

Estoque

Proc. N.º 125/73
Rub.

Fls. A a E
1 a 86

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO

ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DA SOJA

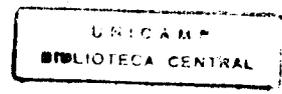
Pedro Luiz Antunes
Eng.º. Agrônomo

Orientador

VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI, PH.D.
Professor da FTA/UNICAMP

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

T
109



AGRADECIMENTOS

Ao orientador e amigo, Professor Valdemiro Carlos Sgarbieri, Ph.D., por sua orientação inteligente, objetiva e sempre presente.

Ao Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas e do Curso de Pós-Graduação, pelo dimensionamento técnico-científico que caracterizam sua atuação.

Ao Doutor Guido Kaster, Diretor da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio e incentivo em cada etapa deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e à CAPES, na pessoa de seus dirigentes, pelo suporte financeiro e facilidades para realização deste trabalho.

A todos os Professores que participaram do Curso e, em especial, ao Dr. R. Moretti, ao Dr. Y. Park, ao Dr. L. Hartmann, ao Dr. R. Rohr e à Senhora Astrid Sgarbieri, pelo carinho no auxílio à solução de muitos problemas.

A minhas amigas Maria Inez Reis, Maritza Guerra e Marlene Andrade, pelo companheirismo.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial, à Senhora Angelina Godoy e Senhoritas Masako Toma, Tania Haddad, Adelaide Costa, Terezinha Nobre e Maria Noêmia Almeida.

...))) • (((...

	página
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material	24
3.1.1. Amostras de Soja	24
3.1.2. Ingredientes (Nutrientes) para os Ensa- ios Biológicos	24
3.1.3. Reativos	25
3.1.4. Aparelhos e Equipamentos	25
3.1.5. Animais Utilizados nos Ensaaios	25
3.2. Métodos	26
3.2.1. Preparo das Amostras no Laboratório ...	26
3.2.2. Análises Químicas e Físicas	27
3.2.2.1. Umidade	27
3.2.2.2. Nitrogênio Total	27
3.2.2.3. Nitrogênio não Protéico	28
3.2.2.4. Efeito da Relação Sólido:Sol- vente na Extração de Compostos Nitrogenados da Soja	28
3.2.2.5. Solubilidade das Proteínas da Soja em Função do Tratamento Térmico	28
3.2.2.6. Solubilidade das Proteínas da Soja em Função da Concentra- ção de KOH e pH Final do Ex- trato	29
3.2.2.7. Inativação da Urease da Soja em Função do Tempo de Trata- mento Térmico	29
3.2.2.8. Determinação da Lisina Dispo- nível da Soja.....	29
3.2.2.9. Atividade da Tripsina	30

3.2.2.10.	Determinação da Atividade do Fator Antitripsina da Soja ...	30
3.2.2.11.	Medida da Atividade da Hemaglutinina da Soja	31
3.2.3.	Ensaio Biológico	32
3.2.3.1.	Preparo das Dietas para os Ensaio Biológico	32
4.	RESULTADOS	35
4.1.	Análises Químicas e Físicas	35
4.2.	Efeito da Relação Sólido:Solvente na Extração dos Compostos Nitrogenados da Soja	37
4.3.	Solubilidade das Proteínas da Soja em Função do Tratamento Térmico	38
4.4.	Solubilidade das Proteínas da Soja em Função da Concentração de KOH e pH Final do Extrato..	38
4.5.	Inativação da Urease em Função do Tempo de Tratamento Térmico	41
4.6.	Determinação da Lisina Disponível da Soja ...	41
4.7.	Atividade da Tripsina	44
4.8.	Determinação da Atividade do Fator Antitripsina da Soja	47
4.9.	Inativação do Fator Antitripsina na Soja em Grão em Função do Tratamento Térmico	47
4.10.	Inativação da Hemaglutinina da Soja pelo Tratamento Térmico	51
4.11.	Correlação Gráfica entre a Inativação do Fator Antitripsina, da Urease e a Perda de Solubilidade das Proteínas da Soja	54
4.12.	Ensaio Biológico	58
4.13.	Confronto entre o Valor Nutricional (PER) e Análises Físico-Químicas das Proteínas da Soja	62
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	64
5.1.	Análises Químicas e Físicas	64
5.2.	Efeito da Relação Sólido:Solvente na Extração dos Compostos Nitrogenados da Soja	64
5.3.	Solubilidade das Proteínas de Soja em Água em Função do Tratamento Térmico	65
5.4.	Solubilidade das Proteínas da Farinha de Soja em Função da Concentração de KOH e pH Final do Extrato	66

5.5. Inativação da Urease em Função do Tempo de Tratamento Térmico	67
5.6. Determinação da Lisina Disponível da Soja ...	68
5.7. Atividade da Tripsina	68
5.8. Determinação da Atividade do Fator Antitripsina da Soja	69
5.9. Inativação do Fator Antitripsina e da Hemaglutinina da Soja em Função do Tratamento Térmico	70
5.10. Correlação entre a Inativação do Fator Antitripsina, da Urease e a Perda de Solubilidade das Proteínas da Soja	71
5.11. Ensaio Biológico	72
6. CONCLUSÕES	74
7. BIBLIOGRAFIA	75

QUADROS E FIGURAS

QUADROS:

QUADRO 1: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	32
QUADRO 2: COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALINA USADA NAS DIETAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS	33
QUADRO 3: COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA UTILIZADA NAS DIETAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS	34
QUADRO 4: ANÁLISES DAS SUBSTÂNCIAS NITROGENADAS EM PRODUTOS DE SOJA UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	36
QUADRO 5: EFEITO DA RELAÇÃO SÓLIDO:SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS DA SOJA ^a	37
QUADRO 6: LISINA DISPONÍVEL NA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO ^a	43
QUADRO 7: LISINA DISPONÍVEL NAS FARINHAS USADAS NAS RAÇÕES PARA OS TESTES BIOLÓGICOS	43

QUADRO 8:	INATIVAÇÃO DA ANTITRIPSINA NO EXTRATO EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO ^a	50
QUADRO 9:	INATIVAÇÃO DA HEMAGLUTININA DA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO ^a E DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	52
QUADRO 10:	INATIVAÇÃO DA HEMAGLUTININA DA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO ^a E DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	53
QUADRO 11:	QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTÉICA (PER) EM PRODUTOS DE SOJA ^a	59
QUADRO 12:	CONFRONTO ENTRE O VALOR NUTRICIONAL (PER) ^a E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS DA SOJA	63
FIGURAS:		
FIGURA 1:	SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO	39
FIGURA 2:	SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE SOJA EM FUNÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÃO DE KOH	40
FIGURA 3:	DESTRUIÇÃO TÉRMICA DA ATIVIDADE UREÁTICA DA SOJA	42
FIGURA 4:	CURVAS DE SATURAÇÃO DA TRIPSINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CASEÍNA	45
FIGURA 5:	CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE DA TRIPSINA SOBRE A CASEÍNA	46
FIGURA 6:	INATIVAÇÃO DA TRIPSINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA DA SOJA	48
FIGURA 7:	INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA NA SOJA EM GRÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO	49
FIGURA 8-A; 8-B e 8-C:	CORRELAÇÃO GRÁFICA ENTRE A INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA, DA UREASE E A PERDA DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA SOJA..	55,56,57
FIGURA 9 e 9-A:	CURVAS DE CRESCIMENTO MÉDIO DOS RATOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS (PER) ...	60,61

RESUMO

Algumas características físicas e químicas das proteínas da soja e o valor biológico (PER) foram estudados em produtos preparados no laboratório e de procedência industrial.

O tratamento térmico, na soja, é inerente à necessidade de inativação dos agentes antinutricionais. Contudo, quando em excesso, diminui a disponibilidade dos elementos nutricionais. Face a isso, estudou-se a inativação dos fatores antinutricionais mais importantes - antitripsina e hemaglutinina - em função do tempo de tratamento térmico em água fervente e das condições iniciais do preparo da amostra de soja (sem embebição, com embebição, com embebição e descorticada). Verificou-se que 25,0, 15,0 e 10,0 minutos, respectivamente, são necessários para total inativação da antitripsina nas amostras em grão e 30 minutos em autoclave a 121°C, no caso do extrato. Para a hemaglutinina, tal inativação necessitou de 45 minutos de aquecimento, nas amostras em grão, e de 7,5 minutos, no extrato. Essas determinações servem, para avaliar a eficiência do tratamento térmico nos produtos de soja. Entretanto, são de relativa complexidade, levando a indústria, em geral, a fazer tal avaliação em função da atividade ureática e da solubilidade das proteínas que se constituem em testes mais simples e mais rápidos de serem realizados. Determinou-se a atividade ureática e a solubilidade das proteínas em água, nas mesmas amostras, e estabeleceu-se um paralelo entre esses fatores e os agentes antinutricionais (antitripsina e hemaglutinina). Verificou-se que existe boa correlação gráfica entre esses fatores, quando o tratamento térmico é feito na amostra de soja sem embebição. No grão embebido, a urease é inativada muito mais rapidamente que o fator antitripsina.

Extrações, usando-se diferentes relações de sólido:solvente (farinha:água), demonstraram que a mais eficiente, para as proteínas da soja, sem tratamento térmico, foi a de 1:30 (P:V).

Estudou-se o efeito do pH e da concentração de base (KOH) na extração das proteínas da soja, constatando-se que, quanto maior for a desnaturação térmica das proteínas, maior será a

influência do aumento desses fatores na extração. Verificou-se que 0,1% de KOH promove uma extração de 70-80%, quando a soja é tratada termicamente, sendo que, em água, é inferior a 10%.

Para a soja que não sofreu tratamento térmico, encontrou-se um rápido aumento da lisina disponível, quando aquecida em água fervente até 30 minutos, notando-se um decréscimo, com tratamentos mais prolongados.

Estudos do valor nutritivo (valores de PER) foram conduzidos para as seguintes matérias, provenientes das diversas fases da indústria de processamento da soja: 1) soja triturada e sem tratamento térmico; 2) soja laminada e com pequeno tratamento térmico; 3) farelo na saída da rosca secadora; 4) farelo tostado; 5) isolado protéico de procedência industrial, na forma de proteinato de sódio. O mesmo estudo foi feito nos produtos preparados no laboratório, os quais foram triturados até granulometria de 50 mesh e que são: 6) farinha de soja de sengordurada; 7) leite integral de soja, em pó; 8) isolado protéico no ponto isoelétrico; 9) resíduo do leite de soja; 10) padrão de caseína. Os valores de PER encontrados foram, respectivamente: (-1,08); 2,24; 2,44; 2,31; 1,72; 2,66; 1,75; 2,02; 1,30 e 3,36.

SUMMARY

Some physical-chemical properties and nutritive value (PER) of soy proteins were studied on products prepared in the laboratory and on soybeans and meals from different stages of an oil industry processing line.

In the processing of soy, heat-treatment is necessary to destroy anti-nutritional factors. However, an excess of heating will decrease the availability of soy nutrients. Therefore heat-treatment for two of the most well known anti-nutritional factors - trypsin inhibitor and hemagglutinin - was studied on samples at different physical states and water contents. It was found that 25, 15 and 10 minutes in boiling water were necessary for total destruction of trypsin inhibitor activity in unsoaked beans, beans soaked in water for 12 hours and beans soaked for 12 hours and dehulled, respectively. For total destruction of trypsin inhibitor, in solution, heating for 30 minutes in autoclave (121°C) was necessary. For destruction of hemagglutinin activity in unsoaked beans it was necessary to heat 45 minutes in boiling water, whereas, only 7.5 minutes of heating of a water extract, in boiling water, was needed for complete inactivation. As these determinations are not simple enough to be used as a routine procedure for estimating the extent of heat-treatment and for quality control of soy products, industries use routinely, protein solubility and urease residual activity determination, as index of heat-processing.

For comparison purposes, urease activity and protein solubility in water were determined in all samples studied. It was shown that good apparent correlations exist between inactivation of trypsin inhibitor and urease, and, decrease in solubility of the proteins, when heat-treatment is applied on unsoaked beans or soy products and by-products with low moisture content. Good correlation seems not to exist on heated liquid products, because, with increasing water content of the beans or, of the products, urease activity and protein solubility decrease much faster than the activity of the trypsin inhibitor.

For extraction of soybean proteins the best solid:solvent ratio found was 1:30 (w/v).

Effects of concentration of KOH and pH on soy protein so-

lubility (extraction) were also studied. It was found that the effect of increasing pH and KOH concentration on improving solubility is more pronounced in denatured protein systems. It was shown that 0.1% KOH in water, extracted 70-80% of the proteins of heat-treated soy products, whereas, solubility of the same proteins in water alone was lower than 10%.

Heating soybeans in boiling water up to 30 minutes increased lysine availability and, further heating, decreased it. Heat-treatment applied by the oil industry decreased lysine availability of soybean meals.

Growth studies conducted with rats permitted the evaluation of protein efficiency ratio (PER) on by-products of the oil industry, as well as, on different products prepared in the laboratory. Calculated PER were as follows, for industry samples: 1. grinded soybean without heat-treatment (-1.08); 2. laminated grinded soybean with little heat-treatment, 2.24; 3. soybean meal after solvent extraction of oil 2.44; toasted soybean meal, 2.31; 5. commercial protein isolate, as sodium proteinate, 1.72.

The following products prepared in the laboratory were also tested: 6. defatted soybean flower, 2.66; 7. full-fat dried soymilk, 1.75; 8. isoelectric protein isolate, 2.02; 9. residue (insolubles) of soymilk extraction, 1.30; 10. casein standard, 3.36.

1. INTRODUÇÃO

A soja, originária da China Continental, em 1804 foi "transplantada" e adaptada às condições ecológicas dos Estados Unidos da América do Norte. Contudo, 100 anos após, sua produção ainda não alcançava um milhão de toneladas anuais.

No Brasil, nos estados do sul, o cultivo da soja é bem mais recente, sendo que na última década, seu desenvolvimento começou a tomar vulto. Motivou-o a necessidade dos granjeiros de trigo de diminuir o período de ociosidade tanto da terra, como dos grandes implementos agrícolas, destinados à lavoura tritícola. A soja reúne as melhores características para esse fim, pois seu plantio, coincide com a colheita do trigo (novembro-dezembro). Também, no seu manejo, são utilizadas as mesmas máquinas. Como leguminosa, serve, ainda, de excelente cultura de rotação para o trigo, que é uma gramínea.

Atualmente, estamos observando uma gigantesca arrancada na produção de soja, já garantindo ao Brasil o 3º lugar na produção mundial, com cerca de 4,5 milhões de toneladas anuais, cabendo o 2º lugar à China, enquanto os Estados Unidos, ocupam o 1º lugar, concorrendo com 70% da produção mundial (35 milhões de toneladas anuais). O grande incremento nacional na produção de soja é devido, especialmente, aos incentivos governamentais, à boa adaptação da cultura às nossas condições ecológicas, às possibilidades de total mecanização no seu manejo e ao fato de sua colheita coincidir com a entressafra dos Estados norte-americanos, o que assegura bom mercado de exportação.

Outro motivo foram as cheias nos rios Mississipi e Missouri (junho-julho de 1973 - época de colheita da soja nos Estados Unidos), que destruíram grande parte da sua colheita, obrigando o governo norte-americano a cancelar muitos dos compromissos de fornecimento de farelo de soja a países europeus e ao Japão. Isso motivou, por parte dos países consumidores, verdadeira corrida em busca da soja, beneficiando, altamente, o Brasil.

A soja é uma excelente cultura de rotação, uma vez que, sendo leguminosa, fixa o nitrogênio atmosférico ao solo, através da fixação simbiótica nos nódulos radiculares. Esse foi o principal motivo da sua introdução na América do Norte.

O valor da soja prende-se, principalmente, às suas propriedades como alimento protéico e fonte de óleo de boa qualidade. Apresenta ela alto teor de proteínas de fácil digestão e é muito rica em aminoácidos essenciais, o que a torna um bom substituto para a carne e para o próprio leite.

Industrialmente, ela se constitui num desafio ao químico e ao tecnologista, pois, atualmente, cerca de 200 produtos comerciais são preparados com a soja. Certamente, poderemos estar seguros de que, num futuro não muito distante, a soja e seus subprodutos desempenharão um papel vital e, mesmo, estratégico, na crescente necessidade que o mundo tem de proteínas. Isso, como uma reação em cadeia, rapidamente, deverá concretizar-se em realidade incontestável, já que a escassez de carne, que se faz presente, tenderá a aumentar sempre, pelo fato de a expansão demográfica estar limitando, cada vez mais, as áreas pastoris. Por outro lado, a carne é um produto que, dado o seu preço elevado, não está ao alcance de todos para o consumo diário.

A soja, que, certamente, representa a fonte mais importante de proteínas de origem vegetal para a humanidade, também se constitui na proteína de mais baixo custo que se conhece. Isso se deve à grande produtividade por hectare e por ser a mesma de alto teor em proteínas. Para dar apenas alguns exemplos: a carne bovina apresenta um custo comparativo de \$ 32,00/Kg de proteínas e uma produção média de carne de 300 Kg/ha, ou seja, 60 Kg de proteínas; para o leite desnatado em pó, tais valores são respectivamente, \$ 18,00/Kg, 2.200 Kg/ha e 80 Kg de proteínas; para a soja integral, tais valores são, respectivamente, \$ 1,80/Kg, 1.400 Kg/ha e 560 Kg de proteínas.

Mesmo sendo alimento de grande valor nutricional, completo e quase perfeito em muitos aspectos, ainda não conseguiu ocupar o lugar que merece na dieta do homem moderno, devido ao seu paladar "antiocidental", que os americanos chamam de gosto "Painty" ou "Beany".

A despeito de tudo o que foi dito em prol das boas qualidades da soja, estão os agentes antinutricionais que, enormemente, depreciam suas características biológicas, tornando-a tóxica, quando ministrada no estado nativo ou quando tenha sofrido processamento não devidamente adequado. Os fatores antinutricionais, de que se tem notícia na soja, são: 1) antitrip

sina: funciona como anti-enzima inibidora da enzima digestiva tripsina; 2) hemaglutinina: promove a coagulação do sangue de várias espécies de animais, bem como a aglutinação de eritrócitos lavados; 3) bocigênico: responsável pela formação do bôcio (papeira); 4) saponina: responsável pela ruptura de eritrócitos "in vitro".

Para os químicos e bioquímicos, o propósito principal dos investigadores é adquirir conhecimentos mais detalhados sobre os agentes antinutricionais das proteínas da soja. Conhecimentos científicos, a respeito desses agentes antinutricionais, bem como sua inativação, somente, tiveram início nas últimas 3 ou 4 décadas. Antes, a possibilidade do uso de soja na alimentação humana e, mesmo, animal, era vista com reservas. Estudos para inativar esses agentes e, conseqüentemente, aumentar as qualidades e o valor biológico da soja têm sido levados a efeito por um grande número de pesquisadores. Alguns desses agentes já foram isolados e estudados com bastantes detalhes, enquanto que a natureza química e as propriedades de outros, ainda, não são bem conhecidas. De maneira geral, esses agentes antinutricionais são termolábeis, ficando inativados pelo calor e, mais rapidamente, pelo calor úmido. Todavia, tanto os agentes prejudiciais como os nutrientes valiosos são destruídos pelo calor e, dessa maneira, mesmo o tratamento térmico ideal, para a inativação dos agentes prejudiciais, implica em solução de compromisso. Disso decorre a grande importância do controle, do tratamento térmico durante o processamento, dentro de especificações bem definidas.

Também o gosto característico, desagradável da soja, que, por muito tempo, foi atribuído à presença de constituintes inerentes à mesma, descobriu-se ser, em grande parte, o resultado da ação enzimática da "lipoxidase", que se encontra, principalmente, na casca. Ao entrar em contato com o substrato, por ocasião da trituração, essa enzima inicia, rapidamente, os processos de oxidação dos ácidos graxos insaturados, originando o gosto e odor desagradáveis, que são irreversíveis. Daí, a importância da inativação dessa enzima, antes de se iniciar qualquer processamento com a soja.

Os principais objetivos deste trabalho foram: 1) estudar em condições de laboratório e na soja preparada de diferentes maneiras, os melhores tratamentos para eliminar dois fatores

antinutricionais importantes (antitripsina e hemaglutinina) ; 2) estudar os efeitos dos diferentes tratamentos térmicos na solubilidade e valor biológico das proteínas da soja; 3) comparar as propriedades das proteínas da soja nos produtos preparados no laboratório com alguns produtos e subprodutos industriais; 4) sugerir medidas para a obtenção de proteínas de melhores características químicas, funcionais e de mais alto valor biológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O feijão soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma leguminosa de alto teor de óleo e proteínas, cuja classificação botânica, de acordo com Burkard (18), é:

Divisão	<u>Fanerogamae</u>
Classe	<u>Dicotyledoneae</u>
Família	<u>Leguminosae</u>
Subfamília	<u>Papilionoideae</u>
Tribo	<u>Faseoleas</u>
Gênero	<u>Glycine</u>
Espécie	<u>Glycine max</u> (L) Merrill

Nesta revisão bibliográfica, será dada ênfase às características físico-químicas, funcionais e nutricionais das proteínas de soja, em função do tratamento térmico, dando-se destaque a:

- a) agentes antinutricionais e valor nutricional das proteínas da soja;
- b) atividade ureática da soja;
- c) solubilidade das proteínas da soja em função do processamento.

a) Agentes Antinutricionais e Valor Nutricional das Proteínas da Soja

Osborne e Mendel (73) foram os primeiros a observar que as proteínas da soja, no estado natural, ou seja, crua, eram de qualidades nutricionais muito pobres e o calor úmido aumentava, consideravelmente, seu valor nutritivo. Esses autores observaram que ratos jovens, alimentados com dieta com o componente farinha de soja autoclavada, cresciam muito melhor do que aqueles alimentados com a mesma dieta, porém com a soja no estado natural. Antes do trabalho desses autores, a possibilidade de utilização da soja, em maior escala, na alimentação animal e humana, era encarada com reservas.

