estoque de tripsina em HCl 0,001M, $A_{280} = 1,569$;

$[Tripsina] = 1,569 \times 0,694 / 24000 = 4,537 \times 10^{-5} \text{ M}$;

$[Centro \text{ ativo}] = 75\%$;

$[Tripsina \text{ ativa}] = 4,537 \times 10^{-5} \times 0,75 = 3,4027 \times 10^{-5} \text{ M}$;

Solução de incubação = 0,05 mL de tripsina ativa em 0,60 mL de solução;

$[Tripsina] \text{ na solução de incubação} = 2,835 \times 10^{-6} \text{ M}$;

Solução de atividade enzimática = 0,5 ml da solução de incubação em 1,8 mL de solução;

$[Tripsina] \text{ na solução de atividade enzimática} = 7,87 \times 10^{-7} \text{ M}$;

$0,001 \text{ mg de tripsina} / 24000 / 1,8 \text{ mL} = 2,314814 \times 10^{-8} \text{ M e}$

Fator de tripsina (C) = $2,314814 \times 10^{-8} \times 0,642 (A_{410}) / 7,87 \times 10^{-7} \text{ M} =$ **0,01888**

4.6.3. Determinação da atividade da quimotripsina

A determinação da atividade de quimiotripsina foi realizada na presença e ausência de inibidores, pelo método de ERLANGER et al. (1961). Foram pipetados 400 μL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2, 50 μL da solução de quimiotripsina e 150 μL do extrato em um tubo de ensaio. Esta mistura foi incubada por 5 minutos á temperatura ambiente. Após 5 minutos, 500 μL dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 μL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 com 5% de dimetilformamida e 500 μL da solução de L-BTpNA. Esta mistura foi agitada rapidamente e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida interrompeu-se a reação com a adição de 300 μL de ácido acético 60% (v/v). A absorvância foi medida em

espectrofotômetro a 410nm. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os tubos testes foram preparados substituindo o extrato por tampão Tris-HCl e o branco preparado adicionando ácido acético antes de adicionar L-BTpNA.

Os resultados foram convertidos em mg de quimiotripsina pura inibida por grama de proteína, por meio da equação:

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

Onde:

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

B = fator de correção da amostra

C = fator de quimiotripsina. Esse fator corresponde a absorvância em 410 nm do produto da atuação de 1 g de quimiotripsina sob o substrato L-BTpNA, nas condições do ensaio.

P = concentração de proteína em g/g da amostra (quantidade de proteína determinada pelo método semimicro Kjeldahl).

4.6.4. Determinação da atividade da quimotripsina (C)

Solução estoque de quimiotripsina em HCl 0,001M, $A_{280} = 2,346$;

[Quimotripsina] = $2,346 \times 0,490/25000 = 4,5981 \times 10^{-5}$;

[Centro ativo] = 75%;

[Quimotripsina ativa] = $4,5981 \times 10^{-5} \times 0,75 = 3,4486 \times 10^{-5}$ M;

Solução de incubação = 0,05mL de quimotripsina ativa em 0,60mL de solução;

[Quimotripsina] na solução de incubação = $2,873 \times 10^{-6}$ M;

Solução de atividade enzimática = 0,5mL da solução de incubação em 1,8mL de solução;

[Quimiotripsina] na solução de atividade enzimática = $7,98 \times 10^{-7}$ M;

0,001mg de quimiotripsina/25000/1,8mL = $2,222 \times 10^{-8}$ M; e

Fator de quimiotripsina (C) = $2,222 \times 10^{-8}$ M x 0,1083 (A_{410})/ $7,98 \times 10^{-7}$ M
= **0,00301**

4.7. Teste de urease

Foi pesada 0,2g da amostra e colocada no tubo de ensaio. Em seguida o tubo foi tampado e acondicionado em banho-maria a 30° C. A cada 2 minutos foi adicionado aos tubos 10 mL de uma solução tampão de uréia (15g de uréia dissolvida em 500 mL de solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 e ajustou o pH para 7,0). O branco foi preparado com 0,2g de amostra e 10mL da solução tampão fosfato 0,05M. Com o tubo fechado a cada 5 minutos eram agitados. Passados 30 minutos, o conteúdo dos tubos foi transferido para béquers e o pH medido em potenciômetro devidamente equilibrado. A determinação do pH entre os tubos testes e o branco foi de no mínimo 2 minutos. Entre as determinações de pH o eletrodo foi lavado com solução de HCl 0,1N para remover uma possível camada de proteína aderida á superfície do vidro.

4.8. Determinação da digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade *in vitro* foi determinada pelo sistema pepsina-pancreatina, de acordo com o método de SAUNDERS et al. (1973), com algumas modificações realizadas por PIRES, 2002. Foi utilizada pepsina Sigma (1:60.000) e pancreatina Sigma (3 x USP). Amostras contendo 250 mg de farinha de soja previamente liofilizadas foram hidrolisadas com 1,5 mg de pepsina em 15 mL de tampão KCl-HCl, pH 2,0, a 37 °C por 3 horas, Após este período, o pH foi elevado pela adição do mesmo volume de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0, contendo 8 mg de pancreatina, procedendo-se à hidrólise por 24 horas a 37°C, sob agitação. As amostras foram centrifugadas a 12400 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O material foi ressuspendido em água para um volume de 30 mL e centrifugado novamente por mais duas vezes, sendo descartado o sobrenadante. O controle do experimento foi preparado apenas com os tampões não contendo as enzimas. A digestibilidade foi calculada como segue:

$$\% \text{ digestibilidade} = \frac{\text{N amostra controle} - \text{N da amostra teste}}{\text{N total amostra}} \times 100$$

O nitrogênio das amostras foi determinado pelo método de KJELDAHL, descrito pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIC, 1984).

4.9. Determinação da digestibilidade *in vivo*

A digestibilidade foi realizada a fim de verificar a qualidade protéica das farinhas de soja integrais, derivadas dos quatro genótipos para presença de LOX e/ou KTI, quando submetidas ao processamento térmico.

O ensaio biológico foi conduzido durante 14 dias com 36 ratos machos da raça Wistar, recém desmamados com 23 dias de idade. As dietas experimentais utilizadas foram baseadas na composição da dieta AIN-93G indicada para animais em fase de crescimento.

A composição da dieta é mostrada no Quadro 1. Planejou-se um teor de 9 a 10% de proteína, ajustou-se o teor de óleo de soja das dietas de farinha de soja, de acordo com os seus teores de lipídios, de forma a promoverem 7% de lipídios na dieta, pois se utilizou a farinha de soja integral, nenhum adicional de fibra, pois o processo de retirada das cascas não foi 100% eficiente, 3,5% de mistura salina (Quadro 2) e 1% de mistura vitamínica (Quadro 3). Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta, pelo método semimicro Kjeldhal, com amostras em triplicata (AOAC, 1984). Os animais foram mantidos nas dietas experimentais durante 14 dias. Neste período, determinaram-se consumo alimentar, ganho de peso, NPR (Razão Protéica Líquida), PER (Relação da Eficiência Protéica), e digestibilidade verdadeira.

Quadro 1 - Composição das dietas experimentais utilizadas no experimento com ratos (g/100 g de mistura)

Ingredientes	Dietas					
	Aprotéica	Caseína	D1	D2	D3	D4
Caseína	-----	10,74	-----	-----	-----	-----
Farinha de soja	-----	-----	21,39	25,46	22,38	23,50
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	2,0	2,0	2,0	2,0
Fibra (celulose microcristalina)	5,0	5,0	-----	-----	-----	-----
Mistura salínica	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
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	59,75	49,01		44,29	47,37	46,25
% de proteína (*)	Nd	8,51	8,43	9,56	8,53	9,25

Fonte: REEVES et al (1993)

D1 - dieta de farinha de soja integral com KTI e com LOX, processada a 120 °C/ 18 min.

D2 - dieta de farinha de soja integral com KTI e sem LOX, processada a 120 °C/ 18 min.

D3 - dieta de farinha de soja integral sem KTI e sem LOX processada a 120 °C/ 12 min.

D4 - dieta de farinha de soja integral sem KTI e com LOX processada a 120 °C/ 12 min.

(*) Valor determinado (AOAC, 1984) Quadro 2 – Mistura salina utilizada nos experimentos com ratos

Quadro 2 - Mistura de salina utilizada nos experimentos

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)	46,60
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)	0,30
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.

Quadro 3 - 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
Retinol palmitato (A)	0,8
Colecalciferol (D)	0,25
Menaquinona (D)	0,075
Sacarose	q.s.p.

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). Foram distribuídos em gaiolas individuais, onde receberam água e alimento *ad libitum*, durante o período experimental.

Para o cálculo da digestibilidade, as dietas foram marcadas com índigo carmin (100 mg/100 g de dieta) e as fezes coletadas diariamente a partir do 7º até o 14º dia do experimento, sendo acondicionadas em recipientes individuais para cada rato e mantidas sob refrigeração. Após o período de coleta, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar, a 105 °C durante 24 h. Em seguida foram resfriadas, pesadas e moídas em multiprocessador para determinação do teor de nitrogênio. Para este fim, foi utilizado o método semimicro Kjeldhal com 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 valor da digestibilidade foi expresso em percentagem, utilizando-se da seguinte fórmula:

$$D = \frac{NI - (NF - NFK)}{NI} \times 100$$

Em que:

D = digestibilidade;

NI = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

NF = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste; e,

NFK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Determinação da qualidade protéica das farinhas integrais de soja

A qualidade protéica das farinhas integrais foi determinada pelos valores de NPR (Razão Protéica Líquida), PER (Relação da Eficiência Protéica) e a digestibilidade verdadeira.

