

FABIANO DE PAULA PEREIRA MACHADO

**EFEITOS DO TRATAMENTO TÉRMICO NA QUALIDADE PROTÉICA DE
FARINHAS DE SOJA CONVENCIONAL E ISENTA DE LECTINA E INIBIDOR
KUNITZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

T

M149e
2005

Machado, Fabiano de Paula Pereira, 1977-

Efeitos do tratamento térmico na qualidade protéica de
farinhas de soja convencional e isenta de lectina e inibidor
Kunitz / Fabiano de Paula Pereira Machado. – Viçosa :
UFV, 2005.

vii, 71f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Humberto de Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 56-68.

1. Farinha de soja - Tratamento térmico. 2. Farinha de
soja - Composição. 3. Alimentos - Teor protéico.
4. Inibidores da tripsina. 5. Lectina. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.024

FABIANO DE PAULA PEREIRA MACHADO

**EFEITOS DO TRATAMENTO TÉRMICO NA QUALIDADE PROTÉICA DE
FARINHAS DE SOJA CONVENCIONAL E ISENTA DE LECTINA E INIBIDOR
KUNITZ**

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

Aprovada: 29 de julho de 2005.

Prof^a. Marli Lourdes de Oliveira

Prof. George H. Kling de Moraes

Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Prof. Everaldo G. de Barros

José Humberto de Queiroz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita misericórdia, bondade, fidelidade e justiça.

A toda minha família, especialmente meus pais, minha irmã e meus avós, por estarem sempre ao meu lado, acreditando nos meus sonhos e, muitas vezes, vivendo exclusivamente para que todos eles se tornassem realidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A meu orientador José Humberto de Queiroz pela atenção e amizade.

A meus conselheiros Maria Goreti Almeida de Oliveira e Maurílio Alves Moreira pelo apoio que me deram.

A Inês José Chamel e Newton Deniz Piovesan e aos professores Everaldo Gonçalves de Barros, Maria do Carmo Gouveia Peluzio Neuza Maria Brunoro Costa e Marli Lourdes de Oliveira pela disponibilidade e esclarecimento de muitas dúvidas.

A todos os meus amigos da graduação e da pós-graduação, assim como àqueles que conheci nos diversos laboratórios onde realizei pelo menos parte das análises, e que, direta ou indiretamente, contribuíram para essa vitória.

Ao Departamento de Nutrição e Saúde da UFV pelo consentimento para a utilização de suas instalações.

BIOGRAFIA

Fabiano de Paula Pereira Machado, filho de Vicente de Paula Martins Machado e de Marlene Pereira Machado, nasceu em Muriaé, Minas Gerais, em 11 de outubro de 1977.

Iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa em março de 1998, concluindo-o em fevereiro de 2003.

Ingressou no curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola em agosto de 2003, defendendo tese em julho de 2005.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Proteínas da soja	2
2.2. Inibidores de proteases	4
2.3. Lectinas	10
2.4. Efeitos antinutricionais de lectinas e inibidores de proteases de soja	13
2.5. Eliminação de lectinas e inibidores de proteases de farinhas de soja	17
2.5.1. Tratamento térmico	17
2.5.2. Melhoramento genético	19
2.5.3. Outras técnicas	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Material genético	21
3.2. Obtenção das farinhas integrais de soja	21
3.3. Caracterização das farinhas integrais de soja	22
3.3.1. Análise eletroforética de KTI e lectina	22
3.3.2. Determinação da composição centesimal	22
3.3.2.1. Quantificação de proteínas	22
3.3.2.2. Quantificação de cinzas	23
3.3.2.3. Quantificação de umidade	23
3.3.2.4. Quantificação de lipídios	24
3.3.2.5. Quantificação de carboidratos	25
3.4. Processamento térmico das farinhas integrais de soja	25
3.5. Quantificação da inibição de tripsina das farinhas de soja	25
3.5.1. Reagentes	25
3.5.2. Medidas da atividade de tripsina na presença e ausência de inibidores	26
3.5.3. Medidas do teor de proteínas nos extratos das farinhas de soja	27
3.6. Avaliação do índice de urease das farinhas de soja	28
3.7. Avaliação da solubilidade protéica das farinhas de soja em solução de KOH 0,2%	28

3.8. Avaliação da atividade hemaglutinante de lectinas das farinhas de soja	29
3.9. Avaliação nutricional das farinhas de soja	30
3.10. Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Caracterização das farinhas integrais de soja	37
4.1.1. Verificação das linhagens de soja	37
4.1.2. Composição centesimal das farinhas de soja <i>in natura</i>	37
4.2. Efeito do tratamento térmico no índice de urease das farinhas de soja	38
4.3. Efeito do tratamento térmico na atividade antitriptica das farinhas de soja	40
4.4. Efeito do tratamento térmico na solubilidade protéica das farinhas de soja em solução de KOH 0,2%	42
4.5. Efeito do tratamento térmico na atividade hemaglutinante de lectinas das farinhas de soja	44
4.6. Efeito do tratamento térmico no valor nutricional das farinhas de soja	46
4.6.1. Efeito do tratamento térmico nos valores de ganho de peso	46
4.6.2. Efeito do tratamento térmico nos valores de quociente de eficiência protéica (PER) e quociente de eficiência protéica líquida (NPR)	48
4.6.3. Efeito do tratamento térmico nos valores de digestibilidade verdadeira <i>in vivo</i> e de índice de utilização protéica líquida (NPU)	50
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7. APÊNDICE	69

RESUMO

MACHADO, Fabiano de Paula Pereira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2005. **Efeitos do tratamento térmico na qualidade protéica de farinhas de soja convencional e isenta de lectina e inibidor Kunitz.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Conselheiros: Maria Goreti Almeida de Oliveira e Maurílio Alves Moreira.

Nesse trabalho foi avaliado o efeito do tratamento térmico em autoclave na qualidade protéica de farinhas integrais de soja, obtidas de uma linhagem contendo KTI e lectina (KTI+Lec+) e de uma isolinha isenta desses antinutrientes (KTI-Lec-). Para isso, foram avaliadas as composições centesimais dessas farinhas *in natura* assim como a inibição de tripsina, a atividade hemaglutinante, o índice de urease e a solubilidade protéica nas farinhas *in natura* e processadas termicamente. Realizou-se também um ensaio com ratos Wistar para a avaliação do ganho de peso, da digestibilidade verdadeira *in vivo*, do quociente de eficiência protéica (PER), do quociente de eficiência líquida protéica (NPR) e da utilização líquida protéica (NPU). O tratamento térmico foi efetivo na inativação de urease, lectina e inibidores de tripsina, sendo que 15 minutos de tratamento térmico foram suficientes para reduzir em mais de 90% o efeito desses compostos. Simultaneamente, as farinhas obtidas nesse tempo de processamento apresentaram um adequado valor de solubilidade protéica. Os resultados obtidos de PER, NPR e ganho de peso mostraram que o tratamento térmico melhorou igualmente a qualidade nutricional das duas farinhas, embora a farinha da isolinha KTI-Lec- tenha necessitado de um maior tempo de processamento térmico. Por outro lado, não foi observado um aumento significativo nos valores de NPU e de digestibilidade verdadeira *in vivo* para dietas contendo farinhas da linhagem de soja KTI-Lec-, embora os valores tenham sido estatisticamente iguais aos das dietas contendo farinha da linhagem de soja KTI+Lec+.

ABSTRACT

MACHADO, Fabiano de Paula Pereira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2005. **Effects of heat treatment in the protein quality of convencional and lacking lectin and Kunitz inhibitor soybean flours.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Committee members: Maria Goreti Almeida de Oliveira and Maurílio Alves Moreira.

The effects of autoclaving in the protein quality of full-fat soybean flours prepared from a line having KTI and lectin (KTI+Lec+) and a isolate lacking these antinutritional factors (KTI-Lec-) were studied. Thus, it were measured the partial chemical composition of these raw soybean flours and the trypsin inhibition, hemagglutination activity, urease index and protein solubility of the raw and heated soybean flours. A biological assay was conducted with Wistar rats in order to determine some nutritional parameters like weight gain, *in vivo* true digestibility, protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR) and net protein utilization (NPU). The heat treatment was enough efficient in the urease, lectin and trypsin inhibitors inactivation, being 15 minutes sufficient to reduce more than 90% of these compounds. Simultaneously, the flours processed at that time had suitable protein solubility values. The results of PER, NPR and weight gain showed that the heat treatment equally improved the nutritional quality of both soybean flours, although that from the isolate (KTI-Lec-) required a longer autoclaving time. For the other side, was not achieved a significant rise on the NPU and *in vivo* true digestibility values to diets containing flours obtained from the soybean isolate. However these results were significantly the same to that obtained with diets containing soybean line KTI+Lec+.

1. INTRODUÇÃO

A soja tem sido amplamente utilizada como fonte de óleo comestível e proteína para alimentação humana e animal. Além de seu elevado valor nutricional, benefícios relacionados à saúde humana contribuem para o aumento de seu consumo. Entretanto, o potencial nutricional da soja é limitado pela presença de fatores antinutricionais que diminuem o desempenho de animais e podem provocar alterações metabólicas também em humanos. Lectina e inibidores de proteases são os principais responsáveis pelos efeitos fisiológicos observados pelo consumo de soja.

Há diversos métodos para inativar esses antinutrientes, sendo que o tratamento térmico é o que apresenta os melhores resultados práticos. Além disso, a eliminação de fatores antinutricionais por meio de programas de melhoramento genético, apresenta-se como uma alternativa eficaz para a obtenção de linhagens de soja com maior valor nutricional ou que necessite de um menor tempo de tratamento térmico.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar os efeitos da eliminação genética de lectina e inibidor Kunitz assim como o efeito do tratamento térmico na qualidade protéica de farinhas integrais de soja. Para isso, foram utilizadas linhagem de soja contendo KTI e lectina (KTI+Lec+) e isolinha sem KTI e lectina (KTI-Lec-) desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas da soja

As proteínas da soja constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidades de carga e estruturas diferentes, podendo ser agrupadas em quatro frações com velocidades de sedimentação equivalentes a 2, 7, 11 e 15S. As quantidades relativas e as faixas de pesos moleculares representadas por estas frações são apresentadas na Tabela 1 (SGARBIERI, 1996).

Tabela 1 – Quantidades relativas, componentes e pesos moleculares de frações protéicas obtidas de soja por ultracentrifugação.

Fração protéica	Porcentagem do total	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
		Lipoxigenase	108 000
		Globulina 7S	180 000
11S	31	Globulina 11S	210 000
			350 000
15S	11	-----	600 000

A maior parte das proteínas de sementes de soja é composta por proteínas de reserva localizadas nos corpúsculos protéicos. A β -conglucina (globulina 7S) e a glicina (globulina 11S) são as principais proteínas de reserva das sementes de soja e correspondem aproximadamente a 70% do total de proteínas (SGARBIERI, 1996).

A β -conglucina é constituída por seis glicoproteínas distintas, designadas B₁ a B₆, compostas por diferentes proporções de resíduos de manose e glicosamina e de subunidades β , β' e β'' . Os polipeptídeos B₂ e B₄ são constituídos por combinações das estruturas β e β' , enquanto B₁, B₃, B₅ e B₆ são compostos pelas subunidades β / β' , β / β'' , β' e β'' , respectivamente (THANH e SHIBASAKI, 1976).

A glicina é composta por seis subunidades polipeptídicas ácidas (A₁, A₂, A₃, A₄, F2(1) e F2(2)) e quatro básicas (B₁, B₂, B₃ e B₄). A composição aminoacídica desses polipeptídeos revela que os de natureza ácida possuem proporcionalmente mais Glx que Asx, enquanto os polipeptídeos básicos são mais ricos em leucina, valina e alanina. Além disso, as subunidades A₁, A₂, B₁ e B₂ apresentam maior número de resíduos de metionina em relação aos demais polipeptídeos ácidos e básicos, respectivamente (MOREIRA et al., 1979).

As proteínas da soja constituem a principal fonte protéica de origem vegetal destinada à produção de rações, principalmente para aves e suínos, cujo consumo tem aumentado nos últimos anos. Para isso, contribuem não apenas seu elevado teor protéico, geralmente acima de 40%, e de óleo, aproximadamente 20%, como também seu custo relativamente baixo e uma satisfatória conversão alimentar quando utilizada em rações (ARNDT et al., 1999; EYES, 2002).

Constata-se também o aumento do consumo de soja na alimentação humana devido a sua qualidade nutricional. A utilização da soja em diversos alimentos permite o aumento significativo do valor nutritivo desses produtos tanto na quantidade de proteínas como na qualidade em termos de aminoácidos essenciais. A utilização de soja possibilita a elaboração de misturas de proteínas vegetais com valor nutricional comparável ao de proteínas de origem animal (SRIHARA e ALEXANDER, 1984; DHINGRA e JOOD, 2001; IWE et al. 2001; OBATOLU, 2002).

Mesmo se tratando de uma fonte protéica com valor nutricional limitado pelo seu baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, EMMERT e BAKER (1995) mostraram que a suplementação de concentrados ou isolados protéicos de soja com metionina promoveu aumento significativo de sua qualidade protéica. Somado a isso, diversos

benefícios relacionados à saúde humana devido ao consumo de soja e derivados, principalmente na população oriental, contribuem para uma maior aceitação de proteínas de soja (ALBERTAZZI, 2002; CHIECHI et al., 2002; MWATSAMA, 2003). Conseqüentemente, a população está mais consciente a respeito dos benefícios da soja, o que influencia no aumento de seu consumo (BUS e WORSLEY, 2003). Além disso, proteínas da soja apresentam algumas propriedades funcionais como dispersibilidade em água, absorção de água ou de gordura, emulsificação, formação de espuma e viscosidade, indicando um potencial para sua aplicação na elaboração de diversos produtos para o consumo humano (TRAINA e BREENE, 1994).

No entanto, a soja contém outros componentes protéicos e não protéicos que limitam seu valor nutricional. Alguns, como inibidores de proteases, lectinas, goitrogênios e antivitaminas podem ser eliminados com a aplicação de calor. Por outro lado, saponinas, taninos, estrógenos, fatores de flatulência, alergenos e fitatos são estáveis ao calor. Esses compostos causam efeitos fisiológicos adversos ou diminuem a biodisponibilidade de nutrientes, provocando deficiência no crescimento em humanos e animais (LIENER, 1994). Entre os compostos citados, lectinas e inibidores de proteases tipo Kunitz e Bowman-Birk são os principais responsáveis pelo baixo crescimento de animais alimentados com soja crua ou insuficientemente processada (DOUGLAS et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2001; PALACIOS et al., 2002).

2.2. Inibidores de proteases

Inibidores enzimáticos são encontrados em animais, microrganismos e plantas. Atuam inibindo proteases, amilases, lipases, glicosidases e fosfatases, sendo mais conhecidos os que inibem proteases (LAJOLO e GENOVESE, 2002).

Levando-se em consideração o aspecto nutricional, os inibidores de proteases presentes em leguminosas são os mais estudados, principalmente aqueles que inibem as serino proteases tripsina e quimotripsina (LIENER et al., 1988; FRIEDMAN et al., 1991). Os inibidores de tripsina correspondem aproximadamente a 6% do total de proteínas de sementes de soja (FRIEDMAN e BRANDON, 2001).

Os inibidores de proteases encontrados em sementes de soja são divididos em duas classes principais: inibidores tipo Kunitz (KTI) e tipo Bowman-Birk (BBI)

(LIENER, 1994). O primeiro é o principal responsável pela atividade antitriptica observada em sementes de soja e, portanto, o mais estudado (FRIEDMAN et al., 1991). Apesar de inibidores tipo Kunitz estarem presentes em sementes de soja em quantidade duas a três vezes superior aos inibidores Bowman-Birk, eles se equivalem em concentração molar (TAN-WILSON, 1988).

O inibidor tipo Kunitz de soja apresenta peso molecular de aproximadamente 20 KDa, sendo composto por motivos estruturais de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, estruturalmente organizados como quatro cadeias consecutivas conectadas por *loop* (L-₁-L-₂-L-₃-L-₄). Seis dessas cadeias formam um pequeno barril antiparalelo com um de seus lados fechado pelas outras seis cadeias (Figura 1). Também fazem parte de sua estrutura uma hélice 3₁₀ e duas ligações dissulfeto (Cys 39-86 e Cys 136-145). O sítio reativo está localizado em um *loop* que é estabilizado pela formação de ligações de hidrogênio entre alguns de seus resíduos e o resíduo Asn13 (SONG e SUH, 1998).