Esses achados têm sido confirmados por numerosos investigadores, que concluíram que o efeito favorável do tratamento

térmico sobre o valor nutricional das proteínas da soja referem-se não, somente, aos ratos, mas, também, a outras espécies monogástricas, tais como: porcos, pintos, perus, homens, etc. Em animais adultos, a retenção de nitrogênio e aminoácidos sulfurados é muito maior naqueles alimentados com soja autoclavada, do que naqueles que recebem soja crua.

a.1) Fator Antitripsina

O inibidor da tripsina é, talvez, o mais conhecido dos inibidores e o mais exaustivamente estudado entre os fatores tóxicos da soja. É chamado "inibidor da tripsina" por causa de sua capacidade de interferir com a atividade digestiva da tripsina no trato intestinal do homem e dos animais.

Bowman (16), Ham e Sandstedt (36), em 1944, foram os primeiros a fazerem referência de que, no extrato obtido da soja não tratada termicamente, havia uma substância que, "in vitro", inibia a ação da tripsina sobre a caseína. Entretanto, essa substância tornava-se inativa quando o extrato era autoclavado ou, então, preparado com soja previamente submetida ao calor. Também pela diálise, havia perda da atividade antiproteolítica do inibidor. Esses autores atribuem o baixo valor biológico das proteínas da soja crua à presença do inibidor da tripsina. Na época, eles não obtiveram provas conclusivas quanto ao efeito retardatório do crescimento de animais alimentados com dieta, contendo fração do inibidor da tripsina por eles purificada. Desde a referência desses autores sobre a presença de um inibidor da tripsina em soja crua, considerável interesse foi despertado em torno da possibilidade de o inibidor da tripsina alterar o valor nutritivo das proteínas.

Kunitz (46, 47) foi que, pela primeira vez, cristalizou e isolou da soja um produto com forte atividade inibitória da tripsina. Mais tarde, o próprio Kunitz (48) caracterizou suas propriedades, mostrando sua forte afinidade pela tripsina e menor afinidade para a quimotripsina. A esse produto, foi dado o nome de "inibidor da tripsina" ou "fator antitripsina" que é uma proteína com propriedades de uma alfa-globulina (com 16% de nitrogênio), precipitável com TCA, não dialisável, peso molecular cerca de 24.000, com um espectro máximo de absorção a 280 nanômetros, ponto isoeletrico a pH 4,5 e termolábil.

Sua ação inibitória evidencia-se, apenas, no estado nativo, sendo que o calor, ácido ou álcali, destroem seu poder inibidor. Experimentos "in vitro" com esse inibidor cristalino têm mostrado, mesmo em alta diluição, uma reação estequiométrica praticamente irreversível e instantânea entre a enzima tripsina e o inibidor, formando um composto estável que não se dissocia, exceto em meio fortemente ácido.

O inibidor da tripsina encontrado na soja, quando purificado, reage com igual peso da tripsina pura, e sua atividade é detectada pelo decréscimo da atividade da tripsina na digestão da caseína. A atividade do inibidor é expressa em termos de unidades de tripsina inibidas, e sua medida consiste, simplesmente, em comparar a atividade triptica sobre duas misturas de reação, tendo caseína como substrato, uma contendo determinada quantidade de inibidor, e a outra, livre do mesmo.

Klose, Hill e Fevold (44) referem-se ao fato de que, agora, que foi possível isolar da soja, na forma cristalina, o inibidor da tripsina, a questão de ser ou não o mesmo responsável pelo retardamento do crescimento pode ser melhor respondida, uma vez que será possível incluir a substância isolada na dieta. Esses autores verificaram a presença de substâncias, na soja crua, com capacidade de retardar o crescimento de ratos. Na conclusão dos mesmos, a substância com essas propriedades é uma proteína não dialisável, precipitável por sal e inativada pelo calor. Com isso concordam Ham e Sandstedt (36). É interessante, ainda, notar que os efeitos nocivos do extrato ativo da soja não estão associados ao decréscimo de ingestão de alimentos.

Westfall e Hauge (102), estudando a qualidade nutritiva da farinha de soja, aquecida a várias temperaturas, levando em conta o fator antitripsina ainda existente, puderam concluir que: 1) a eficiência das proteínas da farinha de soja aumenta na razão direta da destruição do fator antitripsina; 2) a presença do inibidor da tripsina era a principal causa da pouca utilização, pelo organismo, das proteínas da soja; 3) autoclavando-se a farinha de soja por 15-30 minutos a 180°C, as proteínas da soja adquirem alto valor biológico nos ensaios com ratos, enquanto, autoclavando-se por tempo superior a 10 minutos a 120°C, causa um progressivo decréscimo no mesmo valor biológico. Baseados nas conclusões apresentadas, esses autores sugeriram que a determinação da potência do inibidor

nos produtos de soja fosse usada como índice do tratamento térmico adequado para aumentar a qualidade das proteínas, indicando que o tratamento não deve ser prolongado além do tempo requerido para a total destruição do inibidor. Resumindo: podemos dizer que esses autores observaram uma excelente correlação entre o valor nutritivo e o inibidor da tripsina contido na soja aquecida sob condições variadas, e o inibidor da tripsina era a maior causa da baixa utilização das proteínas da soja.

Chernick, Lepkovsky e Chaikoff (23) mostraram que pintos ou ratos, alimentados com dieta contendo farinha de soja crua, apresentam profundas modificações, tanto no tamanho do pâncreas, como no conteúdo de tripsina neste órgão. Segundo esses autores, o tamanho do pâncreas de pintos ou ratos, alimentados com dieta normal ou contendo soja autoclavada, raramente excede a 0,5% do peso do seu corpo, enquanto que o dos alimentados com soja crua, frequentemente excede a 1% e apresenta uma elevação no seu poder proteolítico. Suplementando a farinha de soja crua, usada na dieta, com metionina ou cisteína, corrige-se a deficiência do crescimento, mas não se previne a hipertrofia do pâncreas ou o aumento das enzimas proteolíticas dessa glândula. A hipótese desses autores para a hipertrofia do pâncreas e para o aumento do seu conteúdo proteolítico, nos animais alimentados com soja crua, é o resultado do estímulo do tecido de secreção exócrina (acinos) dessa glândula em relação ao inibidor por si só ou pelo produto da digestão incompleta das proteínas. É conhecido que a presença de peptonas, no trato intestinal, aumenta a secreção do tecido acinos do pâncreas, o que suporta essa hipótese.

Segundo Lyman e Lepkovsky (61) e Lyman (60), quando ratos ou pintos são alimentados com soja crua, quantidades excessivas de enzimas pancreáticas, aminoácidos essenciais, especialmente, os sulfurados, e proteínas são encontrados nos intestinos e nas fezes. A produção de enzimas e a quantidade liberada no intestino é 3-4 vezes maior, mas como a maior parte é eliminada nas fezes, o real coeficiente de digestão do material nitrogenado é baixo. Enquanto a secreção de enzimas pancreáticas (perda de aminoácidos essenciais de fonte endógena) aumentou, observaram os autores que pintos, alimentados com soja crua, absorvem somente 43-65% das proteínas, compara

do com 92-97% retidos pelos pintos alimentados com a mesma dieta, contendo a soja previamente autoclavada.

Numerosos outros pesquisadores reconhecem que o processo adequado de aquecimento aumenta as qualidades nutricionais da soja. De qualquer maneira, para Ambrose (3), a inativação ou destruição do inibidor da tripsina pelo cozimento ou autoclavagem nem sempre aumenta o valor nutricional, possivelmente, devido ao desbalanceamento dos aminoácidos ou à presença de outros princípios tóxicos.

Assim, o fator antitripsina foi, sempre, o agente antinutricional da soja que mereceu mais atenção, tendo, na última década, sido feitos muitos estudos referentes ao isolamento, purificação e caracterização de suas propriedades físico-químicas.

Atualmente, conhecem-se, pelo menos, 7 a 10 inibidores de enzimas proteolíticas na soja, já caracterizados.

Rackis e col. (79) isolaram diretamente do soro de soja, por cromatografia em DEAE-celulose, dois inibidores da tripsina altamente purificados, os quais denominaram de SBTIA₁ e SBTIA₂. SBTIA₂ e o SBTI(5x) (produto comercial 5 x cristalizado) são idênticos ao inibidor cristalizado e isolado por Kunitz (46, 47).

Birk, Gertler e Khalef (11) isolaram, por cromatografia em CM-celulose, outro inibidor da tripsina, insolúvel em acetona, já mencionado por Bowman (17). Originalmente, foi designado de "inibidor purificado AA", mas, agora, referido como "inibidor de Bowman-Birk", por Frattali (32).

Rackis e Anderson (78) separaram diretamente do extrato cru da soja, usando cromatografia em DEAE-celulose, 4 inibidores da tripsina altamente purificados, designando-os: SBTIA₁; SBTIA₂; SBTIB₁ e SBTIB₂. O SBTIB₁ e SBTIB₂ apresentaram-se com alta atividade inibitória da tripsina. SBTIA₂ e SBTI(5x) têm propriedades físicas, químicas e cromatográficas iguais. SBTIA₁ e SBTIA₂ são os mesmos já mencionados por Rackis e col. (79).

Yamamoto e Ikenaka (106) obtiveram, da soja, dois inibidores da tripsina, um que parece ser idêntico com o inibidor de Kunitz (48) e com o SBTIA₂. O segundo inibidor, designado 1,9S, contém 13 ligações dissulfídicas por molécula, quando comparado com 2 ligações dissulfídicas no inibidor de Kunitz e no SBTIA₂.

Frattali e Steiner (33) demonstraram 3 inibidores da tripsina, designados F_1 , F_2 e F_3 , em preparações comerciais do inibidor de Kunitz. O maior componente, F_2 , é aparentemente, idêntico ao inibidor de Kunitz.

Frattali (32) sugeriu que o inibidor de Bowman-Birk e o inibidor 1,9S de Yamamoto e Ikenaka (106) devem ser idênticos.

Eldridge e Wolf (27), após recalcularem os valores originais, verificaram que os coeficientes de sedimentação de 1,7-1,8 de SBTIA₁; SBTIB₁ e SBTIB₂ indicaram pesos moleculares de 14.000-18.000, enquanto que F_1 e F_2 têm pesos moleculares de 18.000-24.000.

Smith e Circle (91) publicaram, recentemente, um livro sobre química e tecnologia das proteínas da soja, onde fazem ampla revisão bibliográfica.

A função biológica do inibidor da tripsina é desconhecida, uma vez que não inibem a atividade proteolítica da soja.

a.2) Hemaglutinina da Soja

Muitos termos têm sido usados, para designarem esta proteína de plantas a qual tem a capacidade de aglutinar as células vermelhas do sangue: fitohemaglutinina, fitoaglutinina e lectinas.

Inicialmente, conforme a citação de Smith e Circle (91), Lanfer e col., em 1944, propuseram para essa proteína aglutinadora, isolado de soja, o nome de "soyin" e, para a mesma proteína, Liener (51) propôs o nome de "hemaglutinina da soja". Soyin não é nomenclatura muito largamente usada. No presente trabalho, será usado o termo "hemaglutinina da soja", por ser a nomenclatura mais amplamente usada pelos pesquisadores que trabalham com essa proteína.

Sharon e Lis (85) fazem referências a que as proteínas das plantas responsáveis pela aglutinação das células vermelhas do sangue, geralmente, são chamadas de fitohemaglutininas e fitoaglutininas. Entretanto, como tais proteínas ocorrem em outros organismos, além das plantas, o termo "lectins", proposto por Boyd em 1963, conforme citação de Sharon e Lis (85), parece ser mais adequado e foi usado no artigo por eles publicado.

Conforme a citação de vários pesquisadores, desde o início do século, sabe-se que, em sementes de leguminosas, e,

especialmente, de feijões, existem substâncias capazes de promoverem a coagulação do sangue de diferentes espécies de animais e de aglutinarem eritrócitos lavados. Após autoclavar o extrato, preparado com esses produtos, a hemaglutinação não ocorre. Também, segundo vários pesquisadores, não só o inibidor da tripsina da soja é responsável pelo deficiente crescimento de animais jovens, mas também, outras substâncias que interferem com o metabolismo das proteínas.

Liener e Pallansch (54) foram os primeiros a isolarem e a purificarem uma substância tóxica da soja, mostrando característica de forte inibidor do crescimento, quando usado intraperitonalmente e capaz de matar os animais, se sua proporção, em relação à dieta, exceder a 1%. Essa substância é, virtualmente, livre da atividade antitriptica e se caracteriza por marcada habilidade de aglutinação "in vitro" das células vermelhas do sangue de várias espécies.

Liener (51) sugeriu o nome de "hemaglutinina da soja" para a proteína tóxica até então denominada de "soyin". O mesmo autor estudou o efeito retardatório no crescimento de ratos e a toxidez da hemaglutinina. Segundo ele, a toxidez da hemaglutinina da soja é semelhante a de outras plantas. O LD₅₀ da hemaglutinina da soja para ratos novos é cerca de 50 mg/kg quando administrado intraperitonalmente, mas não tem ação letal, quando administrada no tubo estomacal até o nível de 500mg/kg. Ainda diz que a hemaglutinina é responsável por cerca de 50% da inibição do crescimento dos ratos alimentados com soja. Injeção intraperitonal com o inibidor da tripsina, cristalizado por Kunitz, não é tóxica.

Liener (52) desenvolveu um método fotométrico para determinação quantitativa da atividade hemaglutinante, particularmente para a soja. O método está baseado em que os eritrócitos de coelho sedimentam, proporcionalmente, com a concentração de hemaglutinina. Essa técnica permite predizer o valor nutritivo de produtos de soja submetidos a diferentes tratamentos térmicos. A presença de múltiplas hemaglutininas na soja tem sido referida por vários pesquisadores, entre os quais Lis e col. (55) que mostram que a soja contém 4 diferentes hemaglutininas, separáveis por cromatografia em DEAE-celulose, denominadas HGI, HGII, HGIII e HGIV. A fração mais abundante é a HGI, sendo similar à hemaglutinina purificada de soja por Liener e Pallansch (54) e Lis, Sharon e Katchalski (57). Todas as quatro hemaglutininas da soja parecem ser glicoproteí

nas, contendo 4,5% de manose e 1% de glucosamina, peso molecular cerca de 110.000.

Catsimpooolas e Meyer (22) mostraram quatro diferentes formas de hemaglutinina da soja separadas por focalização isoelétrica e denominadas A, B, C e D. As quatro hemaglutininas são, imunoquimicamente, idênticas. A mais abundante (forma B) é idêntica à primeira hemaglutinina descrita por Liener e Pallansch (54) e é dissociável em 2 subunidades.

Muitos pesquisadores indicam que a atividade da hemaglutinina da soja crua é, rapidamente, destruída pelo calor úmido.

Sharon e Lis (85) acreditam que, embora muito grande progresso tenha sido feito no estudo da hemaglutinina (lectinas), um grande número de questões a respeito de suas propriedades, usos e funções permanecem sem resposta. Praticamente, nada é conhecido a respeito da estrutura dessa glicoproteína.

Liener (53) afirma que, mesmo após mais de 10 anos de estudos dirigidos para a hemaglutinina, sua significância nutricional ainda está longe de ser perfeitamente entendida. Embora as propriedades físico-químicas e biológicas, do fator antitripsina e hemaglutinina sejam diferentes, baseado no estudo do isolamento e purificação, essas substâncias mostram um efeito comum de diminuir o crescimento de animais jovens. Isso mostra que eles são capazes de influenciar a digestão e utilização metabólica dos materiais nutritivos. A coexistência dessas e de outras substâncias, todas com o mesmo efeito, mesmo com ações biológicas diferentes, sugere que o mecanismo do retardamento do crescimento é muito complicado. Realmente, dos conhecimentos acumulados durante a última década, parece claro que a inibição do crescimento é o resultado da ação combinada de um certo número de efeitos individuais.

Ainda existem outros elementos antinutricionais na soja que são menos conhecidos e necessitam de futuras investigações, entre os quais, saponinas e agentes bocigênicos.

a.3) Saponinas

Não sendo muito ampla a bibliografia a respeito deste assunto, vamos considerar as citações dadas por Liener (53) e Smith e Circle (91). Do extrato de soja, que não sofreu tratamento térmico, foram isoladas substâncias que causam ruptura

dos eritrócitos "in vitro" e formam abundante e persistente espuma com água. Sua incorporação no alimento de pintos causa retardo no crescimento. Após várias recristalizações, têm-se obtido substâncias com propriedades de saponinas que continuam retardando o crescimento de pintos. É possível inativar essa substância pela fervura ou pela hidrólise com solução ácida. O resultado favorável do tratamento térmico tem sido atribuído à liberação de um "aglicon" (saponina) que faz cessar a toxidez. Como média a soja contém cerca de 0,5% de saponina. Estudos mais recentes têm comprovado que saponinas isoladas de soja não fazem mal a pintos, a ratos e a ratazanas, mesmo quando alimentados a um nível três vezes mais alto do que o contido em dietas com soja. Saponina de soja purificada tem pouco ou nenhum sabor e não é amarga, o que contraria as frequentes referências encontradas na literatura. De qualquer maneira, saponinas de soja são mais complexas do que, inicialmente, se imaginava.

a.4) Agentes Bocigênicos

Conforme citação de vários autores, desde 1937, muitos pesquisadores têm feito referências à hipertrofia da tiróide de animais alimentados com soja.

Liener (53) refere-se a produtos de soja que, não tendo sofrido adequado tratamento térmico, produzem um marcado aumento da glândula tiróide (papeira) em ratos e pintos. Esse efeito maléfico pode ser eliminado pela suplementação com iodo ou pela aplicação de tratamento térmico aos produtos de soja que fazem parte da ração. Vários pesquisadores têm observado a incidência do bócio em crianças alimentadas com leite de soja. Aparentemente, o tratamento térmico, aplicado na esterilização desses produtos de soja, não é suficiente, para eliminar tal agente.

Halverson, Zeppelin e Hart (35), relacionando o iodo com as propriedades bocigênicas da soja, puderam observar que: 1) 1 a 2 microgramas de iodo por rato/dia é suficiente, para prevenir a hipertrofia da tiróide, quando os ratos foram alimentados com 10 a 30% de soja crua ou tratada termicamente; 2) o iodo, requerido pelos ratos alimentados com soja, foi maior do que para os alimentados com a dieta padrão; 3) o tratamento térmico reduziu a hipertrofia da tiróide, indicando ser o

agente bocigênico da soja termolábil.

Smith e Circle (91), ao referirem-se a que a falta de iodo é a principal causa do bócio na soja, citam que Bloch e col., 1961, são da opinião de que a soja crua contém o agente bocigênico, mas que é removido ou destruído durante o processamento. A adição de 160 microgramas de iodo na forma de KI por 100 g de dieta faz com que a hipertrofia da tiróide retorne ao normal.

De qualquer maneira, nenhum agente bocigênico foi isolado da soja, assim que não é conhecida a substância responsável pelo efeito bocigênico da soja crua.

Futuras investigações, ainda, se fazem necessárias, para melhor conhecimento e caracterização desse agente maléfico para a fisiologia dos animais que se alimentam com dietas enriquecidas com soja crua.

b) Atividade Ureática da Soja

Caskey e Knapp (21) foram os primeiros autores a estudarem um método, para determinar a atividade da urease em produtos de soja. A soja crua tem a enzima urease em grande quantidade. A urease não se constitui em agente antinutricional, apenas é importante sua inativação em alimentos fortificados com uréia, destinados para a ração de ruminantes, uma vez que cataliza o desdobramento da uréia com NH_3 e CO_2 , desenvolvendo paladar desagradável nos alimentos. O alto valor nutritivo das proteínas da soja na alimentação humana e na dos animais domésticos depende, consideravelmente, do tratamento térmico usado no seu processamento. Tratamento térmico adequado aumenta o valor nutritivo das proteínas e, simultaneamente, inativa as enzimas presentes. A determinação da atividade ureática da soja é importante, porque se constitui em teste simples e rápido na avaliação da eficiência do processo de tostagem do farelo, pois apresenta resistência térmica semelhante aos fatores antinutricionais, especialmente no fator antitripsina. Devido à sua alta concentração na soja e à facilidade de sua detecção, a atividade ureática é usada pela indústria como índice de eficiência do tratamento térmico dos produtos de soja. As farinhas com alto teor de urease, também, são pobres no seu valor nutritivo. Infelizmente, o teste não pode ser usado, para indicar excesso de tratamento térmico. Para isso,

deve-se recorrer a outros testes como a solubilidade das proteínas, a destruição de aminoácidos essenciais e a vitamina B₁.

Outros autores também voltaram a atenção para o problema da necessidade de desenvolver métodos de controle da tostagem, motivados pela crescente utilização da soja em produtos alimentícios e para propósitos industriais. Croston, Smith e Cowan (25) e Smith, Belter e Anderson (88) fazem referências aos vários métodos existentes para a avaliação da tostagem, entre os quais, a medida da solubilidade dos compostos nitrogenados em água, frequentemente referida como índice de solubilidade do nitrogênio, o método modificado de Caskey-Knapp que se baseia na variação do pH, medida da inativação do fator antitripsina, hemaglutinina, etc. Dentre estes testes, os mais usados são os dois primeiros.

Croston, Smith e Cowan (25) compararam três métodos para determinação da atividade ureática: 1) titulação com NaOH 0,1N; 2) condutividade específica (urease converte uma solução de uréia de condutividade relativamente baixa em solução de sal de amônia de alta condutividade) e pela mudança do pH (método modificado de Caskey-Knapp). As diferenças, observadas nos três métodos, são, principalmente, devidas às técnicas operacionais. Smith, Belter e Anderson (88) estudaram vários fatores que afetam a atividade ureática (tempo de embebição, efeito do tratamento térmico, tratamento em autoclave, variedade, etc.) usando o método previamente mencionado por Croston, Smith e Cowan (25), só que com titulação contínua da amônia como medida da atividade ureática.

Baker e Mustakas (7), ao se referirem a que o teste da urease é, frequentemente, usado como índice do tratamento térmico adequado, fazem as seguintes observações: 1) quando o tempo de tratamento térmico é suficientemente longo, as médias de inativação da urease e do fator antitripsina são, mais ou menos, semelhantes; 2) uma desvantagem do método, como índice do tratamento térmico adequado, é que, ao serem usadas altas temperaturas por tempo curto, as médias de inativação são diferentes, inativando, completamente, a urease, enquanto considerável quantidade do fator antitripsina, ainda, fica presente.

c) Solubilidade das Proteínas de Soja em Função do Processamento

Smith e Circle (91) referem-se a vários pesquisadores que estudaram, de maneira intensiva, a solubilidade, a desnaturação e outras propriedades físico-químicas das proteínas da soja, em função do tratamento térmico e de outras operações desenvolvidas durante o processamento.