O PER mede o quociente do ganho de peso, em gramas, pela quantidade de proteína ingerida, também em gramas, de ratos submetidos a uma dieta contendo a proteína em estudo (SGARBIERI, 1996).

$$\text{Cálculo: PER} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

O NPR constitui apenas uma modificação do PER e consiste em somar ao ganho de peso do grupo que recebeu a dieta protéica, a perda de peso de um grupo equivalente que recebeu dieta aprotéica (SGARBIERI, 1996).

$$\text{Cálculo: NPR} = \frac{\text{ganho de peso (g)} + \text{perda de peso do grupo Livre de Nitrogênio (g)}}{\text{consumo de proteína (g)}}$$

As farinhas utilizadas nas análises *in vivo* foram submetidas ao tratamento térmico de 120 °C, sendo que o tempo de exposição ao calor empregado foi escolhido segundo a atividade inibitória de tripsina (Quadro 9). Dessa forma, as farinhas integrais de linhagens de soja com KTI foram processadas por 18 minutos e as sem KTI por 12 minutos.

4.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizado para fins de cálculos o programa estatístico SAEG (UFV).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das farinhas de soja

Na figura 5 são apresentados os resultados da eletroforese SDS-PAGE dos extratos protéicos obtidos das farinhas de soja integrais utilizadas neste trabalho. Observa-se em cada canaleta a composição polipeptídica das farinhas, que ao ser comparada com um padrão (Pd) verifica a presença e/ou ausência de KTI e LOX.

A análise eletroforética foi realizada de maneira a se confirmar a presença de KTI e/ou LOX nas farinhas para assim, utilização destas farinhas em análise posteriores. Assim, através da análise apresentada na Figura 5, ao se comparar as diferentes farinhas com um padrão (Pd) específico verifica-se que os genótipos das farinhas, quanto à presença de KTI e/ou LOX, são confirmados.

Monteiro (2000) através da eletroforese de sementes e das farinhas das mesmas linhagens de soja constatou que o tratamento térmico (89 °C/5 minutos) aplicado no grão na retirada da casca para a obtenção das farinhas, não alterou a composição polipeptídica das proteínas. E como o processamento térmico neste trabalho foi menor (55°C/3 minutos)

concluimos que a composição protéica das farinhas não difere da composição dos grãos das quais foram originadas.

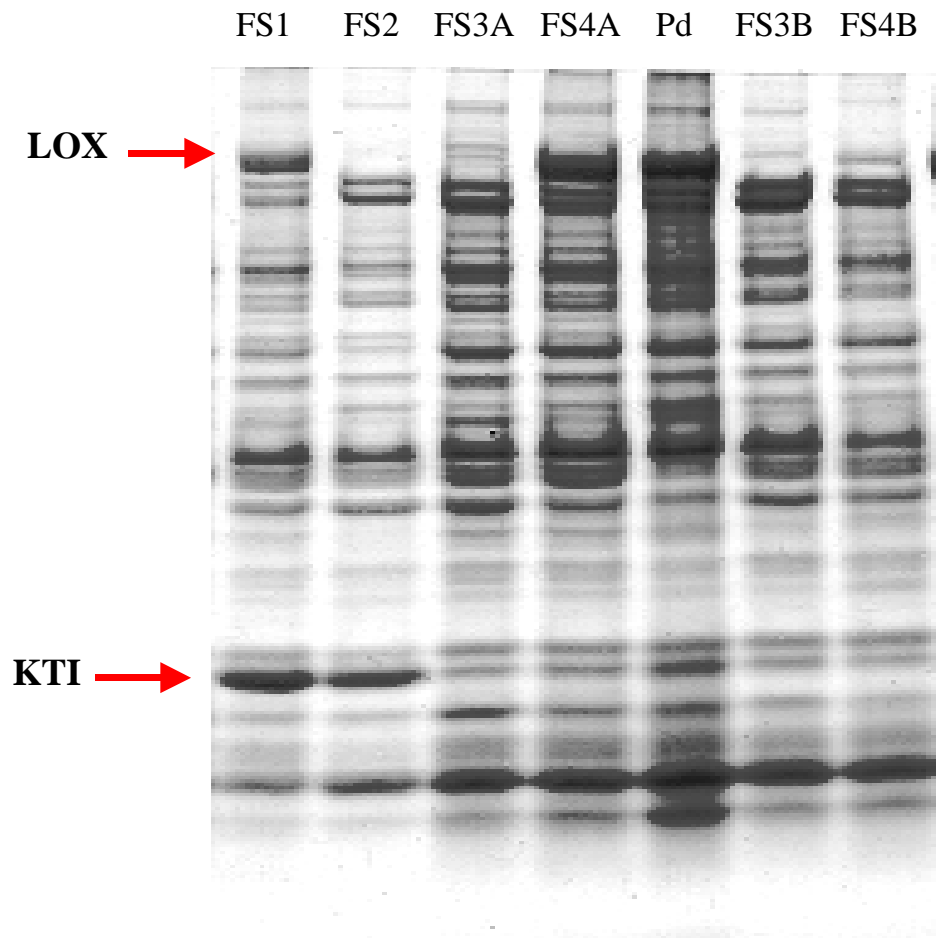


Figura 5-Eletroforese em gel de poliacrilamida (14%)

A partir da esquerda para a direita as amostras nas canaletas podem ser caracterizadas como:

FS1 - farinha integral com KTI e com LOX;

FS2 - farinha integral com KTI e sem LOX;

FS3A - farinha integral sem KTI e sem LOX de uma primeira amostragem;

FS3B - farinha integral sem KTI e sem LOX de uma segunda amostragem;

FS4A - farinha integral sem KTI e com LOX de uma primeira amostragem;

FS4B - farinha integral sem KTI e com LOX de uma segunda amostragem;

Pd - Padrão.

5.2. Caracterização da composição centesimal das farinhas

No quadro 4 apresenta-se o resumo da análise físico-química das farinhas de soja integrais utilizadas neste trabalho. Observa-se que o teor de proteína variou de 42,49% a 44,07%, lipídios de 23,30% a 25,53%, umidade de 9,56 a 11,64%, cinzas de 5,86 a 5,95% e carboidratos de 14,65% a 17,33%.

Quadro 4 - Análise físico-química das farinhas de soja integrais

Amostras	Proteínas	Lipídios	Umidade	Cinzas	Carboidratos
FS1	43,56%AB	23,69%C	9,56%D	5,86%A	17,33%A
FS2	42,49%B	25,30%A	11,64%A	5,95%A	14,65%C
FS3	43,04%AB	24,48%B	11,47%B	5,88%A	15,13%BC
FS4	44,07%A	23,53%C	10,69%C	5,86%A	15,85%B

FS1 = farinha de soja KTI+ e LOX +

FS2 = farinha de soja KTI+ e LOX –

FS3 = farinha de soja KTI- e LOX –

FS4 = farinha de soja KTI- e LOX+

Os valores mostrados no Quadro 4 caracterizam tratar-se de farinha de soja integral onde a porcentagens médias de proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e carboidratos são 43,29%, 24,25%, 10,89%, 5,88% e 15,74% respectivamente. Estes dados estão de acordo com os valores médios encontrados por MONTEIRO et al., 2000.

No Quadro 5 verifica-se a composição de minerais presentes nas farinhas de soja integrais. Observa-se que o teor de Fe variou de 4,41 a 5,21mg, Zn de 4,43 a 4,88mg, Mn de 1,99 a 2,29mg, Mg de 223,46 a 235,01mg, Ca de 168,01 a 211,29mg e K de 2146,63 a 2280,61mg.

Quadro 5 - Composição de minerais das farinhas de soja integrais

Amostras	Fe	Zn	Mn	Mg	Ca	K *
FS1	4,84 B	4,56 A	2,29 A	226,77 B	168,01 C	2280,61 A
FS2	5,20 A	4,75 A	2,17 B	228,74 AB	174,81 C	2146,63 A
FS3	4,49 C	4,43 A	1,98 C	223,46 B	211,28 A	2247,93 A
FS4	4,40 C	4,88 A	2,12 C	235,01 A	184,96 B	2274,72 A

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

FS1 = farinha de soja KTI+ e LOX +

FS2 = farinha de soja KTI+ e LOX –

FS3 = farinha de soja KTI- e LOX –

FS4 = farinha de soja KTI- e LOX+

Nos valores apresentados no Quadro 5 verifica-se, que quanto ao elemento ferro, a farinha que apresentou maior concentração foi a FS2, sendo este valor diferente estatisticamente da farinha FS1. As farinhas que apresentaram menores concentrações de ferro foram a FS3 e a FS4, sendo que estes valores não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade. Os valores apresentados foram inferiores ao encontrado na tabela de composição de alimentos (FRANCO, 1997) para farinha de soja industrializada, onde o teor de ferro foi de 9,10 mg/100 g de amostra.

As recomendações diárias do elemento ferro na dieta são de 11mg/dia para homens e 18 mg/dia para mulheres (NRC, 2001). Os resultados mostram que em cada 100g de amostra, as linhagens estudadas são capazes de fornecer de 40 a 50% das necessidades diárias desse mineral para homens e de 24 a 28% para as mulheres em 100 g de farinha de soja.

Para o elemento zinco, os valores encontrados entre as linhagens não diferiram estatisticamente em nível de 5% de probabilidade. Os valores encontrados foram superiores ao encontrado na tabela de composição de alimentos para o grão de soja, de 2,9 mg/100g (FRANCO, 1997).