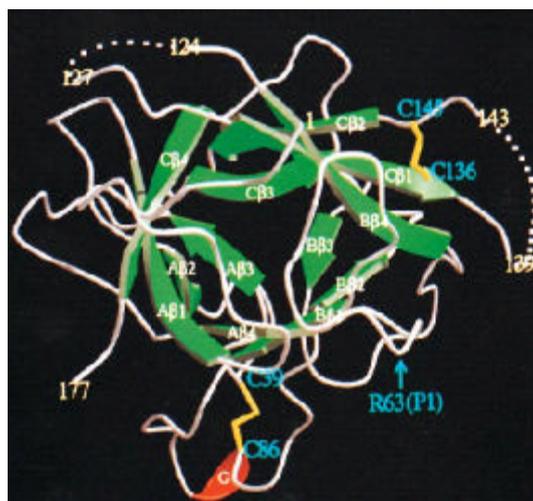


Figura 1 – Estrutura do inibidor Kunitz. Estão indicados as cadeias (verde), *loop* (branco), as pontes dissulfeto (amarelo), a hélice 3₁₀ (vermelho) e o *loop* do sítio reativo (seta azul) (SONG e SUH, 1998).

Esse inibidor apresenta três isoformas denominadas Ti^a, Ti^b e Ti^c, compostas por 181 resíduos de aminoácidos e possuindo o sítio de ligação à enzima na mesma posição Arg(63)-Ile(64). Comparando-se as seqüências de aminoácidos dessas isoformas, Ti^a difere de Ti^c apenas pela troca de glicina por ácido glutâmico na

posição 55, enquanto Ti^a e Ti^b apresentam mudanças de resíduos aminoacídicos em outras oito posições sendo que a glicina na posição 55 é mantida (KIM et al., 1985).

Os valores de constante de inibição de Ti^a e Ti^c são $1,5 \times 10^{-10}$ M e 2×10^{-10} M, respectivamente, enquanto para Ti^b este valor é de $1,0 \times 10^{-8}$ M. Portanto, Ti^b apresenta menor adaptação ao centro reativo da enzima, o que pode ser atribuída à troca dos resíduos aminoacídicos das posições 62 e 71 que estão entre os resíduos envolvidos na interação do inibidor com a enzima (KIM et al., 1985).

ORF e HYMOWITZ (1978) observaram grande variação na distribuição das isoformas Ti^a , Ti^b e Ti^c entre diferentes coleções de germoplasma, sendo Ti^a a forma predominantemente encontrada. Essas isoformas são codificadas por um sistema multialélico co-dominante em locus único. O fenótipo de ausência de inibidor Kunitz é herdado como um alelo recessivo a essas isoformas.

Além de Ti^a , Ti^b e Ti^c , WANG et al. (1996) relataram outras duas variantes denominadas Ti^{as} e Ti^{bf} . A primeira apresentou mobilidade eletroforética mais lenta que Ti^a e a última mais rápida que Ti^b . Os autores constataram que essas variantes eletroforéticas apresentaram distribuição bastante diferente entre as diversas variedades analisadas.

O mecanismo que explica a inibição de proteases é análogo ao que descreve sua ação hidrolítica. Porém, comparando-se substrato e inibidor, a adaptação desse último ao centro ativo da enzima é muito maior, promovendo grande aumento da energia de ativação necessária para ocorrer a hidrólise do inibidor. Logo, a formação do complexo não covalente inibidor-enzima é termodinamicamente muito mais estável, resultando no acúmulo desse complexo devido a sua baixa taxa de dissociação (JENSEN et al., 1996).

O inibidor Kunitz combina-se estequiometricamente, na proporção 1:1, com tripsina e, em menor afinidade, com quimotripsina no mesmo sítio reativo (BIDLINGMEYER et al., 1972; SONG e SUH, 1998). Durante a interação entre o inibidor e a enzima, apenas doze resíduos de aminoácidos do inibidor promovem a formação do complexo. Entretanto, os cinco resíduos presentes no *loop* do sítio reativo, Pro61 (P3), Tyr62 (P2), Arg63 (P1), Ile64 (P1') e Arg65 (P2'), são os responsáveis pela maioria destas interações. Entre esses, o resíduo Arg63 é o responsável pela maior parte das ligações de hidrogênio formadas com a tripsina (SONG e SUH, 1998).

O inibidor Kunitz é codificado por uma família multigênica constituída por, no mínimo, dez genes, dos quais ao menos seis estão ativos em embriões de sementes de soja e organizados em pares de repetições. Três genes (KTI1, KTI2 e KTI3) foram caracterizados e não apresentaram íntrons. A proteína expressa por KTI3 é idêntica à principal forma do inibidor Kunitz (Ti^a) que é responsável pela maior parte da atividade antitriptica encontrada em sementes de soja. Os genes KTI1 e KTI2 compartilham 97% de similaridade em sua região codificadora, enquanto a similaridade entre KTI3 e esses dois genes é de 80%. Esses três genes codificam mRNAs de 0,9kb (JOFUKU e GOLDBERG, 1989).

Analisando-se a base molecular da mutação que impede o acúmulo de inibidor Kunitz durante o desenvolvimento da semente, JOFUKU et al. (1989) constataram na linhagem mutante que duas deleções e uma transversão G T, na região de codificação do gene KTI3, resultaram na criação de quatro códons de parada no mRNA transcrito. Com isso, a tradução deste mRNA é interrompida com a produção de proteína truncada. Apesar da transcrição desse gene não ser afetada na linhagem mutante, essa mutação implica na síntese de mRNA instável que é encontrado em nível bastante reduzido. Dessa maneira, a redução da quantidade de inibidor Kunitz em sementes de soja é consequência tanto da síntese da proteína truncada como do baixo nível de mRNA transcrito.

Os genes KTI1, KTI2 e KTI3 são regulados durante a embriogênese, alcançando sua expressão máxima no estágio médio de maturação do embrião. Contudo, o gene KTI3 é expresso a um nível superior em relação aos outros dois genes devido, principalmente, a uma maior taxa de transcrição do gene KTI3. Apesar da similaridade genética, os genes KTI1 e KTI2 são diferentemente expressos. Os genes KTI1 e KTI2 também são expressos em outras partes da planta como folha, raiz e talo, enquanto KTI3 é expresso somente na folha. No entanto, essa expressão é reduzida devido, em parte, a um menor nível transcricional (JOFUKU e GOLDBERG, 1989).

A classe de inibidores Bowman-Birk contém pelo menos 8 isoformas já identificadas em sementes de soja. Elas são subdivididas em 3 grupos, apresentando de 65 a 80 resíduos de aminoácidos, com peso molecular variando de 7 a 9 KDa. Dentro de cada subgrupo, as diferentes isoformas parecem estar relacionadas por proteólise limitada. A multiplicidade desses inibidores pode ser justificada também

pela presença de vários genes que codificam diferentes isoformas. Nesse sentido, a soja parece conter pelo menos 3 loci gênicos, cada um codificando um isoformador de subgrupo diferente (TAN-WILSON et al., 1987).

STAHLHUT e HYMOWITZ (1983) encontraram três variantes eletroforéticas de inibidores Bowman-Birk em sementes de diferentes cultivares de soja e constataram grande variação na distribuição de duas dessas isoformas.

A forma clássica do inibidor tipo Bowman-Birk possui aproximadamente 8 kDa, 72 resíduos de aminoácidos e 7 ligações dissulfeto (TAN-WILSON et al., 1987). Apresenta sítio ativo para inibição de tripsina localizado na ligação peptídica Lys(16)-Ser(17) e para inibição de quimotripsina na ligação Leu(43)-Ser(44) (JENSEN et al., 1996).

O inibidor tipo Bowman-Birk contém dois *loops* de nove resíduos de aminoácidos, incluindo duas cisteínas, localizados em lados opostos da molécula, permitindo ao inibidor atuar independente e simultaneamente em duas proteases distintas, geralmente tripsina e quimotripsina (Figura 2). Uma seqüência típica do *loop* consiste de Cys-Thr-X-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Cys, em que o resíduo X varia com a protease à qual o inibidor é específico (WERNER e WERNER, 1992, citados por SCARPI et al., 2001).

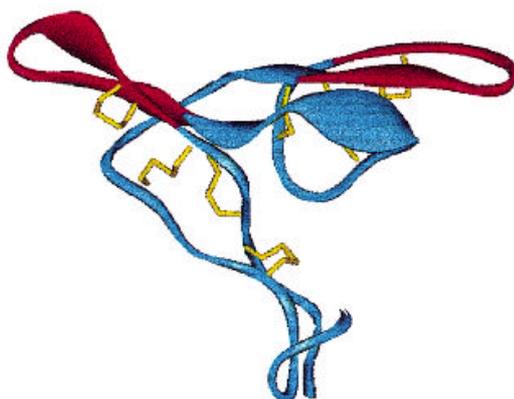


Figura 2 – Estrutura do inibidor Bowman-Birk. Estão mostradas as pontes dissulfeto (amarelo) e os dois *loops* (vermelho) para inibição de duas proteases distintas.

O *loop* dos sítios reativos compreendem os resíduos das posições de P3 a P6', de acordo com a nomenclatura de SCHECHTER E SCHOENBERGER (1989) citados

por McBRIDE et al. (1998), sendo que alguns são bem conservados quando se comparam diferentes seqüências de loops do sítio reativo de Bowman-Birk.

O resíduo de treonina da posição P2 do *loop* é altamente conservado em inibidores Bowman-Birk de diferentes fontes o que se deve a sua importante contribuição para a estabilidade do sítio reativo e do mecanismo inibitório. Em estudo realizado por McBRIDE (1998), constatou-se que uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo os grupamentos -hidroxil e -metil desse resíduo exercem importante contribuição para os baixos valores da taxa hidrólise e da constante de inibição (K_i) do inibidor. Observou-se também que resíduos menores são preferenciais na posição P2, pois aqueles contendo cadeias laterais alifáticas ou aromáticas grandes resultaram em inibidor com reduzida atividade inibitória. Valores ainda mais altos de K_i foram obtidos quando se utilizou glutamato ou aspartato, o que foi atribuído a interações eletrostáticas desfavoráveis entre as cadeias laterais destes aminoácidos com o resíduo Asp102 da tríade catalítica da tripsina.

A presença de resíduos de prolina com configuração cis-trans em P3'-P4' contribui para a conformação necessária para a atividade antitriptica do inibidor. Embora a ligação peptídica cis, altamente conservada em P3', seja essencial para esta atividade, o resíduo de prolina em P4' apenas estabiliza a configuração cis em P3', eliminando conformações alternativas que possam diminuir a inibição (BRAUER et al., 2002). Por outro lado, o resíduo de serina altamente conservado na posição P1' não é essencial para a integridade do *loop* do sítio reativo e apresenta pouca contribuição para a afinidade do inibidor pela tripsina. BRAUER e LEATHERBARROW (2003) sugeriram que, para uma melhor compreensão da participação do resíduo em P1', na inibição de serino proteases, estudos devem ser realizados na tentativa de se verificar possíveis interações ou competições entre as cadeias laterais dos resíduos em P1', P2 e P5'.

Além dos inibidores tipos Kunitz e Bowman-Birk, que compõem as duas principais classes de inibidores de proteases em sementes de soja, outros inibidores foram identificados. TAN-WILSON et al. (1987) relataram uma outra classe denominada inibidores de tripsina ricos em glicina que inibem fortemente tripsina bovina. A principal característica que diferencia essa classe de inibidores das outras já descritas é seu elevado teor de glicina. Esses inibidores apresentam mais de 200 resíduos de aminoácidos dos quais apenas dois são cisteínas, diferindo-se estruturalmente dos

inibidores tipo Bowman-Birk. Além disso, a composição de aminoácidos, mobilidade eletroforética ou pontos isoelétricos dos inibidores dessa nova classe são diferentes dos inibidores tipo Kunitz.

HWANG et al. (1977), avaliando a presença de inibidores de baixo peso molecular em sementes de soja, observaram a presença de inibidores com capacidade de inibir tripsina mas não quimotripsina e que, aparentemente, não estão relacionados a inibidores tipo Bowman-Birk.

A quantidade de inibidores de proteases em sementes de soja depende de alguns fatores como variedade, tempo e condições da colheita, duração e condições da estocagem e interação genótipo x local de cultivo (BURNS, 1987; KUMAR et al., 2003).

Além desses fatores, CARVALHO et al. (1999) avaliaram o efeito da eliminação genética de lipoxigenases (LOX) de diferentes cultivares de soja nos níveis dos inibidores Kunitz e Bowman-Birk e constataram redução de 34 a 72% na atividade antitriptica e de 32 a 54% na atividade anti-quimotriptica em sementes de soja. Embora não esteja devidamente esclarecido, a presença de pelo menos uma das três isoenzimas lipoxigenases (LOX1, LOX2, LOX3) parece promover a biosíntese de jasmonato que, conhecidamente, ativa os genes de inibidores de protease.

Diversas funções biológicas são atribuídas a inibidores de proteases em plantas como, por exemplo, constituição de parte das proteínas de reserva, regulação de proteases endógenas e defesa contra ataque de insetos e microrganismos (RICHARDSON, 1977). No entanto, a ausência simultânea de inibidor Kunitz e de lectina em sementes de soja não prejudicou o desenvolvimento, a germinação ou o crescimento das plantas (PRISCHMANN e HYMOWITZ, 1988).

2.3. Lectinas

Lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos, por meio de ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (KOCOUREK e HOREJSI, 1983, citados por KORDÁS et al., 2000; AOYAMA et al., 2001). Por esse motivo, são capazes de promover aglutinação de células, inclusive

de hemáceas de animais, sendo, portanto, conhecidas também como hemaglutininas ou aglutininas (LIS et al., 1970). Estão amplamente distribuídas nos reinos animal e vegetal, atuando como moléculas de reconhecimento intra e intercelular ou entre organismos (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991; ARASON, 1996).

Lectinas de plantas, principalmente de leguminosas, são as mais estudadas, sendo-lhes atribuídas diversas funções biológicas fundamentais por estarem presentes em diversos tecidos e órgãos da planta. Entre essas funções podem ser citadas ativação de enzimas em sementes de soja (AOYAMA et al., 2001), constituição de parte das proteínas de reserva de sementes (VODKIN et al., 1983; CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991), proteção contra predadores e patógenos (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004) e reconhecimento celular para a formação simbiótica *Rhizobium*-leguminosa (HIRSCH, 1999).

A lectina de soja é uma glicoproteína de 120 KDa e possui 4,5% de manose e 1% de glicosamina. É constituída por duas subunidades diferentes (I e II) de 28 kDa que contêm uma cadeia de carboidrato de 2kDa e se associam para a formação do tetrâmero (I₂II₂) (LIS et al., 1966; LOTAN et al., 1974, 1975). A composição aminoacídica dessas subunidades possui grande similaridade, diferindo apenas em um resíduo de lisina excedente na subunidade I e em dois resíduos de Asx e um de Glx na outra subunidade (LOTAN et al., 1975). Essa proteína contém poucos resíduos de metionina, é isenta de cisteína e apresenta elevado número de aminoácidos contendo hidroxila e de natureza ácida (LOTAN et al., 1974). Em comparação a inibidores Kunitz e Bowman-Birk, a maior susceptibilidade de lectina de soja à inativação pelo calor constatada por QIN et al. (1996) deve-se principalmente à ausência de ligações dissulfeto em sua estrutura por não apresentar resíduos de cisteína (LOTAN et al., 1974).

Ao contrário de lectinas de diferentes fontes que geralmente apresentam o mesmo número de subunidades e de sítios de ligação a resíduos de carboidratos, a lectina da semente de soja possui apenas dois desses sítios (LOTAN et al., 1974). Os resíduos de carboidratos presentes nesses sítios de ligação constituem uma unidade polissacarídica única, ligada à proteína por meio de ligação covalente N-glicosídica entre resíduos de asparagina e N-acetil-D-glicosamina (LIS et al., 1966).

Lectina de soja apresenta especificidade a superfícies celulares nas quais os sítios receptores contêm resíduos de N-acetil-D-galactosamina ou dissacarídeos contendo N-acetil-D-galactosamina na extremidade não redutora. Porém, essa afinidade é bem menor para D-galactose e seus derivados. Por outro lado, lectina de soja não apresenta afinidade por outros sacarídeos como N-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-glicose, D- e L-fucose e metil - e -D-glicosidases (LIS et al., 1970).

Alguns resíduos de aminoácidos estão direta ou indiretamente envolvidos na ligação da lectina ao resíduo de carboidrato. Nesse sentido, ao menos um resíduo de triptofano, ao contrário de tirosina e histidina, participa na ligação dessa proteína a resíduos de carboidrato. Embora as cadeias laterais de resíduos de lisina, arginina, glutamato e aspartato não estejam presentes no sítio ativo, esses grupamentos carregados são importantes para estabilizar a conformação ativa da lectina (DESAI et al., 1988).

A atividade aglutinante da lectina de soja mostra ser dependente também da presença de certos íons metálicos. Essa proteína contém em sua estrutura quatro sítios para ligação de metais de transição, sendo que dois apresentam baixa afinidade por Mn^{2+} , mas somente um dos sítios de alta afinidade deve ser ocupado para a proteína desempenhar sua atividade biológica (JAFFE et al., 1977).