Nagel, Becker e Milner (68), em 1938, foram os primeiros a investigarem a dispersão, em água, dos constituintes nitrogenados da soja que não sofreu tratamento térmico. Nesse estudo, foi considerado o efeito da moagem, o tempo de agitação, a relação sólido:solvente e o efeito da temperatura na dispersão em água das proteínas de soja.

Smith e Circle (90) no mesmo ano, em 1938, também investigaram, de maneira mais concreta, a dispersão, em água, das proteínas de soja em função do pH, tendo extendido as investigações de maneira detalhada, sobre o efeito das soluções de sais neutros, ácidos e alcalinos na dispersão e características de precipitação das proteínas da soja. Esses autores verificaram que a mínima solubilidade está na faixa de pH 4-5, que corresponde à região do ponto isoelétrico da maior parte das proteínas da soja. Ajustando-se o pH do extrato para 4,0-4,2, há precipitação de cerca de 90% das proteínas extraídas. A região de pH 6,5-9,0 é a melhor para a extração, sendo desaconselhável a região de pH 2,0-3,0, por causar algumas alterações irreversíveis. Para os testes de rotina laboratorial, o método estabelecido por esses autores é largamente usado e se resume em: 1) dissolver 2,5 g de farinha, com granulometria 100 mesh, em 100 ml de água, agitando-se, mecanicamente, por 30 minutos; 2) centrifugar por 6 minutos a cerca de 2.000 x G, tomando-se alíquota do sobrenadante, para determinar o nitrogênio pelo método de Kjeldahl; 3) referir os resultados, em percentagem, de nitrogênio dispersível em relação ao nitrogênio total da amostra.

Belter e Smith (10) referem-se a que o grande aumento na utilização dos produtos proteínicos da soja, nas últimas décadas, cada vez mais, desperta a atenção para os efeitos da extração e para outras operações, durante o processamento sobre as propriedades das proteínas. Para eles, a desnaturação das proteínas da soja é inerente ao processamento, devi-

do à necessidade de aplicar calor úmido, para garantir o máximo de valor nutricional das proteínas. A desnaturação das proteínas determina suas propriedades físico-químicas e nutricionais bem como sua aplicação industrial. Muitas são as definições referentes à desnaturação das proteínas, entretanto, geralmente, são boas para fins teóricos, sendo necessário um procedimento simples, para a determinação do grau de desnaturação das proteínas da soja no processamento industrial. Para isso, esses autores preferem usar as mudanças na dispersibilidade das substâncias nitrogenadas, em água, no seu pH natural, que é, em torno de 6,6-6,8, como medida da desnaturação das proteínas de soja. As proteínas de soja são muito sensíveis ao calor úmido, uma vez que a aplicação de vapor, à pressão atmosférica, durante 15 minutos, reduz o nitrogênio dispersível para níveis tão baixos, que todo o tratamento adicional pouca mudança ocasiona. Nas operações de extração do óleo com solvente, ocorre pequena desnaturação, mas, durante o tratamento térmico, com vapor, para remover o solvente e a posterior "tostagem", para garantir o máximo de valor nutricional, é que ocorre a maior desnaturação das proteínas da soja.

Segundo Becker, Milner e Nagel (9), o nitrogênio não protéico da soja varia entre 2,88 e 7,80%. Por outro lado, o nitrogênio dispersível da farinha comercial, após o tratamento térmico, situa-se na faixa inferior a 10%, o que leva a crer que, praticamente, toda a proteína foi insolubilizada.

Smith, Belter e Johnsen (89) referem-se a que um dos métodos mais aceitáveis, para a medida da desnaturação das proteínas da soja, é a determinação da dispersão dos compostos nitrogenados em água. Ao ser usada uma alta relação de farinha:água na extração das proteínas, tal como 1:40, a dispersibilidade das substâncias nitrogenadas, em farinha de soja que não tenha sofrido nenhuma desnaturação, será em torno de 85-92%. Farinha tratada com vapor, com a finalidade de desenvolver o máximo de valor nutricional, apresenta uma dispersibilidade das substâncias nitrogenadas em torno de 7,0-16,0%. Vários são os fatores que influenciam na extratibilidade das proteínas de soja em água, tais como tratamento térmico, método de extração do óleo, tamanho da partícula, relação sólido:solvente, temperatura e pH da solução, concentração de sais, etc. Isso enfatiza a natureza empírica da determinação

e a necessidade de selecionar um procedimento padrão para tal determinação. Quando a desnaturação for drástica, então, a dispersão em solução alcalina (pH 8,0) pode melhor diferenciar a desnaturação do que em água.

Paulsen, Holt e Anderson (75) fizeram uma ampla revisão dos métodos, até então usados, de dispersão das proteínas de soja em água e, também, caracterizaram as definições dos vários termos existentes, tais como "Solubilidade das Proteínas em Água" e "Índice de Dispersão das Proteínas". Os índices de solubilidade ou dispersão das proteínas referem-se ao quociente das proteínas solúveis ou dispersíveis em água, multiplicado por 100 e dividido pelo total de proteínas da amostra. Esses autores desenvolveram um método para determinar o "Índice de Dispersão das Proteínas", usando o agitador denominado de "Hamilton Beach Drink-master", tendo levado em consideração: 1) tempo, velocidade e aumento da temperatura durante a agitação; 2) tipo de lâminas do agitador e pH da solução extratora; 3) tempo e velocidade da centrifugação; 4) tamanho e moagem da amostra.

Smith e col. (92), em recente estudo, usando extração dupla nas relações de farinha: água 1:20 e 1:10 ou 1:60 e 1:50, conseguiram uma extração média de 93,6% (variação de 91-97%). O rendimento de proteína isolada foi de 39-56 g/100 g de farinha, cuidadosamente preparada (descorticada, desengordurada e em base seca). As pequenas variações, na dispersibilidade das substâncias nitrogenadas, são devidas às diferentes variedades de soja, enquanto que as grandes diferenças, no rendimento de proteína isolada, estão relacionadas com o teor de proteínas da amostra. Para o máximo de extração, deve-se evitar o calor úmido e o uso de solventes como álcool e acetona. A extração foi com água (pH 6,5-6,8) ou alcalina (pH 7,2), e o aumento da relação sólido:solvente, para valores maiores dos que os acima referidos, não resultou em aumento significativo na extração.

Smith e Circle (91) referem-se a que, para os trabalhos rotineiros de laboratório, a extração feita com a relação farinha:água de 1:10, com ou sem extração secundária de 1:5, já é suficiente. A extração com a relação de 1:20 ou 1:40 pode resultar em maior extração, mas também resulta em soluções muito diluídas para as operações subsequentes. Mesmo sendo o calor um tratamento básico comum, dado à maior parte dos alimentos, tanto durante o processamento como no cozimen

to, surpreendentemente, pouco se conhece a respeito das reações que as proteínas de soja sofrem, quando são tratadas termicamente. Os estudos demonstram que o principal efeito do tratamento com calor úmido sobre as proteínas da soja é uma diminuição da solubilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Amostras de Soja

A soja em grão e os produtos de soja utilizados para os estudos foram das seguintes procedências: 1) soja seca, em grão, da variedade Santa Rosa, safra de 1972 e 1973, fornecida pela Cooperativa Cotia; 2) material proveniente dos quatro principais estágios da indústria de óleo e isolado protéico de soja de procedência industrial.

As amostras obtidas na indústria, numeradas de I a IV, apresentavam as seguintes características: 1) composição - 85-90% da variedade Santa Rosa e 10-15% da variedade Pelicano; 2) tratamento - Amostra I: soja integral triturada e sem nenhum tratamento térmico; Amostra II: soja integral laminada, tendo, inicialmente, sofrido tratamento com vapor direto por 10 minutos e, em seguida, passado nos rolos laminadores (formação de escamas - "flakes"), com a finalidade de aumentar a superfície para extração do óleo; Amostra III: farelo de soja desengordurado (rosca secadora), tendo sofrido tratamento com vapor em camisa e vapor direto durante 10-15 minutos, dando uma temperatura de saída de 100°C na saída da rosca e umidade de 16%; Amostra IV: farelo tostado, tratado com vapor direto e em camisa (chaleiras de 5 estágios) durante 15-20 minutos, dando uma temperatura de saída de 85-90°C e 14% de umidade.

3.1.2. Ingredientes (Nutrientes) para os Ensaio Biológicos

Utilizaram-se produtos comerciais técnicos ou farmacêuticos, com exceção dos sais minerais que eram quimicamente puros, a saber: caseína comercial, fornecida pela Indústria e Comércio de Laticínios (Tacrigy Ltda.); amido de milho, grau alimentício (Refinações de Milho Brasil); óleo comercial de soja (Primor); sacarose (Açúcar União); vitaminas, grau farmacêutico (Merck); sais minerais, diversas procedências todos p.a.

3.1.3. Reativos

Todos os reativos utilizados para as análises foram quimicamente puros (p.a.) e de diversas procedências (Merck, Baker, Sigma, Ecibra, Carlo Erba, etc.).

3.1.4. Aparelhos e Equipamentos

Além da vidraria e utensílios comuns de laboratório (pipetas, buretas, termômetros, balões volumétricos, balança analítica, estufa, dessecador, etc.) utilizaram-se os seguintes equipamentos e aparelhos específicos:

- Potenciômetro H-5 Horiba;
- Fotocolorímetro Spetronic 20, Bauch & Lomb;
- Espectofotômetro PMQ II - UV - visível - Zeiss;
- Centrífuga Modelo B-20, International Equipment;
- Centrífuga Modelo IEC UV/DAMON;
- Banho-maria, Soc. Fabbe Ltda. Model L69;
- Jogo de Peneiras Produtest, (50-100 mesh);
- Evaporador Centrífugo - Tipo Centri-Therm - Modelo CT-1B-2 - Alfa-Laval;
- Autoclave - Lufanco-Steril-Matic - Lutz Ferrando;
- Evaporador Rotativo - Buchler Instruments, Inc.;
- Túnel de Secagem (projeto e construção na FTA);
- Spin Cooker - ICMA;
- Gaiolas de tela e chapas galvanizadas para ratos.

3.1.5. Animais Utilizados nos Ensaio

Ratos brancos da raça "Whistar" com idade de 21-25 dias (peso médio por rato 40-50 g) todos machos, provenientes da colônia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em São Paulo, SP.

Coelho branco, do sexo feminino, proveniente do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo das Amostras no Laboratório

As amostras preparadas, a partir da soja em grão, receberam os seguintes tratamentos:

3.2.1.1. Soja em grão, seca. Esse material foi submetido aos seguintes tratamentos térmicos: 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 minutos em água fervente. A seguir, foi descorticado, seco ao ar, triturado, desengordurado e, novamente, triturado até granulometria de 100 mesh. Na extração do óleo, foi utilizado o aparelho Soxhlet e, como solvente, éter dietílico (p.e. 35°C).

3.2.1.2. Soja em grão, embebida em água (12 horas) à temperatura ambiente e submetida aos mesmos tratamentos que em 3.2.1.1.

3.2.1.3. Soja em grão, embebida em água (12 horas) à temperatura ambiente, descortificada, separando os cotilédones, e submetida aos mesmos tratamentos que em 3.2.1.1., exceto o descorticamento, por já estar nessa condição.

3.2.1.4. As amostras recebidas da indústria, numeradas de I a IV conforme descrito em 3.1.1., foram, inicialmente, desengorduradas (teor de óleo menor que 1%) e, em seguida, moídas até granulometria de 50 mesh para a obtenção da farinha desengordurada. A extração foi feita com éter de petróleo (p.e. 30-60°C).

3.2.1.5. Farinha de soja desengordurada (solvente éter de petróleo-p.e. 30-60°C), granulometria de 50 mesh, preparada como se segue: submeteu-se, soja em grão, às mesmas condições descritas em 3.2.1.3., tendo sido de 7,5 minutos o tempo de tratamento térmico em água fervente.

3.2.1.6. Leite integral de soja, desidratado, moído até granulometria de 50 mesh e preparado da seguinte maneira: soja em grão, embebida por 12 horas em temperatura ambiente e

pH 8,5 com NaHCO_3 . Seguindo-se as operações de rotina, elaborou-se o leite de soja que, a seguir, foi concentrado em evaporador centrífugo - tipo Centri-Therm. Inativaram-se os agentes antinutricionais em "Spin Cooker" por 10 minutos com vapor direto (100°C). A desidratação foi feita em secador de túnel a 60°C durante 15 horas.

3.2.1.7. Precipitado protéico de soja, desidratado, moído até granulometria de 50 mesh e preparado como se segue: soja tratada nas mesmas condições da amostra 3.2.1.6. até a elaboração do leite. Seguiu-se a inativação dos agentes antinutricionais em "Spin Cooker" por 7,5 minutos com vapor direto (100°C). Acertou-se o pH com HCl para 4,5 (ponto isoelétrico da maior parte das proteínas de soja) e separou-se o precipitado por centrifugação a 2.500 x G. A desidratação foi feita em secador de túnel como na amostra 3.2.1.6.

3.2.1.8. Resíduo do leite de soja, desidratado, moído até granulometria de 50 mesh e preparado como se segue: o resíduo do leite de soja, foi desidratado, conforme descrito em 3.2.1.6., e em seguida fez-se a inativação enzimática por 10 minutos em estufa a 110°C e, quando seco, moído até granulometria desejada.

3.2.2. Análises Químicas e Físicas

Nas amostras devidamente preparadas foram feitas, em duplicatas ou triplicatas, as análises que se seguem, cujos valores médios estão representados em quadros e figuras na apresentação dos resultados.

3.2.2.1. Umidade

A umidade foi feita segundo o método descrito no AOAC, procedimento 22.8 (6). As amostras foram levadas à estufa a 110°C até obtenção de peso constante, a partir do que se calculou a percentagem de umidade.

3.2.2.2. Nitrogênio Total

Pelo método micro-Kjeldahl descrito no AOAC, segundo o

procedimento 2.23 (6) para nitrogênio total, cujo teor, multiplicado pelo fator 6,25, representa a percentagem de proteína bruta.

3.2.2.3. Nitrogênio não Protéico

Determinado segundo o método descrito por Becker, Milner e Nagel (9) para nitrogênio não protéico, cuja diferença do nitrogênio total corresponde ao nitrogênio protéico.

3.2.2.4. Efeito da Relação Sólido:Solvente na Extração de Compostos Nitrogenados da Soja

Fundamentalmente, para a realização deste ensaio, utilizaram-se os procedimentos recomendados por Smith e Circle(90), Smith, Belter e Johnsen (89), Smith e col. (92), Belter e Smith (10) e Paulsen, Holt e Anderson (75) com adaptações para as condições de trabalho. Utilizou-se, para este ensaio, a amostra preparada conforme 3.2.1.1., cujo lote não sofreu nenhum tratamento térmico. Prepararam-se soluções de farinha: solvente nas seguintes relações: 1:5; 1:7,5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30 e 1:50 (P:V). Deixaram-se as soluções, assim preparadas, em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Cada solução, a seguir, foi homogeneizada, em liquidificador, por 2 minutos, e o homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 17.000 x G. No sobrenadante (extrato) de cada solução centrifugada, determinou-se o nitrogênio através do método micro-Kjeldahl (6) e, a seguir, calculou-se a percentagem de extração em função do teor total de proteínas da amostra.

3.2.2.5. Solubilidade das Proteínas da Soja em Função do Tratamento Térmico

Na realização deste ensaio seguiram-se, fundamentalmente, as recomendações de Belter e Smith (10) com adaptações para as condições de trabalho. Usaram-se as amostras, preparadas conforme descrito em 3.2.1.1., 3.2.1.2. e 3.2.1.3. Na realização do ensaio, utilizou-se a relação sólido:solvente 1:30 conforme descrito em 3.2.2.4. O solvente usado foi água destilada cujo valor final de pH da solução foi em torno de 6,8.

Seguindo-se o procedimento do ensaio acima referido, determinou-se a percentagem de extração em função do teor total de proteínas das amostras.

3.2.2.6. Solubilidade das Proteínas da Soja em Função da Concentração de KOH e pH Final do Extrato

Para estudar o efeito de várias concentrações de KOH na solubilidade das proteínas, em função do tratamento térmico, utilizaram-se os procedimentos descritos por Smith, Belter e Johnsen (89) e Belter e Smith (10) com modificações em função das condições de trabalho. Para esse ensaio, utilizaram-se as amostras preparadas conforme descrito em 3.2.1.1., água destilada e soluções de KOH nas concentrações de 0,0125%, 0,025%, 0,05%, 0,10% e 0,20%, cujos valores finais de pH do extrato, preparado na relação de 1:30 (P:V), foram, respectivamente, em torno de 6,7-6,8, 8,5-9,0, 10,0, 11,3, 11,9 e acima de 12. Usando-se o procedimento descrito no ensaio 3.2.2.4., determinou-se a solubilidade das proteínas em função do teor total de proteínas das amostras.

3.2.2.7. Inativação da Urease da Soja em Função do Tempo de Tratamento Térmico

As amostras usadas na realização deste ensaio foram as descritas em 3.2.1.1., 3.2.1.2. e 3.2.1.3. Usou-se o método descrito no AACC 22-90, 1962 (4) que está baseado no aumento de pH, nas condições do método.

3.2.2.8. Determinação da Lisina Disponível da Soja

Usaram-se os reagentes e o procedimento experimental conforme descrito no método de Kakade e Liener (40) que usa TNBS (ácido 2, 4, 6 - trinitrobenzeno sulfônico), para complexar com o grupo épsilon $-NH_2$ da lisina, formando o composto "épsilon TNP-L-lisina" que pode ser determinado pela leitura da absorbância em 346 nm, relacionado com uma curva padrão. As amostras usadas nesse ensaio foram as descritas em 3.2.1.1. e 3.2.1.4.

3.2.2.9. Atividade da Tripsina

Foi determinada, basicamente, segundo o método original descrito por Kunitz (48) que emprega caseína e leitura espectrofotométrica dos aminoácidos hidrolizados em função de uma concentração de tripsina. Foram introduzidas algumas modificações ao método, tais como: 1) 2% de caseína em lugar de 1%; 2) 30 minutos de incubação em lugar de 20 minutos; 3) uso do método de Folin e Ciocalteu (29) e Lowry e col. (58) na determinação dos aminoácidos hidrolizados durante a digestão da caseína pela tripsina, em lugar da leitura da absorbância no U.V. a 280 nanômetros (nm). Para isso, foi preparada uma curva padrão de tirosina em 660 nm, cujo comprimento de onda foi usado nas análises; 4) definição das unidades de tripsina em função dos microgramas de tirosina liberados, durante o ensaio, em lugar das mesmas unidades, em função da leitura a 280 nm.

Após uma série de ensaios, variando a concentração de caseína e de tripsina, estabeleceu-se que 2% de caseína apresenta a melhor atividade nas condições do método. Usando-se 2% de caseína e concentrações crescentes de tripsina, estabeleceu-se a curva padrão da tripsina da qual se definiu a nova unidade de tripsina como sendo: "atividade capaz de produzir, nas condições do método, um micrograma de tirosina por minuto de digestão e foi designada como |U.T.^{CAS.}". A partir dessa curva, em função das unidades de tripsina, foi traçada uma nova curva que servirá de curva padrão da atividade da tripsina.

Na realização dos ensaios, usou-se: 1) 1,0 ml de caseína; 2) 0,4 ml de tampão de Na_2HPO_4 1M pH 7,6; 3) 0,5 ml de água destilada; 4) 0,1 ml de solução de tripsina. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos, inativou-se com 2 ml de ácido tricloracético (TCA) 10% e determinou-se, no filtrado, a concentração de aminoácidos liberados, contra um branco em que o TCA foi adicionado antes de iniciar o tempo de incubação.

3.2.2.10. Determinação da Atividade do Fator Antitripsina da Soja

Utilizou-se, neste ensaio, a amostra preparada conforme 3.2.1.1., cujo lote não sofreu nenhum tratamento térmico. No

preparo do extrato de proteínas, seguiu-se o procedimento descrito em 3.2.2.4., relação sólido:solvente, 1:30 (P.V), tendo-se preparado soluções com concentrações crescentes de proteínas (0,1; 0,2; ... 1,0 mg/ml). Na determinação da atividade inibitória do fator antitripsina da soja, seguiu-se o procedimento descrito em 3.2.2.9, variando-se, apenas, as concentrações de proteínas do extrato (contendo o inibidor). Usou-se solução de caseína na concentração de 2% e 10 microgramas de tripsina na mistura (298×10^{-1} U.T. |^{cas.}) que resultaram na melhor atividade nas condições do ensaio. Determinou-se a concentração de proteínas, no extrato, necessária, para inibir completamente a atividade da tripsina nas condições do método que foi de 0,3 mg na mistura de reação. Essa concentração será o ponto de partida, para poder-se estimar a atividade anti-tripsina residual de qualquer amostra de produto de soja. Fizeram-se, inicialmente, análises em duplicata, com pré-incubação (tripsina + inibidor), durante 30 minutos, a 37°C e sem pré-incubação.

3.2.2.11. Medida da Atividade da Hemaglutinina da Soja

Utilizou-se, fundamentalmente, o método descrito por Lerner (52) que usa sangue de coelho, extraído por punção-cardíaca, e avaliação da aglutinação por medida fotométrica das células vermelhas do sangue não sedimentadas em função da concentração inicial de eritrócitos na presença ou não da hemaglutinina. Nesse trabalho, tal avaliação foi realizada, visualmente, ou por meio de microscópio, sendo levada em conta a concentração mínima de proteínas no extrato, que provocou aglutinação dos eritrócitos tratados. O método baseia-se na grande sensibilidade de aglutinação dos eritrócitos, especialmente de coelhos, tratados com tripsina, quando em presença da hemaglutinina. Para a realização do ensaio, o extrato de soja foi diluído com soro fisiológico, de maneira a conter de 1 mg até 0,000244 mg de proteínas por mililitro. O extrato, nas suas diferentes diluições, foi misturado com a suspensão de eritrócitos na proporção de 1:1. Deixou-se em repouso, à temperatura ambiente, por uma hora. Centrifugou-se por 5 minutos, à baixa rotação (200 x G), observando-se qual a concentração mínima de proteínas capaz de produzir aglutinação dos eritrócitos.