As recomendações diárias para o zinco são de aproximadamente, 10 mg/dia para uma pessoa adulta (NRC, 2001). Assim, uma dieta contendo 100g de farinha

de soja integral é capaz de suprir aproximadamente, 44% das necessidades diárias do organismo humano.

Nos valores encontrados para os teores de manganês verifica-se que a farinha FS1 apresentou maior concentração deste mineral (2,29mg/100g), sendo este valor diferente das demais em nível de 5% de probabilidade. A farinha de soja que apresentou menor concentração de manganês foi a FS3, 1,986mg/100g diferindo estatisticamente das demais. Contudo, os valores encontrados são inferiores ao encontrado na tabela de composição de alimentos para o grão de soja, que é de 2,9 mg/100g (FRANCO, 1997).

As recomendações diárias deste mineral, para adultos são de 1,6 a 2,3 mg/dia (NRC,2001). Portanto, todas as farinhas de soja analisadas são capazes de suprir tais necessidades, pois os valores encontrados estão dentro da faixa requerida.

Para o magnésio, a farinha que apresentou maior concentração deste elemento foi a FS4, 235,01 mg/100g, não diferindo, ao nível de 5% de probabilidade da farinha FS2 quando este valor foi de 228,74 mg/100g. Porém, esse valor diferiu estatisticamente das demais farinhas de soja. O menor valor encontrado para a concentração desse mineral foi à farinha FS3, 223,46mg/100g, sendo que este valor não diferiu estatisticamente do valor encontrado para as farinhas de soja FS1 e FS2. Os valores relatados, neste trabalho, para o magnésio são próximos daquele encontrado na tabela de composição de alimentos, que é de 241 mg/100g para grãos de soja (FRANCO, 1997).

As recomendações diárias para este mineral, para idade maior que 19 anos, são de 320 mg/dia para mulheres e 420 mg/dia para homens. Os resultados mostram que as farinhas estudadas são capazes de suprir cerca de 70% das necessidades para as mulheres e 55% para os homens a cada 100g.

Para o cálcio, a farinha que apresentou maior teor deste mineral foi a FS3, 211,28mg/100g, sendo que este valor diferiu estatisticamente das demais farinhas. A farinha FS1 foi a que apresentou a menor concentração deste mineral, 168,01 mg/100g, não diferindo estatisticamente da farinha FS2, 174,81mg/100g. Os valores encontrados são próximos ao encontrado na tabela de composição de alimentos para farinhas industrializadas que é de 263 mg/100g (FRANCO, 1997).

As recomendações diárias de cálcio, para pessoas de 11 a 24 anos, são de 1300 mg/dia e para idades maiores que 25 anos 1000 mg/dia. Assim, em cada 100 g das farinhas de soja analisadas neste trabalho, são capazes de suprir cerca de 14% das necessidades para pessoas na faixa etária de 11 a 24 anos e cerca de 18% das necessidades daquelas pessoas maiores de 25 anos (NRC, 2001).

Para o potássio, os valores encontrados entre as linhagens variaram de 2146,63 mg/100g a 2280,61 mg/100g, sendo que entre as farinhas não houve diferenças ao nível de 5% de probabilidade. Estes valores são considerados bastante elevados, com relação a outras classes de alimentos.

Observa-se que as farinhas de soja integrais estudadas são capazes de suprir grande parte das necessidades diárias de minerais da alimentação. Isto demonstra que a soja, além de ser uma fonte de proteína possui em sua composição uma série de outros nutrientes importantes para compor uma alimentação equilibrada. Apesar de seu consumo ainda ser baixo em comparação a outras leguminosas como por exemplo o feijão, a soja vem se destacando nas indústrias alimentícias no preparo de uma série de alimentos e também na ração animal.

5.3. Análise dos fatores de tripsina e quimotripsina

A determinação destes fatores é importante, para a análise da atividade inibitória dos inibidores de proteases presentes na soja. Desta forma para a determinação de tais fatores foram utilizadas as mesmas condições empregadas por KAKADE et al., 1974 em sua análise do fator de tripsina. Assim, o produto da atuação de 1µg de tripsina ativa, determinado neste trabalho, sobre o substrato sintético DL-BApNA apresentou leitura de absorvância a 410 nm de 0,01888, sendo este valor equivalente ao encontrado por KAKADE et al.,1974 que foi de 0,019.

Já o produto da atuação de 1µg de quimotripsina ativa, determinado neste trabalho, sobre o substrato sintético L-BTpNA apresentou leitura de absorvância a

410 nm de 0,003. Este fator diferiu daquele encontrado por BARBOSA (1997) que foi de 0,013.

Os fatores 0,019 e 0,003, encontrados nesse ensaio foram utilizados para a determinação dos inibidores de tripsina e quimiotripsina respectivamente.

5.4. Caracterização das farinhas integrais de soja in natura quanto á presença de inibidores de proteases (kti e bbi)

Os teores de inibidores de proteases nas farinhas de soja integrais cruas foram estimados através da medida da atividade inibitória da atividade de tripsina e quimiotripsina na presença de seus respectivos substratos sintéticos.

No Quadro 6 verifica-se os teores estimados de inibidores de tripsina expresso em mg de tripsina inibida por grama de proteína, das farinhas de soja integrais *in natura*.

Quadro 6 - Atividade inibitória de tripsina

Amostras	mg de tripsina inibida/ g de proteína no extrato
FS1 (KTI+ e LOX+)	1229,170 A ¹
FS2 (KTI+ e LOX-)	1302,603 A
FS3 (KTI- e LOX-)	928,724 C
FS4 (KTI- e LOX+)	1128,023 B

¹As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme resultados apresentados no quadro 6 verifica-se que extratos protéicos obtidos das farinhas de soja *in natura* sem KTI (FS3 e FS4) apresentaram os menores valores de inibição de tripsina quando comparados aos valores encontrados nas farinhas das variedades com KTI (FS1 e FS2). Apesar, das

variedades sem KTI terem apresentado cerca de 11 a 26% de atividade inibitória de tripsina menor que a soja convencional, o nível destes inibidores na soja sem KTI foi elevado. Isto pode ser explicado pelo fato da soja isenta de KTI conter o inibidor BBI expressando alta atividade inibitória.

Os valores estimados de inibidores de proteases variaram de cerca de 900 a 1300 mg de tripsina inibida/g de proteína nas farinhas cruas. Estes valores foram superiores aos encontrados por MONTEIRO (2000), que analisando os teores de inibidores de proteases nas mesmas linhagens de farinha de soja, obteve valores entre 110 a 160 mg de tripsina inibida/g de proteína. Porém, no processo de obtenção destas farinhas, por MONTEIRO (2000), as sementes foram processadas a uma temperatura de 89 °C por 5 minutos para retirada da casca, o que pode ter contribuído para os baixos valores encontrados, por aquele autor, da atividade inibitória de tripsina. A casca do grão de soja contém grande quantidade de BBI e o binômio tempo/temperatura interfere com a porcentagem de retirada das mesmas. Assim, possivelmente a inibição trípica residual elevada encontrada nos resultados apresentados seja devido à presença de uma maior quantidade de BBI, já que, neste trabalho, para o processo de retirada da casca o binômio tempo x temperatura aplicados foi baixo (55°C/3 minutos). Este binômio favoreceu a retirada das cascas, porém parcialmente. O uso de temperaturas elevadas tendem a melhorar o processo de retirada das cascas. Contudo, neste trabalho optou-se por usar uma temperatura mais baixa, de forma a obter uma farinha com teor de inibidores não alterado pela temperatura, para assim efetuar a determinação da atividade inibitória dos mesmos e avaliar o efeito do processamento térmico.

Mesmo nas farinhas isentas de KTI, o conteúdo estimado de inibidores foi elevado, em torno de 1000 mg de tripsina inibida/g de proteína, ao ser comparados com valores, comumente encontrados para farinhas com KTI. Em seu trabalho MONTEIRO (2000) obteve para as farinhas isentas de KTI, em média 116 mg de tripsina inibida/g de proteína.

Segundo SMITH et al. (1980), a presença de ácidos graxos livres em produtos de soja, particularmente os fermentados, podem atuar como potentes inibidores não específicos de tripsina *in vitro* e interferir com a análise dos

inibidores específicos. O que pode explicar a elevada atividade inibitória de tripsina encontrada nas variedades de soja analisadas, devido ao conteúdo de lipídeos da farinha.

KAKADE et al. (1974), analisando o conteúdo de inibidores de proteases em 108 cultivares de soja obtiveram valores no extrato, que variaram de 35 a 123 mg de tripsina inibida/g de proteína. Valores estes, inferiores ao encontrado no presente trabalho.

BARBOSA (1997) obteve um valor de 556 mg de tripsina inibida por grama de proteína em extratos obtidos com Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM de sementes da variedade cristalina, este valor foi significativamente superior á extração com NaOH 0,01M, pH 9,5 que foi de 350,71 mg de tripsina inibida/g de proteína. Observou que o Tris-HCl favorece a extração de inibidores de proteases em grãos e em produtos de soja menos elaborados em detrimento á extração de proteínas de reserva de soja. Assim, quanto maior a eficiência na extração dos inibidores no grão maior será a atividade inibitória encontrada. Como fizemos a extração utilizando Tris-HCl, o elevado nível de inibição encontrado em todas as farinhas de soja analisadas neste trabalho, talvez esteja relacionado com o solvente extrator utilizado.