O genoma da soja possui dois genes (L1 e L2) relacionados à lectina. No entanto, o gene L2 não possui função conhecida, enquanto o gene L1 codifica a lectina presente em sementes de soja (GOLDBERG et al., 1983).

Comparando-se a linhagem convencional que acumula níveis normais de lectina com a linhagem mutante que apresenta nível não detectável dessa proteína, ambas apresentam o gene codificador de lectina. No entanto, na linhagem mutante esse gene é interrompido pela inserção de um segmento de DNA de 3,4 kb dentro da região codificadora. A presença desse elemento, que possui características estruturais análogas a transposons procarióticos e eucarióticos, promove uma falha no processo de transcrição e resulta no bloqueio da síntese ou processamento do mRNA, impedindo a expressão do gene codificador de lectina (GOLDBERG et al., 1983). O gene que expressa lectina não contém íntrons e sua transcrição resulta na formação de mRNA de 1 kb para a síntese de lectina em sementes de soja (VODKIN et al., 1983).

Com exceção de três mudanças de base, as regiões codificadoras para lectina das linhagens convencional e mutante são idênticas. Além disso, apresentam promotor com a mesma seqüência consenso (TATAAATA) (VODKIN et al., 1983).

A produção de lectina é praticamente restrita à fase embrionária, período no qual a expressão de seu gene está sob regulação, sendo maximizada durante o estágio médio de maturação do embrião quando, simultaneamente, as proteínas de semente atingem seu maior nível de expressão (GOLDBERG et al., 1983).

2.4. Efeitos antinutricionais de lectinas e inibidores de proteases de soja

As principais conseqüências verificadas em animais alimentados com soja crua ou subprocessada são ganho de peso insatisfatório devido à baixa digestibilidade protéica e alterações no metabolismo de diversos órgãos, principalmente pâncreas e intestino (PERILLA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2001).

Para explicar o mecanismo pelo qual inibidores de tripsina exercem seus efeitos no pâncreas, GREEN e LYMAN (1972) citados por LIENER (1994) postularam que a secreção pancreática em ratos é controlada por um mecanismo de feedback negativo que estabelece uma relação inversa entre a secreção enzimática e o nível de tripsina presente no intestino delgado. Portanto, quando o nível de tripsina no intestino é reduzido o pâncreas responde de maneira a produzir mais enzima. O hormônio colecistocinina é o mediador entre o nível de tripsina no intestino e a secreção pancreática (LIENER, 1995).

Na tentativa de se entender a relação entre a secreção pancreática e o hormônio colecistocinina, IWAI et al. (1988) citados por LIENER (1994) identificaram um peptídeo, contendo 61 resíduos aminoacídicos no suco pancreático de ratos. Somente quando o inibidor se complexa com a tripsina, esse peptídeo, que é sensível a esta enzima, fica livre e promove a liberação de colecistocinina que, por sua vez, estimula a secreção enzimática pelo pâncreas. Dessa forma, o inibidor de tripsina estimula o crescimento do pâncreas, atribuído à hipertrofia (aumento no tamanho das células acinares pancreáticas) e à hiperplasia (aumento do número de células acinares pancreáticas).

Associada a esta hipertrofia está o aumento na secreção de enzimas digestivas, incluindo tripsina, quimotripsina e elastase. Devido ao fato de enzimas pancreáticas

como tripsina e quimotripsina serem ricas em aminoácidos sulfurados, o efeito hiperativo do pâncreas é desviar esses aminoácidos da síntese de proteínas dos tecidos para a síntese de novas enzimas que são excretadas quando complexadas com inibidor. Sendo assim, ocorre a perda de peso, já que aminoácidos sulfurados são limitantes em proteínas de soja (LIENER, 1995).

Entretanto, a hipertrofia do pâncreas provocada por ingestão de farinha de soja crua e outros produtos de soja não foi observada em macacos, cobaias ou leitões, embora os dois últimos apresentaram baixo ganho de peso quando alimentados com farinha de soja crua (STRUTHERS et al., 1983; HASDAI et al., 1989). Portanto, diferentes espécies podem responder de modo diferente a dietas contendo soja crua e a extrapolação do mecanismo que explica a hipertrofia e a perda de peso em ratos para outras espécies deve ser vista com cuidado. Possivelmente, em algumas espécies o hormônio colecistocinina e inibidores de tripsina podem não ser os principais fatores envolvidos na hipertrofia pancreática (STRUTHERS et al., 1983).

Embora a maioria dos estudos em que se avaliam os efeitos antinutricionais provocados pela ingestão de inibidores de proteases são provenientes de experimentos utilizando-se animais, LIENER et al. (1988) mostraram que, em humanos, o inibidor Bowman-Birk promoveu um aumento na secreção pancreática de tripsina, quimotripsina, elastase e amilase. Esses resultados sugeriram a existência de um controle feedback negativo da secreção pancreática também em humanos.

Inibidores de tripsina também têm sido avaliados em relação a seu potencial carcinogênico. MYERS et al. (1991) constataram o efeito de inibidor de tripsina em potencializar o efeito de azaserina no desenvolvimento de lesões preneoplásticas. Vários trabalhos mostraram o desenvolvimento de nódulos neoplásticos e hiperplásticos, assim como o de carcinomas, no pâncreas de ratos alimentados com farinha de soja crua ou concentrado de inibidor de tripsina (LIENER, 1995). No entanto, diferentes animais apresentam respostas variadas em relação ao desenvolvimento de hipertrofia, hiperplasia e nódulos pancreáticos (BURNS, 1987).

KENNEDY (1998) relata que a propriedade anticarcinogênica do inibidor Bowman-Birk, purificado ou concentrado em extrato de soja, vem sendo muito estudada em diversos sistemas modelo *in vivo*.

Os efeitos biológicos de lectinas envolvem basicamente sua ligação a receptores, contendo resíduos específicos de carboidratos, localizados na superfície do epitélio

intestinal ou de células acinares pancreáticas (HAJÓS e GELENCSÉR, 1995; GRANT et al., 1997). Uma vez ligadas ao trato digestivo, lectinas podem promover alterações na morfologia celular e no metabolismo do estômago, assim como do intestino delgado, induzindo mudanças nas funções digestivas, absorptivas, secretórias ou protetoras do sistema digestivo. Além disso, podem inibir a ação de várias enzimas intestinais e da membrana em bordadura em escova (KORDÁS et al., 2000; VASCONCELOS, 2004).

BUTTLE et al. (2001) observaram em salmão atlântico (*Salmo salar*) alimentado com ração suplementada com 3,5% de lectina de soja a ruptura das vilosidades (DV) com liberação do conteúdo da mucosa (SM) para o lúmen intestinal (GL). (Figuras 3a e 3b). Em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada com ração suplementada com 60% de soja observaram-se vacúolos absorptivos (AV) com tamanho irregular em torno da camada de enterócitos e ruptura da membrana em bordadura em escova (BB), inclusive na extremidade das vilosidades (VT), com liberação do conteúdo (SM) para o lúmen intestinal (GL) (Figuras 3e e 3f).

Dessa forma, a ruptura das microvilosidades intestinais combinada com os efeitos inibitórios de enzimas digestivas permitem as lectinas atuarem, de forma direta ou indireta, não somente na utilização de proteínas e carboidratos como também nos estágios inicial e final da digestão e do transporte de proteínas e carboidratos (VASCONCELOS, 2004).

Somado aos efeitos observados no intestino, ensaios com ratos confirmaram a liberação de colecistocinina dependente da dose de lectina utilizada e estímulo na secreção de enzimas sintetizadas pelo pâncreas (JORDINSON et al., 1997). Portanto, lectinas podem estar também envolvidas na hipertrofia pancreática.

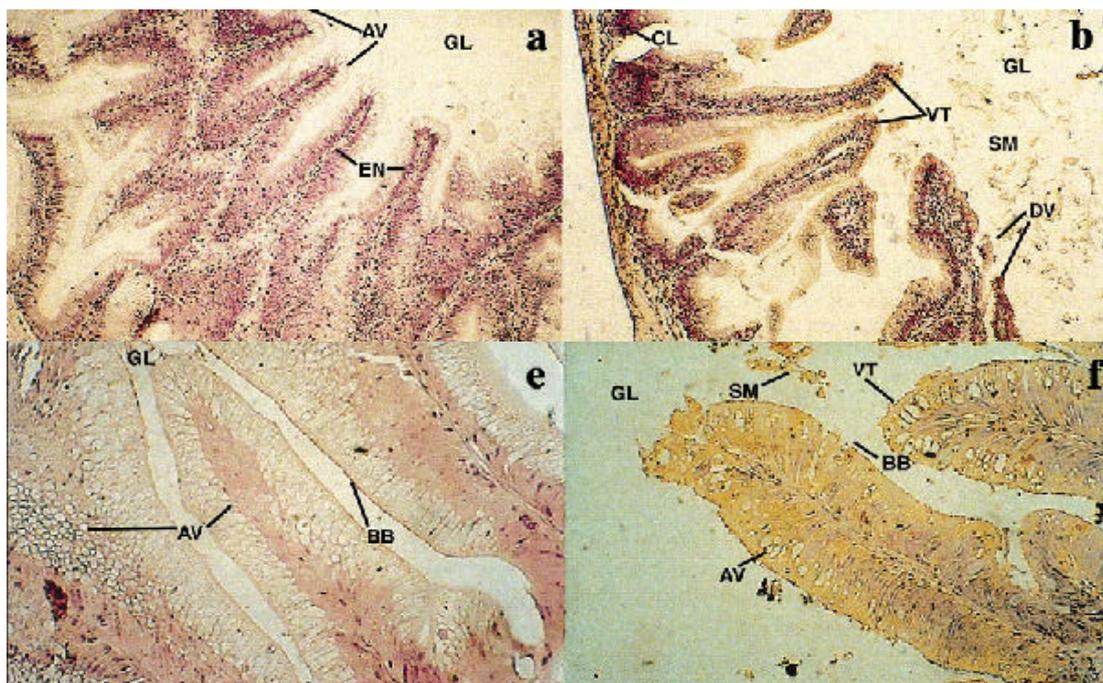


Figura 3 (a) Aparência histológica normal de seção do intestino distal de salmão atlântico alimentado com dieta controle. (b) Aparência histológica de seção do intestino distal de salmão atlântico alimentado com dieta contendo 3,5% de lectinas de soja. (c) Aparência histológica normal de seção do intestino distal de truta de arco íris alimentada com dieta controle. (d) Aparência histológica de seção do intestino distal de truta de arco íris alimentada com dieta contendo 60% de soja.

Os efeitos biológicos provocados por lectinas e inibidores de proteases são conseqüência da sua estabilidade ao trato gastrointestinal de animais. Nesse sentido, HAJÓS e GELENCSÉR (1995) constataram que 76% do inibidor Kunitz mantiveram-se biologicamente ativos após sua passagem pelo trato gastrointestinal de ratos, enquanto lectina e Bowman-Birk apresentaram resistência bem menor. Por outro lado, LIENER (1986) afirmou que o inibidor tipo Bowman-Birk apresentou maior estabilidade que o inibidor tipo Kunitz quando exposto ao suco gástrico humano, enquanto JORDINSON et al. (1997) constataram que lectina de soja apresentou estabilidade ao suco pancreático de ratos.

De acordo com SILVA e SILVA (2000), a maior questão sobre os riscos à saúde provocados por fatores antinutricionais é o desconhecimento dos níveis de tolerância, do grau de variação do risco individual e da influência de fatores ambientais sobre a capacidade de detoxificação do organismo humano. Essa preocupação aumenta tendo em vista três grupos populacionais: 1) pessoas, principalmente crianças,

alérgicas a leite de vaca e às quais é administrado extrato hidrossolúvel de soja; 2) pessoas que, por motivos filosóficos ou religiosos, substituem todas as proteínas de origem animal por aquelas de origem vegetal, principalmente soja; 3) pacientes que, apresentando quadro clínico de hiperlipidemia, utilizam proteínas de soja como substituição a proteínas de origem animal na tentativa de se reduzir o nível de colesterol sanguíneo.

Sendo assim, ainda não é satisfatório o conhecimento a respeito das implicações nutricionais e fisiológicas da ingestão crônica de soja e derivados contendo baixos níveis de lectinas e inibidores de proteases, pois a maioria dos experimentos realizados abrangem um tempo relativamente curto (LAJOLO e GENOVESE, 2002).

2.5. Eliminação de lectinas e inibidores de proteases de farinhas de soja

2.5.1. Tratamento térmico

A aplicação de calor é a maneira mais utilizada para se eliminar fatores antinutricionais termolábeis. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para inativar fatores antinutricionais, como extrusão, autoclavagem, tostagem com ar quente ou com vapor, cozimento e aplicação de microondas (SAKLA e GHALI, 1988; ARMOUR et al., 1998; QIN et al., 1998; LJOKJEL et al., 2000; WHITE et al., 2000; WIRIYAUMPAIWONG et al., 2004). Embora sejam tecnologias diferentes, todas elas estão baseadas na aplicação de calor na matriz protéica da soja, resultando em desnaturação protéica de lectinas e inibidores de proteases.

Avaliando-se o efeito do calor nos inibidores Kunitz e Bowman-Birk puros em solução, observou-se que o segundo apresentou maior estabilidade. Enquanto Bowman-Birk manteve aproximadamente 75% de atividade antitriptica após tratamento a 100 °C por 360 minutos, o inibidor Kunitz foi quase completamente inativado após 180 minutos (DIPIETRO e LIENER, 1989). No entanto, o inibidor Kunitz *in situ* apresentou maior estabilidade térmica que o Bowman-Birk (DIPIETRO e LIENER, 1989; FRIEDMAN et al., 1991).

Quando se compara a inativação dos inibidores Kunitz e Bowman-Birk *in situ* e puros em solução, observa-se maior susceptibilidade ao tratamento térmico quando presentes na matriz protéica da soja (DIPIETRO e LIENER, 1989), o que se deve às

alterações na estrutura dos inibidores devido à formação de ligações dissulfeto com grupos tióis (SH) livres presentes na matriz protéica (FRIEDMAN et al., 1984).

Esse efeito pode ser potencializado com a adição de compostos contendo grupo tiol, como cisteína e N-acetilcisteína, o que resulta na formação de ligações dissulfeto mistas entre os inibidores, os compostos adicionados e as proteínas presentes na matriz protéica da soja. Nessas ligações dissulfeto formadas, um dos átomos de enxofre origina-se do composto adicionado e o outro da proteína. Dessa forma, ligações dissulfeto que contribuem para a adequada conformação estrutural dos inibidores são alteradas o que resulta na perda da capacidade dos inibidores em se complexar com os sítios ativos de tripsina ou outras enzimas proteolíticas (FRIEDMAN et al., 1984). Essa perda da atividade inibitória de enzimas, assim como a maior susceptibilidade à ação de enzimas proteolíticas promovida pela formação de ligações dissulfeto mistas, permitem melhora na digestibilidade protéica *in vivo* e conseqüentemente maior ganho de peso (FRIEDMAN et al., 1982, 1984).

Segundo TRUGO et al. (2000), o tratamento térmico aplicado não somente reduziu a atividade antitriptica, como também promoveu uma desnaturação parcial de proteínas da soja, expondo suas ligações peptídicas a enzimas digestivas. Esses efeitos contribuíram sinergisticamente para o aumento da digestibilidade protéica. Nesse sentido, FRIEDMAN et al. (1991) mostraram que, mesmo em se tratando de linhagem isenta de inibidor Kunitz, a utilização de tratamento térmico é necessária para aumentar o valor nutricional de farinhas de soja.

Por outro lado, se o aquecimento for muito severo pode ocorrer diminuição da quantidade ou da digestibilidade de proteínas de soja, reduzindo sua absorção e utilização para a nutrição humana ou animal. LJOKJEL et al. (2000) verificaram uma redução significativa na quantidade de arginina, lisina e cisteína quando farelo de soja, previamente tostado a 105°C por 30 minutos, foi autoclavado por 30 minutos a 130°C. Quando esse farelo foi adicionado à dieta de “mink” como única fonte protéica, observou-se redução dos valores de digestibilidade de todos os aminoácidos, sendo mais acentuada para cisteína, aspartato e lisina.

FRIEDMAN e BRANDON (2001) alertaram para a perda de aminoácidos durante o processamento ou a estocagem, em virtude da ocorrência de reações de Maillard, principalmente entre os grupamentos $-NH_2$ da lisina e grupos aldeídicos de açúcares redutores presentes na soja. Em pH elevado, pode ocorrer também a formação de

lisinoalanina e a conversão de L- para D-lisina que não são fontes utilizáveis pelo organismo humano.