3.2.3. Ensaio Biológicos

Para a determinação do valor biológico das proteínas, nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos, determinou-se o valor PER (quociente de eficiência protéica), utilizando-se testes de crescimento com ratos. Em todos os casos, a caseína foi usada como padrão. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e comida "ad libitum".

3.2.3.1. Preparo das Dietas para os Ensaio Biológicos

A composição centesimal das dietas, utilizadas para a determinação dos valores PER, está especificada no Quadro 1.

QUADRO 1: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Componentes	Porcentagem
Proteína (proveniente de cada amostra)	10%
Óleo de Soja Comercial (Primor)	8%
Mistura Salina (ver Quadro 2)	5%
Mistura Vitamínica (ver Quadro 3)	2%
Sacarose (Açúcar União)	25%
Amido de Milho (Refinações de Milho Brasil)	50%

A composição da mistura salina usada foi a de Rogers e Harper (81) e está discriminada no Quadro 2.

QUADRO 2: COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALINA USADA NAS DIETAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Componentes	Percentagem
Molibdato de Amônio $4H_2O$	0,003
Carbonato de Cálcio	29,290
Fosfato de Cálcio $2H_2O$	0,430
Sulfato Cúprico	0,156
Citrato Férrico $6H_2O$	0,623
Sulfato de Magnésio $7H_2O$	9,980
Sulfato de Manganês H_2O	0,121
Iodeto de Potássio	0,0005
Fosfato de Potássio	34,310
Cloreto de Sódio	25,060
Selenito de Sódio $5H_2O$	0,002
Cloreto de Zinco	0,020

Fonte: ROGERS, Q.R., e HARPER, A.E. J.Nutr., 87:267-273, 1965.

A composição da mistura vitamínica foi calculada baseando-se no trabalho de Warner (99) sobre as exigências mínimas do rato em crescimento. Os valores indicados por Warner foram utilizados em dobro na composição das dietas e estão especificados no Quadro 3.

QUADRO 3: COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA UTILIZADA NAS DIETAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Quantidades por 100 g de mistura e por 100 g de ração		
Componentes	p/ 100 g de mistura vitamínica	p/ 100 g de ração
Vitamina A - U.I.	20.000	400
Vitamina D - U.I.	20.000	400
Vitamina E - mg	600	12
Vitamina K - mg	1,00	0,020
Tiamina HCl- mg	12,50	0,250
Riboflavina- mg	25,00	0,500
Vitamina B ₆ - mg	12,00	0,240
Niacina - mg	150,00	3,000
Pantotenato de Cálcio - mg	80,00	1,600
Cloreto de Colina - mg	7.500,00	150,000
Vitamina B ₁₂ - mg	0,05	0,001
Inositol - mg	100,00	2,000
Ácido Fólico - mg	10,00	0,200
Ácido p-aminobenzóico - mg	100,00	2,000
Biotina - mg	1,00	0,020
Etoxiqum (antioxidante) - na proporção de 0,13 g/Kg ração		
Farinha torrada de mandioca - veículo para completar o peso		

Fonte: WARNER, R.G. NAS/NRC, Publicacion nº 990, p. 51-81, 1962.

Considerou-se, na composição das dietas, apenas o nitrogênio protéico de cada amostra. Da percentagem de açúcar da dieta, subtraíram-se as substâncias não nitrogenadas, presentes na amostra desengordurada. A pesagem inicial dos ratos e da dieta foi realizada 24 horas após a sua introdução. A partir da primeira pesagem, estabelecida como primeiro dia, foram feitas pesagens regulares a cada 7 dias, pelo período de 4 semanas (1ª, 7ª, 14ª, 21ª e 28ª). As pesagens compreenderam sempre o peso de cada rato e respectiva ração consumida. Calculou-se, no final, o valor PER que é o quociente do ganho de peso pela proteína consumida. Os valores encontrados foram corrigidos para caseína igual a 2,50.

4. RESULTADOS

4.1. Análises Químicas e Físicas

No Quadro 4, página seguinte, estão representadas as análises efetuadas nas amostras, preparadas no laboratório, e nas provenientes da indústria e utilizadas no preparo das dietas para os ensaios biológicos.

As análises efetuadas, segundo os métodos descritos em 3.2.2.2. e 3.2.2.3., foram as seguintes: percentagem de proteína total ($N \times 6,25$); percentagem de nitrogênio não protéico multiplicado por 6,25 ($N \times 6,25$); percentagem de nitrogênio protéico que corresponde à diferença entre o nitrogênio protéico e o não protéico. Os dados são a média de várias determinações.

QUADRO 4: ANÁLISES DAS SUBSTÂNCIAS NITROGENADAS EM PRODUTOS DE SOJA UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS (PER

Descrição das Amostras	% Proteína Total (N x 6,25)	% Nitrogênio não Protéico (N x 6,25)	% Nitrogênio Protéico (N x 6,25)
Farinha sem tratamento térmico ^a - 1ª fase	46,30	3,40	42,90
Farinha preparada com soja laminada ^a - 2ª fase	46,30	3,84	42,46
Farelo de soja na saída da rosca secadora ^a - 3ª fase	46,40	3,88	42,60
Farelo tostado de soja ^a - 4ª e última fase	46,40	3,94	42,46
Farinha de soja desengordurada preparada no laboratório ^b	54,80	1,60	53,20
Leite integral de soja, em pó ^b	47,40	3,41	43,99
Isolado protéico de soja no ponto isoelétrico ^b	53,50	0,96	52,54
Resíduo do leite de soja ^b	28,00	1,40	26,60
Isolado protéico de soja de procedência industrial	86,60	0,62	85,98
Caseína comercial	74,40	2,73	71,67

a - Farinha de soja desengordurada, granulometria 50 mesh, preparada com os produtos das 4 principais fases da indústria de óleo, conforme procedimento 3.2.1.4.

b - Produtos de soja elaborados no laboratório, granulometria 50 mesh, conforme 3.2.1.5. a 3.2.1.8.

4.2. Efeito da Relação Sólido:Solvente na Extração dos Compostos Nitrogenados da Soja

A extração dos produtos nitrogenados da farinha de soja, em função da quantidade de água utilizada, é dada no Quadro 5. Usando-se o método descrito em 3.2.2.4., fizeram-se múltiplas extrações, usando-se as relações de farinha:solvente (P:V) 1:5; 1:7,5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:30 e 1:50. Com base nos resultados, foi possível determinar a melhor relação sólido:solvente para a melhor extração das proteínas da soja, quando no estado nativo. Os resultados foram calculados em função do teor de proteínas totais da amostra, 54,8, e os dados são a média de duas ou mais determinações.

QUADRO 5: EFEITO DA RELAÇÃO SÓLIDO:SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS DA SOJA^a

Farinha:Solvente (g:ml)	Nitrogênio Extraído ^b (%)
1:5	63,7
1:7,5	73,7
1:10	86,8
1:15	92,4
1:20	94,4
1:30	95,4
1:50	95,5

a - Extração com água pH 6,8 por 30 minutos à temperatura ambiente.

b - A percentagem de nitrogênio extraído (ou solúvel) é baseada no nitrogênio total da farinha.

4.3. Solubilidade das Proteínas da Soja em Função do Tratamento Térmico

Na Figura 1, página seguinte, está representada a perda de solubilidade das proteínas da soja em função do tempo de tratamento térmico, em água fervente, e diferentes condições de umidade da amostra. No preparo do extrato para a determinação da solubilidade das proteínas, utilizou-se a relação sólido:solvente (farinha:água) 1:30 (P:V) e condições descritas em 3.2.2.5. As substâncias nitrogenadas solúveis foram determinadas no sobrenadante após centrifugação do extrato e relacionadas com o nitrogênio total da amostra. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

4.4. Solubilidade das Proteínas da Soja em Função do Concentração de KOH e pH Final do Extrato

Na Figura 2, página 40, são dados os resultados do estudo da solubilidade das proteínas da soja em função do tratamento térmico e diferentes concentrações de KOH na extração. No preparo do extrato para determinação da solubilidade das proteínas, utilizou-se a relação sólido:solvente (farinha:solução de KOH) 1:30 (P:V) e condições descritas em 3.2.2.6. Todos os resultados foram calculados, considerando-se o nitrogênio total. As substâncias nitrogenadas solúveis foram determinadas no sobrenadante após centrifugação do extrato e relacionadas com o nitrogênio total da amostra. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

FIGURA 1: SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO

Extração na relação 1:30 (P:V) com repouso de 30 minutos à temperatura ambiente; homogeneização por 2 minutos em liquidificador; centrifugação por 10 minutos a 17.000 x G; determinação do nitrogênio no sobrenadante pelo método micro-Kjeldahl; percentagem de extração em função do teor total de proteínas da amostra.

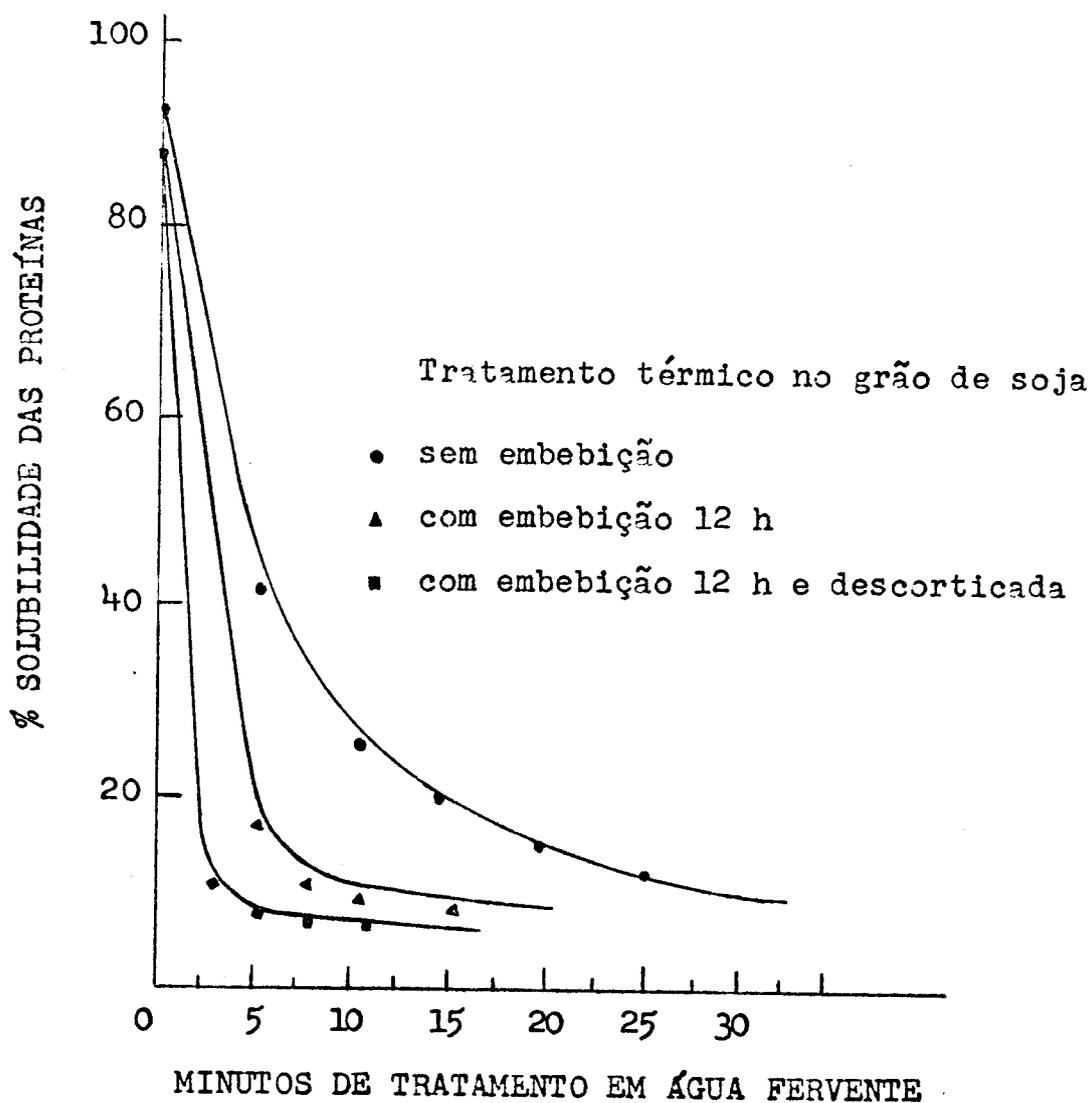
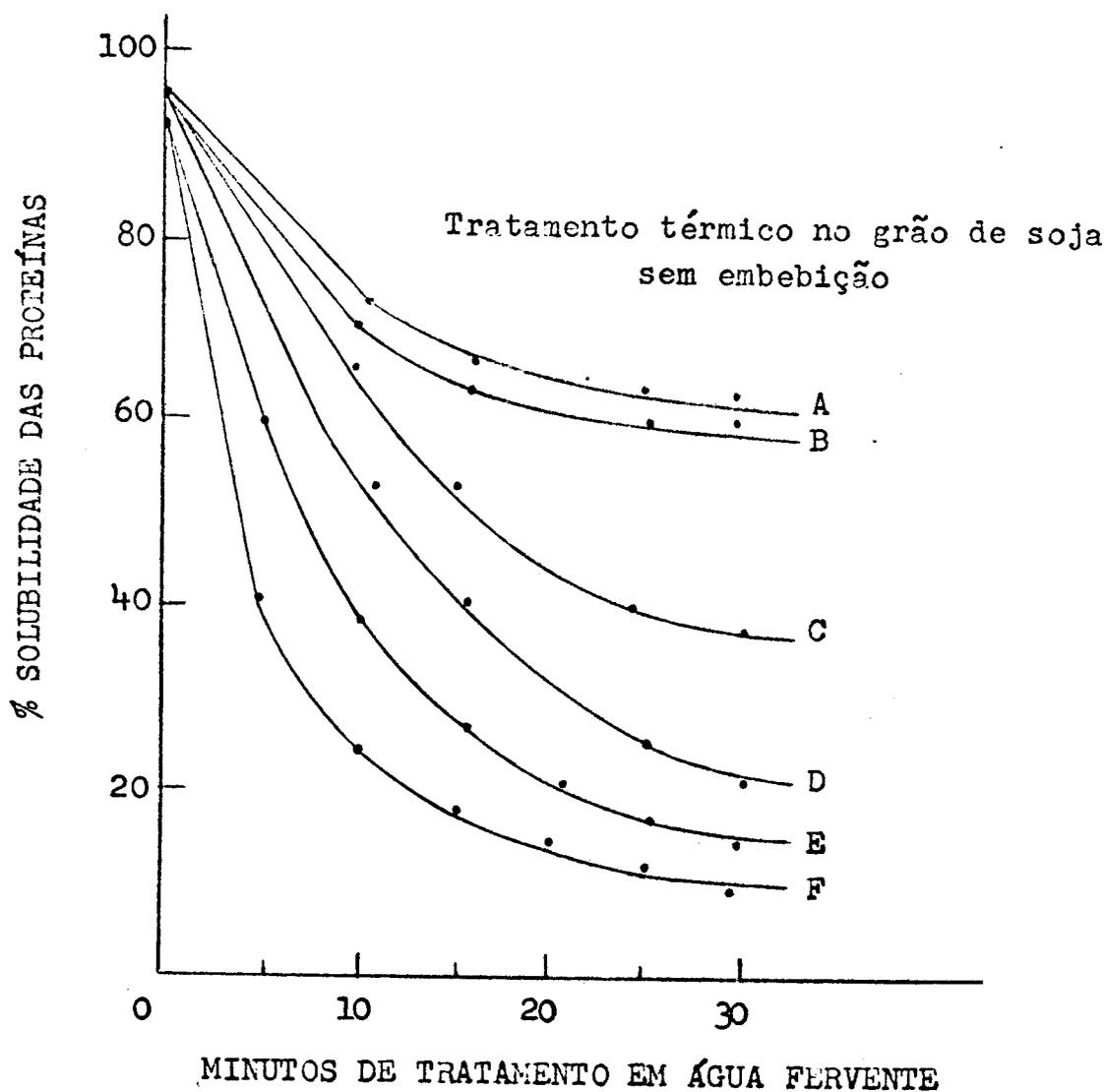


FIGURA 2: SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE SOJA EM FUNÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÃO DE KOH

Curvas A; B; C; D; E e F correspondem à extração com solução de KOH nas concentrações de 0,2%; 0,1%; 0,05%; 0,025%; 0,0125% e água, cujos valores de pH foram, respectivamente, cerca de 13; 11,9; 11,3; 10,0; 9,0 e 6,8. Extração na relação 1:30 (P:V) com repouso de 30 minutos à temperatura ambiente; homogeneização por 2 minutos em liquidificador; centrifugação por 10 minutos a 17.000 x G; determinação do nitrogênio no sobrenadante pelo método micro-Kjeldahl; percentagem de extração em função do teor total de proteínas da amostra.



4.5. Inativação da Urease em Função do Tempo de Tratamento Térmico

Na Figura 3, página seguinte, estão representados os resultados, relacionando o efeito do tempo de tratamento térmico, em água fervente, e as condições iniciais de umidade da amostra, com a inativação da urease da soja. Usou-se o método descrito em 3.2.2.7. para a obtenção dos resultados. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

4.6. Determinação da Lisina Disponível da Soja

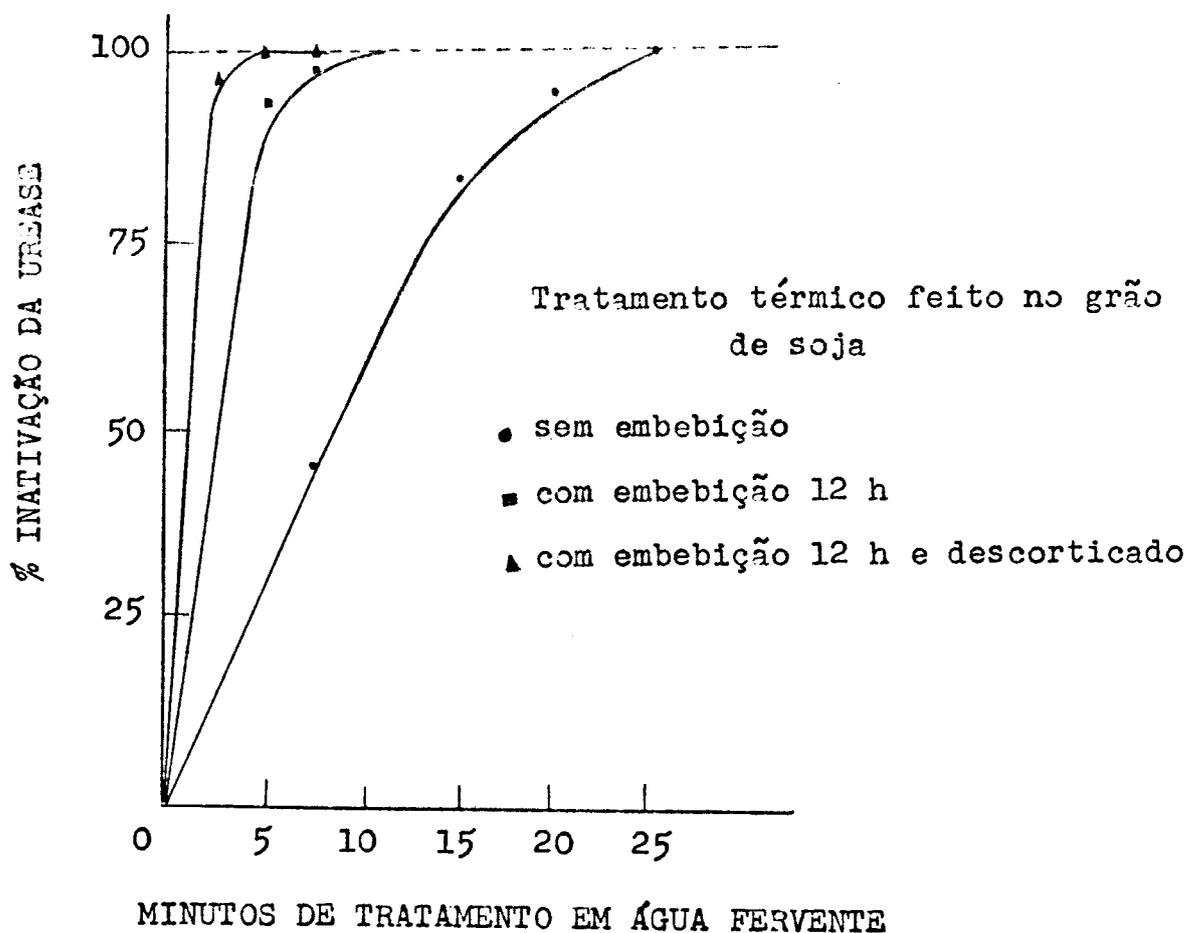
Nos Quadros 6 e 7, página 43, estão representados os valores de lisina disponível da soja, tendo-se usado o método descrito em 3.2.2.8.

No Quadro 6, estão os resultados, relacionando os valores de lisina disponível em amostra de soja, preparada no laboratório, em função do tempo de tratamento térmico em água fervente.

O Quadro 7, mostra os valores de lisina disponível nos produtos (farinhas) de soja usados nas rações para os testes biológicos. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

FIGURA 3: DESTRUÇÃO TÉRMICA DA ATIVIDADE UREÁTICA DA SOJA

Curvas do gráfico representam % de inativação da urease, usando-se: 0,200 g de farinha de soja; 10 ml de solução de ureia em tampão de fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0; 30 minutos em banho-maria a 30°C; atividade da urease representa a diferença entre o pH da amostra e do branco preparado com tampão de fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0.



QUADRO 6: LISINA DISPONÍVEL NA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO^a

Tratamento Térmico (Minutos)	Lisina Disponível (g/16 g N)
0	5,16
5	5,26
10	5,41
15	5,52
20	5,79
30	6,27
45	6,18
60	6,20
90	6,17
120	6,22

a - Tratamento térmico, em água fervente, feito no grão de soja.