DIPIETRO e LIENER (1989) analisaram 27 farelos de soja e encontraram valores de inibição de tripsina variando de 5,1 a 151 mg de tripsina inibida/g de amostra. Os autores atribuíram a esta grande variação às diferenças no processamento dos produtos. Entretanto, ressalta-se que a comparação entre dados referentes ao conteúdo de inibidores, não é tão exata por se tratar de produtos resultantes de matérias-primas e processamentos diferentes.

Entre as variedades com KTI (FS1 e FS2) pode-se observar que, a diferença na atividade inibitória, quanto à presença e/ou ausência da enzima LOX, nestas farinhas não foi significativa. Contudo, os resultados obtidos para as variedades sem KTI (FS3 e FS4) diferiram significativamente entre si. Verifica-se que a variedade com ausência de LOX (FS3) apresentou uma menor atividade inibitória para tripsina indicando que, entre as variedades isentas de KTI, a enzima LOX parece ter influenciado na menor presença de KTI.

CARVALHO et al. (1999) demonstrou em seu estudo, que a enzima LOX presente no grão de soja interfere na atividade inibitória tanto da tripsina quanto da quimiotripsina. A linhagem CAC-1 (com KTI e LOX) apresentou 368 mg de tripsina inibida/g de proteína. Em linhagens com ausência de LOX, esse valor diminui para 201 mg de tripsina inibida/g de proteína. O mesmo foi verificado para a quimiotripsina. A linhagem CAC-1 (com KTI e LOX) apresentou 178 mg de quimiotripsina inibida/g de proteína e a linhagem CAC-1 (com KTI e sem LOX) foi de 82 mg de quimiotripsina inibida/g de proteína. Em outras linhagens de soja analisadas, valores reduzidos na atividade inibitória de tripsina e quimiotripsina, também foram obtidos quando na ausência da enzima LOX. Contudo, MONTEIRO et al. (2000) trabalhando com linhagens que diferiram quanto à presença e/ou ausência da LOX em sementes de soja, não constatou diferença estatística no valor da atividade inibitória do KTI e BBI quando a LOX foi retirada da semente.

Assim, novos estudos devem ser conduzidos de maneira a se verificar o real efeito fisiológico da LOX sobre os inibidores de proteases em sementes de soja.

De forma equivalente, os níveis de inibidores de quimiotripsina foram estimados em extratos das farinhas de soja *in natura*.

No Quadro 7 verifica-se o teor de inibidores de quimiotripsina expresso em mg de quimotripsina inibida por grama de proteína do extrato.

Quadro 7 - Atividade inibitória de quimotripsina em farinhas derivadas de diferentes linhagens de soja

Amostras	mg de quimotripsina inibida/ g de proteína no extrato
FS1 (KTI+ e LOX+)	678,17 A ¹
FS2 (KTI+ e LOX-)	613,58 AB
FS3 (KTI- e LOX-)	436,63 B
FS4 (KTI- e LOX+)	502,81 AB

¹Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Como pode ser observado pelo Quadro 7, o extrato protéico das farinhas sem KTI e sem LOX foi o que apresentou menor atividade inibitória sobre a quimotripsina, diferindo estatisticamente somente da variedade com KTI e com LOX, ou seja, FS1. Entre as variedades com ou sem KTI e/ou com ou sem LOX nenhuma diferença estatística foi verificada.

Todos os valores estimados para inibição de quimotripsina foram elevados quando comparados aos encontrados por MONTEIRO (2000), que para farinhas sem KTI encontrou um valor de inibição de quimotripsina cerca de 10 mg/g de proteína e para as farinhas com KTI em torno de 19 mg/g de proteína. FRIEDMAN et al. (1991) encontraram valores de inibição para farinha de soja aquecida a 121°C em autoclave por 10 min, de 4,2mg de quimotripsina inibida/g de proteína. Neste caso, o baixo valor encontrado pode ser explicado pelo binômio tempo x temperatura aplicado. Os valores encontrados por BRANDON et al. (1991) para farelos provenientes de linhagens com e sem KTI foram respectivamente, de 144 e 113 unidades de inibidor de quimotripsina/g de proteína. Estes valores são baixos comparados com os encontrados neste trabalho. Os valores de inibição de quimotripsina obtidos por BARBOSA (1997) em grãos da variedade Cristalina foram de 189,67 mg de quimotripsina/g de proteína, para extratos obtidos em Tris-HCl e de 116,30 mg de quimotripsina/g de proteína de proteína para extratos obtidos com hidróxido de sódio. O autor verificou ainda que o tampão Tris-HCl foi mais eficiente na extração do inibidor Bowman-Birk (BBI) em grãos e em produtos menos processados de soja. O elevado conteúdo de inibidores de quimotripsina encontrado nas linhagens analisadas no presente trabalho pode ser explicado pela grande extração destes, em Tris-HCl. A alta atividade inibitória de quimotripsina encontrada pode também, ser atribuída à presença de inibidores não específicos da enzima, como fitatos e taninos nos farelos de soja analisados (DOMAGALSKI et al., 1992).

5.5. Caracterização das farinhas integrais de soja processadas quanto à presença do inibidor de tripsina (KTI)

As farinhas obtidas das quadro linhagens de soja foram submetidas ao tratamento térmico a 120°C com variação no tempo de exposição ao calor de 9, 12, 15 e 18 minutos. Em seguida, estimou-se o teor de inibidor de tripsina nestes tempos, na presença de seu substrato específico.

No Quadro 8 verifica-se os teores estimados de inibidores de tripsina expresso em mg de tripsina inibida por grama de proteína das farinhas de soja integrais submetidas ao tratamento térmico com variação no tempo de processamento.

Quadro 8 - Atividade inibitória de tripsina em farinhas de soja submetidas ao processamento térmico (mg de tripsina inibida/ g de proteína no extrato)

Amostras	mg de tripsina inibida/g de proteína no extrato de acordo com o tempo de tratamento térmico a 120°C (min)				
	0	9	12	15	18
FS1 (KTI+ e LOX+)	1229,17A ¹	191,07A	92,33A	72,45A	0,00A
FS2 (KTI+ e LOX-)	1302,60A	108,32B	82,08A	58,53A	0,00A
FS3 (KTI- e LOX-)	928,72C	4,64C	0,00B	0,00B	0,00A
FS4 (KTI- e LOX+)	1128,02B	0,00C	0,00B	0,00B	0,00A

¹As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No quadro 9 verifica-se elevada redução na porcentagem da atividade inibitória de tripsina em todas as variedades de soja analisadas, em comparação com as mesmas farinhas em seu estado in natura.

Quadro 9 - Porcentagem de redução da atividade inibitória de tripsina nos diferentes tempos de processamento térmico

Amostras	Tempo de tratamento térmico a 120 °C (min)			
	9	12	15	18
FS1 (KTI+ e LOX+)	84.45%	92.48%	94.10%	100%
FS2 (KTI+ e LOX-)	91.68%	93.69%	95.50%	100%
FS3 (KTI- e LOX-)	99.50%	100%	100%	100%
FS4 (KTI- e LOX+)	100%	100%	100%	100%

Em geral, a inativação do inibidor de tripsina pelo calor está em função do binômio tempo x temperatura, o que pode ser observado no presente trabalho, pois à medida que o tempo de exposição ao calor aumentou, uma diminuição da atividade inibitória foi verificada. Com o aquecimento, a atividade inibitória reduz bruscamente nos primeiros minutos e com o aumento do tempo de exposição ao calor a queda é mais lenta (LEI, 1981).

Segundo alguns autores, os produtos de soja destinados ao consumo humano devem passar por tratamento térmico suficiente para inativar pelo menos 80% da atividade inibitória dos inibidores de tripsina (BURNS,1987; LIENER, 1994). De acordo com os resultados encontrados (Quadro 10), verifica-se, portanto, que a temperatura de 120 °C foi suficiente para a inativação dos inibidores de tripsina em níveis aceitáveis. Alguns estudos demonstram também que, a utilização de temperaturas mais baixa necessita de um tempo maior de exposição ao calor para se conseguir uma redução significativa dos inibidores de proteases na soja. KAPPOR e GUPTA (1978) mostraram que a 100 °C se consegue uma completa inativação do inibidor de tripsina, porém somente, quando as sementes são autoclavadas por 30 minutos ou quando cozidas a vapor por 60 minutos. Contudo, se as sementes são deixadas de molho em água por 8 horas antes do cozimento, o tempo necessário para inativação dos inibidores reduz para 15 minutos.

Assim, vários métodos são descritos na literatura de forma a se conseguir um melhor tratamento térmico, quanto aos fatores antinutricionais, sem, contudo, afetar a qualidade nutricional das proteínas da soja.

No Quadro 8 observa-se que o tempo de 9 minutos de autoclave foi suficiente para a completa inativação dos inibidores nas variedades isentas de KTI (FS3 e FS4). Entre estas, não foi verificada diferença estatística. Porém, as variedades com KTI (FS1 e FS2), apesar da grande redução na atividade inibitória com o aumento do tempo de aquecimento, a completa inativação dos inibidores só é conseguida no tempo de 18 minutos de exposição ao calor.

Desta forma, verifica-se que mesmo sendo as variedades de soja isentas de KTI, a aplicação do tratamento térmico torna-se necessário para obtenção de uma melhor inativação dos inibidores, devido possivelmente a inibidores inespecíficos e também ao BBI. Porém, a duração do tempo de autoclave ou aquecimento necessário para minimizar a atividade inibitória de tripsina foi cerca de 50% a menos para as farinhas derivadas das linhagens de soja sem KTI (FS3 e FS4) que a farinha de soja obtida da variedade CAC-1 (com KTI e com LOX). Alguns dos efeitos benéficos do aquecimento da soja sem KTI estão provavelmente associados com a desnaturação das proteínas e a redução de outros fatores antinutricionais como a atividade hemaglutinante (HAFERMANN, 1992).