No entanto, o tratamento térmico insuficiente resulta em baixo desempenho do crescimento de animais devido à atividade residual antitriptica ou anti-quimotriptica que diminui a digestibilidade protéica (FRIEDMAN et al., 1991; PERILLA, 1997). Por outro lado, a completa inativação térmica de lectinas e inibidores de proteases em soja pode resultar na diminuição de sua qualidade protéica (QIN et al., 1996; ARNDT et al., 1999). Assim é compreensível que produtos de soja processados ainda contenham atividade residual desses antinutrientes (BARBOSA, 1997; MAENZ et al., 1999).

2.5.2. Melhoramento genético

Estudos mostram que lectinas e inibidores de tripsina, principalmente o inibidor Kunitz, são os principais responsáveis pelo baixo desempenho de animais alimentados com soja crua (DOUGLAS et al., 1999). Sendo assim, o desenvolvimento de linhagens de soja sem fatores antinutricionais é apontado como alternativa eficiente para aumentar o valor nutricional dessa leguminosa. DOMAGALSKI et al. (1992) identificaram vários acessos de diferentes espécies do gênero *Glycine* ausentes da principal forma do inibidor Bowman-Birk, sugerindo a utilização desses materiais para o desenvolvimento de cultivar de soja sem essa isoforma. Além disso, diversas linhagens de soja com nível reduzido de lectinas, inibidor Kunitz e outros inibidores com capacidade de inibir tripsina e quimotripsina também podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético de soja (FRIEDMAN et al., 1991; KRISHNAN, 2001; VASCONCELOS et al., 2001).

Entre alguns dos benefícios relacionados à eliminação de lectina e inibidor Kunitz de sementes de soja destaca-se a melhora na digestibilidade protéica e no ganho de peso. CARDOSO et al. (2003) relataram um aumento nos valores de digestibilidade protéica quando ratos foram alimentados com farinha de soja isenta de KTI. FRIEDMAN et al. (1991) também trabalharam com isolinha sem KTI e obtiveram maior ganho de peso em comparação à linhagem convencional de soja. PALACIOS et al. (2002) observaram que a eliminação de lectina e de inibidor Kunitz de soja proporcionou uma melhora de aproximadamente 55% no valor de ganho de peso em

porcos quando se comparou ao resultado obtido com a linhagem convencional. Outras vantagens relacionadas às linhagens de soja com menor quantidade de inibidores de tripsina são a menor incidência de alterações metabólicas em órgãos de animais e a diminuição no tempo de tratamento térmico necessário para aumentar o valor nutricional das proteínas de soja (FRIEDMAN et al., 1991; VASCONCELOS et al., 2001).

Outro aspecto importante é que a eliminação desses fatores antinutricionais não promoveu redução significativa da quantidade de proteínas ou lipídeos em sementes de soja (MONTEIRO et al., 2003). Além disso, a eliminação de lectina e de inibidor Kunitz não alterou a composição ou a digestibilidade de aminoácidos, inclusive sulfurados, em comparação a linhagens convencionais (FRIEDMAN et al., 1991; DOUGLAS et al., 1999). Por outro lado, KRISHNAN (2001) sugere o desenvolvimento de isolinhas que acumulem formas inativas de inibidores de tripsina em sementes de soja, pois esses antinutrientes constituem um grupo de proteínas ricas em aminoácidos sulfurados, e sua eliminação poderia diminuir o valor nutricional de soja.

2.5.3. Outras técnicas

Utilizando cromatografia de afinidade, BAJPAI et al. (2005) removeram lectinas e inibidores de tripsina de farinha de soja e verificaram ser possível obter farinha de soja sem esses fatores antinutricionais. Também obteve-se elevada taxa de recuperação desses compostos em uma forma altamente purificada com alto valor agregado.

OSMAN et al. (2002) constataram inativação mais eficiente de inibidores Kunitz e Bowman-Birk purificados quando foram autoclavados em meio alcalino devido à destruição de ligações dissulfeto necessárias para a estabilidade e a atividade desses inibidores (FRIEDMAN et al., 1984).

O tratamento de farelo de soja com protease subtilisina produzida por *Bacillus subtilis* permitiu a diminuição dos níveis de inibição de tripsina e o aumento da digestibilidade de proteínas em leitões jovens (CAINE et al., 1998).

FARAG (1998) observou que em soja integral tratada com dose de irradiação gama de 60 Kgy ocorreu redução na atividade hemaglutinante e antitriptica, o que

permitiu um aumento dos valores de eficiência protéica e de ganho de peso em pintinhos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material genético

Foram utilizadas duas isolinhas derivadas da variedade de soja Monarca com alto teor de proteína, sendo uma com teores normais do inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e de lectina e a outra isenta de KTI e lectina. Essas isolinhas estão sendo desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV. Inicialmente, foram obtidas linhagens com essas características separadamente, utilizando a variedade Monarca como progenitor recorrente. As fontes doadoras dos genes para alto teor protéico, ausência de KTI e lectina foram o acesso BARC-8, a linhagem BRM 925262 e o acesso Columbia, respectivamente. Após a obtenção dessas linhagens com as características isoladas foram feitas combinações por meio de intercruzamentos das três isolinhas, com posteriores autofecundações e seleções para reunir as três características em apenas uma variedade.

3.2. Obtenção das farinhas integrais de soja

Os grãos dos dois genótipos foram previamente analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo item 3.3.1 e submetidos a tratamento térmico em calor seco (aproximadamente 80°C por 5 minutos) para facilitar a retirada da casca. Esse aquecimento provoca uma ligeira perda de água do cotilédone que se encolhe, permitindo à casca se desprender facilmente. Em seguida, os grãos foram quebrados em moinho de martelo e a casca removida com o uso de peneira. Os fragmentos dos grãos foram novamente moídos em moinho de martelo. As farinhas obtidas foram passadas através de peneira Granutest (nº 40, abertura de 0,42 mm) com objetivo de padronizar o tamanho de suas partículas o que interfere nos valores de solubilidade protéica (PARSONS et al., 1991).

3.3. Caracterização das farinhas integrais de soja

3.3.1. Análise eletroforética de KTI e lectina

As farinhas foram analisadas quanto à presença de KTI e lectina por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para isso, foram utilizados géis de poliacrilamida com sistema descontínuo contendo SDS descrito por LAEMMLI (1970) com algumas modificações. O gel de concentração foi preparado com 6% de acrilamida-bisacrilamida em tampão 0,5 M de Tris, pH 6,8 e 0,4% de SDS e o gel de separação com 14% de acrilamida-bisacrilamida em tampão contendo 0,5 M de Tris, pH 8,8 e 0,4% de SDS. O tampão de corrida foi preparado com 0,5 M de Tris, pH 8,8, 1,92 M de glicina e 1% SDS. Para o preparo da amostra foram macerados 15 mg da farinha em 500 µL de tampão de extração (0,092 M Tris, 0,023 M CaCl₂.2H₂O, 20% de sacarose, pH 8,1) e centrifugados 18 500 x g por 15 minutos. A 60 µL desse sobrenadante foram adicionados 30 µL de tampão de amostra 3X (0,18755 M Tris, 30% glicerol, 6,9% SDS pH 6,8, 2% de β-mercaptoetanol, azul de bromofenol) e aquecidos por 3 minutos a 100°C. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e 25 µL foram aplicados em gel para análise eletroforética. A corrida foi realizada a 120 Volts até todo o corante abandonar o gel de separação. O gel obtido foi corado em solução corante (0,15% corante Comassie Blue, 9% ácido acético, 45% metanol) e, em seguida, colocado em solução descorante (7,5% ácido acético, 25% metanol).

3.3.2. Determinação da composição centesimal

Foram caracterizadas farinhas integrais de soja, não tratadas termicamente, obtidas a partir das linhagens com KTI e lectina e sem KTI e lectina.

3.3.2.1. Quantificação de proteínas

A determinação do conteúdo de proteínas foi realizada em triplicata, segundo o método de Kjeldahl, descrito pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Para isto, foram pesados exatamente aproximadamente 300 mg da farinha de soja em balança analítica e digeridos em 10 mL de mistura digestora (H₂SO₄ concentrado, 1% de selênio e 1% de sulfato de cobre). Após a digestão

parcial do material, foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio à mistura, digerindo-a por mais 1 hora. Na fase de destilação a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico com indicador 4%. O material recolhido foi titulado com HCl 0,05 M. Foi utilizado o fator de 6,25 para converter a quantidade de nitrogênio encontrada em teor de proteínas.

3.3.2.2. Quantificação de cinzas

O conteúdo de cinzas foi determinado em triplicata, segundo o método da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). A amostra foi colocada em cadinho previamente seco e pesado e levado à mufla a uma temperatura de 570°C por aproximadamente 15 horas. Em seguida, o cadinho contendo as cinzas foi colocado em dessecador para resfriar e pesado. O procedimento foi novamente realizado até a completa incineração da amostra. O cálculo do teor de cinzas foi realizado como mostrado a seguir:

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

Onde:

C = peso das cinzas;

PA = peso da amostra.

3.3.2.3. Quantificação de umidade

A determinação do conteúdo de umidade foi realizada em triplicata, pelo método gravimétrico, segundo AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Foram pesados exatamente aproximadamente 2 g de amostra em balança analítica e colocados em placa de Petri, previamente seca e pesada, para secar em estufa por 5 horas a uma temperatura de 105°C. Em seguida, a amostra foi colocada em dessecador para resfriar e pesada. O procedimento foi novamente realizado até peso constante. O cálculo do teor de umidade foi realizado da seguinte maneira:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{(P2 - P1) \times 100}{P2}$$

Onde:

P2 = peso da amostra úmida;

P1 = peso da amostra seca.

3.3.2.4. Quantificação de lipídios

A determinação do conteúdo de lipídios foi realizada em triplicata, segundo o método da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Aproximadamente 5 g de farinha de soja foram pesados em balança analítica e colocados em cartucho de papel de filtro, que foi colocado em um extrator Soxhlet, conectado a um balão previamente seco e pesado, contendo em torno de 250 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, o solvente recuperado e o balão colocado para secar em estufa a 105°C por um período de 5 horas. O balão contendo os lipídios extraídos foi colocado em dessecador para resfriar e pesado. O procedimento de secagem foi repetido até completa evaporação do solvente, e o cálculo da porcentagem de lipídios foi realizado da seguinte forma:

$$\% \text{ de lipídios} = \frac{(P2 - P1) \times 100}{PA}$$

Onde:

P2 = peso do balão após extração e secagem;

P1 = peso do balão vazio seco e pesado;

PA = peso da amostra.

3.3.2.5. Quantificação de carboidratos

A determinação do conteúdo de carboidratos foi realizada por diferença em relação aos demais componentes. Para isso, foi subtraída de 100% a soma das porcentagens de lipídios, proteínas, umidade e cinzas.

3.4. Processamento térmico das farinhas integrais de soja

Para o processamento térmico, foi utilizada metodologia segundo ANDERSON-HAFERMANN et al. (1992) com modificações. As farinhas integrais de soja provenientes dos dois genótipos foram autoclavadas durante 5, 10, 15 e 25 minutos. Para cada processamento foram adicionadas quantidades iguais das farinhas em erlenmeyers de 1 L, formando uma fina camada cuja espessura foi de aproximadamente 1 cm. Os erlenmeyers foram colocados em autoclave e o tempo de tratamento térmico iniciado quando o interior da autoclave atingiu 121°C. Ao atingir o tempo definido, a autoclave foi desligada, as amostras deixadas esfriar à temperatura ambiente e estocadas a -20°C.

3.5. Quantificação da inibição de tripsina das farinhas de soja

A quantificação da atividade dos inibidores de tripsina foi realizada em extratos das farinhas de soja processadas e *in natura*.

3.5.1. 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 (1 mg/mL) foram preparadas em HCl 1mM e armazenadas a -20°C. Durante a realização das medidas de 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 ensaios foi de 1,2 mM, sendo preparada a partir de 200 L do

estoque diluídos em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 0,02 M. A solução deve ser preparada na hora do uso mantendo-se estável por cerca de 2 horas.

3.5.2. Medidas da atividade de tripsina na presença e ausência de inibidores

Para a extração dos inibidores foi utilizado o método descrito por BRANDON et al. (1988) com modificações realizadas por BARBOSA (1997). A cada 100 mg de farinha de soja desengordurada e liofilizada foram adicionados 15 mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 0,02 M. A suspensão foi agitada por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 35 600 x g por 30 minutos e o sobrenadante utilizado para a quantificação da inibição de tripsina e do teor de proteínas.

A determinação da atividade de tripsina foi realizada na presença e ausência de inibidores segundo método descrito por ERLANGER et al. (1961) com modificações realizadas por BARBOSA (1997). Foram adicionados 450 L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 0,02 M, 50 L da solução de tripsina e 100 L do extrato em tubo de ensaio. Decorridos exatamente 5 minutos de incubação, 500 L desta mistura foram transferidos para outro tubo contendo 500 L deste tampão e 500 L da solução D,L-BapNA (0,2 mM). Após 5 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 300 L de solução de ácido acético 60% (v/v). O controle da atividade da enzima foi feito substituindo-se o extrato por tampão Tris-HCl e o branco, substituindo-se a enzima e o extrato pelo mesmo tampão. Os brancos do controle da enzima e das amostras foram preparados adicionando-se ácido acético antes da adição do substrato D,L-BApNA.

A absorvância da solução foi medida a 410 nm em espectrofotômetro Beckman DU-65. As análises foram efetuadas em triplicata para cada uma das três repetições. Os resultados foram convertidos em mg de tripsina pura inibida por grama de proteína do extrato, 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 menos absorvância da amostra, ambas corrigidas pela leitura de seus respectivos brancos;

B = fator de diluição da amostra;

C = fator de tripsina. Esse fator corresponde à absorvância em 410 nm do produto da atuação de 1 g de tripsina sob o substrato D,L-BApNA nas condições do ensaio. Equivale a 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/mL do extrato.

3.5.3 Medidas do teor de proteínas nos extratos das farinhas de soja

Foi utilizado o método do ácido bicinconínico (BCA) descrito por SMITH et al. (1985) e adaptado por BARBOSA (1997), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

O reagente de trabalho utilizado consistiu na mistura do reagente A com o reagente B na proporção de 50:1, respectivamente.

Para o preparo do reagente A foram dissolvidos em água destilada 1 g de bicinconinato de sódio, 0,16 g de tartarato de potássio, 1,8 g de carbonato de sódio, 0,4 g de hidróxido de sódio e 0,95 g de bicarbonato de sódio. O pH da solução foi ajustado para 11,3 com NaOH e o volume completado para 100 mL.

Para o preparo do reagente B foram dissolvidos em água destilada 2 g de sulfato de cobre pentaidratado e o volume completado para 50 mL.

O procedimento para análise consistiu em pipetar 50 µL de extrato em um tubo ao qual foi adicionado 1 mL do reagente de trabalho. Essa mistura foi colocada em banho-maria a 37°C (±1) por 30 minutos.

Após este tempo, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente por 20 minutos e a absorvância determinada a 562 nm em espectrofotômetro Beckman DU-65. Para cada repetição os extratos foram analisados em triplicata.

Foi utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) a partir de diluições seriadas de solução estoque de albumina 0,2% (p/v). Para a determinação do conteúdo de proteínas, a absorvância medida nos extratos foi utilizada na equação obtida com a regressão linear da curva padrão de BSA.

3.6. Avaliação do índice de urease das farinhas de soja

Essa metodologia consiste em medir a variação de pH provocada pela ação da urease em uma solução de uréia sob condições controladas.

Foi utilizada metodologia segundo CARDOSO (2003). Para isso, foram utilizadas soluções tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,0) para o tubo controle e tampão fosfato de potássio com uréia (7,5 g uréia por litro de solução tampão e o pH corrigido para 7,0) para o tubo teste. Para cada determinação de variação de pH foram utilizados um tubo controle e um tubo teste, ambos contendo 0,2 g ($\pm 0,001$) de amostra. Foram adicionados 10 mL da solução tampão ao tubo branco, sendo devidamente tampado e acondicionado em banho-maria a 30°C (± 1). Após 3 minutos, o mesmo volume da solução tampão contendo uréia foi adicionado ao tubo teste, o qual também foi mantido pelo mesmo tempo em banho-maria. Os tubos foram agitados aproximadamente a cada 5 minutos. Após 30 minutos, o conteúdo de cada tubo foi transferido para béqueres e o pH medido em potenciômetro devidamente calibrado. O índice de urease consiste na diferença de pH entre os tubos branco e teste. Para cada uma das três repetições o índice de urease foi determinado em duplicata.

3.7. Avaliação da solubilidade protéica das farinhas de soja em solução de KOH 0,2%

Foi utilizada metodologia segundo BRASIL (1991). O método baseia-se na extração e determinação da fração de nitrogênio da amostra solúvel em solução de hidróxido de potássio 0,2%, sendo o resultado expresso em percentagem de nitrogênio solúvel em relação ao nitrogênio total contido na amostra.

Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 3840 x g por 15 minutos e 15 mL do sobrenadante foram recolhidos para determinação do conteúdo de nitrogênio total pelo método de Kjeldhal, segundo AOAC (1984). O cálculo da porcentagem de nitrogênio solúvel (% NS) foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ NS} = \frac{((V_A - V_B) \times 0,05 \times f \times 1,4) \times 100}{\text{PA}}$$

PA

Em que:

V_A = volume de HCl 0,05 M gasto na titulação da amostra;

V_B = volume de HCl 0,05 M gasto na titulação do branco;

f = fator de padronização do HCl;

PA = peso da amostra em grama.

A solubilidade protéica foi calculada como índice de solubilidade de nitrogênio (% ISN) a partir do quociente entre a percentagem de nitrogênio solúvel (% NS) e a percentagem de nitrogênio da farinha (%NT):

$$\text{Índice de solubilidade de nitrogênio (\% ISN)} = \frac{\% \text{ SN} \times 100}{\% \text{ NT}}$$

3.8. Avaliação da atividade hemaglutinante de lectinas das farinhas de soja

Essa análise consiste na medida da capacidade de lectinas em aglutinar solução de hemáceas de coelho ou humanos.

Foi utilizada metodologia segundo OLIVEIRA et al. (2003). Foram adicionados 10 mL de tampão fosfato de potássio salino (0,15 M, 0,9 % NaCl, pH 7,4) a 1 g de farinha de soja e agitados a 4 °C por 12 horas. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 17 600 x g por 30 minutos e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade hemaglutinante.

Para o preparo da suspensão de hemáceas, sangue de coelho foi coletado em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio (4,4 % de citrato de sódio, 1,6 % de ácido cítrico, pH 4,8). Em seguida, foram adicionados aproximadamente 8 mL de tampão fosfato salino a cada 4 mL de sangue e centrifugados a 750 x g por 10 minutos a 2 °C. As hemáceas foram lavadas outras duas vezes com o mesmo tampão. Este precipitado de hemáceas obtido pode ser conservado em geladeira por até 3 dias. A suspensão de hemácias 0,2 % foi obtida adicionando-se 0,2 mL deste precipitado de hemáceas a 10 mL do tampão fosfato salino.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em placas de ELISA adicionando-se 25 µL dos extratos obtidos, que foram diluídos em série (1:2) em tampão fosfato salino, e 25 µL de solução de hemáceas 0,2 %. Para a comparação do efeito de aglutinação foram utilizados um branco, substituindo-se o extrato por tampão, e um

controle positivo, contendo extrato de soja com lectina. A aglutinação, visível a olho nu, foi monitorada após 50 minutos à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

A atividade hemaglutinante foi expressa segundo FRIEDMAN et al. (1991) como a recíproca da menor concentração da amostra, expressa em mg/mL, capaz de aglutinar solução de hemáceas.

3.9. Avaliação nutricional das farinhas de soja

O ensaio biológico foi conduzido durante 14 dias com 72 ratos machos da raça Wistar, recém desmamados com 23 dias de idade. As composições das dietas experimentais utilizadas foram baseadas na dieta AIN-93G, indicada para animais em fase de crescimento segundo REEVES (1993), tendo sido planejado entre 9 e 10% de proteína para essas dietas. As composições das dietas são mostradas nas Tabelas 1 e 2. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentadas as composições das misturas mineral e vitamínica utilizadas nesse experimento.

Os animais foram divididos em grupos de seis completamente ao acaso, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse 10 gramas. Foram distribuídos em gaiolas individuais, onde receberam água e alimento *ad libitum* durante o período experimental. Os grupos de ratos foram alimentados com dietas à base de farinhas de soja, processadas em diferentes tempos de tratamento térmico, e à base de caseína adotada como referência.

Determinou-se a digestibilidade protéica que é a medida da porcentagem de proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado (SGARBIERI, 1996). A utilização de um grupo de seis animais com dieta aprotéica permitiu a determinação da digestibilidade verdadeira. Para isso, foi subtraído do conteúdo de nitrogênio fecal de ratos alimentados com as dietas teste o conteúdo de nitrogênio fecal daqueles alimentados com a dieta isenta de proteína. A digestibilidade verdadeira foi expressa utilizando-se a seguinte fórmula:

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

Em que:

D = digestibilidade verdadeira;

NI = quantidade de nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

NF = quantidade de nitrogênio fecal do grupo com dieta teste;

NFK = quantidade de nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Para o cálculo da digestibilidade, as dietas foram marcadas com corante índigo carmim (aproximadamente 300 mg para cada dieta) no quinto dia de experimento e as fezes coletadas diariamente do sexto ao nono 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 horas. Em seguida foram resfriadas, pesadas e moídas em multiprocessador para determinação da quantidade de nitrogênio, utilizando-se o método de Kjeldhal, com amostras em triplicata segundo AOAC (1984).

Ao término dos 14 dias de experimento também foram medidos os valores de ganho de peso, quociente de eficiência protéica (PER), quociente de eficiência protéica líquida (NPR) e índice de utilização protéica líquida (NPU). Esses valores foram medidos para cada animal para se ter o controle da homogeneidade do grupo.

O PER é o quociente do ganho de peso, em gramas, e da quantidade de proteína ingerida, também em gramas, para ratos submetidos a uma dieta contendo a proteína em estudo (SGARBIERI, 1996). O valor de PER é um indicativo da qualidade da proteína em estudo para promover o crescimento de animais.

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

O NPR é uma modificação do PER, consistindo em somar a perda de peso do grupo que recebeu dieta aprotéica ao ganho de peso do grupo contendo a dieta teste (SGARBIERI, 1996).

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

NPU compara a ingestão de nitrogênio, por um período de tempo, com o conteúdo de nitrogênio na carcaça do animal (SGARBIERI, 1996). O valor de NPU é um indicativo da qualidade da proteína em estudo para promover a manutenção corporal em animais.

$$\text{NPU} = \frac{(\text{N carcaça do grupo com dieta teste} - \text{N carcaça do grupo aprotéico}) \times 100}{\text{N consumido pelo grupo contendo dieta teste}}$$

Para o cálculo de NPU, as carcaças dos ratos abatidos foram evisceradas e secas em estufa com circulação de ar a 105°C por 24 horas. Em seguida, foram maceradas em porcelana e desengorduradas em extrator Soxhlet por aproximadamente 8 horas, utilizando-se éter etílico como solvente. As carcaças desengorduradas foram pulverizadas em multiprocessador e armazenadas a -20°C.

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

Ingredientes (g/kg)	Dietas						
	Aprotéica	Caseína	D1	D2	D3	D4	D5
Caseína	-----	182,69					
Farinha de soja	-----	-----	216,11	213,82	213,96	210,64	214,01
Amido dextrinizado	132	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70	70	70	70	70
Fibra (celulose microcristalina)	50	50	50	50	50	50	50
Mistura salínica	35	35	35	35	35	35	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho	597,5	414,81	381,39	383,6	383,54	386,86	383,49
% de proteína*	Nd	9,72	10,2	10,06	9,93	9,78	10,19

Fonte: REEVES et al (1993)

D1 - dieta de farinha de soja integral KTI+ Lec+ *in natura*.

D2 - dieta de farinha de soja integral KTI+ Lec+, processada a 121°C/ 5 minutos.

D3 - dieta de farinha de soja integral KTI+ Lec+, processada a 121°C/ 10 minutos.

D4 - dieta de farinha de soja integral KTI+ Lec+, processada a 121°C/ 15 minutos.

D5 - dieta de farinha de soja integral KTI+ Lec+, processada a 121°C/ 25 minutos.

*Valor determinado pelo método de Kjeldhal descrito pela AOAC (1984).

nd – não determinado

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais (g/kg de mistura) utilizadas no experimento com ratos

Ingredientes (g/kg)	Dietas						
	Aprotéica	Caseína	D6	D7	D8	D9	D10
Caseína	-----	182,69					
Farinha de soja	-----	-----	208,56	208,33	203,86	204,04	206,03
Amido dextrinizado	132	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70	70	70	70	70
Fibra (celulose microcristalina)	50	50	50	50	50	50	50
Mistura salínica	35	35	35	35	35	35	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho	597,5	414,81	388,94	389,17	393,64	393,46	391,47
% de proteína*	nd	9,72	9,9	9,40	9,73	10	10,14

Fonte: REEVES et al (1993)

D6 - dieta de farinha de soja integral KTI- Lec- *in natura*.

D7 - dieta de farinha de soja integral KTI- Lec-, processada a 121°C/ 5 minutos.

D8 - dieta de farinha de soja integral KTI- Lec-, processada a 121 °C/ 10 minutos.

D9 - dieta de farinha de soja integral KTI- Lec-, processada a 121°C/ 15 minutos.

D10 - dieta de farinha de soja integral KTI- Lec-, processada a 121°C/ 25 minutos.

*Valor determinado pelo método de Kjeldhal descrito pela AOAC (1984).

nd – não determinado

Tabela 3 – Composição da mistura salina utilizada no experimento com ratos

Sais minerais	g
Macro 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
Micro elementos minerais potencialmente benéficos	
Meta silicato de sódio 9 hidratado (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.	1000

Tabela 4 – Composição da mistura vitamínica utilizada no experimento com ratos

Vitaminas	g
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.	1000

3.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das farinhas integrais de soja

4.1.1. Verificação das linhagens de soja

As farinhas integrais de soja obtidas a partir da linhagem convencional e da isolinha isenta de KTI e lectina, não tratadas termicamente, foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE. A confirmação da presença ou ausência de KTI e lectina, como mostrado na Figura 4, foi realizada por comparação com padrões conhecidos para a presença ou ausência de KTI e lectina.

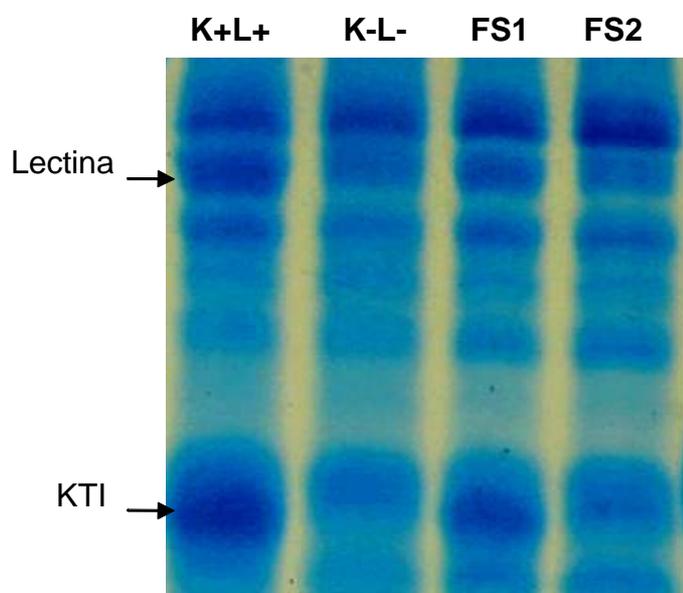


Figura 4 – Análise de KTI e lectina por eletroforese SDS-PAGE em farinhas da linhagem com KTI e lectina (FS1) e da isolinha sem KTI e lectina (FS2) por comparação com os padrões contendo KTI e lectina (KTI+Lec+) e sem KTI e lectina (KTI-Lec-).

4.1.2. Composição centesimal das farinhas de soja *in natura*

Os resultados das análises físico-químicas apresentados na Tabela 5 mostram que as duas amostras apresentaram valores muito próximos dos constituintes avaliados, revelando que a eliminação de KTI e lectina não diminuiu o valor nutricional em termos da quantidade de proteínas e lipídeos. Os valores encontrados

para os constituintes medidos estão na faixa de valores obtida por MONTEIRO et al. (2003) e apresentados por LIU (1995) para diferentes variedades de soja.

Tabela 5 - Composição centesimal das farinhas de soja integrais não tratadas termicamente

Amostras	Proteínas(%) [*]	Lipídeos(%)	Umidade(%)	Cinzas(%)	Carboidratos(%)
FS1	43,96±0,52	15,83±0,08	9,12±0,04	5,22±0,06	25,87
FS2	45,55±0,06	15,84±0,06	9,4±0,08	5,23±0,03	23,98

*Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão.

FS1 - farinha de soja integral obtida da linhagem KTI+ Lec+

FS2 - farinha de soja integral obtida da linhagem KTI- Lec-

4.2. Efeito do tratamento térmico no índice de urease das farinhas de soja

Os resultados do índice de urease apresentados na Tabela 6 refletem claramente o efeito do tratamento térmico na inativação dessa enzima, estando de acordo com diferentes trabalhos (QIN et al., 1996, CARDOSO, 2003). Para a farinha da amostra com KTI e lectina (FS1) os valores variaram de 1,85 a 0,02 após 25 minutos de tratamento térmico, enquanto no material da amostra sem KTI e lectina (FS2) a variação foi de 1,91 a 0,08.

Verifica-se também que a amostra FS1 apresentou acentuada diminuição do índice de urease entre 5 e 10 minutos de tratamento térmico, o que ocorreu entre 10 e 15 minutos na amostra FS2. Sendo assim, a amostra com KTI e lectina apresentou maior sensibilidade à inativação da urease que a amostra sem KTI e lectina. No entanto, com 15 minutos de tratamento térmico, as duas farinhas apresentaram índices de urease estatisticamente iguais. Apesar do valor de índice de urease ter sido significativamente diferente entre os dois materiais no tempo de 25 minutos, isso não deve ser levado em consideração, pois esses diferentes valores se aproximam de zero, estando no limite de precisão do método.

Tabela 6 – Índice de urease das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

Amostras ¹	ΔpH^*				
	Tempo de tratamento térmico (minutos)				
	0	5	10	15	25
FS1	1,9±0,02 ^{Ab}	1,4±0,04 ^{Bb}	0,4±0,03 ^{Cb}	0,1±0,01 ^{Da}	0,02±0,01 ^{Eb}
FS2	1,9±0,03 ^{Aa}	1,8±0,03 ^{Ba}	1,7±0,03 ^{Ca}	0,1±0,01 ^{Da}	0,08±0,01 ^{Da}

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

As médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

¹FS1 - farinha de soja KTI+ Lec+, FS2 -farinha de soja KTI- Lec-.

Além da influência de tempo e temperatura na inativação de urease, McNAUGHTON et al. (1980) comprovaram, para o mesmo tempo de tratamento térmico, maior inativação quando se aumentou a umidade em farelos de soja.

O índice de urease destaca-se como metodologia rápida, barata e reprodutível, sendo muito utilizada em indústrias de soja com o objetivo de se avaliar o efeito do tratamento térmico na qualidade nutricional, uma vez que a urease e os inibidores de tripsina apresentam um padrão similar de inativação (QIN et al., 1996). O calor aplicado não deve ser muito severo, o que pode implicar na redução da digestibilidade, mas deve ser suficiente para inativar fatores antinutricionais (LJØKJEL et al., 2000; WHITE et al., 2000).

Nesse sentido, valores de índice de urease de 0 a 0,3 são relatados como indicadores de soja processada com boa qualidade nutricional. Trabalhando com leitões, WHITE et al. (2000) verificaram que ganho de peso satisfatório foi obtido com soja integral processada em tostador, com valor de índice de urease de 0,25. ANDERSON-HAFERMANN et al. (1992) autoclavaram (121°C por 12 minutos) farinha integral de soja isenta de inibidor Kunitz e observaram que o índice de urease de 0,3 permitiu bom crescimento de frangos.

Sendo assim, 15 minutos de tratamento térmico foi suficiente para se atingir valores aceitáveis de índice de urease, nas duas amostras utilizadas.

4.3. Efeito do tratamento térmico na atividade antitriptica das farinhas de soja

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, verifica-se que a inibição promovida pela farinha de soja *in natura* sem KTI e lectina foi de 27,62 mg de tripsina inibida/g de proteína, enquanto os inibidores de tripsina presentes na farinha de soja convencional inibiram 40,75 mg de tripsina/g de proteína. A princípio, essa diferença de 32% em relação aos dois materiais foi menor que o esperado, tendo em vista que o inibidor Kunitz da soja é responsável por aproximadamente 50% da inibição de tripsina em soja (FRIEDMAN et al., 1991). Porém, MONTEIRO et al. (2003) e CARDOSO (2003), avaliando a atividade antitriptica em farinhas de soja isentas de KTI, constataram uma redução de apenas 20% e 8%, respectivamente, em relação à linhagem convencional utilizada. Esses resultados comprovam que a inibição de tripsina não se deve apenas ao inibidor Kunitz, estando presentes na matriz da soja outros componentes ativos contribuindo para esta inibição.

FRIEDMAN et al. (1991) verificaram que a farinha de isolinha de soja sem KTI ainda manteve atividade residual antitriptica de aproximadamente 54%, o que foi atribuído ao inibidor Bowman-Birk e a outros inibidores específicos e não específicos. Segundo DOMAGALSKI et al. (1992) fitatos e taninos podem atuar de modo não específico inibindo proteases. DOUGLAS et al. (1999) constataram a presença de quantidades aproximadamente iguais de inibidor Bowman-Birk em linhagens de soja isentas de KTI ou lectina, sugerindo que a presença desse inibidor independe da presença desses antinutrientes. Somado a isso, foram identificadas em soja diferentes formas de inibidores de baixo peso molecular, variando em sua atividade inibitória de tripsina e quimotripsina (HWANG et al., 1977; STAHLHUT e HYMOWITZ, 1983). TAN-WILSON et al. (1987) estudaram uma nova classe de inibidores de tripsina, ricos em glicina, que apresentaram forte inibição de tripsina bovina.

Portanto, a variação desses compostos em sementes de soja contribuem para os diferentes níveis de inibição de tripsina entre diversas variedades (FRIEDMAN et al., 1991; CARVALHO et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2001). Por isso, mesmo em linhagens de soja sem KTI, é necessária a aplicação de tratamento térmico para maximizar a qualidade nutricional de soja (FRIEDMAN et al., 1991; ANDERSON-HAFERMANN et al., 1992).

Tabela 7 – Inibição de tripsina das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

Amostras ¹	mg de tripsina inibida/g de proteína do extrato *				
	Tempo de tratamento térmico (minutos)				
	0	5	10	15	25
FS1	40,8±6,3 ^{Aa}	11,9±2,2 ^{BCa}	7,8±0,2 ^{BCDa}	3,1±0,2 ^{CDa}	1,1±0,1 ^{Da}
FS2	27,6±1,4 ^{Ab}	7,6±0,8 ^{BCb}	5,8±0,5 ^{BCDa}	1,4±0,3 ^{CDa}	0,3±0,1 ^{Da}

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

¹FS1 – farinha de soja KTI+ Lec+; FS2 – farinha de soja KTI- Lec-.

Também pode ser notado que o efeito do tempo de tratamento térmico na redução de inibidores e os valores de inibição de tripsina apresentados na Tabela 7 estão de acordo com os resultados obtidos em outros trabalhos (McNAUGHTON et al., 1980, QIN et al., 1996; CARVALHO et al., 1999).

Em consonância com o trabalho realizado por QIN et al. (1996), os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 mostram que a aplicação do tratamento térmico nos primeiros minutos permitiu acentuada redução de inibição de tripsina nas duas amostras, que se tornou mais branda com o aumento do tempo de processamento. Além disso, à medida que se aumentou o tempo de tratamento, a diferença dos valores de inibição entre as duas amostras diminuiu, não havendo diferença significativa entre os dois materiais a partir de 10 minutos de tratamento térmico. Resultados semelhantes foram encontrados por ARNDT et al. (1999).

Geralmente quanto maior a temperatura empregada menor será o tempo necessário para ser alcançada uma satisfatória redução de inibidores, o que também se aplica a outros antinutrientes termolábeis como lectinas (QIN et al., 1996). Também contribuem para a magnitude da eliminação de inibidores a variedade utilizada, o teor de umidade na soja antes do processamento e o nível de inibição residual permitido sem comprometimento da qualidade protéica (FRIEDMAN et al., 1991; ANDERSON-HAFERMANN et al., 1992; QIN et al., 1998; ARNDT et al., 2000; WHITE et al., 2000).

Tabela 8 – Redução da atividade antitriptica das farinhas de soja em diferentes tempos de tratamento térmico

Amostras ¹	Redução da atividade antitriptica em %				
	Tempo de tratamento térmico (minutos)				
	0	5	10	15	25
FS1	0	70,89	80,90	92,51	97,32
FS2	0	72,48	79	95	98,76

¹FS1 – farinha de soja KTI+ Lec+; FS2 – farinha de soja KTI- Lec-

Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 fornecem evidências de que pequenas diferenças nos valores de redução da atividade de inibidores em soja podem implicar em diferenças significativas na quantidade desses antinutrientes.

Quando se comparam os resultados das Tabelas 6 e 7, verifica-se maior sensibilidade dos inibidores de tripsina ao tratamento térmico em comparação à urease, pois a partir de 10 minutos os valores de atividade antitriptica são estatisticamente iguais. Enquanto os valores de índice de urease ainda diferem significativamente nesse mesmo tempo.

Em relação à quantidade residual de inibidores presentes em soja processada, PERILLA et al. (1997) observaram que frangos alimentados com soja extrusada (126°C por 20 segundos), contendo 1,26 mg de tripsina inibida/g de amostra, ainda alcançaram ótimo ganho de peso.

WHITE et al. (2000) constataram que leitões submetidos a dietas à base de soja processada, contendo 9,18 mg de tripsina inibida/g de amostra, apresentaram ganho de peso satisfatório.

4.4. Efeito do tratamento térmico na solubilidade protéica das farinhas de soja em solução de KOH 0,2%

A eliminação genética de lectina e inibidor Kunitz não afetou a solubilidade protéica da isolinha. Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que, em cada tempo de tratamento térmico, os valores de solubilidade protéica obtidos para as farinhas de ambas as linhagens foram estatisticamente iguais.

Somente a partir de 10 minutos de processamento térmico ocorreu diminuição significativa dos valores de solubilidade protéica das duas amostras. Entretanto, mesmo quando essas farinhas foram autoclavadas por 25 minutos essa redução foi relativamente pequena em comparação àquela observada por ARNDT et al. (1999). Esses autores encontraram redução de aproximadamente 28% nos valores de solubilidade protéica quando autoclavaram farinha de soja por 20 minutos. Além disso, verificaram que a partir de 10 minutos de tratamento térmico não houve redução significativa na atividade antitriptica, enquanto os valores de solubilidade protéica sofreram acentuada redução após 20 minutos.

WIRIYAUMPAIWONG et al. (2004) verificaram que a redução da solubilidade protéica depende basicamente do processo de aquecimento e das condições operacionais como tempo e temperatura utilizados.

Segundo QIN et al. (1998), temperaturas muito altas promovem mais desnaturação de proteínas que inativação de inibidores de tripsina.

Tabela 9 – Solubilidade protéica das farinhas de soja em diferentes tempos de tratamento térmico

Amostras ¹	Solubilidade protéica (%) *					Média
	Tempo de tratamento térmico (minutos)					
	0	5	10	15	25	
FS1	86,61	86,48	85,15	82,37	76,76	83,47 ^a
	±0,86	±0,97	±0,23	±1,51	±0,90	
FS2	89,46	88,34	86,31	84,20	78,08	85,28 ^a
	±0,26	±0,57	±0,50	±0,71	±0,66	
Média	88,03 ^A	87,41 ^A	85,73 ^B	83,28 ^C	77,42 ^D	

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

¹FS1 – farinha de soja KTI+ Lec+; FS2 – farinha de soja KTI- Lec-.

Os valores de solubilidade protéica observados neste trabalho estão de acordo com PERILLA et al. (1997) e ARNDT et al. (1999). No entanto, o valor encontrado para o material *in natura* foi relativamente baixo, o que pode ser explicado pela possibilidade de se ter trabalhado com farinha de soja cujo tamanho das partículas

possam ter sido maiores que o utilizado por aqueles autores, e pela utilização de diferentes tipos de soja e de equipamentos para o processamento térmico (PARSONS et al., 1991).

ARABA e DALE (1990) e PARSONS et al. (1991) indicaram a solubilidade protéica como um parâmetro para avaliação da qualidade nutricional de farelo de soja que melhor se relacionou com a performance de animais. Nesse sentido, aqueles autores mostraram que a variação dos valores de solubilidade protéica ocorreu paralelamente a dos valores de ganho de peso e de coeficiente de eficiência alimentar, ao passo que a urease foi completamente inativada antes da diminuição do desempenho dos animais.

Sendo assim, ARABA e DALE (1990) relataram que valores de solubilidade protéica de 70 a 85% são indicativos de soja adequadamente processada, sendo que acima de 85% estão relacionados a possível subprocessamento, enquanto abaixo de 70% podem indicar superprocessamento.

4.5. Efeito do tratamento térmico na atividade hemaglutinante de lectinas das farinhas de soja

Os resultados de atividade hemaglutinante apresentados na Tabela 10 mostram a eficácia do tratamento térmico na inativação de lectinas da farinha de soja KTI+Lec+ (FS1). Os valores de atividade hemaglutinante em FS1 variaram de 1,28 na farinha de soja *in natura* a 0, após 25 minutos de tratamento térmico, não diferindo significativamente a partir de 15 minutos de processamento. A amostra FS2 não apresentou atividade hemaglutinante, confirmando a ausência de lectina na isolinha KTI-Lec-. QIN et al. (1996) também verificaram a redução da atividade hemaglutinante em diferentes temperaturas e tempos de processamento térmico.

Tabela 10 – Atividade hemaglutinante das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

Amostras ¹	Atividade hemaglutinante * ²				
	Tempo de tratamento térmico (minutos)				
	0	5	10	15	25
FS1	1,28±0 ^{Aa}	0,64±0 ^{Ba}	0,27±0,09 ^{Ca}	0,07±0,02 ^{Da}	0 ^{Da}
FS2	0 ^{Ab}	0 ^{Ab}	0 ^{Ab}	0 ^{Ab}	0 ^{Aa}

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha e letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

²A atividade hemaglutinante é definida como a recíproca da menor concentração da amostra (mg/mL) capaz de aglutinar hemáceas de coelho nas condições utilizadas para o ensaio.

¹FS1 – farinha de soja KTI+Lec+; FS2 – farinha de soja KTI-Lec-.

Os valores de atividade hemaglutinante encontrados estão na faixa de valores reportada por FRIEDMAN et al. (1991) que também avaliaram o efeito do tratamento térmico em farinha de soja sem KTI. No entanto, mesmo após 60 minutos de processamento em autoclave (121°C), aqueles autores encontraram atividade residual de hemaglutinação, enquanto neste trabalho nenhuma atividade foi detectada após 25 minutos de processamento térmico. Porém, essa diferença de valores encontrada entre os dois trabalhos pode ser explicada pela maior quantidade de lectinas na soja utilizada por aqueles autores em relação à soja utilizada neste trabalho, uma vez que pode haver grandes diferenças na quantidade de lectinas entre diferentes variedades (ARMOUR et al., 1998; FRIEDMAN et al., 1991).

VASCONCELOS et al. (2001) encontraram valores de 6,5 e 6,4 mg de lectina/Kg para farinhas de soja desengordurada obtidas dos cultivares Rio Balsas e Bays, respectivamente, desenvolvidas pela EMBRAPA (Piauí, Brasil).

Avaliando o efeito nutricional de linhagens de soja sem KTI ou lectina, DOUGLAS et al. (1999) encontraram valores menores que 0,00015 mg de lectina/g de amostra para linhagem isenta de lectina. As linhagens convencional e sem KTI apresentaram 8,3 mg e 8 mg de lectina/g de amostra, respectivamente.

Comparando-se os resultados das Tabelas 6, 7 e 10, nota-se que lectinas apresentaram maior sensibilidade ao tratamento térmico que inibidores de tripsina e

urease, pois foram completamente inativadas com 25 minutos de processamento. Nesse tempo, foi observada atividade residual de urease e inibidores de tripsina.

QIN et al. (1996) observaram que lectinas foram mais eficientemente eliminadas quando foi utilizada temperatura de 120°C ao invés de 102°C. Após 1 minuto e 30 segundos de tratamento térmico verificou-se inativação quase completa de lectinas, enquanto foi detectada considerável atividade residual de urease e inibição de tripsina.

4.6. Efeito do tratamento térmico no valor nutricional das farinhas de soja

4.6.1. Efeito do tratamento térmico nos valores de ganho de peso

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13, comprova-se a melhor qualidade nutricional da caseína em relação a proteínas de soja, sendo que o tratamento térmico mostrou-se bastante eficaz no aumento do valor nutricional dessa leguminosa.

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que os valores de ganho de peso foram estatisticamente iguais para ratos alimentados com dietas à base de farinhas de soja KTI+Lec+ e KTI-Lec- *in natura*. Entretanto, o tratamento térmico melhorou igualmente a qualidade nutricional destas farinhas.

Portanto, nota-se que os valores de ganho de peso aumentaram significativamente quando as farinhas de soja KTI+Lec+ e KTI-Lec- foram tratadas termicamente por 5 minutos e 15 minutos, respectivamente. Esses valores observados foram quase o dobro em comparação àqueles obtidos para estas farinhas *in natura*.

Tabela 11 – Ganho de peso de ratos alimentados com dietas de farinha de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

Dietas	Tempo de tratamento térmico (minutos)	Ganho de peso (g) * +	Ganho de peso relativo à caseína (%)
Caseína	--	71,33 ± 8,87 ^A	100
KTI+Lec+	0	24,5 ± 8,50 ^D	34,35
KTI-Lec-	0	27,5 ± 7,77 ^D	38,55
KTI+Lec+	5	41,83 ± 3,13 ^{BC}	58,64
KTI-Lec-	5	32 ± 5,59 ^{CD}	44,86
KTI+Lec+	10	42 ± 6,87 ^{BC}	58,88
KTI-Lec-	10	36 ± 4,98 ^{BCD}	50,46
KTI+Lec+	15	42,67 ± 6,74 ^{BC}	59,82
KTI-Lec-	15	45,33 ± 10,80 ^{BC}	63,54
KTI+Lec+	25	46,67 ± 3,98 ^B	65,43
KTI-Lec-	25	44,17 ± 8,06 ^{BC}	61,92

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra igual não diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

+Após 14 dias de experimento

Os valores de ganho de peso obtidos neste trabalho foram superiores aos encontrados por CARDOSO (2003) que obteve 23,5 g para dieta à base de farinha de soja com KTI, processada a 120°C/18 minutos, e 26,83 g para dieta à base de farinha de soja sem KTI autoclavada a 120°C/12 minutos.

FRIEDMAN et al. (1991) encontraram valores de ganho de peso de 88 g e 90,8 g quando ratos foram alimentados com dietas à base de farinhas de soja convencional e de isolinha sem KTI, respectivamente, processadas a 121°C por 20 minutos. No entanto, quando seus resultados são comparados em relação aos obtidos para o grupo controle de caseína são encontrados valores de 66% a 68% de ganho de peso, muito próximos àqueles encontrados neste trabalho.

4.6.2. Efeito do tratamento térmico nos valores de quociente de eficiência protéica (PER) e de quociente de eficiência protéica líquida (NPR)

Como pode ser observado na Tabela 12, as dietas contendo farinha de soja KTI+Lec+ apresentaram valores de PER de 1,79 a 2,94, enquanto os valores de NPR variaram de 0,99 a 2,28 de acordo com o tratamento utilizado. Para as dietas contendo farinha de soja KTI-Lec- os valores variaram de 2,15 a 2,99 para PER e de 1,3 a 2,27 para NPR.

Tabela 12 – PER, PER relativo (RPER), NPR e NPR relativo (RNPR) de dietas contendo farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

Dietas	Tempo de tratamento térmico (minutos)	PER *	RPER (%)	NPR *	RNPR (%)
Caseína	--	4,05 ± 0,15 ^A	100	3,45 ± 0,21 ^A	100
KTI+Lec+	0	1,79 ± 0,42 ^E	44,19	0,99 ± 0,51 ^D	28,69
KTI-Lec-	0	2,15 ± 0,42 ^{DE}	53,08	1,30 ± 0,51 ^D	37,68
KTI+Lec+	5	2,62 ± 0,19 ^{BCD}	64,69	1,95 ± 0,25 ^{BC}	56,52
KTI-Lec-	5	2,39 ± 0,27 ^{CD}	59,01	1,59 ± 0,32 ^{CD}	46,08
KTI+Lec+	10	2,77 ± 0,21 ^{BC}	68,39	2,07 ± 0,20 ^{BC}	60
KTI-Lec-	10	2,73 ± 0,33 ^{BC}	67,4	1,93 ± 0,33 ^{BC}	55,94
KTI+Lec+	15	2,9 ± 0,24 ^{BC}	71,6	2,17 ± 0,24 ^{BC}	62,89
KTI-Lec-	15	3 ± 0,17 ^B	74,07	2,28 ± 0,29 ^B	66,08
KTI+Lec+	25	2,94 ± 0,13 ^B	72,59	2,28 ± 0,14 ^B	66,08
KTI-Lec-	25	2,99 ± 0,29 ^B	73,82	2,27 ± 0,34 ^B	65,79

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra igual não diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

Apesar de as dietas não terem apresentado diferença significativa entre si em relação aos valores de PER e NPR, inclusive nos diferentes tempos de tratamento térmico utilizados, observa-se uma tendência na redução da diferença dos valores desses parâmetros entre as dietas avaliadas com o aumento do tempo de

processamento. Quando se compara o valor desses parâmetros entre dietas contendo farinha de soja *in natura* e farinha de soja processada, verifica-se uma diferença significativa que se torna maior com o aumento do tempo de tratamento térmico, confirmando a importância da aplicação de calor para a melhora da qualidade nutricional. FRIEDMAN et al. (1991) observaram essa mesma tendência quando submeteram ratos a dietas contendo farinhas de soja com e sem KTI processadas a diferentes tempos de processamento térmico.