QUADRO 7: LISINA DISPONÍVEL NAS FARINHAS USADAS NAS RAÇÕES PARA OS TESTES BIOLÓGICOS

Dietas	Lisina Disponível (g/16 g N)
Padrão elaborado com caseína	9,34
Farinha de soja desengordurada, granulometria 50 mesh, preparada no laboratório conforme 3.2.1.5.	6,26
Farinha sem tratamento térmico ^a - 1ª fase	5,60
Farinha preparada com soja laminada ^a - 2ª fase	5,96
Farelo de soja na saída da rosca secadora ^a - 3ª fase	5,75
Farelo tostado de soja ^a - 4ª e última fase	5,57

a - Farinha de soja desengordurada, granulometria 50 mesh, preparada com amostras das 4 principais fases da indústria de óleo de soja conforme 3.2.1.4.

4.7. Atividade da Tripsina

Na Figura 4, página seguinte, estão representadas as curvas de saturação da tripsina em função de diferentes concentrações de caseína, usando-se o método descrito em 3.2.2.9. Dos resultados, escolheu-se a concentração de caseína 2% e 10 microgramas de enzima como sendo as condições de quase saturação da tripsina, o que dava uma boa leitura de absorbância nas condições do método. A atividade específica da tripsina foi calculada pelo traçado da linha tangente à primeira parte da curva e representada por $|U.T.|^{cas.}$.

A Figura 5, página 46, mostra microgramas de tirosina liberadas em função das unidades de tripsina. Essa curva, calculada com os dados da curva D (Figura 4), foi utilizada como padrão para as posteriores determinações da atividade da tripsina.

FIGURA 4: CURVAS DE SATURAÇÃO DA TRIPSINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CASEÍNA

Curvas A; B; C; D; E e F, representam substrato caseína nas concentrações respectivas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% (1 ml). Soluções de tripsina nas concentrações de 50; 100; 150 e 200 microgramas/ml (0,1 ml). Tampão de fosfato de sódio 1,0 M, pH 7,6 (0,9 ml). Incubação 30 minutos a 37°C e leitura a 660 nm.

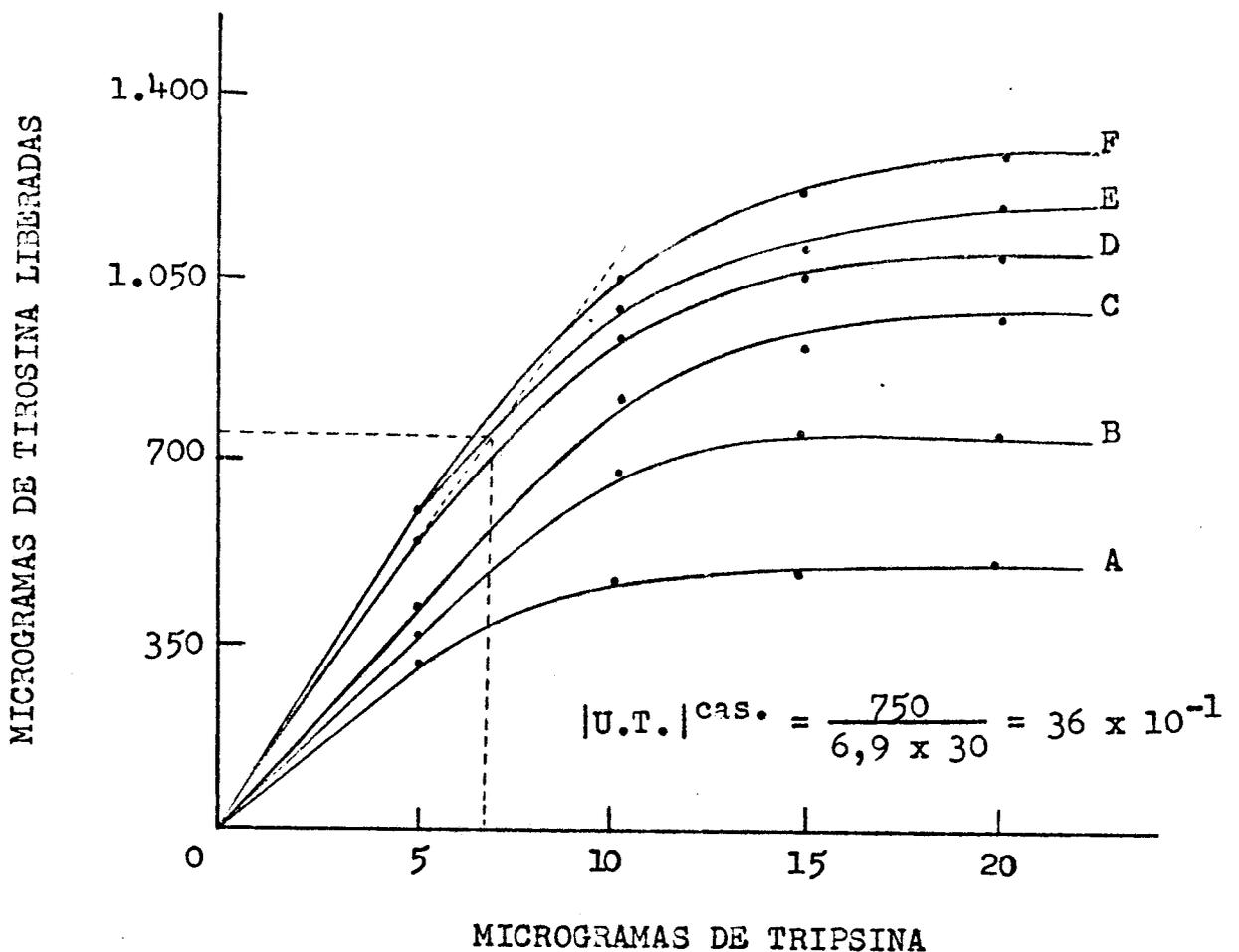
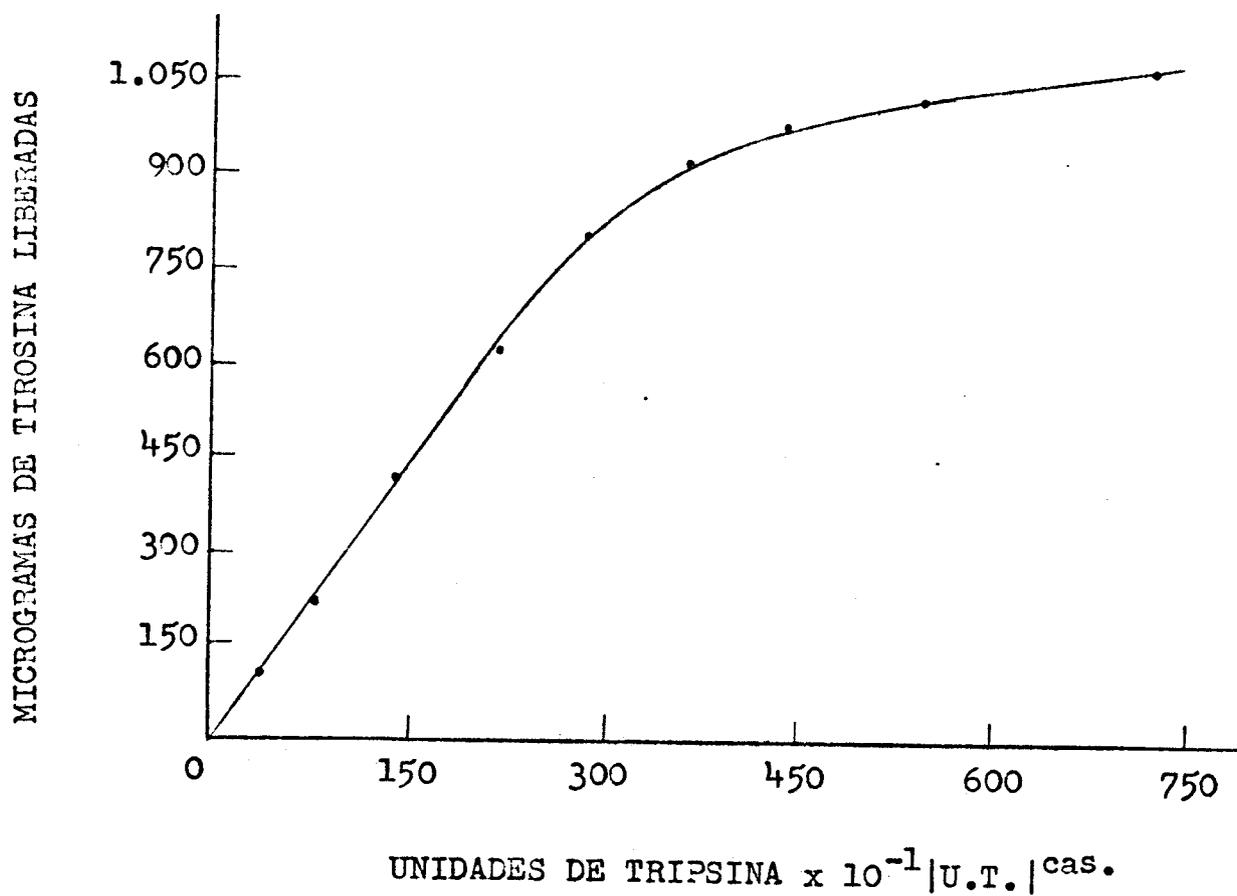


FIGURA 5: CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE DA TRIPSINA SOBRE A CASEÍNA

Calculada com os dados da curva D (Figura 4)



4.8. Determinação da Atividade do Fator Antitripsina da Soja

Na Figura 6, página seguinte, estão representados os resultados da atividade do fator antitripsina da soja em função da concentração, quando mantido constante o substrato e a tripsina na mistura de reação. Na realização do ensaio, usou-se o método descrito em 3.2.2.9., variando-se, apenas, a concentração de proteínas no extrato (contendo o inibidor). Na mesma figura, estão representados os valores de ensaios feitos em paralelo, com pré-incubação do inibidor com a tripsina e sem pré-incubação. De acordo com os resultados, foram selecionadas as melhores condições para os testes seguintes. Calculou-se a atividade do fator antitripsina em função das unidades de tripsina inibidas, e os resultados são as médias de duas ou mais determinações.

4.9. Inativação do Fator Antitripsina na Soja em Grão em Função do Tratamento Térmico

Na Figura 7, página 49, estão os resultados da inativação do fator antitripsina em função do tempo de tratamento térmico feito no grão, e no Quadro 8, página 50, a inativação do mesmo fator, quando o tratamento térmico foi feito no extrato. Usou-se o método descrito em 3.2.2.9., mantendo-se concentração de proteínas constante no extrato, 0,3 mg/ml na mistura da reação, conforme estabelecido em 3.2.2.10. Calculou-se a inativação da antitripsina em função das unidades de tripsina, inibidas nas condições do método. De acordo com os resultados, foram estabelecidas as melhores condições de tratamento térmico nas condições iniciais da amostra. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

FIGURA 6: INATIVAÇÃO DA TRIPSINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA DA SOJA

Substrato: solução de caseína 2% (1 ml); enzima: solução de tripsina 100 microgramas/ml (0,1 ml); inibidor: extrato de soja nas concentrações de 0,1 a 0,7 mg/ml (0,5 ml); tampão de fosfato de sódio 1,0 M, pH 7,6 (0,4 ml); incubação: 30 minutos a 37°C; leitura a 660 nm.

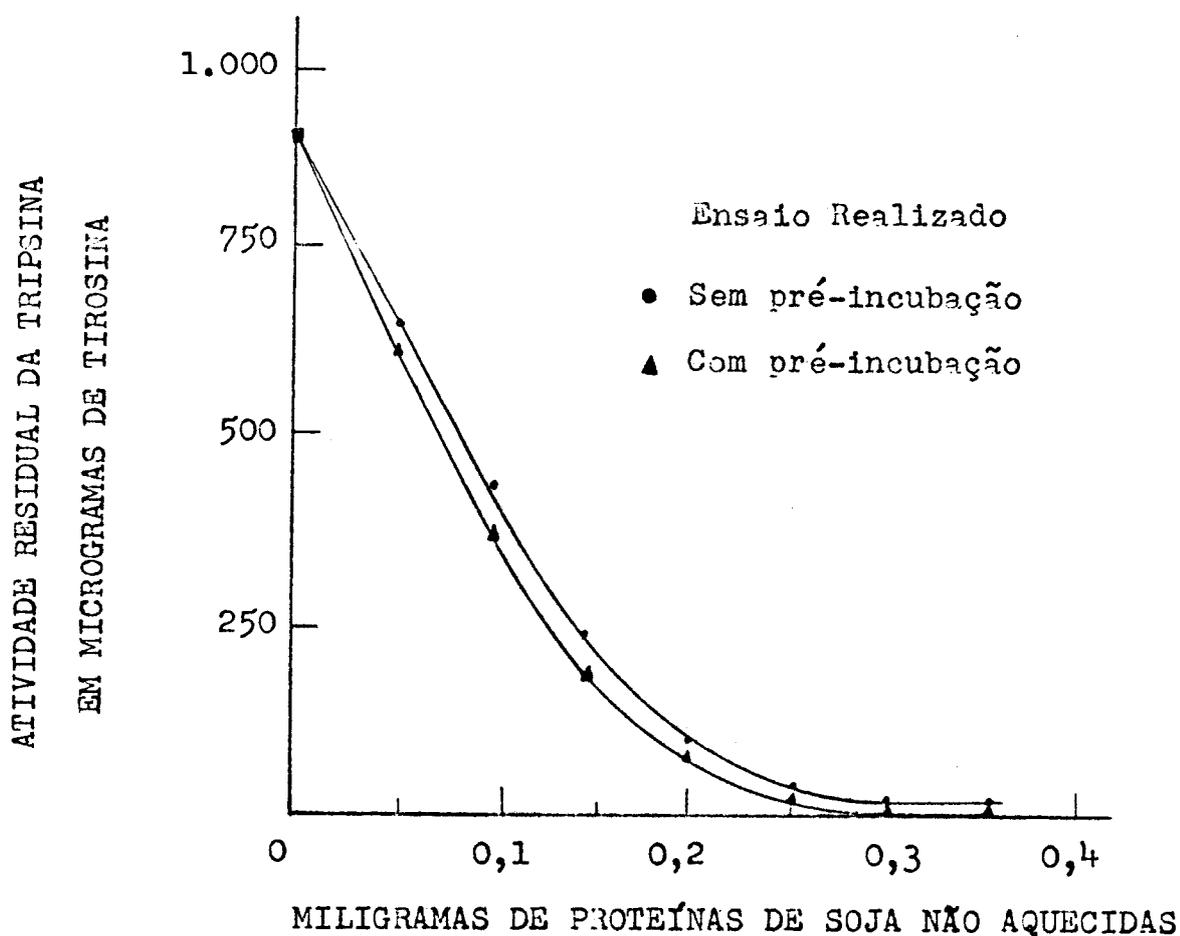
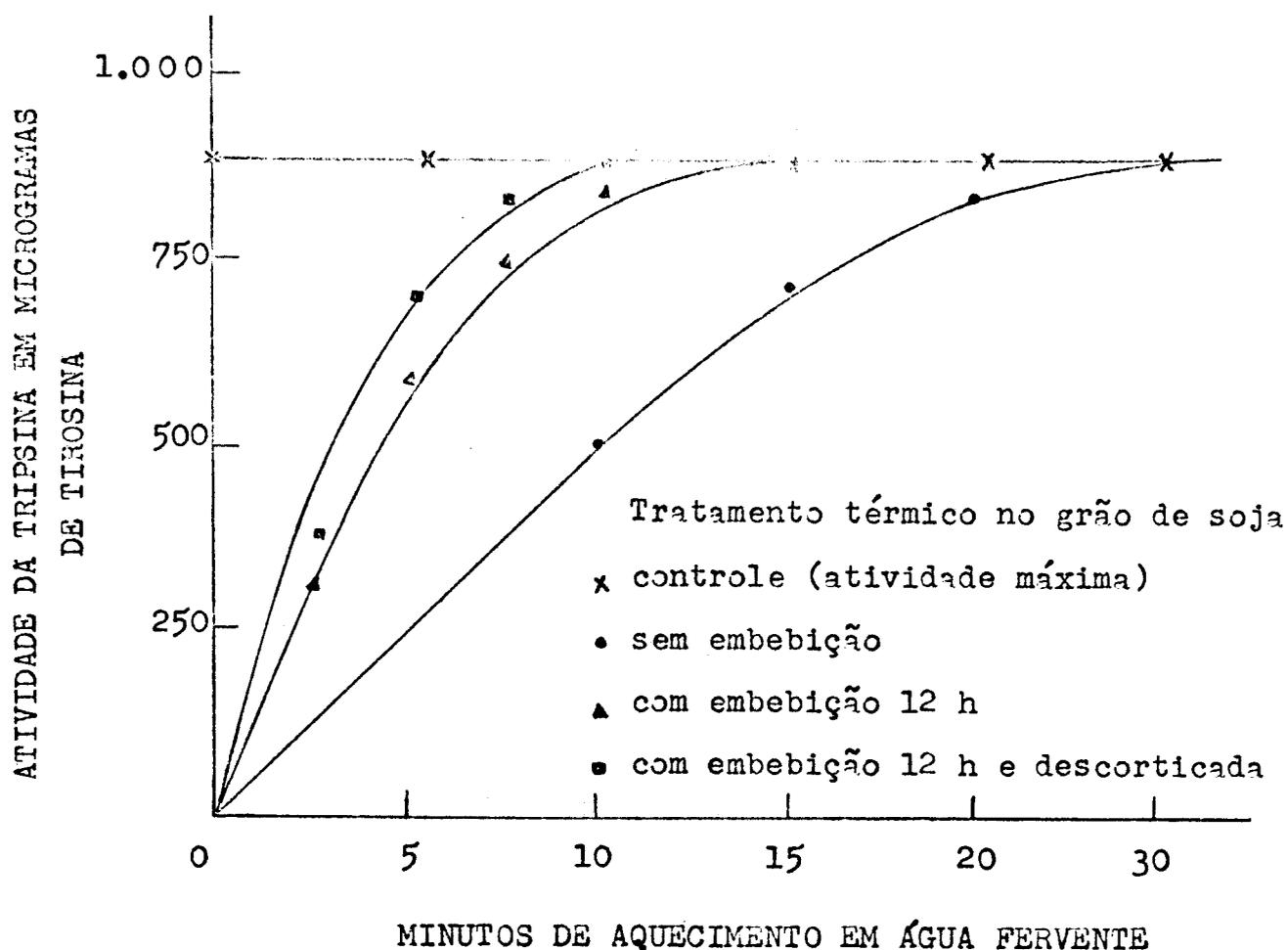


FIGURA 7: INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA NA SOJA EM GRÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO

Substrato: solução de caseína 2% (1 ml); enzima: solução de tripsina 100 microgramas/ml (0,1 ml); inibidor: extrato de soja 0,6 mg/ml (0,5 ml); tampão de fosfato de sódio 1,0 M, pH 7,6 (0,4 ml); incubação: 30 minutos a 37°C; leitura a 660 nm.



QUADRO 8: INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA NO EXTRATO EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO^a

Descrição dos Parâmetros	Con- tro- le	Minutos de Aquecimento						
		Água Fervente				Autoclave-121°C		
		0	30	60	120	15	30	45
Microgramas Tirosina liberadas por ml de caseína 2%	882	0,0	10	54	115	512	882	882
10^{-4} U.T. ^{cas. b} li- das na curva, Fig. 4	298	0,0	3,5	18	39	173	298	298
10^{-4} U.T. ^{cas. ini-} bidas (por diferen- ça)	0,0	298	294	280	259	125	0,0	0,0
% Inativação da Antitripsina	0,0	0,0	1,2	6,2	13	50	100	100

a - Tratamento térmico feito no extrato de proteínas da soja crua.

b - Unidades de tripsina, usando-se caseína como substrato, conforme estabelecido em 3.2.2.9.

4.10. Inativação da Hemaglutinina da Soja pelo Tratamento Térmico

No Quadro 9, página seguinte, estão representados os resultados da inativação da hemaglutinina em função do tempo de tratamento térmico, com água fervente, feito no grão. No Quadro 10, página 53, estão os resultados do ensaio feito pelo mesmo procedimento, porém o aquecimento foi feito no extrato. Preparou-se extrato de soja que não sofreu tratamento térmico, acertou-se a concentração para 1 mg/ml de proteínas e aplicou-se tratamento térmico, banho-maria 100°C por 2,5; 5,0 e 7,5 minutos. A seguir, fizeram-se as diluições e realizou-se o teste. Usou-se o método descrito em 3.2.2.11. e o extrato de proteínas nas concentrações decrescentes de 1 mg/ml até 0,000244 mg/ml. A inativação da hemaglutinina foi dada em função da concentração de proteínas no extrato, necessária para aglutinação dos eritrócitos do sangue de coelho, extraído por punção-cardíaca e tratados com tripsina. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

QUADRO 9: INATIVAÇÃO DA HEMAGLUTININA DA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO^a E DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Extrato protéico nas concentrações de 1 mg a 0,000244 mg/ml; suspensão de eritrócitos de coelho (punção-cardíaca) de absorbância 0,50 em 620 nm; mistura do extrato e eritrócitos na proporção de 1:1; repouso por uma hora; centrifugação por 5 minutos a 200 x G; observação da aglutinação dos eritrócitos a olho nu ou pelo microscópio.

Proteínas no Extrato (mg/ml)	Aquecimento em Minutos						
	0	5	10	20	25	30	45
0,500000	+	+	+	+	+	+	-
0,250000	+	+	+	+	+	+	-
0,125000	+	+	+	+	+	-	-
0,062500	+	+	+	+	+	-	-
0,031250	+	+	+	+	-	-	-
0,015625	+	+	+	+	-	-	-
0,007813	+	+	+	-	-	-	-
0,003906	+	+	-	-	-	-	-
0,001953	+	+	-	-	-	-	-
0,000977	+	-	-	-	-	-	-
0,000488	+	-	-	-	-	-	-
0,000244	-	-	-	-	-	-	-

a - Tratamento térmico, em água fervente, feito no grão da soja.