Apesar da solubilidade protéica não ter sido analisada neste trabalho e, visto sua importância na qualidade da proteína de soja, é importante mencionar que FRIEDMAN (1992) constatou que a solubilidade da proteína da soja convencional não mudou consistentemente, na temperatura de 120°C, com o aumento do tempo de autoclave de 0 a 18 minutos. E que existiu uma redução de 16% na solubilidade protéica para a soja convencional a 21 minutos comparados com 18 minutos de autoclave. Portanto, isto indica que, a solubilidade protéica das farinhas de soja analisadas neste trabalho, não foi comprometida, o que é favorável sob o ponto de vista qualitativo.

Desta maneira, verifica-se que entre as variedades com KTI, à medida que aumenta o tempo de exposição ao calor ocorre uma redução

significativa em sua atividade inibitória. Porém, para as variedades sem KTI, o aumento no tempo de autoclave acima de 9 minutos não foi significativo.

5.6. Teste de urease

A enzima urease (uréia aminohidrolase) faz parte da constituição da soja e de muitas outras leguminosas, sendo o seu teste muito utilizado pelas indústrias de alimentos. Constitui um método barato e rápido de avaliar o teor dos inibidores de tripsina nos produtos derivados de soja. Este teste é baseado no aumento do pH devido à liberação da amônia ocasionada pela atividade da urease nos produtos.

O propósito primário da análise é determinar se os produtos à base de soja têm sido suficientemente aquecidos para destruir muitos dos fatores antinutricionais. O grau de tratamento térmico aplicado na soja é freqüentemente estimado pela determinação da atividade de urease, pois esta enzima e os inibidores de tripsina são destruídos pelo calor a uma taxa similar (HERKELMAN et al., 1992).

Observa-se nos dados apresentados no Quadro 10 que as farinhas de soja *in natura* apresentaram os maiores valores de pH variando entre 1,85 e 2,12. Isto demonstra uma alta atividade da enzima urease nas farinhas derivadas de soja quando cruas.

Quadro 10 - Índice de urease nas farinhas derivadas das linhagens de soja

Linhagens	pH em cada tempo de processamento térmico				
	0	9	12	15	18
FS1 (KTI+ e LOX+)	1,85	0,225	0,135	0,070	0,025
FS2 (KTI+ e LOX-)	2,12	0,200	0,090	0,050	0,025
FS3 (KTI- e LOX-)	1,99	0,195	0,114	0,085	0,025
FS4 (KTI- e LOX+)	2,04	0,115	0,100	0,075	0,025

Os menores valores de pH foram obtidos para as farinhas processadas a 120°C/18 minutos. Verifica-se assim, que com o aumento do tempo de exposição ao calor de 120°C ocorreu uma diminuição nos valores de pH indicando redução da atividade da enzima urease.

Através da inativação da enzima urease pode-se avaliar a intensidade do tratamento térmico aplicado, sendo que faixa na qual se considera um processamento adequado varia de 0,05 a 0,20. Assim, índice de urease elevado (>0,20) indica que o calor aplicado foi insuficiente e índice de urease baixo (<0,05), indica que o calor foi excessivo. Porém, não é interessante para as indústrias de alimentos os produtos sub-processados nem super-processados, pois ambos ocasionam diminuição na qualidade protéica pela redução na digestibilidade. Porém, Noland et al. (1976) citado por HERKELMAN et al. (1992) relatam que quando porcos foram alimentados com farinha de soja integral autoclavada, com índice de urease de 0,05 ou 0,03 observou-se uma melhor performance no crescimento dos animais do que quando foram alimentados com farinha de soja apresentando atividade de urease de 0,11, 0,02 e 0,01. Baseado neste resultado e nos níveis propostos do índice de urease verifica-se que o tratamento térmico aplicado nos tempos propostos neste estudo foi adequado indicado que as farinhas de soja foram devidamente processada. Sendo que o tempo de 18 minutos de autoclave apresentou o melhor índice de urease.

Ao se correlacionar o índice de urease e a atividade dos inibidores de tripsina encontrados, neste trabalho verifica-se que as farinhas derivadas de linhagens de soja com maior teor de inibidores de tripsina apresentam um índice de urease também elevado, sendo que uma diminuição na concentração, de ambos é conseguida com o aumento do tempo de exposição ao calor à temperatura de 120°C.

5.7. Determinação da qualidade protéica das farinhas integrais de soja

As farinhas utilizadas nas análises *in vivo* foram as sem KTI submetida ao tratamento térmico de 120°C por 12 minutos e as com KTI de 120°C por 18

minutos. O tempo de exposição ao calor foi escolhido segundo a isenção da atividade inibitória (quadro 8).

5.7.1. Consumo alimentar e ganho de peso

Verifica-se no Quadro 11 a análise do consumo alimentar e do ganho de peso dos ratos alimentados com dietas à base de farinhas derivadas de diferentes linhagens de soja, sendo estes comparados com os grupos de rato que receberam dieta à base de caseína.

Quadro 11 - Consumo alimentar e ganho de peso dos ratos alimentados com diferentes dietas à base de proteína de soja, nos 14 dias de experimento

Dietas	Consumo alimentar* (g)	Ganho de peso* (g)	Coefficiente de Eficiência Alimentar (CEA) Ganho de peso/consumo
Caseína	162,81 A	57,50 A	0,35 A
D1	106,24 B	23,50B	0,22 B
D2	102,38 B	19,00 B	0,18 B
D3	110,52 B	21,16 B	0,19 B
D4	116,72 B	26,83 B	0,22 B

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

D1- Dieta à base de farinha de soja com KTI e com LOX processada a 120°C/18 minutos

D2- Dieta à base de farinha de soja com KTI e sem LOX processada a 120°C/18 minutos

D3- Dieta à base de farinha de soja sem KTI e sem LOX processada a 120° C/12 minutos

D4- Dieta à base de farinha de soja sem KTI e com LOX processada a 120° C/12 minutos

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 11, verifica-se que os ratos alimentados com dietas à base de proteína de soja apresentaram um consumo alimentar menor, com valores variando de 102,38g a 116,72g o que corresponde a 7,31g/dia a 8,33g/dia, do que aqueles animais alimentados com dieta à base de caseína, que apresentaram um consumo alimentar de 11,63g/dia e ganho de peso

4,10g/dia. Assim, o menor ganho de peso, dentro dos grupos que receberam dieta à base de farinha de soja, variou de 19,0g a 26,83g o que corresponde a 1,35g/dia a 1,92g/dia.

Observa-se uma redução no consumo alimentar e no ganho de peso de aproximadamente, 33,82% e 39,34% respectivamente, para os grupos de ratos que receberam dieta à base de proteína de soja, em relação àqueles que receberam dieta à base de caseína. Não foi observada diferença estatística entre os grupos de ratos que receberam dietas de soja. Porém, o grupo de animais que receberam dieta livre de nitrogênio, ou seja, isenta de proteína, tiveram uma redução no consumo alimentar de, em média, 67% em relação ao grupo que recebeu caseína e 50,76% em relação aos grupos que receberam proteína à base de soja. Em relação ao peso observa-se déficit de, aproximadamente 0,82g/dia para o grupo isento de proteína.

HASDAI e LIENER (1983), avaliando o crescimento e a digestibilidade de hamsters alimentados com soja crua e aquecida, observaram um consumo alimentar para farinha de soja tostada de 7,66g/dia e um ganho de peso de 1,57g/dia, sendo que o consumo alimentar foi equivalente ao encontrado neste trabalho, porém, o ganho de peso foi superior ao analisado. Para a farinha de soja crua, este autor obteve um consumo alimentar de 5,5g/dia e um ganho de peso de 0,33g/dia, valores estes, inferiores ao encontrado para as farinhas de soja analisadas neste trabalho.

SARWAR (1997), estudando a digestibilidade de várias proteínas contendo fatores antinutricionais e suplementadas com aminoácidos sulfurados em ratos, obteve um consumo alimentar para farelo de soja aquecida a 121°C/20 minutos de 160 g (11,42g/dia) e um ganho de peso de 44 g (3,14g/dia). Estes valores foram superiores aos encontrados neste trabalho para as farinhas de soja aquecidas.

Assim, ao avaliar os coeficientes de eficiência alimentar verifica-se que a dieta à base de caseína apresenta uma maior eficiência alimentar que as dietas à base de farinha de soja. No entanto, os coeficientes de eficiência alimentar obtidos para as farinhas de soja aquecidas, foi em média 0,21. Quando comparados com os dados apresentados por HASDAI e LIENER (1983) para farinha de soja crua, cujo coeficiente de eficiência alimentar foi de 0,06, constata-se que a farinha de soja,

quando submetida ao processamento térmico, apresenta uma maior eficiência alimentar.

5.7.2. Análise do NPR e PER

No Quadro 12 verifica-se a qualidade protéica, avaliada pelos dados de NPR (Razão Protéica Líquida) e PER (Relação da Eficiência Protéica).