Embora os valores de PER e NPR das dietas contendo farinha de soja KTI+Lec+ e KTI-Lec não tenham diferido significativamente, após 5 minutos e 10 minutos de tratamento térmico, respectivamente, dos tempos seguintes de tratamento, é evidente a tendência no aumento desses valores com o tempo de processamento. Comportamento semelhante foi encontrado por FRIEDMAN et al. (1991) que, trabalhando com dietas contendo farinha de soja com e sem KTI, observaram valores de PER estatisticamente iguais quando as farinhas foram tratadas termicamente por 20 e 30 minutos. Além disso, os valores encontrados foram também estatisticamente iguais entre essas duas dietas.

Valores de PER próximos ao deste trabalho foram encontrados por SARWAR (1997) que obteve valores de 1,3 e 3,04 para farelo de soja cru e autoclavado (121°C/20 minutos), respectivamente, em experimento com ratos. Esse mesmo material apresentou valores de NPR de 2,51 e 4, respectivamente, superiores aos verificados neste trabalho.

CARDOSO (2003) encontrou valores de PER relativo de 66,84% para dieta com farinha de soja contendo KTI, autoclavada a 120°C/18 minutos, e 59,2% para dieta contendo farinha de soja sem KTI, processada a 120°C/12 minutos, inferiores aos obtidos neste trabalho que foram aproximadamente 72% e 70%, respectivamente. No entanto, aquele autor obteve para essas mesmas amostras, valores de NPR relativo de 82,14% e de 70,80%, respectivamente, bem superiores aos encontrados neste trabalho que foram próximos de 66 e 60%.

4.6.3. Efeito do tratamento térmico nos valores de digestibilidade verdadeira *in vivo* e de índice de utilização protéica líquida (NPU)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13 nota-se que o tratamento térmico promoveu aumento significativo dos valores de digestibilidade verdadeira das dietas à base de farinha de soja KTI+Lec+, variando de 82,79 a 88,32%. Entretanto, os valores de digestibilidade verdadeira para as dietas contendo farinha de soja KTI-Lec-, que variaram de 86,92 a 91,22%, foram estatisticamente iguais nos diferentes tempos de tratamento térmico, apesar da tendência no aumento desses valores. Além disso, os valores de digestibilidade verdadeira das dietas contendo soja KTI+Lec+ e KTI-Lec- foram estatisticamente iguais em todos os tempos de tratamento térmico utilizados.

Tabela 13 – Digestibilidade protéica verdadeira *in vivo* absoluta e relativa, NPU e NPU relativo (RNPU) das dietas contendo farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

Dietas	Tempo de tratamento térmico (minutos)	Digestibilidade verdadeira (%) *	Digestibilidade verdadeira relativa (%)	NPU *	RNPU (%)
Caseína	--	98,59 ± 0,77 ^A	100	59,83 ± 1,62 ^A	100
KTI+Lec+	0	82,79 ± 1,86 ^D	83,97	21,99 ± 6,73 ^D	36,75
KTI-Lec-	0	86,72 ± 5,49 ^{BCD}	87,96	31,55 ± 4,57 ^C	52,73
KTI+Lec+	5	83,99 ± 1,63 ^{CD}	85,19	32,09 ± 3,44 ^{BC}	53,63
KTI-Lec-	5	87,11 ± 0,81 ^{BCD}	88,35	33,51 ± 2,45 ^{BC}	56
KTI+Lec+	10	87,51 ± 2,98 ^{BCD}	88,83	35,35 ± 4,10 ^{BC}	59,08
KTI-Lec-	10	87,70 ± 1,52 ^{BCD}	88,95	37,29 ± 2,67 ^{BC}	62,32
KTI+Lec+	15	88,32 ± 3,14 ^{BC}	89,58	36,90 ± 3,08 ^{BC}	61,67
KTI-Lec-	15	91,22 ± 3,38 ^B	92,52	39,53 ± 2,74 ^{BC}	66,07
KTI+Lec+	25	89,56 ± 2,08 ^B	90,84	40,78 ± 1,88 ^B	68,16
KTI-Lec-	25	90,91 ± 1,98 ^B	92,21	36,55 ± 2,18 ^{BC}	61,08

*Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra igual não diferem entre si a 5% pelo teste Tukey.

Segundo OLGUIN et al. (2003) interações entre proteínas e outros componentes, a presença de oligossacarídeos e compostos associados a fibras em dietas à base de soja podem ocasionar aumento na proliferação microbiana implicando em excreção aumentada de nitrogênio, resultando em diminuição dos valores de digestibilidade aparente de nitrogênio.

MIURA et al. (2001) observaram que dietas à base de farinhas de soja com e sem KTI, submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico, apresentaram coeficientes de digestibilidade verdadeira estatisticamente iguais. Aqueles autores atribuíram estes resultados a um menor consumo e excreção nos tratamentos com farinha de soja crua e maior consumo e excreção nos tratamentos com farinha de soja processada.

MONTEIRO et al. (2003) obtiveram valores de digestibilidade verdadeira relativa à caseína de 88,16% e 93,4% para dietas à base de farinha de soja integrais não processadas, com e sem KTI, respectivamente. Neste trabalho, os valores encontrados foram inferiores, sendo de 83,97% para dieta contendo farinha da soja convencional e de 87,96% para aquela contendo farinha de soja isenta de KTI.

CARDOSO (2003) avaliou a digestibilidade verdadeira relativa de dietas à base de farinhas de soja com KTI, processada a 120°C/18 minutos, e sem KTI, autoclavada a 120°C/12 minutos, e encontrou valores de 87,54% e 85,35%, respectivamente. Neste trabalho, com 15 minutos de tratamento térmico foram obtidos valores de digestibilidade verdadeira próximos a 90% e, portanto, superiores aos valores relatados por CARDOSO (2003).

Como a digestibilidade de proteínas de soja é muito influenciada pela quantidade de inibidores de tripsina (VASCONCELOS et al., 2001), diferenças nos valores de digestibilidade encontrados em diferentes experimentos podem ocorrer devido a variações da quantidade e dos tipos de inibidores presentes em diferentes linhagens de soja (TAN-WILSON et al., 1987; ARMOUR et al., 1998) e a diferentes metodologias empregadas para a inativação desses fatores antinutricionais (PERILLA et al., 1997; FARAG, 1998; MONTEIRO et al., 2003).

Os resultados de NPU apresentados na Tabela 13 mostram que, ao contrário dos outros parâmetros nutricionais avaliados, houve diferença significativa entre as dietas à base de farinha de soja não processada. Portanto, a farinha de soja crua KTI-Lec foi melhor para manutenção de pesos de ratos que a farinha de soja convencional

crua. Como observado para a digestibilidade verdadeira, os valores de NPU de dietas contendo farinhas de soja KTI-Lec-, processadas termicamente, foram estatisticamente iguais, apesar desses valores também terem apresentado tendência de aumento com o tempo de tratamento térmico.

Os valores de NPU relativo encontrados neste trabalho estão próximos daqueles encontrados por VASCONCELOS et al. (2001) que avaliaram dois diferentes cultivares brasileiros de soja. Esses autores obtiveram valores de NPU relativo à ovoalbumina de 43,37% para dieta à base de farinha de cultivar Rio Balsas e de 33,54% para a dieta contendo farinha do cultivar Bays. Quando a farinha desse segundo cultivar foi tratada termicamente, o valor de NPU relativo da dieta contendo esta farinha foi de 74,25%, sendo superior ao encontrado neste trabalho.

Os resultados obtidos de PER, NPR, NPU e ganho de peso, foram dependentes da quantidade de inibidores de tripsina presente na farinha de soja crua. Logo, houve melhora na qualidade nutricional de farinhas de soja KTI+Lec+ e KTI-Lec-, tratadas termicamente, em relação às farinhas *in natura*. MIURA et al. (2001), em seu estudo com farinhas de soja desengorduradas com e sem KTI, processadas a 95°C por diferentes tempos, também encontraram esta relação entre a quantidade de inibidores de tripsina e os valores de PER e NPR.

FRIEDMAN et al. (1991) verificaram que seria necessário menor tempo de tratamento térmico sobre a isolinha de soja isenta de inibidor Kunitz, em relação à linhagem convencional, para maximizar o potencial dessa fonte protéica para o crescimento e desenvolvimento de ratos. Porém, neste trabalho não foi verificado este comportamento para a isolinha utilizada.

Inibidores de proteases e lectinas presentes em sementes de soja crua diminuem a qualidade nutricional de soja pelo comprometimento do desenvolvimento de animais (PERILLA et al., 1997; DOUGLAS et al., 1999). Portanto, seria esperado que, com a utilização de isolinha de soja sem KTI e lectina, sua qualidade nutricional fosse superior a de linhagens convencionais, principalmente levando-se em consideração a aplicação de tratamento térmico para maximizar o valor nutricional dessa isolinha. Contudo, isso não foi observado neste trabalho.

ARMOUR et al. (1998) também obtiveram resultados muito semelhantes aos deste trabalho. Esses autores avaliaram o desempenho de ratos submetidos a dietas contendo farinhas *in natura* de dois cultivares de soja, um dos quais contendo teor

reduzido de lectina e de inibidores de tripsina e quimotripsina. Observou-se que, com exceção dos pesos de intestino delgado e de pâncreas, o desempenho de ratos submetidos a dietas contendo farinha crua desses dois cultivares de soja foi estatisticamente igual. Logo, a contribuição geral de lectina ou de inibidores de protease para o baixo desempenho dos animais foi pequena. Portanto, outros fatores podem ser responsáveis por boa parte dessa deficiente utilização da soja *in natura* como fonte protéica para o crescimento.

TURNER e LIENER (1975) avaliaram a qualidade nutricional de extratos *in natura* obtidos a partir de farinhas de soja desengorduradas com e sem lectina. Os autores observaram valores estatisticamente iguais de PER e ganho de peso quando ratos foram alimentados com dietas contendo esses diferentes extratos como única fonte protéica.

Segundo KAKADE et al. (1972), outro fator não relacionado a inibidores de tripsina e capaz de causar hipertrofia pancreática e inibição de crescimento pode estar presente em soja crua. Aqueles autores sugerem que, além do teor de aminoácidos sulfurados e inibidores termolábeis de crescimento, outros fatores podem estar envolvidos no valor nutricional de proteínas de soja.

SAMBETH et al. (1967) estudaram o efeito de diferentes frações de concentrado protéico de soja no desempenho de frangos. Esses autores concluíram que os efeitos antinutricionais observados podem ser o resultado das interações de diversos componentes presentes nas diferentes frações de soja estudadas. Além disso, estas interações parecem atuar de maneira sinérgica.

5. CONCLUSÕES

A farinha *in natura* obtida da isolinha de soja KTI-Lec- apresentou valor de inibição de tripsina significativamente menor em comparação à farinha *in natura* da linhagem KTI+Lec+ confirmando a eliminação do inibidor Kunitz. Entretanto, o valor de inibição de tripsina observado para a isolinha ainda foi relativamente elevado, sugerindo a presença de outros compostos presentes na matriz protéica da soja capazes de inibir tripsina.

O tratamento térmico em autoclave utilizado neste trabalho foi efetivo na eliminação de urease e dos fatores antinutricionais lectina e inibidores de tripsina presentes nas farinhas das duas linhagens de soja utilizadas. Essa inativação aumentou com o tempo de tratamento térmico, sendo que, com 15 minutos de processamento, foi superior a 92%.

Urease e inibidores de tripsina foram menos sensíveis ao tratamento térmico em comparação à lectina que foi completamente inativada com 25 minutos de processamento.

Ao mesmo tempo, constatou-se que o tratamento térmico não promoveu acentuada desnaturação protéica nas farinhas das duas linhagens utilizadas, mesmo com a inativação da maior parte dos fatores antinutricionais avaliados.

O tratamento térmico melhorou a qualidade nutricional das farinhas obtidas da linhagem KTI+Lec+ e da isolinha KTI-Lec-. Quando a farinha de soja da linhagem KTI+Lec+ foi autoclavada por 5 minutos, os valores de PER, NPR e de ganho de peso aumentaram significativamente para a dieta contendo essa farinha. Por outro lado, foram necessários 10 minutos de tratamento térmico para que houvesse melhora significativa nos valores de PER e de NPR para dietas contendo a farinha de soja da isolinha KTI-Lec-, enquanto 15 minutos de tratamento foram necessários para o aumento no ganho de peso.

O tratamento térmico também proporcionou uma melhora significativa nos valores de NPU e de digestibilidade verdadeira de dietas contendo farinha de linhagem de soja KTI+Lec+, o que não foi observado nas dietas contendo farinha da isolinha KTI-Lec-.

Com exceção dos valores de NPU para dietas contendo farinhas *in natura* da linhagem de soja KTI+Lec+ e da isolinha KTI-Lec-, aqueles obtidos para as outras

dietas, assim como os valores de PER, NPR, ganho de peso e de digestibilidade verdadeira, foram estatisticamente iguais comparando-se as duas linhagens avaliadas. Portanto, outros compostos estáveis ao calor com propriedades inibidoras de proteases podem estar presentes em soja causando baixo desempenho em ratos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTAZZI, P. Clinical use of soy products. **International Congress Series**, v.1229, p.189–193, 2002.

ANDERSON-HAFERMANN, J. C., ZHANG, Y., PARSONS, C. M. Effect of heating on nutritional quality of conventional and Kunitz trypsin inhibitor-free soybeans. **Poultry Science**, v.71, n.10, p.1700-1709, 1992.

AOYAMA, H., CAVAGIS, A. D. M., TAGA, E. M., FERREIRA, C. V. Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. **Phytochemistry**, v.58, n.2, p.221-225, 2001.

ARABA, M., DALE, N. M. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. **Poultry Science**, v.69, p.76-83, 1990.

ARASON, G. J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish & Shellfish Immunology**, v.6, n.4, p.277–289, 1996.

ARMOUR, J. C., PERERA, R. L. C., BUCHAN, W. C., GRANT, G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.78, n.2, p.225-231, 1998.

ARNDT, R. A., HARDY, R. W., SUGIURA, S. H., DONG, F. M. Effects of heat treatment and substitution level on palatability and nutritional value of soy defatted flour in feeds for Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Aquaculture**, v.180, n.1-2, p.129–145, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Washington, D.C: 1984. 1141p.

BAJPAI, S., SHARMA, A., GUPTA, M. N. Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry**, v.89, n.4, p.497–501, 2005.

BARBOSA, M. C. A. **Determinação de inibidores de proteases em soja e seus derivados protéicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 61p. Tese (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

BIDLINGMEYER, U. V., LEARY, T. R., LASKOWSKI JR., M. Identity of the tryptic and -chymotryptic reactive sites on soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **Biochemistry**, v. 11, n.17, p.3303-3310, 1972.

BRASIL. Portaria nº 108, de 04/09/1991. Estabelece os Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17/09/1991. Seção I, p.19813-19842.

BRAUER, A. B. E., DOMINGO, G. J., COOKE, R. M., MATTHEWS, S. J., LEATHERBARROW, R. J. A conserved *cis* peptide bond is necessary for the activity of Bowman-Birk inhibitor protein. **Biochemistry**, v.41, n.34, p.10608-10615, 2002.

BRAUER, A. B. E., LEATHERBARROW, R. J. The conserved P1' Ser of Bowman-Birk-type proteinase inhibitors is not essential for the integrity of the reactive site loop. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.308, n.2, p.300-305, 2003.

BURNS, R. A. Protease inhibitors in processed plant foods. **Journal of Food Protection**, v.50, n.2, p.161-166, 1987.

BUS, A. E. M., WORSLEY, A. Consumers' health perceptions of three types of milk: a survey in Australia. **Appetite**, v.40, n.2, p.93–100, 2003.

BUTTLE, L. G., BURRELLS, A. C., GOOD, J. E., WILLIAMS, P. D., SOUTHGATE, P. J., BURRELLS, C. The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.80, n.3-4, p.237-244, 2001.

CAINE, W. R., VERSTEGEN, M. W. A., SAUER, W. C., TAMMINGA, S., SCHULZE, H. Effect of protease treatment of soybean meal on content of total soluble matter and crude protein and level of soybean trypsin inhibitors. **Animal Feed Science and Technology**, v.71, n.1-2, p.177–183, 1998.