QUADRO 10: INATIVAÇÃO DA HEMAGLUTININA DA SOJA EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO^a E DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Extrato protéico nas concentrações de 1 mg a 0,000244 mg/ml; suspensão de eritrócitos de coelho (punção-cardíaca) de absorvância 0,50 em 620 nm; mistura do extrato e eritrócitos na proporção de 1:1; repouso por uma hora; centrifugação por 5 minutos a 200 x G; observação da aglutinação dos eritrócitos a olho nu ou pelo microscópio.

Proteínas no Extrato (mg/ml)	Aquecimento em Minutos			
	0,0	2,5	5,0	7,5
0,500000	+	+	+	-
0,250000	+	+	+	-
0,125000	+	+	+	-
0,062500	+	+	+	-
0,031250	+	+	-	-
0,015625	+	+	-	-
0,007813	+	+	-	-
0,003906	+	+	-	-
0,001953	+	-	-	-
0,000977	+	-	-	-
0,000488	+	-	-	-
0,000244	-	-	-	-

a - Tratamento térmico, em banho-maria 100°C, feito no extrato protéico em lugar de ser no grão de soja.

4.11. Correlação Gráfica entre a Inativação do Fator Antitripsina, da Urease e a Perda de Solubilidade das Proteínas da Soja

Nas Figuras 8-A, B e C, respectivamente nas páginas seguintes, estão representadas as correlações gráficas existentes entre a inativação do fator antitripsina, atividade ureática e a solubilidade das proteínas da soja em função do tratamento térmico e das condições de unidade da amostra.

No estabelecimento dessas correlações, usaram-se os dados das Figuras 1, 3 e 7, sendo representados em percentagem.

FIGURA 8-A: CORRELAÇÃO GRÁFICA ENTRE A INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA, DA UREASE E A PERDA DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA SOJA

Tratamento térmico feito no grão de soja sem embebição. No estabelecimento dessa correlação, usaram-se os dados das Figuras 1, 3 e 7, sendo representados em percentagem.

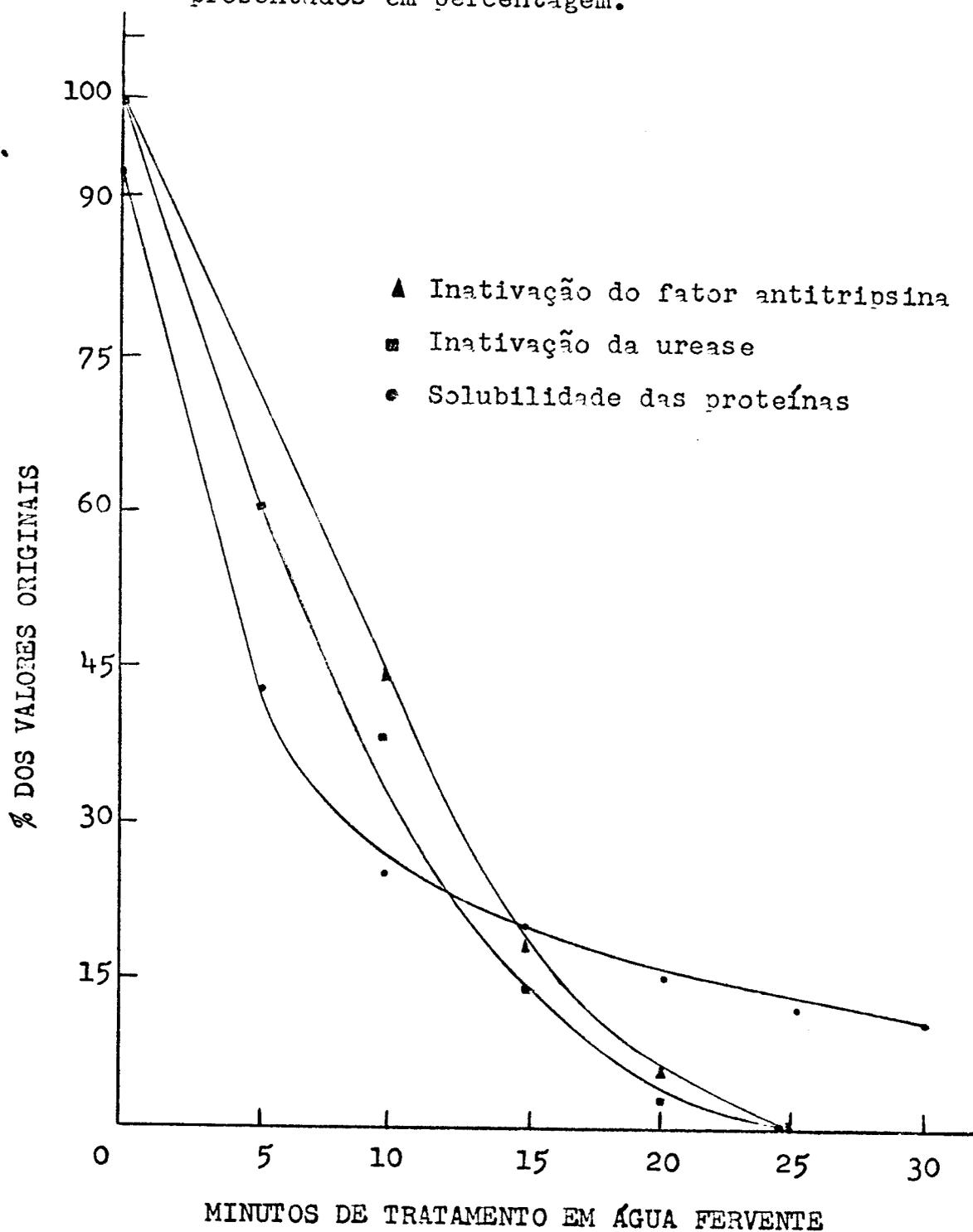


FIGURA 8-B: CORRELAÇÃO GRÁFICA ENTRE A INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA, DA UREASE E A PERDA DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA SOJA

Tratamento térmico feito no grão de soja com embebição 12 horas. No estabelecimento dessa correlação, usaram-se os dados das Figuras 1, 3 e 7, sendo representados em porcentagem.

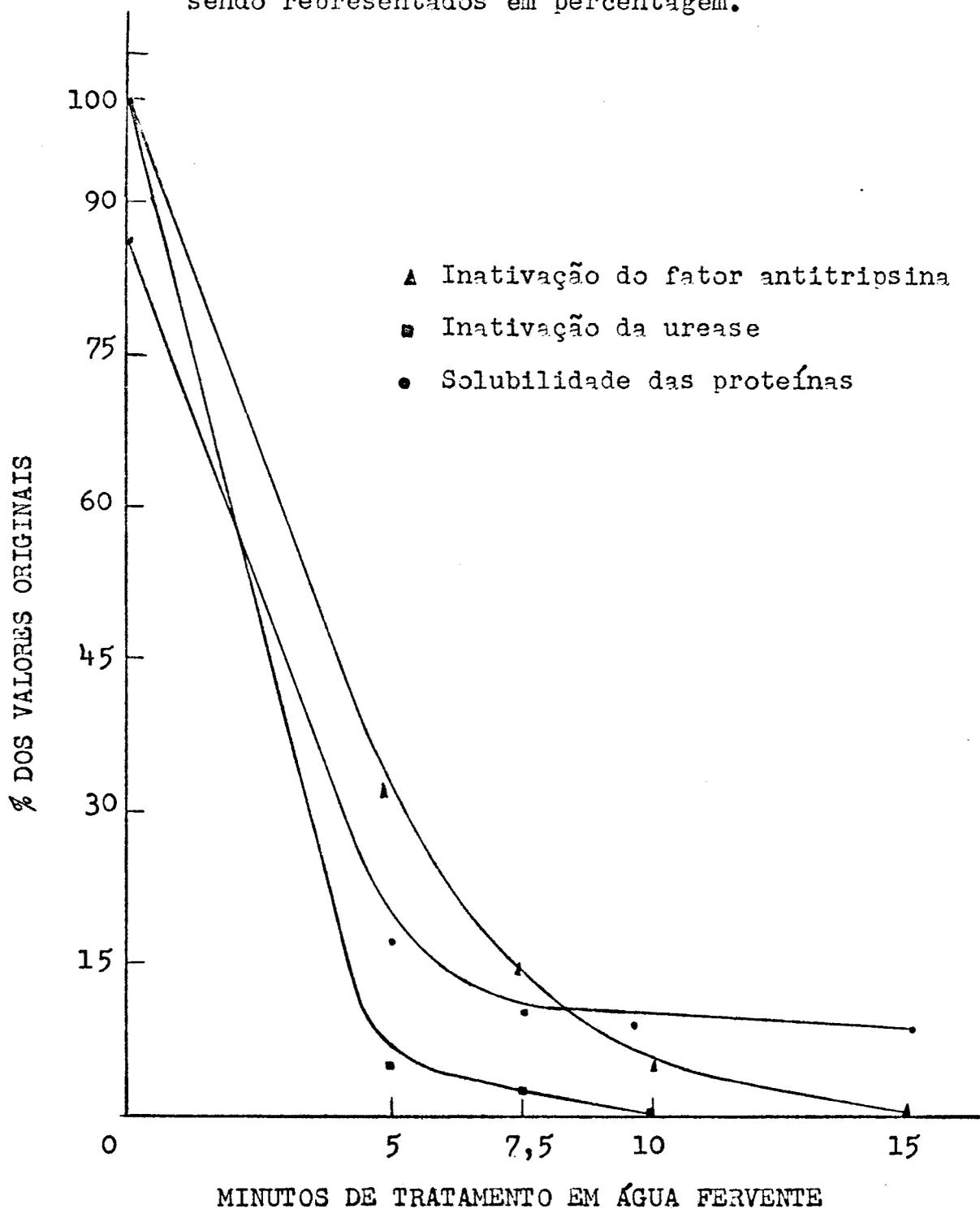
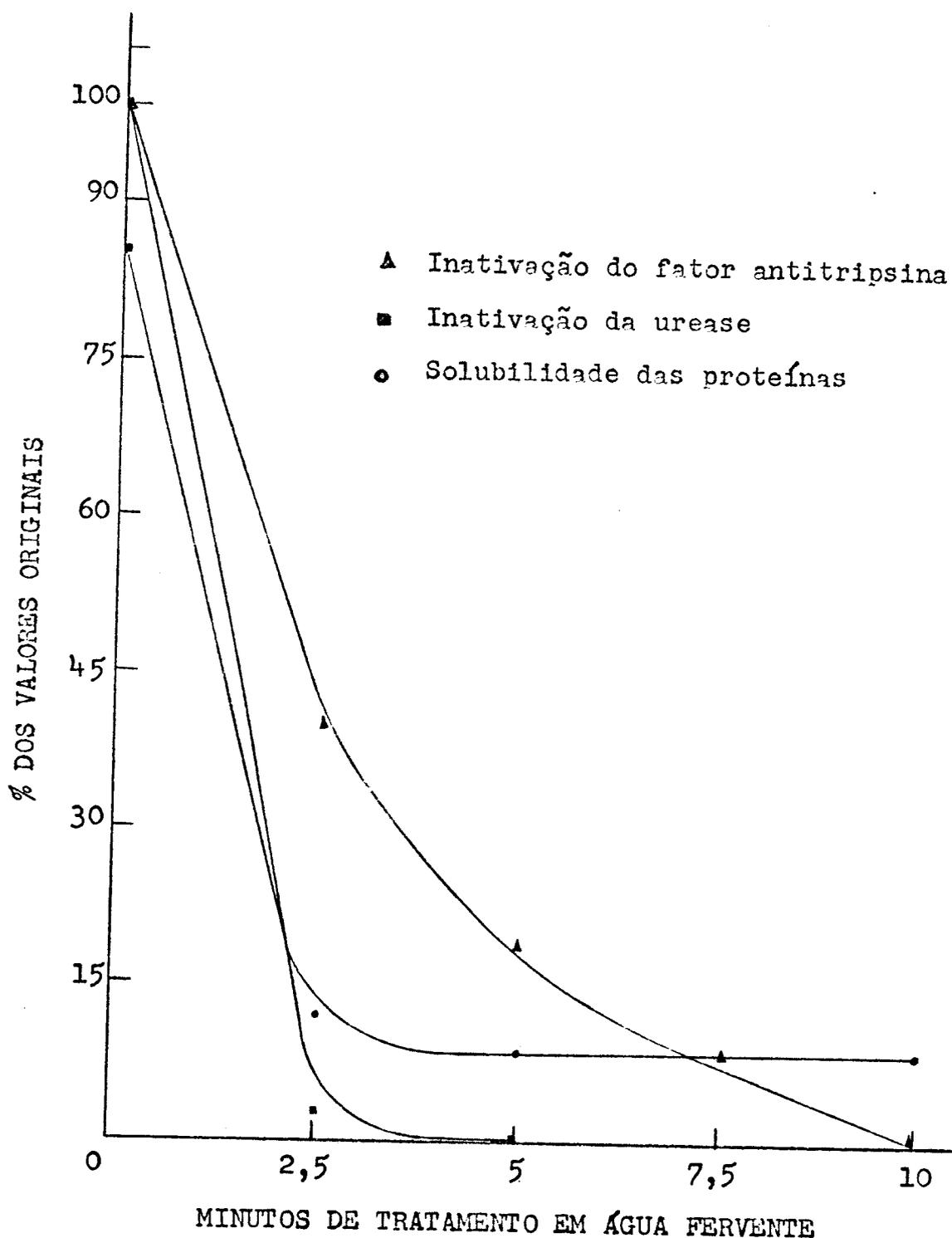


FIGURA 8-C: CORRELAÇÃO GRÁFICA ENTRE A INATIVAÇÃO DO FATOR ANTITRIPSINA, DA UREASE E A PERDA DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA SOJA

Tratamento térmico feito no grão de soja com embebição de 12 h e descorticado. No estabelecimento dessa correlação, usaram-se os dados das Figuras 1, 3 e 7, sendo representados em percentagem.



4.12. Ensaio Biológicos

No Quadro 11, página seguinte, estão representados os valores de PER (quociente de eficiência protéica) das proteínas de soja submetidas a diferentes tratamentos no laboratório e na indústria. Utilizou-se o procedimento descrito em 3.2.3. na realização desse ensaio. Em todos os casos, foi usada a caseína como padrão.

Nas Figuras 9 e 9-A, páginas 60 e 61, estão representadas as curvas de crescimento médio dos ratos utilizados nos ensaios biológicos (PER), tendo-se tomado os pontos correspondentes aos pesos médios dos grupos no: 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia do ensaio.

QUADRO 11: QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTÉICA (PER) EM PRODUTOS DE SOJA^a - Ratos machos, da linhagem "Whistar", com idade de 21 a 25 dias (40-50 g) no início do ensaio, mantidos em gaiolas individuais com água e comida "ad libitum".

Descrição das Amostras	PER Encontrado	PER Corrigido Caseína=2,5
Farinha sem tratamento térmico ^b - 1ª fase	- 1,08	- 1,36
Farinha preparada com soja laminada ^b - 2ª fase	2,24	1,67
Farelo de soja na saída da rosca secadora ^b - 3ª fase	2,44	1,82
Farelo tostado de soja ^b - 4ª e última fase	2,31	1,72
Isolado protéico de soja, procedência industrial	1,72	1,28
Farinha de soja desengordurada preparada no laboratório	2,66	1,98
Isolado protéico de soja preparado no laboratório	2,02	1,50
Leite integral de soja, em pó, preparado no laboratório	1,75	1,30
Resíduo do leite de soja preparado no laboratório	1,30	0,97
Padrão preparado com caseína	3,36	2,50

a - Ensaio realizado com 4 produtos preparados no laboratório e com 5 da indústria, tendo-se caseína como padrão.

b - Farinha de soja desengordurada, granulometria de 50 mesh, preparada com os produtos das 4 principais fases da indústria de óleo, conforme procedimento 3.2.1.4.

FIGURA 8: CURVAS DE CRESCIMENTO MÉDIO DOS RATOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS (PER)

Cada ponto representa a média de ganho de peso de 9 ratos machos, da linhagem "Whistar", com idade de 21 a 25 dias (40-50 g) no início do ensaio, mantidos em gaiolas individuais com comida e água "ad libitum". Curvas A; B; C e D representam as dietas preparadas com farinha de soja, proveniente das 4 principais fases da indústria de óleo; curva E representa dieta preparada com farinha de soja desengordurada preparada no laboratório e curva F, dieta padrão preparada com caseína.

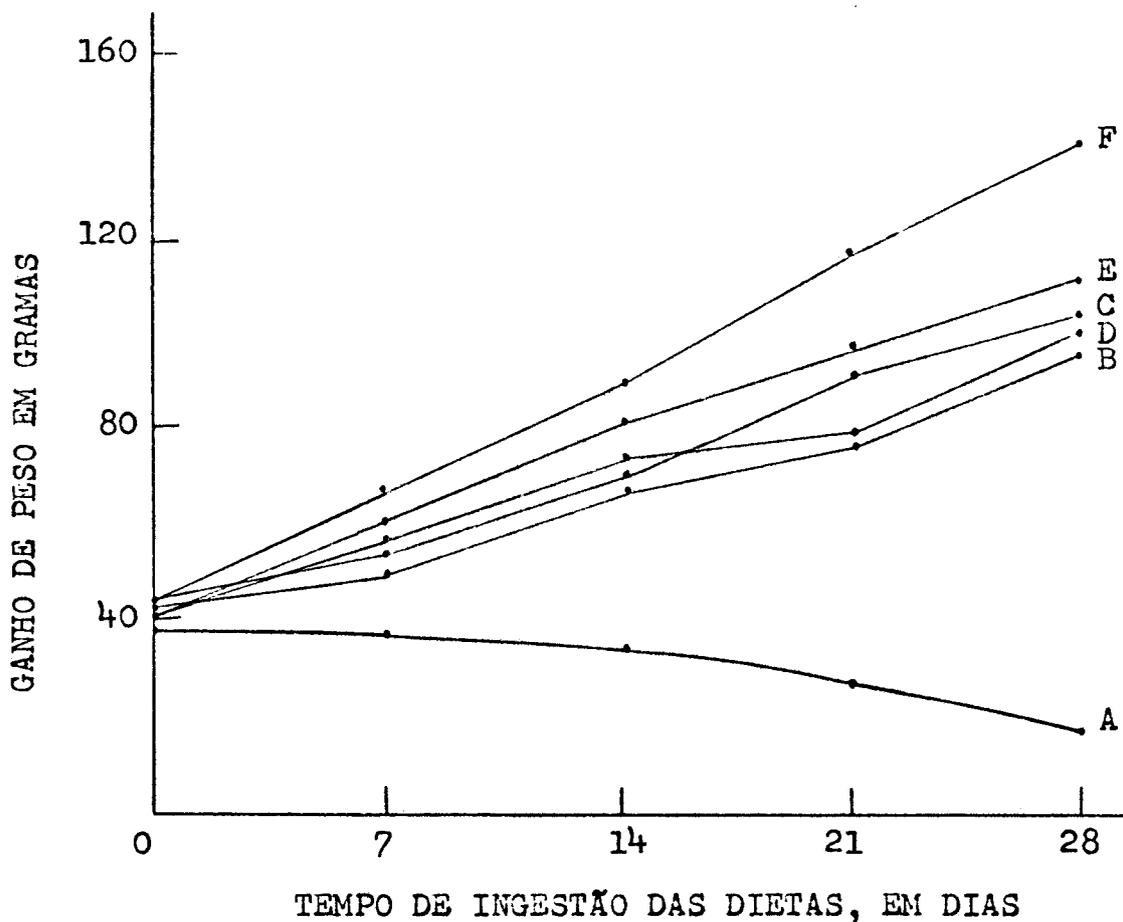
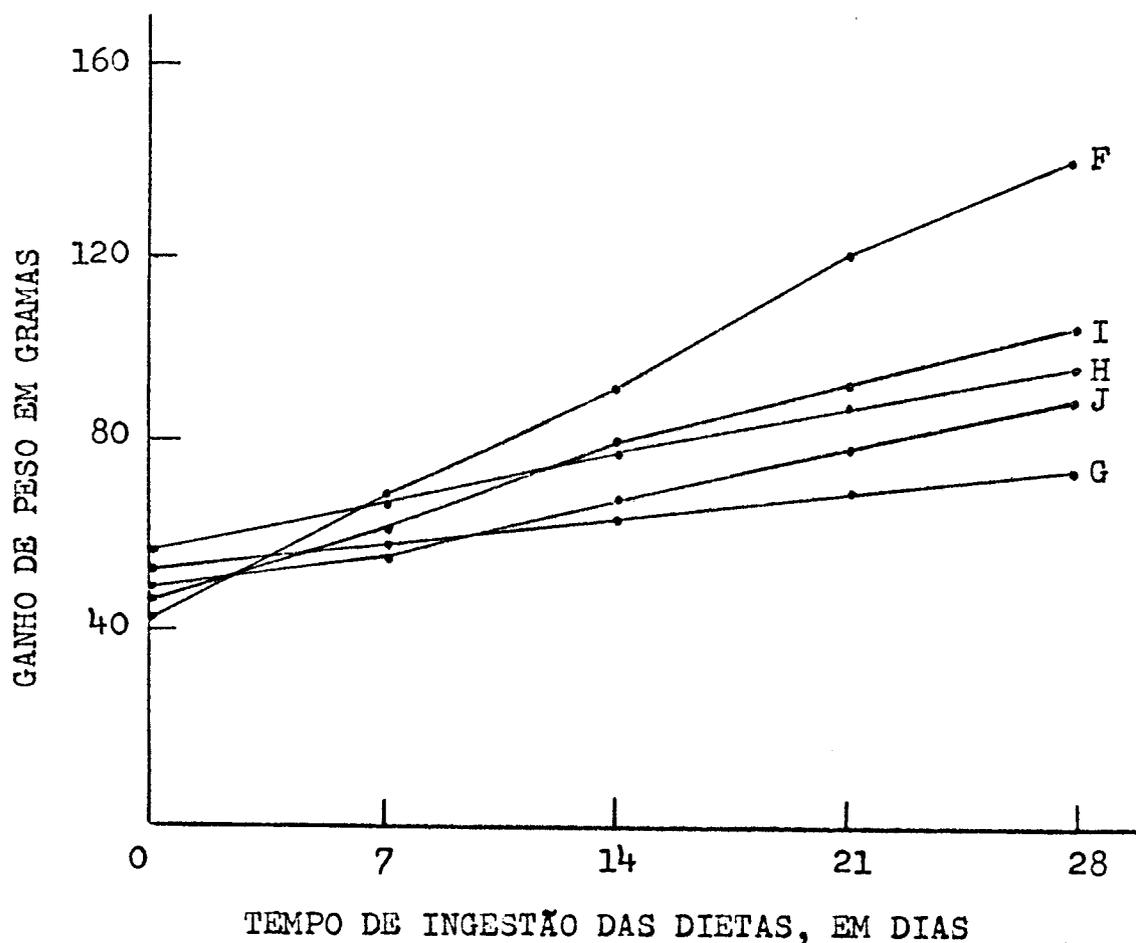


FIGURA 8-A: CURVAS DE CRESCIMENTO MÉDIO DOS RATOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS (PER)

Cada ponto representa a média de ganho de peso de 9 ratos machos, da linhagem "Whistar", com idade de 21 a 25 dias (40-50 g) no início do ensaio, mantidos em gaiolas individuais com comida e água "ad libitum". Curvas G; H e I representam as dietas, preparadas, respectivamente, com resíduo do leite de soja; leite integral de soja, em pó e isolado protéico no ponto isoelétrico, produtos esses preparados no laboratório. Curva J representa a dieta preparada com isolado protéico de procedência industrial em forma de proteinato de sódio e curva F, dieta padrão preparada com caseína.