Quadro 12 - Valores de NPR e PER das dietas de caseína e das farinhas de soja determinados em experimentos em ratos

Dietas	NPR*	RNPR (%)**	PER*	RPER** (%)
Caseína	4,96 A	100,00	4,12 A	100,00
D1	4,08 AB	82,14	2,75 B	66,84
D2	3,03 B	61,14	1,83 B	44,54
D3	3,45 B	69,46	2,21 B	53,59
D4	3,51 B	70,80	2,44 B	59,20

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

** RNPR = NPR relativo e RPER = PER relativo

D1- Dieta à base de farinha de soja com KTI e com LOX processada a 120 °C/18 minutos;

D2- Dieta à base de farinha de soja com KTI e sem LOX processada a 120 °C/18 minutos;

D3- Dieta à base de farinha de soja sem KTI e sem LOX processada a 120 °C/12 minutos;

D4- Dieta à base de farinha de soja sem KTI e com LOX processada a 120 °C/12 minutos.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 12, observa-se que quanto ao NPR, a dieta à base de farinha de soja com KTI e com LOX processada a 120 °C/18 minutos (D1) não diferiu estatisticamente da dieta controle à base de caseína. Isto demonstra a alta qualidade protéica desta farinha para a manutenção de pesos de ratos. Porém, o valor de NPR para dieta com caseína foi significativamente superior aos encontrados para as demais dietas à base de proteínas de soja. E entre estas, não foi verificada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de NPR para as dietas à base de proteínas de soja variaram de 3,04 a 4,08, sendo equivalentes aos valores encontrados por SARWAR, 1997, em

experimento com rato, utilizando-se farinha de soja aquecida a 121 °C/20 minutos encontraram valores de NPR de 4,00, sendo superior à farinha de soja crua, que foi de 2,51.

MONTEIRO (2000) encontrou valores de RNPR para farinhas integrais de soja crua variando de 49,55 a 52,70% em relação à caseína, sendo estes valores inferiores ao encontrado neste trabalho que variaram de 61,14 a 82,14%.

Pelos resultados do Quadro 12 observa-se que, quanto ao PER, houve diferença significativa entre os valores obtidos pela dieta com caseína das demais dietas à base de proteínas de soja, e entre estas, não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade. Isto demonstra que, a qualidade protéica das dietas à base de farinhas integrais de soja é inferior à caseína para promoção de crescimento dos animais, e que não há diferença, quanto à qualidade protéica, entre as dietas à base de farinha de soja com KTI processada a 120 °C/18 minutos e a farinha de soja sem KTI processada a 120 °C/12 minutos.

Pelo Quadro 12, verifica-se ainda que os valores de RPER para as farinhas integrais processadas variaram de 44,54 a 66,84%. Estes valores foram superiores aos valores encontrados por MONTEIRO (2000) para farinhas de soja integrais cruas, cujos valores de RPER variaram de 30,85 a 39,69%. RACKIS et al. (1985) em experimento com ratos, obtiveram valor de PER para farinha de soja desengordurada crua de 47,28%, em relação à caseína.

Os valores de PER para dietas à base de farinhas de soja variaram de 1,83 a 2,75, sendo estes valores inferiores ao encontrado por SAWAR, 1997 em experimento com ratos para farelo de soja aquecida a 121 °C/20 minutos, que foi de 3,04. Porém, para o farelo de soja crua, o valor de PER encontrado foi de 1,30, sendo este, inferior ao encontrado para soja aquecida. FRIEDMAN e GUMBMANN (1986) analisando a qualidade nutricional de farinhas de soja, constataram um aumento do PER de 1,55 para farinha de soja crua para 2,11 para farinha de soja aquecida, sendo que este último valor se encontra dentro da faixa verificada neste trabalho. Assim, constata-se que o tratamento térmico foi capaz de aumentar significativamente a qualidade protéica de farinhas de soja cruas.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 12, 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.

5.7.3. Análise da digestibilidade *in vivo*

No Quadro 13 verifica-se a análise da digestibilidade *in vivo* das farinhas derivadas de diferentes linhagens de soja.

Quadro 13 - Valores de digestibilidade das dietas de caseína e das farinhas de soja determinados em experimentos com ratos

Dietas	Digestibilidade*	R Digestibilidade (%)*
Caseína	95,01 A	100,00
D1	83,17 B	87,54
D2	82,50 B	86,83
D3	79,02 B	83,17
D4	81,09 B	85,35

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

** R Digestibilidade = digestibilidade relativa em %

D1- Dieta à base de farinha de soja com KTI e com LOX processada a 120°C/18 minutos

D2- Dieta à base de farinha de soja com KTI e sem LOX processada a 120°C/18 minutos

D3- Dieta à base de farinha de soja sem KTI e sem LOX processada a 120°C/12 minutos

D4- Dieta à base de farinha de soja sem KTI e com LOX processada a 120°C/12 minutos

A digestibilidade é um condicionante da qualidade protéica dos alimentos, pois, indica o quanto das proteínas são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo. 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, 1997). Em virtude disto, é importante que se conheça os valores de digestibilidade protéica de um alimento para uso posterior na alimentação de animais e humanos.

Assim, verifica-se no Quadro 13 que a digestibilidade da dieta à base de caseína foi superior (95,01) e estatisticamente diferente, ao nível de 5% de probabilidade, das demais dietas, cujos valores variaram de 79,02 a 83,17 correspondendo a 83,17 a 87,54% para digestibilidade relativa. Os valores obtidos para a digestibilidade das dietas à base de farinhas de soja com KTI processada a 120°C/18 minutos não diferiram estatisticamente daqueles obtidos para as dietas à base de farinhas de soja sem KTI (D1 e D2) processadas a 120 °C/12 minutos (D3 e D4). Este resultado mostra que provavelmente, as linhagens de soja com KTI necessitam de um tempo maior de exposição ao calor, para se conseguir a mesma digestibilidade das proteínas, que as linhagens de soja isentas de KTI.

MONTEIRO (2000), avaliando a digestibilidade *in vivo* de linhagens de soja, verificou que as dietas à base de farinhas de soja cruas derivadas de linhagens com ausência de KTI apresentaram valores de digestibilidade superiores (em média 92,94%) às dietas de farinhas de soja derivadas de linhagens contendo KTI (em média 88,98%) mostrando que a eliminação genética do inibidor de tripsina “Kunitz” dos grãos de soja promove uma melhoria significativa na digestibilidade de sua proteína. Porém, os valores de digestibilidade encontrados no presente trabalho foram inferiores aos encontrados por esse autor. Isto pode estar relacionado ao BBI, à perda de alguns aminoácidos, bem como à formação de alguns compostos indisponíveis biologicamente, ambos devido à ação do calor (FRIEDMAN, 2001).

Os resultados descritos no Quadro 13 mostram uma digestibilidade relativa, para as dietas à base de farinha de soja, variando de 83,17 a 87,54%, sendo este valor superior ao encontrado por FRIEMAN e GUMBMAN (1986), que avaliando a qualidade nutricional de farinha de soja obtiveram para digestibilidade *in vivo* o valor de 81,9% para farinha de soja aquecida a 75°C. Já para a farinha de soja crua encontraram um valor de digestibilidade de 78,3%. Isto demonstra que através do tratamento térmico se consegue uma melhoria na digestibilidade protéica, principalmente de produtos de origem vegetal.

No trabalho realizado por SARWAR et al. (1997), em experimento com ratos, encontrou-se um valor de digestibilidade para farelo de soja aquecido de 83,0, próximo aos valores relatados neste trabalho (Quadro 13) que variaram de 79,02 a 83,17.

HAFERMANN et al. (1992), estudando o efeito do aquecimento sobre a qualidade nutricional da soja convencional e isenta de KTI em pintinhos, constataram que os pintinhos alimentados com dieta à base de soja isenta de KTI crua apresentavam um crescimento superior àqueles alimentados com dieta à base de soja com KTI crua. Porém, verificaram que para se conseguir um resultado mais eficiente no crescimento dos pintinhos, era necessário a aplicação de um tratamento térmico adequado para melhorar a qualidade nutricional de ambos tipos de soja. Assim, constataram que a soja isenta de KTI requer um tempo menor de autoclave para obter uma digestibilidade máxima em comparação à soja convencional.

5.7.4. Digestibilidade *in vitro*

PIRES (2002), para avaliar a digestibilidade *in vitro* de diferentes variedades de feijão, utilizou no ensaio um sistema digestivo com pepsina na concentração de 3%, por um período de 3 horas com posterior adição de pancreatina a 8%, seguida por hidrólise durante 24 horas. Este sistema foi o que apresentou maior grau de hidrólise obtendo uma digestibilidade *in vitro* variando entre 50,01 e 68,82%. Assim, para avaliar o grau de digestibilidade *in vitro* das farinhas, derivadas de linhagens de soja, modificadas geneticamente foi empregado o mesmo sistema digestivo utilizado por esse autor.

Observa-se no Quadro 14 que os valores encontrados para a porcentagem de digestibilidade *in vitro* variaram de 5,28 a 5,60% para a farinha de soja crua, de 10,54 a 25,32% para a farinha processada a 120°C /9 minutos, de 12,38 a 22,54% para a farinha processada a 120°C /12 minutos, de 11,55 a 36,43% para a farinha processada a 120°C /15 minutos e de 18,53 a 29,02 para a farinha processada a 120°C /18 minutos.