CARDOSO, L. R. **Caracterização bromatológica e digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de farinhas de soja**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 78p. Tese (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

CARVALHO, W. L., OLIVEIRA, M. G. A., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Lipoxygenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, n.6, p.497-501, 1999.

CHIECHI, L. M., SECRETO, G., D'AMORE, M., FANELLI, M., VENTURELLI, E., CANTATORE, F., VALÉRIO, T., LASELVA, G., LOIZZI, P. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. **Maturitas**, v. 42, n.4, p.295-300, 2002.

CHRISPEELS, M. J., RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, v.3, n.1, p.1-9, 1991.

DESAI, N. N., ALLEN, A. K., NEUBERGER, A. Studies on the chemical modification of soybean agglutinin. **Carbohydrate Research**, v.178, p.183-190, 1988.

DHINGRA, S., JOOD, S. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. **Food Chemistry**, v.77, n.4, p.479–488, 2002.

DIPIETRO, C. M., LIENER, I. E. Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, n.1, p.39-44, 1989.

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, n.6, p.1502-1505, 1992.

DOUGLAS, M. W., PARSONS, C. M., HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. **Poultry Science**, v.78, p.91-95, 1999.

EMMERT, J. L., BAKER, D. H. Protein quality assessment of soy products. **Nutrition Research**, v.15, n.11, p.1647-1656, 1995.

EYES, J. E. Soy and soybean meal use in the feed industry: formulation and quality considerations, 2002. <http://www.asa-europe.org/pdf/soyandsbm.pdf>, acessado dia 03/03/2005.

FARAG, M. D. E.-D. H. The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60 kGy. **Animal Feed Science and Technology**, v.73, n.3-4, p.319-328, 1998.

FRIEDMAN, M., BRANDON, D. L., BATES, A. H., HYMOWITZ, T. Comparison of a commercial soybean cultivar and an isoline lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effects of heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.2, p.327-335, 1991.

FRIEDMAN, M., BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, p.1069-1086, 2001.

FRIEDMAN, M., GROSJEAN, O.-K. K., ZAHNLEY, J. C. Inactivation of soya bean trypsin inhibitors by thiols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.33, n.2, p.165-172, 1982.

FRIEDMAN, M., GUMBMAN, M. R., GROSJEAN, O.-K. K. Nutritional improvement of soy flour. **Journal of Nutrition**, v.114, n.12, p.2241-2246, 1984.

GOLDBERG, R. B., HOSCHEK, G., VODKIN, L. O. An insertion sequence blocks the expression of a soybean lectin gene. **Cell**, v.33, n.2, p.465-475, 1983.

GRANT, G., HENDERSON, L. T., EDWARDS, J. E., EWAN, E. C., BARDOCZ, S., PUSZTAI, A. Kidney bean and soybean lectins cause enzyme secretion by pancreatic acini *in vitro*. **Life Sciences**, v.60, n.18, p.1589-1595, 1997.

HAJÓS, G., GELENCSÉR, E., PUSZTAI, A., GRANT, G., SAKHRI, M., BARDOCZ, S. Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.1, p.165-170, 1995.

HASDAI, A., NITSAN, Z., VOLCANI, R., BIRK, Y. Growth, digestibility and enzyme activities in the pancreas and intestines of guinea-pigs fed on raw and heated soya-bean flour. **British Journal of Nutrition**, v.62, p.529-537, 1989.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, n.4, p.320-326, 1999.

HWANG, D. L.-R., LIN, K.-T. D., YANG, W.-K., FOARD, D. E. Purification, partial characterization and immunological relationships of multiple low molecular weight protease inhibitors of soybean. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.495, n.2, p.369-382, 1977.

IWE, M. O., van ZUILICHEM, D. J., NGODDY, P. O., LAMMERS, W. Amino acid and protein dispersibility index (PDI) of mixtures of extruded soy and sweet potato flours. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.34, p.71-75, 2001.

JAFFE, C. L., EHRLICH-ROGOZINSKI, S., LIS, H., SHARON, N. Transition metal requirements of soybean agglutinin. **FEBS LETTERS**, v.82, n.2, p.191-196, 1977.

JENSEN, B., UNGER, K. K., UEBE, J., GEY, M., KIM, Y.-M., FLECKER, P. Proteolytic cleavage of soybean Bowman-Birk inhibitor monitored by means of high-performance capillary electrophoresis. Implications for the mechanism of proteinase inhibitors. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.33, n.3, p.171-185, 1996.

JOFUKU, K. D., GOLDBERG, R. B. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. **The Plant Cell**, v.1, n.11, p.1079-1093, 1989.

JOFUKU, K. D., SCHIPPER, R. D., GOLDBERG, R. B. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. **The Plant Cell**, v.1, n.4, p.427-435, 1989.

JORDINSON, M., PLAYFORD, R. J., CALAM, J. Effects of a panel of dietary lectins on cholecystokinin release in rats. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.36, p.G946-G950, 1997.

KAKADE, M. L., SIMONS, N. R., LIENER, I. E., LAMBERT, J. W. Biochemical and nutritional assessment of different varieties of soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, n.1, p.87-90, 1972.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68 (suppl), p.1406S-1412S, 1998.

KIM, S.-H., HARA, S., HASE, S., IKENAKA, T., TODA, H., KITAMURA, K., KAIZUMA, N. Comparative study on aminoacid sequences of Kunitz-tipe soybean trypsin inhibitors, Ti^a, Ti^b e Ti^c. **Journal of Biochemistry**, v.98, n.2, p.435-448, 1985.

KORDÁS, K., BURGHARDT, B., KISFALVI, K., BARDOCZ, S., PUSZTAI, A., VARGA, G. J. Diverse effects of phytohaemagglutinin on gastrointestinal secretions in rats. **Journal of Physiology (Paris)**, v.94, n.1, p.31-36, 2000.

KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v.160, n.5, p.979–986, 2001.

KUMAR, V., RANI, A., TINDWANI, C., JAIN, M. Lipoyxygenase isozymes and trypsin inhibitor activities in soybean as influenced by growing location. **Food Chemistry**, v.83, n.1, p.79–83, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p.680-685, 1970.

LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I. S. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6592-6598, 2002.

LIENER, I. E. Trypsin inhibitors: concern for human nutrition or not? **Journal of Nutrition**, v.116, n.5, p.920-923, 1986.

LIENER, I. E., GOODALE, R. L., DESHMUKH A., SATTERBERG, T. L., WARD, G., DIPIETRO, C. M., BANKEY, P. E., BORNER, J. W. Effect of a trypsin inhibitor from soybeans (Bowman-Birk) on the secretory activity of the human pancreas. **Gastroenterology**, v.94, p.419-427, 1988.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.31-67, 1994.

LIENER, I. E. Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. **Journal of Nutrition**, v.125, p.744S-750S, 1995.

LIS, H., SHARON, N., KATCHALSKI, E. Soybean hemagglutinin, a plant glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.241, n.3, p.684-689, 1966.

LIS, H., SELA, B.-A., SACHS, L., SHARON, N. Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Biomembranes**, v.211, n.3, p.582-585, 1970.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997, 532p.

LJOKJEL, K., HARSTAD, O. M., SKREDE, A. Effect of heat treatment of soybean meal and fish meal on amino acid digestibility in mink and dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.84, n.1-2, p.83-95, 2000.

LOTAN, R., CACAN, R., CACAN, M., DEBRAY, H., CARTER, W. G., SHARON, N. On the presence of two types of subunit in soybean agglutinin. **FEBS LETTERS**, v.57, n.1, p.100-103, 1975.

LOTAN, R., SIEGELMAN, H. W., LIS, H., SHARON, N. Subunit structure of soybean agglutinin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, n.4, p.1219-1224, 1974.

MAENZ, D. D., IRISH, G. G., CLASSEN, H. L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, n.3-4, p.335-343, 1999.

McBRIDE, J. D., BRAUER, A. B. E., NIEVO, M., LEATHERBARROW, R. J. The role of threonine in the P 2 position of Bowman-Birk proteinase inhibitors: studies on P 2 variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. **Journal of Molecular Biology**, v.282, n.2, p.447-457, 1998.

McNAUGHTON, J. L., REECE, F. N., DEATON, J. W. Effect of moisture content and cooking time on soybean meal urease index, trypsin inhibitor content and broiler growth. **Poultry Science**, v.59, n.10, p.2300-2306, 1980.

MIURA, E. M. Y., BINOTTI, M. A. R., CAMARGO, D. S., MIZUBUTI, I. Y., IDA, E. I. Avaliação biológica de soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.51, n.2, p.195-198, 2001.

MONTEIRO, M. R. P., MOREIRA, M. A., COSTA, N. M. B., OLIVEIRA, M. G. A., PIRES, C. V. Evaluation of protein digestibility in soybean genotypes with and without the Kunitz trypsin inhibitor and lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.99-107, 2003.

MOREIRA, M. A., HERMODSON, M. A., LARKINS, B. A., NIELSEN, N. C. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.254, n.19, p.9921-9926, 1979.

MWATSAMA, M. K. Soya, phytoestrogens and health what is the role of equol?. **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, v.28, p.135–137, 2003.

MYERS, B. A., HATHCOCK, J., SHIEKH, N., ROEBUCK, B. D. Effects of dietary soya bean trypsin inhibitor concentrate on initiation and growth of putative preneoplastic lesions in the pancreas of the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.29, n.7, p.437-443, 1991.

OBATOLU, V. A. Nutrient and sensory qualities of extruded malted or unmalted millet/soybean mixture. **Food Chemistry**, v.76, n.2, p.129-133, 2002.

OLGUIN, M. C., HISANO, N., D'OTTAVIO, A. E., ZINGALE, M. I., REVELANT, G. C., CALDERARI, S. A. Nutritional and antinutritional aspects of an Argentinian soy flour assessed on weaning rats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, n.4, p.441-449, 2003.

OLIVEIRA, M. L., BELTRAMINI, L. M., SIMONE, S. G., BRUMANO, M. H. N., SILVA-LUCCA, R. A., NAKAEMA, M. K. K., PIRES, C. V., OLIVEIRA, M. G. A. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.2, p.119-122, 2003.

ORF, J. H., HYMOWITZ, T. Genetics of the Kunitz trypsin inhibitor: an antinutritional factor in soybeans. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.56, p.722-726, 1978.

OSMAN, M. A., REID, P. M., WEBER, C. W. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. **Food Chemistry**, v.78, n.4, p.419-423, 2002.

PALACIOS, M., EASTER, R. A., HYMOWITZ, T., SOLTWEDEL, K. T., PETTIGREW, J. E. Effect of soybean variety and processing on growth performance of young pigs, 2002. http://www.hoginfo.com/pubs/topics/Nursey_Management/Soybean_Products, acessado dia 05/05/2005.

PARSONS, C. M., HASHIMOTO, K., WEDEKIND, K. J., BAKER, D. H. Soybean protein solubility in potassium hydroxide: an *in vitro* test of *in vivo* protein quality. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2918-2924, 1991.

PERILLA, N. S., CRUZ, M. P., BELALCÁZAR, F., DIAZ, G. J. Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soybeans for broiler chickens. **British Poultry Science**, v.38, n.4, p.412-416, 1997.

PRISCHMANN, J. A., HYMOWITZ, T. Inheritance of double nulls for protein components of soybean seed. **Crop Science**, v.28, n.6, p.1010-1012, 1988.

QIN, G., ELST, E. R., BOSCH, M. W., van der POEL, A. F. B. Thermal processing of whole soya beans: studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.313-324, 1996.

QIN, G. X., VERSTEGEN, M. W. A., van der POEL, A. F. B. Effect of temperature and time during steam treatment on the protein quality of full-fat soybeans from different origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.3, p.393-398, 1998.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951. 1993.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, v.16, n.2, p.159-169, 1977.

SAKLA, A. B. GHALI, Y., EI-FARRA, A., RIZK, L. F. The Effect of environmental conditions on the chemical composition of soybean seeds: deactivation of trypsin inhibitor and effect of microwave on some components of soybean seeds. **Food Chemistry**, v.29, n.4, p.269-274, 1988.

SAMBETH, W., NESHEIM, M. C., SERAFIN, J. A. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. **Journal of Nutrition**, v.92, n.4, p.479-490, 1967.

SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, v.127, n.5, p.758-764, 1997.

SCARPI, D., OCCHIATO, E. G., TRABOCCHI, A., LEATHERBARROW, R. J., BRAUER, A. B. E., NIEVO, M., GUARNA, A. Introduction of the new dipeptide isostere 7-endo-BtA as reverse turn inducer in a Bowman-Birk proteinase inhibitor: synthesis and conformational analysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.9, n.6, p.1625–1632, 2001.

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

SILVA, M. R., SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição, Campinas**, v.13, n.1, p.3-9, 2000.

SONG, H. K., SUH, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina Caffra* and tissue-type plasminogen activator. **Journal of Molecular Biology**, v.275, n.2, p.347-363, 1998.

SRIHARA, P., ALEXANDER, J. C. Effect of heat treatment on nutritive quality of plant protein blends. **Can. Inst. Food Sci. Technol.**, v.17, n.4, p.237-241, 1984.

STAHLHUT, R. W., HYMOWITZ, T. Variation in the low molecular weight proteinase inhibitors of soybeans. **Crop Science**, v.23, n.4, p.766-769, 1983.

STRUTHERS, B. J., MaCDONALD, J. R., DAHLGREN, R. R., HOPKINS, D. T. Effects on the monkey, pig and rat pancreas of soy products with varying levels of trypsin inhibitor and comparison with the administration of cholecystokinin. **Journal of Nutrition**, v.113, n.1, p.86-97, 1983.

TAN-WILSON, A. L., Subclassification of soybean Bowman-Birk isoinhibitors. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.65, n.9, p.1475-1478, 1988.

TAN-WILSON, A. L., CHEN, J. C., DUGGAN, M. C., CHAPMAN, C., OBACH, R. S., WILSON, K. A. Soybean Bowman-Birk trypsin isoinhibitors: classification and report of a glycine-rich trypsin inhibitor class. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, n.6, p.974-981, 1987.

THANH, V. H., SHIBASAKI, K. J. Heterogeneity of beta-conglycinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.439, n.2, p.326-338, 1976.

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

TRUGO, L. C., DONANGELO, C. M., TRUGO, N. M. F., KNUDSEN, K. E. B. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2082-2086, 2000.

TURNER, R. H., LIENER, I. E. The effect of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, n.3, p.484-486, 1975.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 7.1. Viçosa, MG: 1997. 150p. (Manual do usuário).

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, n.1, p.55-62, 2001.

VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v.44, n.4, p.385-403, 2004.

VODKIN, L. O., RHODES, P. R., GOLDBERG, R. B. cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. **Cell**, v.34, n.3, p.1023-1031, 1983.

WANG, K. - J., KAIZUMA, N., TAKAHATA, Y., HATAKEYAMA, S.,. Detection of two new variants of soybean Kunitz trypsin inhibitor through electrophoresis. **Breeding Science**, v.46, p.39-44, 1996.

WHITE, C. E., CAMPBELL, D. R., McDOWELL, L.R. Effects of dry matter content on trypsin inhibitors and urease activity in heat treated soya beans fed to weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, n.1-2, p.105-115, 2000.

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

7. APÊNDICE

Tabela 1 – Resumo da análise de variância dos resultados de índice de urease das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM
Amostra	1	1,14*
Tempo	4	4,25*
Amostra x tempo	4	0,50*
Resíduo	20	0,00053

CV (%) = 2,45

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos resultados de inibição de tripsina das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM
Amostra	1	142,48*
Tempo	4	1109,47*
Amostra x tempo	4	38,58*
Resíduo	20	4,73

CV (%) = 4,23

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos resultados de solubilidade protéica das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM
Amostra	1	128,36
Tempo	4	71,68*
Amostra x tempo	4	0,24
Resíduo	20	0,27

CV (%) = 0,72

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância dos resultados de atividade hemaglutinante das farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM
Amostra	1	15232,53*
Tempo	4	4155,20*
Amostra x tempo	4	4155,20*
Resíduo	50	9,07

CV (%) = 13,36

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância dos resultados de ganho de peso de ratos alimentados com dietas contendo farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM
Tratamento	10	927,11 *
Resíduo	55	51,54

CV (%) = 17,40

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância dos resultados de PER e NPR das dietas contendo farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM	
		PER ¹	NPR ²
Tratamento	10	1,98 *	2,41 *
Resíduo	55	0,075	0,10

¹CV (%) = 9,96; ²CV (%) = 15,95

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância dos resultados de digestibilidade verdadeira e NPU das dietas contendo farinhas de soja submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico

FV	GL	QM	
		Digestibilidade verdadeira ¹	NPU ²
Tratamento	10	105,39 *	501,47 *
Resíduo	55	7,05	22,48

¹CV (%) = 2,99; ²CV (%) = 12,87

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.