4.13. Confronto entre o Valor Nutricional (PER) e Análises Físico-Químicas das Proteínas da Soja

No Quadro 12, página seguinte, estão representados os valores dos ensaios biológicos (PER), valores esses tomados do Quadro 11, em confronto com as análises de: 1) percentagem de solubilidade das proteínas em água, usando-se o procedimento descrito em 3.2.2.4.; 2) atividade ureática, conforme procedimento relacionado em 3.2.2.7.; 3) atividade residual do fator antitripsina, usando-se o método descrito em 3.2.2.10. O confronto entre esses resultados destina-se a permitir melhor interpretação dos resultados do valor nutricional das proteínas da soja nos produtos analisados. Os resultados são a média de duas ou mais determinações.

QUADRO 12: CONFRONTO ENTRE O VALOR NUTRICIONAL (PER)^a E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS DA SOJA

Descrição das Amostras	PER ^a	Solubilidade das Proteínas (%)	Atividade Ureática (unidade pH)	Atividade Residual do Fator Antitripsina (%)
Padrão preparado com caseína	3,36	63,00	-	-
Farinha de soja desengordurada preparada no laboratório	2,66	8,50	0,0	5,5
Farelo de soja na saída da rosca secadora ^b - 3ª fase	2,44	20,90	0,5	41,5
Farelo tostado de soja ^b - 4ª e última fase	2,31	11,60	0,3	10,72
Farinha preparada com soja laminada ^b - 2ª fase	2,24	33,50	2,2	83,1
Isolado protéico de soja preparado no laboratório	2,02	7,36	0,2	89,5
Leite integral de soja, em pó, preparado no laboratório	1,75	26,02	1,9	94,2
Isolado protéico de soja, procedência industrial	1,72	10,10	0,3	37,0
Resíduo do leite de soja preparado no laboratório	1,30	25,89	0,1	17,5
Farinha sem tratamento térmico ^b - 1ª fase	-1,08	84,80	2,8	100,0

a - Os valores de PER (quociente de eficiência protéica) são provenientes do Quadro 11.

b - Farinha de soja desengordurada, granulometria de 50 mesh, preparada com os produtos das 4 principais fases da indústria de óleo, conforme procedimento 3.2.1.4.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Análises Químicas e Físicas

As análises químicas e físicas (Quadro 4), efetuadas nos produtos e subprodutos da soja, elaborados no laboratório e na indústria, assinalam resultados similares aos encontrados por vários pesquisadores.

A farinha de soja desengordurada, preparada com os produtos das 4 principais fases da indústria de óleo, conforme descrito em 3.2.1.4., tem um teor de proteínas total de 46,3% e 46,4%, enquanto a farinha, preparada no laboratório, apresenta 54,8%, isso porque foi descorticada e desengordurada. Esse valor de 54,8% está de acordo com Smith e col (92) que mencionam um rendimento variável de 39 a 56 g/100 de farinha de soja descorticada e desengordurada (em base seca). O leite integral de soja, em pó, precipitado protéico de soja e resíduo do leite de soja apresentam, respectivamente, 47,4%; 53,5% e 28% como o total de proteínas. Esses valores parecem muito baixos, quando comparados com a farinha de soja, preparada no laboratório, que tem 54,8%, o que é devido ao fato de aqueles produtos terem sido preparados com a soja integral e, por conseguinte, possuírem alto teor de gordura (respectivamente, 26,3; 32,5 e 16,5%). O isolado protéico, de procedência industrial, na forma de proteinato de sódio, cujas especificações são 90% de proteínas, nas análises de laboratório, apresentou 86,6% de proteínas totais.

As análises de proteínas totais, nitrogênio não protéico, multiplicado pelo fator 6,25, foram realizadas nas amostras, para determinar as proporções a serem usadas nas dietas para os testes biológicos.

5.2. Efeito da Relação Sólido:Solvente na Extração dos Compostos Nitrogenados da Soja

No Quadro 5, observa-se que a relação farinha:solvente de 1:30 (P:V) é suficiente, para dar boa extração das proteínas da soja. Na relação indicada, recuperou-se 95,4% do total de proteínas da amostra. À medida que aumenta a proporção de

sólido, gradativamente, diminui a recuperação das proteínas. O aumento da proporção de solvente de 30 para 50 não resultou em nenhuma vantagem. Esses valores estão de acordo com Smith, Belter e Johnsen (89) que, usando a relação de 1:40, conseguiram uma extração de 85-92%, enquanto que Smith e col. (92), usando extração dupla, nas relações de 1:20 e 1:10, conseguiram 92-97% de extração.

5.3. Solubilidade das Proteínas de Soja em Água em Função do Tratamento Térmico

Estudou-se a desnaturação das proteínas da soja, em função do tratamento térmico, pela medida da solubilidade em água, no seu pH natural, que é em torno de 6,6-6,8. Esse estudo possibilitou correlacionar a inativação dos agentes antinutricionais da soja (fator antitripsina e hemaglutinina) com a solubilidade das proteínas, que é um teste mais simples de ser realizado. A necessidade desse estudo é que todo o tratamento térmico a mais implica em redução das qualidades das proteínas da soja.

Na Figura 1, verifica-se que, na soja sem embebição, 15 minutos de tratamento térmico é suficiente, para reduzir a solubilidade em água para valores inferiores a 20%, enquanto que, na soja embebida e descorticada, essa mesma redução da solubilidade já foi observada com apenas 2,5 minutos de aquecimento. Esses valores estão de acordo com Belter e Smith (10) que realizaram ensaio com farinha integral, desengordurada e tratada com vapor a pressão atmosférica por tempos variáveis. Esses resultados também demonstram a grande sensibilidade das proteínas da soja quanto à desnaturação com calor úmido. A solubilidade indicada inclui peptídios e peptonas solúveis bem como nitrogênio não protéico. Em nosso estudo, os valores de nitrogênio não protéico, nas farinhas preparadas com material da indústria, variaram entre 3,40 e 3,94%. Na farinha preparada no laboratório a partir da soja, submetida a embebição (12 horas), o valor do nitrogênio não protéico caiu para 1,60%, porque, durante a embebição, há difusão de substâncias nitrogenadas de baixos pesos moleculares para a água de embebição, incluindo parte do fator antitripsina.

Por outro lado, segundo Becker, Milner e Nagel (9), o ni

trogênio não protéico da soja pode variar de 2,88 a 7,80%. A farinha comercial de soja (farelo tostado de soja) apresenta uma solubilidade em torno de 7 a 10%, o que implica dizer que, praticamente, toda a proteína foi insolubilizada durante o processamento, uma vez que 15 minutos é suficiente, para baixar a solubilidade a níveis tão baixos, que todo o tratamento adicional influirá pouco na solubilidade residual.

5.4. Solubilidade das Proteínas da Farinha de Soja em Função da Concentração de KOH e pH Final do Extrato

A indústria de soja, em geral, usa a solubilidade das proteínas como índice de eficiência do tratamento térmico na inativação dos fatores antinutricionais. Esse assunto tem gerado muitas polêmicas quanto à percentagem de extração das proteínas, uma vez que a mesma pode variar muito em função do pH e concentração de álcali na extração. Smith e Circle (90) estabeleceram a curva de extratibilidade das proteínas da soja, quando não tratada termicamente, em função do pH e de vários sais. Esses autores observaram que, no pH entre 4 e 5, está o mínimo da solubilidade, sendo a região isoeletrica da maior parte das proteínas da soja. Por outro lado, a extração com água (pH 6,6-6,8) já resulta em extração igual ou mais eficiente do que a extração em ácido pH 2,0. A elevação do pH para 8,5-9,0 provoca uma extração quase total, quando a proteína não foi tratada termicamente. Belter e Smith (10) observaram que, frequentemente, farinha de soja comercial (farelo tostado de soja), apresenta uma solubilidade das substâncias nitrogenadas em água, inferior a 8%. A indústria de soja, muitas vezes, relaciona o índice de solubilidade do farelo tostado como sendo em torno de 65-75%.

Para esclarecer esses resultados, aparentemente contraditórios, na Figura 2, estão representadas as curvas de solubilidade da amostra tratada termicamente, quando a extração foi feita com concentração crescente de KOH no extrato. Observa-se que, quanto maior for a desnaturação das proteínas pelo calor, maior é a influência do aumento da concentração de álcali na extratibilidade. Na soja sem tratamento, praticamente, não há diferença na solubilidade em água ou em 0,2% de KOH no extrato, cujo pH é superior a 12, enquanto na amostra que, em

água, apresenta solubilidade em torno de 15%, quando extraída em 0,2% de KOH, a solubilidade eleva-se para mais de 60%. Com isso, fica evidenciada a necessidade de especificar as condições de pH e concentração de álcali, ao dar um índice de solubilidade de proteínas desnaturadas termicamente.

5.5. Inativação da Urease em Função do Tempo de Tratamento Térmico

A soja nativa tem a enzima urease em alta quantidade. A determinação da atividade ureática é importante, porque se constitui em teste simples e rápido na avaliação da eficiência do processo de tostagem da soja, uma vez que essa enzima apresenta resistência térmica semelhante aos fatores antinutricionais, especialmente o fator antitripsina. A indústria usa, frequentemente, o teste de atividade ureática, para verificar se o tratamento térmico foi adequado ou não.

Na Figura 3, estão os resultados da inativação da urease em amostras de soja em grão (sem embebição, com embebição, com embebição e descorticada), que sofreram tratamento térmico, em água fervente. Observa-se que a inativação da atividade ureática, na amostra em que o tratamento foi no grão sem embebição, foi, progressivamente, aumentando até a destruição total aos 25 minutos. Nas amostras que foram somente embebidas e descorticadas, a inativação foi muito rápida, 10 e 5 minutos, respectivamente.

Esses resultados estão em concordância com os trabalhos de Croston, Smith e Cowan (25), Smith, Belter e Anderson (88) e Baker e Mustakas (7), que realizaram ensaios em farinha de soja com diferentes tratamentos térmicos e outras condições, bem como compararam métodos de medida de tal atividade. Segundo Baker e Mustakas (7), uma desvantagem do uso da atividade ureática, como índice de eficiência do tratamento térmico da soja, é que tratamento com altas temperaturas, por tempo curto, inativa, completamente, a urease, enquanto que grande quantidade de fator antitripsina, ainda, fica presente. Pelo que se observa nos nossos resultados, também a alta umidade inicial da amostra, antes do tratamento térmico, é responsável por uma rápida inativação da urease, não coincidindo a inativação da mesma com a inativação do fator antitripsina.

Por outro lado, como pode ser observado no Quadro 8, o fator antitripsina é mais resistente à destruição térmica, quando em solução, enquanto que a urease comporta-se de maneira inversa. Pode-se, assim, prever um paralelismo, o que, aliás, acontece, entre a destruição térmica do fator antitripsina e da urease, no farelo de soja nas condições da indústria (tostagem do farelo). Para produtos como isolado protéico de soja, leite de soja, etc., não é válido relacionar a destruição térmica da urease com o fator antitripsina.

5.6. Determinação da Lisina Disponível da Soja

Dos resultados apresentados no Quadro 6, pode-se observar que o aumento do tempo de tratamento térmico, em água fervente, até 30 minutos, também aumenta o teor de lisina disponível. No Quadro 7, estão os resultados da lisina disponível nas dietas usadas para os testes biológicos. Como pode ser observado nos referidos quadros, a lisina disponível tende a diminuir com o aumento do tratamento térmico, além de um certo limite. Esses resultados estão de acordo com Van Etten e col. (98) que analisaram a composição de aminoácidos das proteínas da soja. A lisina é um aminoácido essencial, e a sua disponibilidade é importante, para caracterizar o valor biológico das proteínas da soja. O grupo épsilon $-NH_2$ da lisina pode dar a reação de Maillard ou outras complexações durante o tratamento térmico, diminuindo a lisina disponível. Essa diminuição foi observada nas amostras analisadas, cujos resultados estão nos quadros já mencionados.

5.7. Atividade da Tripsina

Na Figura 4, está representada uma série de curvas variando a concentração da caseína e da tripsina, das quais escolheu-se o ponto com 2% de caseína e 10 microgramas de tripsina como a melhor condição para essa determinação. A seguir, da curva de 2% de caseína, determinou-se a atividade específica da tripsina usada, traçando-se uma linha tangente à primeira parte da curva e determinando-se a declividade. A declividade, ao ser dividida pelos minutos da digestão, dá a atividade por micrograma de tripsina por minuto, o que caracteriza

a atividade da tripsina usada.

$$|U.T.|^{cas.} = \frac{750}{6,9 \mu g \times 30} = 36 \times 10^{-1}$$

A partir dessa curva, foi traçada a Figura 5, em função das unidades de tripsina, a qual servirá de curva padrão da atividade da tripsina. O estabelecimento dessas condições é para poder-se determinar com maior exatidão a atividade do fator antitripsina da soja.

5.8. Determinação da Atividade do Fator Antitripsina da Soja

Dentre as proteínas da soja, não desnaturadas, existem algumas com pesos moleculares entre 8.000 e 24.000, que têm ação antitriptica (anti-enzima) inibindo a ação da enzima digestiva tripsina, Kunitz (48) e Bowman-Birk, segundo Frattalli (32).

A atividade inibitória do fator antitripsina é expressa em termos de unidades de tripsina inibidas, e a medida consiste, simplesmente, em comparar a atividade triptica na ausência e na presença de determinada quantidade de inibidor. A necessidade de realizar esse ensaio relaciona-se com o estabelecimento de condições de trabalho, uma vez que, nos trabalhos realizados anteriormente, os autores utilizaram o fator antitripsina purificado.

Na Figura 6, estão representados os valores da inativação da tripsina em função da concentração de proteínas nativas da soja (contendo o inibidor da tripsina). Observa-se que a concentração de 0,3 mg de proteínas de soja na mistura de reação é suficiente, para inibir, completamente, a atividade da tripsina nas condições do método. Essa concentração de proteínas será usada como ponto de referência, para estimar a atividade residual do fator antitripsina em qualquer produto de soja.

Também, pode-se observar, na mesma figura, que, nos ensaios feitos com pré-incubação (inibidor + tripsina), a inibição foi ligeiramente maior do que aqueles sem incubação, en-

tretanto, por ter sido a inibição, praticamente, total para os dois casos, eliminou-se a pré-incubação nos testes posteriores. Isso evidencia que a combinação entre a tripsina e o fator antitripsina Kunitz (48) é, aparentemente, instantânea, formando um complexo muito estável.

5.9. Inativação do Fator Antitripsina e da Hemaglutinina da Soja em Função do Tratamento Térmico

Mantida a temperatura constante, o fator antitripsina e a hemaglutinina da soja podem ser progressivamente inativados, em função do tempo de exposição ao calor. Como a inativação desses fatores é mais eficiente com calor úmido, é evidente que, com maior umidade inicial do grão de soja, mais rápida e uniforme será a transmissão de calor, conseqüentemente, inativando-os mais rapidamente. Se, além de umedecidos, os grãos forem descorticados, e seus cotilédones separados, isto reduzirá a espessura do grão, essencialmente, à metade e, conseqüentemente, o tempo de inativação. O estabelecimento do mínimo de tratamento térmico, necessário para a inativação dos fatores antinutricionais, é muito importante, visto que, quanto maior a exposição ao calor, tanto maior será a insolubilização das proteínas e, mesmo, a destruição de fatores nutricionais como vitaminas e aminoácidos essenciais, diminuindo a qualidade e valor biológico das proteínas.

Na Figura 7 e nos Quadros 8, 9 e 10, estão os resultados da inativação do fator antitripsina e da hemaglutinina pelo tratamento térmico nas amostras tratadas em condições diferentes de umidade. Observa-se que, na soja, em grão, que não sofreu embebição antes do tratamento térmico, são necessários 45 minutos para inativação completa da hemaglutinina (Quadro 9), sendo, por conseguinte, mais resistente do que o fator antitripsina que, nas mesmas condições, leva 25 minutos para total inativação (Figura 7). Entretanto, quando o tratamento térmico é feito no extrato protéico, em lugar de ser no grão, apenas 7,5 minutos, em água fervente, são suficientes para total inativação da hemaglutinina (Quadro 10), enquanto que, são necessários 30 minutos a 121°C (autoclave) para completa inativação do fator antitripsina, conforme mostra o Quadro 8. Na soja embebida e na embebida e descorticada, o tempo foi, res-

pectivamente, de 15 e 10 minutos para total inativação do fator antitripsina.

É interessante notar que, quando o aquecimento a 100°C foi feito no extrato protéico (solução), o fator antitripsina mostrou-se muito mais resistente ao tratamento térmico. Mesmo com 120 minutos de aquecimento, a inativação não foi completa (Quadro 8). Ainda não temos uma explicação satisfatória para esse fenômeno, uma vez que é de se esperar que a transmissão de calor seja mais eficiente na solução. Apenas como especulação, queremos lembrar que esses inibidores possuem pesos moleculares diferentes, tendendo a se associarem (maior peso molecular), em elevadas concentrações e dissociarem (menor peso molecular) em soluções diluídas. É possível que o processo de extração em soluções diluídas seja responsável por esse aumento de resistência térmica. Foi observado, também, que a maior ou menor facilidade de inativação do fator antitripsina, em solução, depende do pH da solução, sendo que, em valores de pH ligeiramente ácidos, as proteínas tendem a coagular com o calor, enquanto que, em valores de pH neutros ou ligeiramente alcalinos, as proteínas permanecem em solução com o aquecimento, parecendo oferecer maior resistência à ação do calor.

Os dados indicam que, do ponto de vista da resistência térmica, a hemaglutinina comporta-se de maneira inversa ao fator antitripsina, sendo este mais resistente em solução, enquanto que a hemaglutinina mostrou-se mais resistente no grão de soja, o que poderá, logicamente, ser explicado pela maior dificuldade de transmissão de calor no grão intacto. Observa-se (Quadros 9 e 10), também, a grande reatividade da hemaglutinina não aquecida, a qual pode promover a coagulação dos eritrócitos em concentração tão baixa como a de 0,5 microgramas de proteínas de soja na mistura de reação (2 ml).

5.10. Correlação entre a Inativação do Fator Antitripsina, da Urease e a Perda de Solubilidade das Proteínas da Soja

A inspeção dos dados representados graficamente nas Figuras 8-A, B e C sugerem: 1) que existe boa correlação aparente entre a insolubilização das proteínas, inativação do fator

antitripsina e da urease, quando o aquecimento foi feito no grão sem embebição (Figura 8-A); 2) quando o aquecimento foi feito no grão com embebição, a insolubilização das proteínas e a inativação da urease foram muito mais rápidas, do que a inativação do fator antitripsina, não havendo, graficamente, uma correlação aparente muito boa entre esses fatores (Figura 8-B); 3) na Figura 8-C, em que o aquecimento foi feito no grão embebido e descorticado, a correlação gráfica entre a inativação do fator antitripsina, da urease e a insolubilização das proteínas tornaram-se menos evidentes do que a já citada em 2.

5.11. Ensaio Biológico

Os dados do Quadro 11 representam o valor PER (quociente de eficiência protéica) que nada mais é do que o quociente do ganho de peso em gramas, por gramas de proteínas ingeridas com a dieta. Nas Figuras 9 e 9-A, estão representadas as curvas de crescimento médio dos ratos utilizados nos ensaios biológicos. Dos resultados do Quadro 11, observa-se que a farinha preparada no laboratório teve um PER que só foi superado pela caseína. Da farinha preparada com os 4 principais produtos da indústria do óleo de soja, o PER aumentou até a 3ª fase (saída da rosca secadora), diminuindo na 4ª fase. Isso mostra que, sob o aspecto do valor biológico das proteínas da soja, o tratamento térmico feito, após essa fase foi prejudicial. Por outro lado, a farinha que não sofreu tratamento térmico (1ª fase), evidenciou a existência de agentes antinutricionais extremamente prejudiciais e mesmo tóxicos para os animais, dando um PER negativo. Os ratos perderam peso durante todo o tempo, tendo morrido quatro deles até o final do ensaio, e os sobreviventes estavam em péssimas condições. As análises da atividade ureática e do fator antitripsina (Quadro 12) mostram-nos que, no material da indústria, essas atividades não foram completamente destruídas, mesmo na farinha tostada (4ª fase). Contudo, é de se notar que, mesmo na 2ª fase do processo, com um tratamento térmico reduzido, houve um aumento muito grande (até próximo do valor máximo) do PER, em relação ao material inicial não aquecido. Esses resultados sugerem que, na soja crua, devam existir outros fatores antinutricionais mais tóxicos que os fatores antitripsina e hemagly

tinina. Tais fatores de toxidez mais elevada seriam termolábeis, podendo sua ação ser eliminada do produto muito antes que a do fator antitripsina e da hemaglutinina. Observa-se (Quadro 11) um pequeno aumento do valor PER no material da 3ª fase, em relação ao da 2ª fase (material com menor tratamento térmico), e também, em relação ao da 4ª fase (farelo torrado). Isso sugere que, nas condições industriais, não é desejável o aquecimento até inativação completa da hemaglutinina e do fator antitripsina.

Ainda no Quadro 12, observa-se que, dos produtos preparados no laboratório, exceto a farinha de soja desengordurada, foi o isolado protéico que apresentou o valor PER mais elevado. O leite de soja integral, em pó, apresentou o valor PER inferior ao do isolado protéico, o que parece contraditório, entretanto, ao analisar o Quadro 12, vemos que os valores da atividade ureática, solubilidade das proteínas e atividade do fator antitripsina estão muito elevados, evidenciando que o tratamento térmico, para destruição dos agentes antinutricionais, foi insuficiente. Com relação ao isolado protéico obtido a partir do leite, observa-se que houve inativação quase que completa da urease, porém, apresentou-se com 90% de atividade residual para o fator antitripsina. Isso evidencia, mais uma vez, que, para produtos de soja líquidos ou com elevado teor de umidade, não há correlação positiva entre a inibição da atividade ureática e antitripsina com o tratamento térmico. O isolado protéico de procedência industrial teve um PER que só foi superior ao do resíduo do leite de soja, o que não deixa de surpreender, uma vez que o mesmo é um produto comercial utilizado na alimentação humana. Deve-se, também, observar a grande diferença no valor PER entre o isolado protéico preparado no laboratório a partir do leite de soja e o produto comercial, evidenciando o baixo valor biológico do isolado protéico de procedência industrial. O valor PER mais elevado do isolado protéico do leite de soja é, ainda, mais surpreendente, dada a alta atividade residual encontrada no produto para o fator antitripsina. Nas Figuras 9 e 9-A, observa-se a grande diferença no aumento de peso médio dos ratos em função da melhor qualidade biológica das proteínas, estabelecido em função do valor PER.

6. CONCLUSÕES

1. O fator antitripsina da soja é menos resistente ao calor do que a hemaglutinina, quando o tratamento térmico é aplicado no grão ou farinha, entretanto, se o tratamento térmico for feito no extrato protéico, então essa resistência comporta-se de maneira inversa, sendo que, no extrato, o fator antitripsina torna-se muito resistente.

2. As resistências térmicas do fator antitripsina, hemaglutinina e urease são, praticamente, iguais, e a inativação desses agentes apresenta boa correlação com a solubilidade das proteínas, quando o tratamento térmico é feito no grão ou na farinha de soja com baixo teor de umidade. Essa correlação não é boa, quando tal tratamento é feito no grão embebido ou no extrato (solução).

3. No grão de soja embebido e descorticado, são necessários 10 minutos de tratamento em água fervente para total inativação do fator antitripsina, hemaglutinina e atividade ureáica e para baixar a solubilidade das proteínas a níveis inferiores a 10%. Essa inativação necessita 30 minutos, quando tal tratamento é feito no grão sem embebição.

4. O uso da atividade residual da urease como índice de eficiência da inativação dos agentes antinutricionais, pelo tratamento térmico, é válido nas condições da indústria, entretanto, para produtos de soja com alta umidade ou líquido, e, para o extrato (solução), essa correlação não é positiva.

5. Na extração das proteínas de soja, a relação sólido: solvente de 1:30 (P:V) é a mais eficiente.

6. O efeito do aumento do pH e concentração de base na extração das proteínas de soja é tanto mais pronunciado, quanto maior for o estado de desnaturação térmica das proteínas.

7. A lisina disponível da soja crua aumenta com o tempo de tratamento térmico até 30 minutos, para, depois, baixar.

8. O tratamento térmico, aplicado na soja pela indústria de óleo, não é o mais adequado, uma vez que a tostagem diminui o PER das proteínas, sem contudo inativar completamente os fatores antitripsina e hemaglutinina. O farelo de soja, depois de extraído o óleo e na saída da rosca secadora, apresenta valor biológico maior do que o farelo tostado.

9. A farinha de soja preparada no laboratório tem um valor PER só superado pelo padrão de caseína.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ALLISON, R.M.; LAIRD, W.M. & SYNGE, R.L.M. Notes on a deamination method proposed for determining "chemically available lysine" of proteins. Brit. J. Nutr., 29: 51-55, 1973.
2. ALTSCHUL, A.M. Processed plant protein foodstuffs. In ALTSCHUL, A.M. New York, Academic Press Inc., 1958.
3. AMBROSE, A.M. Naturally occurring antienzymes (inhibitors). In NAS/NRC. Toxicants occurring naturally in foods. Washington, D.C., NAS/NRC, 1966. p. 105-111. (Publication 1354).
4. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. "Cereal laboratory methods". 7th ed. Amer. Assn. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota, 1962. (AACC method 22-90).
5. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official and tentative methods. 3rd ed. Amer. Oil Chemists' Soc., Chicago, Illinois, rev. to 1966.
6. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. "Official methods of analysis". Assn. Off. Agr. Chem., Washington, D.C., 1955.
7. BAKER, E.C. & MUSTAKAS, G.C. Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: effect of acid and base additives. J. Am. Oil Chemists' Soc., 50: 137-141, 1973.
8. BEACON, B.D. Rapid determination of protein in soybean meals. J. Am. Oil Chemists' Soc., 49: 660-661, 1972.
9. BECKER, H.C.; MILNER, R.T. & NAGEL, R.H. A method for determination of monprotein nitrogen in soybean meal. Cereal Chem., 17: 447-457, 1940.

10. BELTER, P.A. & SMITH, A.K. Protein denaturation on soybean meal during processing. J. Am. Oil Chemists' Soc., 29: 170-174, 1952.
11. BIRK, Y.; GERTLER, A. & KHALEF, S. A pure trypsin from soya beans. Biochem. J., 87: 281-284, 1963.
12. BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917, 1959.
13. BOCCU, E.; VERONESE, F.M.; FONTANA, A. & BENASSI, C. A. Sulfenyl halides as modifying reagents for polypeptides and proteins. Quantitative evaluation of tryptophan and cysteine residues in proteins. Eur. J. Biochem., 13: 188-192, 1970.
14. BOOKWALTER, G.N.; MUSTAKAS, G.C.; KWOLEK, W.F.; MCGHEE, J. E. & ALBRECHT, W.J. Full-fat soy extrusion cooked: properties and food uses. J. Food. Sci., 36: 5-9, 1971.
15. BORCHERS, R.; ACKERSON, C.W. & SANDSTEDT, R.M. Trypsin inhibitor. III. Determination and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybeans. Arch. Biochem., 12: 367-374, 1947.
16. BOWMAN, D.E. Fractions derived from soy beans and navy beans which retard tryptic digestion of casein. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57: 139, 1944.
17. BOWMAN, D.E. Differentiation of soybean antitryptic factors. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 63: 547-550, 1946.
18. BURKART, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2ª Ed. ACME AGENCY, Soc. de Resp. Ltda., Buenos Aires, 1952.
19. CAREW JR., L.B.; HILL, F.W. & NESHEIM, M.C. The compara-

tive value of heated ground unextracted soybeans and heated dehulled soybean flakes as a source of soybean oil and energy for the chick. J. Am. Oil Chemists' Soc., 38: 249-253, 1961.

20. CARPENTER, K.J. The estimation of the available lysine in animal-protein foods. Biochem. J., 77: 604-610, 1960.
21. CASKEY JR., C.D. & KNAPP, F.C. Method for detecting inadequately heated soybean oil meal. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 16: 640-641, 1944.
22. CATSIMPOOLAS, N. & MEYER, E.W. Isolation of soybean hemagglutinin and demonstration of multiple forms by isoelectric focusing. Arch. Biochem. Biophys., 132: 279-285, 1969.
23. CHERNICK, S.S.; LEPKOVSKY, S. & CHAIKOFF, I.L. Dietary factor regulating the enzyme content of the pancreas: changes induced in size and proteolytic activity of the chick pancreas by the ingestion of raw soybean meal. Amer. J. Physiol., 155: 33-41, 1948.
24. COLLINS, J.L. & ANDERS, G.G. Deep-fried snack food prepared from soybeans and onions. Food Technol., 27: 46-54, 1973.
25. CROSTON, C.B.; SMITH, A.K. & COWAN, J.C. Measurement of urease activity in soybean oil meal. J. Am. Oil Chemists' Soc., 32: 279-282, 1955.
26. DECHARY, J.M. & ALTSCHUL, A.M. Major seed proteins and the concept of aleurins. In GOULD, R.F. "World Protein Resources". Washington, D.C., American Chemical Society, 1966. p. 148-158. (Advances in Chemistry Series, 57).
27. ELDRIDGE, H.C. & WOLF, W.J. Polyacrylamide-gel electro-

phoresis of reduced and alkylated soybean trypsin inhibitors. Cereal Chem., 46: 470-478, 1969.

28. EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L. & BAUER, D.H. Effect of heating proteins in the autoclave on the liberation of cystine and methionine by several digestion procedures. J. Agr. Food Chem., 10: 416-418, 1962.
29. FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem., 73: 627-650, 1927.
30. FORD, J.E. A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. Brit. J. Nutr., 14: 485-496, 1960.
31. FORD, J.E. A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. 2. The measurement of "available" methionine, leucine, isoleucine, arginine, tryptophan and valine. Brit. J. Nutr., 16: 409-425, 1962.
32. FRATTALI, V. Soybean inhibitors. III. Properties of a low molecular weight soybean proteinase inhibitor. J. Biol. Chem., 244: 274-280, 1969.
33. FRATTALI, V. & STEINER, R.F. Soybean inhibitors. I. Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. Biochem., 7: 521-530, 1968.
34. GUERRA, M.J. Aprovechamiento del afrecho de arroz, para la obtencion de harinas ricas en proteinas y otros nutrientes; extraccion de aceites. Caracas, Venezuela, 1972. 58 p. Tese (Licenciado en Biologia) - Fac. Ci. Esc. Biol. Universidad Central de Venezuela.
35. HALVERSON, A.W.; ZEPPLIN, M. & HART, E.B. Relation of iodine to the goitrogenic properties of soybeans. J. Nutr., 38: 115-129, 1949.

36. HAM, W. & SANDSTEDT, R.M. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal. J. Biol. Chem., 154: 505-506, 1944.
37. HASEGAWA, K.; KUSANO, T. & MITSUDA, H. Fractionation of soybean proteins by gel filtration. Agr. Biol. Chem., 27: 878-880, 1963.
38. HORN, M.J.; JONES, D.B. & BLUM, A.E. Colorimetric determination of methionine in proteins and foods. J. Biol. Chem., 166: 312-319, 1946.
39. KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Aglutinación. In KABAT, E. A. & MAYER, M.M. Inmunoquímica experimental. La Prensa Médica Mexicana, México, 1968. p. 89-122.
40. KAKADE, M.L. & LIENER, I.E. A simplified procedure for the determination of "available" lysine in proteins and protein foodstuffs. Anal. Biochem., 27: 273, 1969.
41. KAKADE, M.L.; SIMONS, N. & LIENER I.E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chem., 46: 518-526, 1969.
42. KASTER, G. Estudo comparativo da composição química de variedades de feijão soja. Pelotas, R.S., 1958. 43 p. Tese de doutoramento - Fac. de Agr. Eliseu Maciel-Universidade Federal de Pelotas.
43. KEELEY, G.M.; PEDDIE, B.A. & HARTMAN, L. Determination of lipo-peroxides in meat meals and poultry feeds. New Zealand J. Sci., 9: 806-808, 1966.
44. KLOSE, A.A.; HILL, B. & FEVOLD, H.L. Presence of a growth inhibiting substance in raw soybeans. Proc.Soc. Biol. Med., 62: 10-12, 1946.
45. KOSHIYAMA, I. & FUKUSHIM, D. Comparison of conformations

- of 7s and 11s soybean globulins by optical rotatory dispersion and circular dichroism studies. Cereal Chem., 50: 114-121, 1973.
46. KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. Science, 101: 668-669, 1945.
47. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. I. Method of isolation. J. Gen. Physiol., 29: 149-154, 1946.
48. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30: 291-310, 1947.
49. LASKOWSKI, M. Trypsinogen and trypsin. In COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N.O. Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1955. v.2, p. 26-36.
50. LASKOWSKI, M. & LASKOWSKI JR., M. Naturally occurring trypsin inhibitors. Advanc. Protein Chem., 9: 203-242, 1954.
51. LIENER, I.E. Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. J. Nutr., 49: 527-539, 1953.
52. LIENER, I.E. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. Arch. Biochem. Biophys., 154: 223-231, 1955.
53. LIENER, I.E. Toxic substances associated with seed proteins. In GOULD, R.F. "World Protein Resources". Washington, D.C., American Chemical Society, 1966. p. 178-193. (Advances in Chemistry Series, 57).
54. LIENER, I.E. & PALLANSCH, M.J. Purification of a toxic substance from defatted soybean flour. J. Biol.Chem., 197: 29-36, 1952.

55. LIS, H.; FRIDMAN, C.; SHARON, N. & KATCHALSKI, E. Multiple hemagglutinins in soybean. Arch. Biochem. Biophys., 117: 301-309, 1966.
56. LIS, H.; SHARON, N. & KATCHALSKI, E. Isolation of a mannose-containing glycopeptide from soybean hemagglutinin. Biochem. Biophys. Acta, 83: 376-378, 1964.
57. LIS, H.; SHARON, N. & KATCHALSKI, E. Soybean hemagglutinin, a plant glycoprotein. I. Isolation of a glycopeptide. J. Biol. Chem., 241: 684-689, 1966.
58. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
59. LUGG, J.W.H. Plant proteins; toxic proteins, trypsin inhibitors, and enzymes. Advanc. Protein Chem., 5: 263, 1949.
60. LYMAN, R.L. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on the intestinal and pancreatic nitrogen in the rat. J. Nutr., 62: 285, 1957.
61. LYMAN, R.L. & LEPKOVSKY, S. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. J. Nutr., 62: 269, 1957.
62. MILNER, M. General outlook for seed protein concentrates. In GOULD, R.F. "World Protein Resources". Washington, D.C., American Chemical Society, 1966. p. 52-62. (Advances in Chemistry Series, 57).
63. MUNRO, H.N. & DOWNIE, E.D. Extraction of protein from tissues during treatment with organic lipid solvents. Arch. Biochem. Biophys., 106: 516-524, 1964.
64. MUSCHE, R.; SHIMOKOMARI, R. & LEITÃO, M.F.F. Determinação do fator antitripsina nos produtos derivados da soja. In Coletânea do Instituto de Tecnologia de A-

- limentos, Campinas, S.P. 1967/68. v.2, p. 103-109
65. MUSTAKAS, G.C. Full-fat and defatted soy flours human nutrition. J. Am. Oil Chemists' Soc., 48: 815-819, 1971.
 66. MUSTAKAS, G.C.; GRIFFIN JR., E.L.; ALLEN, L.E. & SMITH, O.B. Production and nutritional evaluation of extrusion-cooked full-fat soybean flour. J. Am. Oil Chemists' Soc., 41: 607-614, 1964.
 67. MUSTAKAS, G.C.; GRIFFIN JR., E.L. & SOHNS, V.E. Full-fat soybean flours by continuous extrusion cooking. In GOULD, R.F. "World Protein Resources". Washington, D.C., American Chemical Society, 1966. p. 101-111. (Advances in Chemistry Series, 57).
 68. NAGEL, R.H.; BECKER, H.C. & MILNER, R.T. Some physical factors affecting the dispersion of soybean proteins in water. Cereal Chem., 15: 463-471, 1938.
 69. NANNINGA, L.B. & GUEST, M.M. On the interaction of fibrinolysin (plasmin) with the inhibitors antifibrinolysin and soybean trypsin inhibitor. Arch. Biochem. Biophys., 108: 542-551, 1964.
 70. NICKAMP, C.W.; HIXSON JR., H.F. & LASKOWSKI JR., M. Peptide-bond hydrolysis equilibria in native proteins. Conversion of virgin into modified soybean trypsin inhibitor. Biochem., 8: 16-22, 1969.
 71. NOYES, R. Soybeans. In NOYES, R. Protein food supplements. Park Ridge, Noyes, 1969. p. 116-231. (Food processing review, 3).
 72. OBARA, T. & KIMURA, M. Gel filtration fractionation of the whole water-extractable soybean proteins. J. Food Sci., 32: 531-534, 1967.
 73. OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. The use of soy bean as

- food. J. Biol. Chem., 32: 369, 1917.
74. OSTROWSKI, H., JONES, A.S. & CADENHEAD, A. Availability of lysine in protein concentrates and diets using carpenter's method and a modified silcock method. J. Sci. Ed. Agric., 21: 103-107, 1970.
 75. PAULSEN, T.M.; HOLT, K.E. & ANDERSON, R.E. Determination of water-dispersible protein in soybean oil meals and flours. J. Am. Oil Chemists' Soc., 37: 165-171, 1960.
 76. PAYNE, D.S. & STUART, L.S. Soybean protein in human nutrition. Advanc. Protein Chem., 1: 187-208, 1944.
 77. PELLETIER, O. Determination of cystine as cysteic acid after low voltage paper electrophoresis. J. Agr. Food Chem., 14: 496-498, 1966.
 78. RACKIS, J.J. & ANDERSON, R.L. Isolation of four soybean trypsin inhibitors by DEAE-cellulose chromatography. Biochem. Biophys. Res. Comm., 15: 230-235, 1964.
 79. RACKIS, J.J.; SASAME, H.A.; MANN, R.K.; ANDERSON, R.L. & SMITH, A.K. Soybean trypsin inhibitors: isolation, purification and physical properties. Arch. Biochem. Biophys., 98: 471-478, 1962.
 80. RAO, S.R.; CARTER, F.L. & FRAMPTON, V.L. Determination of available lysine in oilseed meal proteins. Anal. Chem., 35: 1927-1930, 1963.
 81. ROGERS, Q.R. & HARPER, A.E. Amino acid diets and maximal growth in the rat. J. Nutr., 87: 267-273, 1965.
 82. ROHR, R. Tostagem de farelo de soja. In Curso de Tecnologia Moderna da Indústria de Óleos Vegetais. Campinas, FCTPTA/FTA/ITAL, 1971. p. 236-257.
 83. ROHR, R. Óleos e gorduras vegetais e seus subprodutos pro

téicos: etiologia, tecnologia, significado e importância na alimentação humana e animal. Campinas, S.P., FTA/UNICAMP, 1973. 184 p.

84. RUTHFUS, J.A. Newer techniques in protein isolation and characterization. J. Am. Oil Chemists' Soc., 47: 316-325, 1970.
85. SHARON, N. & LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science, 177: 949-959, 1972.
86. SHIMOKOMAKI, M. Efeito da temperatura na composição das proteínas nos produtos derivados da soja. Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, Campinas, S.P. nº 12, 1-9, 1967.
87. SMITH, A.K. Theories on improving the nutritional value of soybean meal. In Proceedings of Conference on Soybean Products for Protein in Human Foods. Peoria, Illinois, 1961. p. 101-109.
88. SMITH, A.K.; BELTER, P.A. & ANDERSON, R.L. Urease activity in soybean meal products. J. Am. Oil Chemists' Soc., 33: 360-363, 1956.
89. SMITH, A.K.; BELTER, P.A. & JOHNSON, V.L. Peptization of soybean meal protein. Effect of method of dispersion and age of beans. J. Am. Oil Chemists' Soc., 29: 309-312, 1952.
90. SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. Peptization of soybean proteins. Ind. Eng. Chem., 30: 1414-1418, 1938.
91. SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. Soybeans: chemistry and technology. Volume I. Proteins. In SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. Avi Publishing Co., Westport, Conn., 1972.
92. SMITH, A.K.; RACKIS, J.J.; ISNARDI, P.; CARTER, J.L. & KROBER, O.A. Nitrogen solubility index, isolated pro-

- 57-
- tein yield, and whey nitrogen content of several soybean strains. *Cereal Chem.*, 43: 261-270, 1966.
93. SMITH, A.K.; SCHUBBERT, E.N. & BELTER, P.A. Soybean protein fractions and their electrophoretic patterns. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 32: 274-278, 1955.
 94. STEARNER, S.P. & AZUMA, S.A. Early radiation lethality: enzyme release and the protective action of soybean trypsin inhibitor. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 128: 913-917, 1968.
 95. SPEINER, R.F. & FRATTALI, V. Purification and properties of soybean protein inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Agr. Food Chem.*, 17: 513-518, 1959.
 96. TANFORD, C. Protein denaturation. *Advanc. Protein Chem.*, 23: 180, 1968.
 97. TKACHUK, R. Nitrogen-to-protein conversion factors for cereals and oilseed meals. *Cereal Chem.*, 46: 419-423, 1969.
 98. VAN BITTEN, C.H.; HUBBARD, J.E.; MALLAN, J.M.; SMITH, A.K. & BLESSIN, C.W. Amino acids in soybeans; amino acid composition of soybean protein fractions. *Agric. Food Chem.*, 7: 129, 1959.
 99. WARNER, R.G. Nutrient requirements of the laboratory rat. In NAS/NRC. Nutritional requirements of the laboratory rats. Washington, D.C., NAS/NRC, 1962. p. 51-81. (Publication 990).
 100. WAUGH, D.F. Protein-protein interactions; crystalline soybean trypsin inhibitor. *Advanc. Protein Chem.*, 9: 379, 1954.
 101. WELLS, T.A.G. The rat. A practical guide. In WELLS, T. A.G. New York, N.Y. Dover Publications, Inc., 1968.

102. WESTFALL, R.J. & HAUGE, S.M. The nutritive quality and the trypsin inhibitor of soybean flour heated at various temperatures. *J. Nutr.*, 35: 379-389, 1948.
103. WILKENS, W.F.; MATTICK, L.R. & HAND, D.B. Effect of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk. *Food Technol.*, 21: 86-89, 1967.
104. WOLF, W.J. What is soy protein? *Food Technol.*, 26: 44-54, 1972.
105. WU, Y.V. & SCHERAGA, H.A. Studies of soybean inhibitor. I. Physicochemical properties. *Biochem.*, 1: 698-705, 1962.
106. YAMAMOTO, M. & IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. I. Purification and characterization of two soybean trypsin inhibitors. *J. Biochem.*, 62: 141-149, 1967.

...))) • (((...