Quadro 14 - Digestibilidade protéica *in vitro* de farinhas liofilizadas, derivadas de diferentes linhagens de soja

Amostras	Digestibilidade (%) em cada Tempo (min) a 120°C				
	0	9	12	15	18
FS1 (KTI+ e LOX+)	5,38	18,17	12,38	11,55	18,53
FS2 (KTI+ e LOX-)	5,60	10,54	22,54	23,62	29,02
FS3 (KTI- e LOX-)	5,28	12,36	20,87	36,43	24,72
FS4 (KTI- e LOX+)	5,42	25,32	22,20	22,76	24,30

Observa-se pelos resultados apresentados no Quadro 14 que os valores da digestibilidade *in vitro* foram muito menores quando comparados com os valores obtidos da digestibilidade *in vivo*. Observa-se ainda, que os valores da digestibilidade *in vitro*, de maneira geral, foram muito baixos quando comparados com os resultados obtidos por PIRES, 2002 para o feijão cozido e seco que foi de 50,01 e 68,82%. A farinha derivada da soja isenta de KTI e LOX (FS3) processada a 120 °C/15 minutos foi a que apresentou maior valor para a digestibilidade *in vitro* (36,43%). As farinhas cruas foram as que apresentaram menores valores de digestibilidade variando de 5,28 a 5,60%. Assim, pode-se constatar que o tratamento térmico melhorou a digestibilidade das farinhas derivadas de diferentes linhagens de soja. Isto se deve em parte, a inativação dos inibidores de proteases e em parte, a desnaturação das proteínas facilitando a atuação das enzimas digestivas (BOONVISUT e WHITAKER, 1976). Contudo, BOONVISUT e WHITAKER (1976), citam um trabalho de Jaffé (1972) em que relata, que uma variedade de feijão vermelho, apesar de não conter inibidores de tripsina ou quimotripsina, possuía somente 71% de digestibilidade *in vitro*.

Alguns autores trabalhando com a digestibilidade *in vitro* de feijões encontraram valores baixos variando de 13 a 31%, de acordo com a variedade

utilizada (DUARTE, 1999, MARQUES e LAJOLO, 1981, citados por PIRES, 2002).

Esta baixa digestibilidade da soja e de algumas variedades de feijão pode ser explicada, em parte, por uma baixa digestibilidade que as moléculas de globulinas possuem frente às enzimas proteolíticas. A digestibilidade dessas proteínas pode ser afetada pela sua própria estrutura terciária, pois são bastante compactadas e possuem uma região hidrofóbica no seu interior, resistente à proteólise. Além disto, algumas possuem ligações dissulfeto que irão contribuir ainda mais, para a estabilização da estrutura terciária. Assim, as proteínas não são digeridas de forma satisfatória sem que a estrutura terciária seja destruída (BOONVISUT e WHITAKER, 1976). SEIDL et al., 1969 em estudos de digestibilidade *in vitro* relatou que a fração globulina isolada de feijão preto foi muito resistente à hidrólise por enzimas proteolíticas.

Pelos resultados analisados verifica-se que os valores da digestibilidade *in vitro* foram inferiores aos obtidos da digestibilidade *in vivo*, correspondendo a aproximadamente a 43% do valor obtido para os estudos *in vivo*. Isto mostra que o método testado para a digestibilidade *in vitro* pode não ter sido tão eficiente para a digestibilidade das proteínas de soja, quanto foi para as proteínas do feijão, não permitindo uma boa relação com os valores *in vivo*. A diferença entre a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* existe, pois nos estudos *in vivo*, para que ocorra a digestibilidade protéica, os animais de experimentação utilizam um sistema complexo enzimático próprio de seu organismo, além da produção de ácidos, sendo todo o processo controlado por uma série de fatores hormonais de maneira a alcançar uma digestibilidade protéica satisfatória, enquanto que, no processo de digestibilidade *in vitro* foram utilizadas somente as enzimas pepsina e pancreatina. Assim, novos estudos são necessários de forma a conseguir um método que melhor correlacione a digestibilidade *in vivo* com a *in vitro* para produtos derivados da soja.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a qualidade nutricional de quatro linhagens de soja modificadas geneticamente que diferiam entre si quanto à presença e/ou ausência do inibidor de tripsina “Kunitz” e da enzima lipoxigenase, através da determinação da composição centesimal, dos teores de minerais, da atividade dos inibidores de tripsina e quimiotripsina, do índice de urease e do grau de digestibilidade *in vitro* e *in vivo*.

Para a obtenção das farinhas integrais de soja, sementes selecionadas foram lavadas e submetidas ao tratamento térmico para retirada da casca (55°C/ 5 minutos). Após o tratamento térmico, os grãos foram quebrados em moinho, para separação das cascas, e abanadas em peneiras. Os grãos parcialmente quebrados foram finamente moídos e as farinhas obtidas dessa moagem foram embaladas em sacos plásticos e mantidas a -20° C.

Realizaram-se análises da composição centesimal, inibidores de tripsina e quimiotripsina para as farinhas *in natura* e àquelas submetidas ao tratamento térmico de 120 °C pelos tempos de 9, 12, 15 e 18 minutos. O teste de urease também foi aplicado nas farinhas *in natura* e nas submetidas ao processamento. O valor nutricional das farinhas foi estimado pelos valores da digestibilidade *in vitro* e

também pelos valores de NPR, PER e digestibilidade verdadeira em experimento com ratos. Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- As variações genéticas das linhagens não afetam os teores de minerais das farinhas de soja, que foram semelhantes à variedade convencional, com KTI e LOX.
- Apesar da eliminação genética de KTI dos grãos de soja, os valores de inibição de tripsina e quimiotripsina nas farinhas continuam altos. Porém, as farinhas derivadas de linhagens de soja isentas de KTI apresentaram uma menor atividade inibitória de tripsina e quimiotripsina, sugerindo a presença no grão de soja de outros fatores como os fitatos e polifénóis, além do BBI, que atuam inibindo tripsina e quimiotripsina.
- A atividade inibitória de tripsina para as farinhas submetidas ao processamento térmico de 120°C foi reduzida gradualmente com o aumento do tempo de exposição ao calor. Uma completa eliminação da atividade inibitória de tripsina foi obtida com 18 minutos de autoclave para as farinhas derivadas das linhagens com KTI e com 9 minutos para as farinhas derivadas de linhagens isentas de KTI.
- Para o teste de urease analisado para as farinhas de soja, o pH variou de 2,04 a 0,025, sendo que o menor valor foi obtido para as farinhas processadas a 120°C/18 minutos, indicando que este binômio tempo x temperatura foi adequado tanto para inativar os inibidores de tripsina, quanto para manter a integridade das proteínas presentes na farinha. O uso de menor binômio tempo x temperatura elimina a necessidade de empregar altas temperaturas para inativar KTI, o que pode evitar a insolubilização das proteínas e, conseqüentemente, a redução da biodisponibilidade de aminoácidos.
- Com relação à avaliação da qualidade protéica das farinhas de soja, verificou-se que os valores de NPR, PER e digestibilidade *in vivo* foram inferiores aos da proteína padrão caseína. Porém, entre os grupos que receberam dieta à base de farinha de soja não foi verificada diferença

significativa entre as farinhas derivadas de linhagens de soja com KTI processadas em autoclave pelo tempo de 18 minutos, daquelas derivadas de linhagens de soja sem KTI processadas no tempo de 12 minutos. Estes dados confirmam o fato de que grãos de soja isentos de KTI necessitam de um menor tempo de exposição ao calor, sendo assim, de interesse na redução dos custos de processamento.

- O método testado para a digestibilidade *in vitro* com utilização de pepsina, seguida de hidrólise por 3 horas, com posterior adição de pancreatina, seguida de hidrólise por 24 horas, não permitiu boa relação com os valores *in vivo*. A correlação foi de aproximadamente 43% do valor obtido para os estudos *in vivo* sendo necessários novos estudos de maneira a se conseguir um método que melhor relacione a digestibilidade *in vitro* com a *in vivo* para possibilitar seu uso nas indústrias de alimentos. Apesar disto, os dados *in vitro* confirmam a eficiência do tratamento térmico na qualidade protéica das farinhas integrais de soja.

De maneira geral, a presença e/ou ausência da enzima LOX não foi significativa, porém seu teor reduzido na soja é desejável, ao paladar, pois um dos maiores obstáculos do uso da soja como alimento é o desenvolvimento do flavor “grassy-beany” e seu gosto amargo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Washington, D.C: 1984. 1141p.
- BARBOSA, M. C. A. **Determinação de inibidores de proteases em soja e seus derivados protéicos**. Viçosa, UFV, 1997. 61p. (Tese M.S.).
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, UFV, 1999. 817p.
- BOONVISUT, S. e WHITAKER, J. R. Effect of heat, amylase, and disulfide bond cleavage on the in vitro digestibility of soybean proteins. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 24, n. 6, p. 1130-1135, 1976.
- 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**. Plenum Press, p. 321, New York, 1991.
- BRANDON, D. L., BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. Monoclonal antibody-based enzyme immunossay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 37, n. 4; p. 1192-1196, 1989.

- BRANDON, D. L., HAQUE S., FRIEDMAN M., Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 35, n. 1; p. 195-200,1987.
- BURNS, R. A. Protease inhibitors in processes plant foods. **Journal of Food Protection**. v. 50, n 2, p. 161-166, Fev. 1987.
- CADWELL, J. **O livro da soja**. São Paulo: Ground, 79p. 1981.
- CHANG, C. J. et al. Effects of different hest treatments during processing on nutrient digestibility of soybean meal in growing swine. **Journal Animal Science**. V. 65, n. 5 p. 1273-1282, 1987.
- CHASE, T. JR., SHAW, E. p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoate-HCl: a new active site titrant for trypsin. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, n. 29, p. 508-514, 1967.
- DAVIE, E. W., NEURATH, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. **Journal of Biological Chemistry**, n. 212, p. 515-529, 1955.
- 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.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.** n. 95, p.271-278, 1961.
- FILHO, X. J., CAMPOS, F. A. P. **Proteins and amino acids**. Chapter –Proteinase inhibitors. V. III, 1989.
- FILHO, X. J. **Fisiol. Veg.** The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. v. 4 n. 1 p. 1-6, 1992.
- FRIEDMAN, M. et al. Nutritional improvement of soy flour. **The journal of Nutrition**. v. 114, n. 12, 1984.
- FRIEDMAN, M. e BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 3, 2001.

- FRIEDMAN, M. e GUMBMANN, R. M. Nutritional improvement of soy flour through inactivation of trypsin inhibitors by sodium sulfite. **Journal of Food Science**. v. 51, n. 5, p.1239-1241, 1986.
- 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.
- FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 9ª ed., 1997.
- GARIANI, T. et al. The role P₂' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the studies on P₂' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. **Biochimica et Biophysical Acta**. v. 1431, p. 232-237, 1999.
- GENOVESE, M. I. LAJOLO, F. M. Physicochemical properties of isolated soy proteins from normal, broken or damaged seeds. **Journal of Food Science**. v. 57, n 6, 1992.
- GERONAZZO, H. et al. Inactivación de lipoxigenases e inhibidores de tripsina en um proceso de obtención de leche de soja por molienda directa y ultra alta temperatura (MD-UAT). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v. 48, n. 1, 1998.
- GOMES, J. C., COELHO, D. T. **Leite de soja na alimentação humana**. Viçosa, MG: UFV, 1989. 25p.
- HAFERMAN, A. J. C. et al. Effect of heating on nutritional quality of conventional and Kunitz Trypsin inhibitor-free soybeans. **Poultry Science**. v. 71, n. 10, p. 1700-1709, 1992.
- HASDAI, A. e LIENER, I. E. Growth, digestibility and enzymatic activities in the pâncreas and intestines of hamsters fed raw and heated soy flour. **The Journal of Nutrition**. v. 113, n. 3, p. 662-668, 1983.
- HASDAI, A. and LIENER, E. I. Growth, digestibility and enzymatic activities in the pancreas and intestines of hamsters fed raw and heated soy flour. **The Journal of Nutrition**. v. 113, n. 3, 1983.
- 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 soybean for pigs. **Journal of Animal Science**. v. 70, p. 818-826, 1992.

- HOLM, H. KROGDAHL, A. Problems in predicting the inhibition of human pancreas proteinases by soybean proteinase inhibitors: in vitro assays employing human, bovine and porcine proteinases. **J. Sci. Food Agr.** n. 33, p. 1164-1171, 1982.
- HOLM, H., RESELAND, J. E., THORSEN, L. I., FLATMARK, A., HANSSSEN, L. E. Raw soybeans human pancreatic proteinases secretion. **Journal of Nutrition.** v. 122 p.1407-1415, 1992.
- 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.** n. 51, p. 376-382, 1974.
- KENNEDY Ann R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacol. Ther.** V. 78, n. 3, p. 167-209, 1998.
- KONAREV, A. V., ANISIMOVA, I. N., GAVRILOVA, V. A., et al. Serine proteinase inhibitors in the compositae: distribution, polymorphism and properties. **Phytochemistry.** n. 59, p. 279-291, 2002.
- KRISHNAN, H. B. characterization of a soybean [*Glycine max (L.) Merr.*] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science,** v.160, p. 979-986, 2001.
- KROGDAHL, A.; HOLM, H. Soybean proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. **Journal Nutrition.** v. 111, p. 2045-2051, 1981.
- LASKOWSKI, M. e KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.** v. 49, p. 593-626, 1980.
- LEI, MEI-GUEY, BASSETTE, R. e REECK G. R. Effect of cysteine on heat inactivation of soybean trypsin inhibitors. **Journal agric. Food Chem.** v. 29, n. 5, p. 1196-1199, 1981.
- 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.
- MARTY, B. J. e CHAVEZ, E. R. Ileal digestibility and urinary losses of amino acids in pigs fed heat processed soybean products. **Livestock Productions Science.** v. 43, p. 37-48, 1995.

- McNIVEN, M. A. et al. Laboratory procedure to determine protein digestibility of heat-treated feedstuffs for dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**. v., 96 p. 1-13, 2002.
- McNIVEN, M. A.; GRIMMELT, B.; McLEOD, J. A.; VOLDENG, H. Biochemical characterization of a low trypsin inhibitor soybean. **J. Food Sci.** v.6, n.57, p.241, 1994.
- MELOUN, B., KLUH, I., et al. Covalent structure of bovine chymotrypsinogen A. *Biochemistry and Biophysics Acta*, n. 130, p. 543, 1966.
- MONTEIRO, M. R. P. **Avaliação bioquímica e nutricional de farinhas obtidas de variedades de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina “Kunitz” e lipoxigenases.** Viçosa, UFV, 2000. 67p. (Tese D.S.).
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Evaluation of protein quality.** Washington, D. C., 1963. 74p.
- OSMAN, A. M., REID, M. P., and WEBER, W. C. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. **Food Chemistry**. v. 1, p. 1-6, 2002.
- PIRES, C. V. Caracterização bromatológica e digestibilidade *in vitro* de proteínas de cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). Viçosa, UFV, 2002. 67p. (Tese M.S.).
- RACKIS, J. J., GUNBMANN, M. R., LIENER, I. E. The USDA trypsin inhibitor study. **Qual. Plant. Food Human. Nutri.** v. 199, p. 299-347, 1986.
- 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.
- Research Recommended Dietary Allowances. 10th Edition. National Council, National Academy of Science, Washington, D.C., 1989.
- 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 reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal Nutrition**. v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- RITTER, M. A.; MORR, C. V.; THOMAS, R. L. In vitro digestibility of phytate-reduced and phenolics-reduced soy protein isolates. **J. food Sci.** v. 52, n. 2, p. 325-341, 1987.

- ROEBUCK, B. D. Trypsin inhibitors: potential concern for humans? **The Journal Nutrition**. v. 117, p398-400, 1987.
- 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. **The Journal of Nutrition**. v. 127, n. 7, p. 758-764, 1997.
- SCARPI, D. et al. Introduction of new dipeptide isostere 7-endo-BtA as reverse turns inducer in a Bowman-Birk proteinase inhibitor: Synthesis and conformational analysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 1625-1632, 2001.
- SEDIYAMA, T. et al. **Cultura da soja**. Viçosa: UFV, impr. Univ. 96p., 1989.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo. Varela, 517p., 1996.
- SILVEIRA, I. L.; FLÁVIO, E. F.; OLIVEIRA de, S. A. M. **Soja, o alimento e a nutrição**. Viçosa, UFV, 1989.
- SMITH, C. MEGEN, W. V., TWAALFHOVEN, L. e HITCHCOCK, C. The determination of Trypsin Inhibitor Levels in Foodstuffs. **J. Sci. Food Agric**. n. 31, p. 341-350, 1980.
- TAN-WILSON, A. L. Subclassification of soybean Bowman-Birk isoinhibitors. **J. Am. Oil. Chem. Soc**. v. 65, p. 1475-1478, 1988.
- TROMP, T. C.; RAGHAVAN, S. V.; ALIKHANI, Z. Nutritive quality of whole soybeans heat-treated in a continuous flow processor. **Journal Agric**. v. 61, p. 49-56, 1995.
- WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: M. Dekker, 625p, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Quadro 1A - Resumo da análise de variância dos dados de análise da atividade inibitória de tripsina

FV	G.L	QM	
		Atividade tripsina	F
VARIEDADE	3	78968,76	70,627*
RESÍDUO	8	1118,110	F 5% (3,8) = 2,436

C.V = 2,91

F significativo a 5% de probabilidade

Quadro 2A - Resumo da análise de variância dos dados de análise da atividade inibitória de tripsina nas farinhas submetidas ao processamento térmico

FV	G.L	QM	F
VARIEDADE	3	23944,35	130,69
TEMPO	3	11791,04	64,36
V x T	9	4418,600	24,11*
RESÍDUO	32	183,2028	

C.V = 35.53

F significativo a 5% de probabilidade

Quadro 3A - Resumo da análise de variância dos dados de análise da atividade inibitória de tripsina

FV	G.L	QM	
		Atividade quimiotripsina	F
VARIEDADE	3	35306,97	5,47*
RESÍDUO	8	6453,14	F 5%(3,8) = 2,436

C.V = 14.40

F significativo a 5% de probabilidade

Quadro 4A - Resumo da análise de variância dos dados de análise do teor de minerais

FV	G.L	QM				
		Ca	Fe	K	Mg	Mn
Tratamento	3	1083,0930*	0,4072*	116111,22 ^{NS}	70,8542*	0,0483*
Resíduo	6	7,3516	0,0096	3866,502	5,1860	0,0015

* = Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade

NS = Não Significativo

Quadro 5A - Resumo da análise de variância dos dados de análise do consumo alimentar e ganho de peso dos ratos alimentados com dieta à base de farinha integral derivada de diferentes linhagens de soja

FV	G.L	QM	
		Consumo alimentar	Ganho de peso
Tratamento	5	7287,032*	2084,267*
Resíduo	25	172,8173	58,62667

* = Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade

Quadro 6A - Resumo da análise de variância dos dados de análise do NPR e PER dos ratos alimentados com dieta à base de farinha integral derivada de diferentes linhagens de soja

FV	G.L	QM	
		NPR	PER
Tratamento	5	17,18546*	10,85836*
Resíduo	25	0,5062840	0,4864281

* = Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade

Quadro 7A - Resumo da análise de variância dos dados de análise da digestibilidade *in vivo* dos ratos alimentados com dieta à base de farinha integral derivada de diferentes linhagens de soja

FV	G.L	QM
		Digestibilidade <i>in vivo</i>
Tratamento	5	7272,046*
Resíduo	25	11,32695

* = Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade