



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PROTEÓLISE COM α -QUIMOTRIPSINA DO ISOLADO
PROTÉICO DE SOJA MALEILADO**

Vera Sônia Nunes da Silva

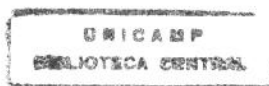
Química

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán

Orientador

**Campinas-SP
2000**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Vera Sônia Nunes da Silva

**PROTEÓLISE COM α -QUIMOTRIPSINA DO ISOLADO
PROTÉICO DE SOJA MALEILADO**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciência da Nutrição*

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Orientador

Campinas-SP

2000

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Vera Sônia Nunes da Silva, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de abril de 2000.

Campinas, 20 de abril de 2000.



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2000846

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
Si 38 p
V. Ex.
TOMBO BC/ 41473
PROC. 278/00
C ☐ D ☒
PREÇO R\$ 11,00
DATA 11-07-00
N.º CPD

CM-00143185-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

N922p Nunes-Silva, Vera Sônia
Proteólise com α -quimotripsina do isolado protéico de soja
maleilado / Vera Sônia Nunes da Silva. – Campinas, SP: [s.n.],
2000.

Orientador: Jaime Amaya Farfán
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Hidrólise. 2.Acilação. 3.Anidrido maléico. 4.Peptídeos.
5.Solubilidade. I.Amaya Farfán, Jaime. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA

 20400

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Universidade Estadual de Campinas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Flávia Maria Netto
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Prof.ª Dr.ª Maria Antônia Martins Galeazzi
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Membro

A Deus

“Por vezes, senti meu corpo fraquejar, e Tu estendeste tua mão e ergueste-me.

Por vezes, senti minha alma se abater, e Tu me deste coragem para prosseguir.

Por vezes, senti meu espírito desvanecer, e Tu enviaste o próprio espírito para me consolar.

Hoje, a vitória é minha...

E a Ti, Meu Deus, toda honra e toda glória, eternamente

Amém...”

Mãe

*"Já não fala, mas escuto a sua voz,
já não sente, mas sinto a sua emoção.
Ausente! Sinto sua presença a cada dia.
Então vibra comigo em cada nova conquista
da minha vida".*

Pai

*"Meu êxito é fruto de seu esforço;
através de seu incentivo constante;
reuni força para vencer as dificuldades.
Obrigada pela lição de amor que me ensinou por toda vida".*

*"Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer
que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente.
Ninguém e nada cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio,
uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão,
uma atitude de amor. A você,
meu marido, dedico
minha vitória".*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, confiança e amizade;

As professoras da banca examinadora que contribuíram para o aprimoramento do trabalho com enriquecedoras sugestões;

A secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Cosme Perota, pela gentileza e eficiência na realização de seu trabalho e sempre disposto a ajudar;

Aos funcionários e amigos de Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Carla de Marco Greggi e Iná A. C. dos Santos, Francisco Carraro, Soely M. P. M. Reis, Eliana M. P. Motta, Eliete C. Leite, Liana Alba C. Dawwood, Rosemary S. Geraldi, Elizabeth F. Silva, Valter F. da Silva, Maria Aparecida V. Osteti, Arlinda C. S. Bueno e Edma M. de Araújo, pela colaboração e prestabilidade constante;

Ao Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX) do Instituto de Biologia, em especial ao pesquisador Armindo Antônio Alves, pela gentileza, dedicada orientação e confiança depositada na utilização do equipamento;

A Norka Beatriz Barrueto González pela amizade, alegria, otimismo e disponibilidade na realização das fotos da eletroforese;

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Creuza K. Nomura, Cláudia Romano, Mara Marquez Silva, Geraldo A. Silva, Antônio Gonçalves, José Marcondes, pela colaboração e especial atenção dispensadas;

Ao Jonas Messias dos Santos, pela atenção e disponibilidade;

Ao Laboratório de Bioquímica do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL, em especial as pesquisadoras Dr^a Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Dr^a Vera Lúcia Signorelli Baldini, pela amizade, permissão na realização dos hidrolisados enzimáticos e confiança depositada na utilização do equipamento;

Aos amigos do Laboratório de Fontes Protéicas, que compartilharam as alegrias desta jornada, Luciana, Beatriz, Érika, Suzana, Derlange, Florência, Lucia, pois onde existe harmonia existe prazer de estar junto;

Aos amigos pesquisadores do DEPAN, Henelyta, Kity, Margarida, Viviane, Rose, Andréa, Vânia, Alessandra, Flávio e Biba, pelo carinho;

Aos meus irmãos Rogério, Renato que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial a Selma, Ceila, Sandra e Sirlene pelo apoio constante, e a certeza de que é preciso continuar;

Aos meus familiares, Mozart, Ademir, Dalmo, Suzete, Sandra, Kelly, Marcelo, Diego, Déborah, Douglas, Leonardo, Aline, Marcos, Viviane, Henrique, Ricardo, Thiago, Lucas, Bianca e a pequena Laura, pois na família reside a felicidade, em especial a tia Laura, exemplo de vida, que mesmo diante das dificuldades mantém sua fé inabalável;

A minha amiga Sônia pelo companherismo e dedicação, sempre incansável na solidariedade e no afeto, pois o verdadeiro amigo é aquele que chega quando todo mundo já se foi;

A SANTISTA S.A. pelo fornecimento do isolado protéico de soja;

A CAPES pela concessão de bolsa durante o curso de mestrado.

SUMÁRIO

<i>Resumo.....</i>	<i>I</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>IV</i>
<i>1. Introdução.....</i>	<i>1</i>
<i>2. Revisão Bibliográfica.....</i>	<i>4</i>
<i>2.1. Isolado protéico de soja.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2. Inibidores de tripsina.....</i>	<i>7</i>
<i>2.3. Inativação dos inibidores de tripsina.....</i>	<i>8</i>
<i>2.4. Modificação química da proteína.....</i>	<i>10</i>
<i>2.5. Modificação enzimática da proteína.....</i>	<i>15</i>
<i>2.6. Proteases empregadas na produção de hidrolisados.....</i>	<i>17</i>
<i>2.7. Hidrofobicidade superficial.....</i>	<i>18</i>
<i>3. Objetivos.....</i>	<i>23</i>
<i>3.1. Geral.....</i>	<i>24</i>
<i>3.2. Específicos.....</i>	<i>24</i>
<i>4. Artigo 1. Efeito da maleilação do isolado protéico de soja na atividade dos inibidores de tripsina.....</i>	<i>25</i>
<i>4.1. Resumo.....</i>	<i>26</i>
<i>4.2. Abstract.....</i>	<i>28</i>
<i>4.3. Introdução.....</i>	<i>30</i>
<i>4.4. Material e Métodos.....</i>	<i>33</i>

4.5. Resultados e Discussão.....	37
4.6. Conclusões.....	48
4.7. Referências Bibliográficas.....	49
5. Artigo 2. Hidrofobicidade Superficial do Isolado Protéico de Soja modificado com anidrido maléico.....	57
5.1. Resumo.....	58
5.2. Abstract.....	60
5.3. Introdução.....	62
5.4. Material e Métodos.....	64
5.5. Resultados e Discussão.....	68
5.6. Conclusões.....	82
5.7. Referências Bibliográficas.....	83
6. Artigo 3. Proteólise do isolado protéico de soja com α -quimotripsina após modificação com anidrido maléico.....	90
6.1. Resumo.....	91
6.2. Abstract.....	93
6.3. Introdução.....	95
6.4. Material e Métodos.....	97
6.5. Resultados e Discussão.....	103
6.6. Conclusões.....	114
6.7. Referências Bibliográficas.....	115
7. Conclusões.....	121
8. Referências Bibliográficas.....	124

Resumo

Proteólise com α -quimotripsina do isolado protéico de soja maleilado

Resumo

Os efeitos da reação de maleilação no isolado protéico de soja (IPS) têm sido muito pouco investigados. O presente trabalho consistiu em estudar a modificação do IPS usando anidrido maléico, acompanhando seu efeito na concentração de lisina disponível, atividade dos inibidores de tripsina, grau de hidrofobicidade superficial e comportamento do IPS maleilado quando submetido à hidrólise enzimática com α -quimotripsina. O IPS foi tratado com anidrido maléico nas concentrações molares de 0,0170 (IPSM1); 0,0505 (IPSM2); 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 (IPSM4). Via de comparação, uma amostra do IPS foi desnaturada termicamente a 80°C, por 10 minutos. A concentração de reagente de 0,0809M foi suficiente para atingir um grau de maleilação de 86,7%. O uso de benzoila-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) indicou que os níveis de atividade do inibidor correlacionaram inversamente com os graus de maleilação e que, excetuando o nível mais baixo de maleilação, a modificação química foi mais efetiva em eliminar a atividade inibitória do que tratamento térmico. A hidrofobicidade superficial, determinada pelo método do ANS (ácido 1-anilino-8-naftaleno sulfônico), mostrou decréscimo linear ($[\lambda=464\text{ nm}]$ 136,6, 135,9, 78,1, 52,6 e 34,7, para o IPS, IPSM1, IPSM2, IPSM3 e IPSM4, respectivamente). O IPSM3, devidamente dialisado e liofilizado, foi escolhido, devido principalmente a seu alto grau de maleilação, para ser hidrolisado com α -quimotripsina tipo-II por 2 horas nas seguintes condições: concentração de substrato 7,75% (N x 6,25), razão enzima/substrato de 1/460, temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH 8,0. O grau de hidrólise (GH), determinado pelos métodos do pH-*stat* e do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), deu valores muito próximos entre si, de $4,46 \pm$

0,01 e $4,25 \pm 0,07$, respectivamente. O IPS modificado e hidrolisado (IPSM3H) foi homogeneizado, novamente liofilizado e desmaleilado (IPSM3HD) para verificar a reversibilidade da modificação. As determinações de composição centesimal, atividade dos inibidores de tripsina (BAPNA), lisina disponível, hidrofobicidade superficial (ANS), aminoácidos, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), propostas neste trabalho, indicaram que a concentração dos inibidores de tripsina foi inversamente proporcional ao grau de maleilação, demonstrando a eficiência da modificação química sobre a atividade dos inibidores de tripsina. Houve também grande redução da hidrofobicidade superficial observada, tanto com relação a maleilação quanto ao processo de hidrólise enzimática. Esse comportamento foi atribuído ao aumento da polaridade da molécula modificada, a reassociação ou a formação de novas interações hidrofóbicas dos fragmentos de peptídeos, levou a formação de agregados solúveis. Os resultados nos levaram a concluir que a maleilação do IPS, na extensão que modifica 86,7% dos grupos lisila, produz profundas alterações estruturais, inibe 74,5% da atividade anti-tríptica e provavelmente também anti-quimotríptica, resultando em produtos diferenciados, como peptídeos de baixo a médio PM, grau de hidrólise superior a 4% e utilizando baixa relação enzima:substrato. Esta alternativa pode ser empregada em substituição do tratamento térmico em casos especiais.

Palavras chave: *hidrólise enzimática, acilação, anidrido maléico, hidrofobicidade, ANS, isolados, glycine max, α -quimotripsina, inativação química, kunitz, bowman-birk.*

Abstract

Proteolysis of maleylated soy protein isolate with α -chymotrypsin

Abstract

Chemical modification of soybean protein isolates (SPI) with maleic anhydride has not been studied to any great extent. The objective of the present work was to investigate the effect of maleylation of SPI on the total trypsin inhibitory activity, available lysine content, polyacrylamide-gel electrophoretic (SDS-PAGE) mobility, surface hydrophobicity of the SPI components and the effect on proteolysis of the isolate with α -chymotrypsin. The SPI suspension was reacted with maleic anhydride in the concentrations of (mole/L) 0.017 (SPIM1), 0.0505 (SPIM2), 0.0809 (SPIM3) and 0.1535 (SPIM4). For comparison, a sample of the isolate was thermally denatured at 80°C for 10 minutes. The SPI treatments showed corresponding lysine modification (maleylation) extents of (%) 3.2, 50.7, 86.7 and 92.4. Use of benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) indicated that the levels of active inhibitor varied inversely with respect to the degree of maleylation and that, except for the least modified product, all of the chemical treatments were more effective at removing the antitryptic activity than thermal treatment. Surface hydrophobicity, as determined by the fluorescence emitted by the hydrophobic probe 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid (ANS) bound to the protein's surface, showed substantial gradual decreases with the degree of maleylation ($[\lambda=464\text{ nm}]$ 136.6, 135.9, 78.1, 52.6 and 34.7, for the SPI, SPIM1, SPIM2, SPIM3 and SPIM4, respectively), which were consistent with the loss of fluorescence and indicative of the reduced ability of hydrophobic amino acid residues on the protein's surface to bind the probe. The modified isolate SPIM3 was chosen for hydrolysis considering mainly the high degree of maleylation. Dialyzed and lyophilized SPIM3 was

hydrolyzed with type II α -chymotrypsin for two hours (substrate concentration 7.75% [Nx6.25], enzyme:substrate ratio 1:460, $40 \pm 1^\circ\text{C}$ and pH 8.0). Values of degree of hydrolysis (DH), as determined by both the pH-stat and the trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) methods, were 4.46 ± 0.01 and $4.25 \pm 0.07\%$ of hydrolysis, respectively. The modified and hydrolyzed SPI (SPIM3H, of light appearance) was homogenized, once again lyophilized and demaleylized (SPIM3HD) in order to verify the reversibility of the reaction, the effect of hydrolysis upon the trypsin inhibitors and the changes on surface hydrophobicity. Under the conditions chosen for demaleylation, it was observed that 1) maleylation was partially reversed (available lysine varied from 0.86 ± 0.01 to 1.86 ± 0.02 mg of protein, for the SPIM3H and the SPIM3HD, respectively), 2) a minor recovery of the inhibitors activity occurred, from 0.56 ± 0.01 to 0.69 ± 0.01 mg/g of protein, for the same products accordingly, and 3) surface hydrophobicity increased also slightly, as determined from the increase in fluorescence intensity from 42.48 ± 0.04 to 50.61 ± 0.02 . It is concluded that maleylation of the SPI proteins to the extent of 86.7%, lowering trypsin inhibitor activity by 74.5%, can be performed in substitution of thermal inactivation of the trypsin and, most likely, chymotrypsin inhibitors, thus permitting the production of hydrolyzates for special applications, with a range of low-to-medium molecular weight peptides, degree of hydrolysis higher than 4% and employing exceedingly low α -Chymotrypsin-to-substrate ratios.

Key-words: *kunitz, bowman-birk, glycine max, peptides, solubility, denaturation, acylation, proteolyzate, denaturation, functional properties, vegetable protein.*

1. Introdução

A soja é uma planta oriunda da China e sua semente constitui importante componente da alimentação animal e humana, tradicionalmente utilizada nos países orientais devido seu valor nutricional e baixo custo. Nos países ocidentais a soja foi introduzida inicialmente na alimentação animal, mas seus produtos derivados estão sendo cada vez mais utilizados na alimentação humana. A expansão do uso da soja como alimento ou ingrediente alimentar decorre não só por ser excelente fonte protéica, mas pelas outras propriedades fisiológicas relacionadas à saúde que lhe têm sido atribuídas.

Os seguintes nutrientes, classicamente procurados no grão de soja, possuem concentração expressiva: proteína (38-40%), além de lipídeos (20%); os minerais ferro, cobre, manganês, cálcio, zinco, cobalto e potássio e as vitaminas: tiamina (B₁) e riboflavina (B₂).

Recentemente, as isoflavonas, genisteína e daidzeína, ganharam destaque nas pesquisas sobre a soja. Estão presentes também, outros componentes considerados antinutricionais, os quais exercem impacto negativo sobre a qualidade biológica da proteína, especialmente no campo da alimentação animal. Estes são: os inibidores de proteases, compostos fenólicos, lectinas, saponinas e fitatos (GARCÍA et al., 1997).

O isolado protéico de soja (IPS) é um dos produtos derivado da soja, disponível no mercado, para uso em formulações. Apresenta teor de proteína superior a 90%, e teores variados de outros compostos como, o ácido

fitico, saponinas, isoflavonas e os inibidores de tripsina (ANDERSON & WOLF, 1995; LIENER et al., 1981). O calor é o meio mais utilizado na inativação dos inibidores (JOHNSON et al., 1980; LIENER, 1981; DiPIETRO & LIENER, 1989; SAVAGE et al., 1995), apesar de técnicas de modificação química também ter sido utilizadas (SESSA & NELSEN, 1991; FRIEDMAN et al., 1986; LIENER, 1994). A inativação se faz necessária principalmente antes de processos proteolíticos, os quais são responsáveis por alterar ou induzir novas propriedades funcionais, bem como produzir pequenos peptídeos e aminoácidos livres destinados a compor formulações dietéticas, enriquecer nutricionalmente alimentos especiais e atuar como agentes saborizantes (ADLER-NISSEN, 1986; FRØKJAER, 1994).

Dentro deste contexto, o presente trabalho consistiu em estudar alguns dos efeitos da modificação química da lisina no isolado protéico de soja (IPS) usando como reagente o anidrido maléico. Foi investigada a atividade dos inibidores de tripsina antes e depois da maleilação, o efeito da modificação na hidrofobicidade superficial e mobilidade eletroforética, assim como o comportamento do IPS maleilado quando submetido à hidrólise enzimática com α -quimotripsina.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Isolado protéico de soja

O isolado protéico de soja (IPS) é preparado pela extração da proteína a partir da farinha desengordurada. Durante o processo de extração, a farinha recebe o mínimo de tratamento térmico necessário para inativar os compostos de ação antinutricional, para não afetar drasticamente a solubilidade das proteínas. O processo consiste na extração da farinha ou flocos desengordurados com solução alcalina diluída (pH 9,0), centrifugação para eliminar o resíduo insolúvel e obter um extrato alcalino, o qual é então acidificado até o pH isoeletrico (pH 4,5), centrifugado novamente para obter o precipitado (isolado isoeletrico). Este é lavado com água fria para eliminar o ácido residual, tratado com álcali (pH 7-8) para dispersão do precipitado, e então seco em “*spray-dryer*” (OHREN, 1981; SGARBIERI, 1996).

A produção do IPS em escala industrial iniciou-se nos Estados Unidos na década de 30 e, na década 50, foi implantada a primeira fábrica destinada ao consumo humano. No Brasil, a primeira unidade industrial surgiu em 1969, em Esteio – RS, com capacidade de 1000 toneladas/ano.

O IPS é empregado na indústria de alimentos com diversas finalidades, como enriquecimento protéico de alguns produtos e o desenvolvimento de algumas propriedades funcionais como gelatinização e emulsificação. Devido suas características tensoativas proporciona aumento da

estabilidade da estabilidade da emulsão em embutidos; bolos, sorvetes, entre outros (KNIES, 1981).

O IPS contém 90% ou mais de proteína, compreendendo frações que se diferenciam pelo peso molecular e coeficiente de sedimentação ("S"). A fração 2S (22% do total) apresenta os seguintes componentes: inibidor de tripsina de Bowman-Birk, inibidor de tripsina de Kunitz, citocromo C, globulina 2,3S, globulina 2,8S, alantoinase. A fração 7S (37%) apresenta os seguintes componentes: beta-amilase, hemaglutininas, lipoxigenase e globulina 7S, enquanto que a fração 11S (31%) consiste da denominada globulina 11S. Por último, existe a fração de maior peso molecular, chamada de 15S (11%) (WOLF, 1972).

A globulina 7S (β -conglucininina) pode ser isolada como um monômero de PM 180 a 210 kDa, em pH 7,6 e força iônica 0,5 μ , ou como dímero (9S) PM 370 kDa, em força iônica 0,1 μ . A globulina 7S é uma proteína polimérica cuja estrutura poderá ser rompida de diversas maneiras. Em solução 8M de uréia ou 4M de hidrocloreto de guanidínio, o peso molecular de 180.000 Da, reduz-se para 22.500-24.000 Da. Em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) o peso molecular do monômero da globulina 7S é aumentado para 34.000 Da, devido à ligação aproximada de 40 moléculas do detergente por subunidade (WOLF, 1972).

A globulina 11S (glicinina) revela a existência de 18 bandas em condições alcalinas e 10 bandas em géis ácidos. Uma característica muito interessante da globulina 11S é a existência de subunidades ácidas e básicas na mesma molécula, estas subunidades se alteram formando anéis com seis subunidades. Os pontos isoeletricos para as subunidades ácidas foram estabelecidos em: 4,75; 5,15 e 5,40; e para as subunidades básicas 8,00; 8,25; e 8,50. Cada uma destas subunidades ocorre em duplicata na molécula de globulina 11S na qual foram encontrados 12 resíduos N-terminais, ou seja, seis glicinas, duas leucinas, duas isoleucinas e duas fenilalaninas. As subunidades básicas possuem glicinina como aminoácido N-terminal (WOLF, 1972).

2.2. Inibidores de tripsina

Os inibidores de tripsina estão presentes no isolado protéico de soja, em concentração que variam entre 1-30 mg/g, sendo que o aquecimento do IPS desnatura os inibidores de tripsina e conseqüentemente melhora as propriedades nutricionais do produto (ANDERSON & WOLF, 1995; LIENER et al., 1981).

O inibidor de Kunitz (ITK), descoberto pelo pesquisador de mesmo nome em 1946, apresenta peso molecular 21.500 Da e ponto isoeletrico a pH 4,50, é formado de 181 resíduos de aminoácidos, com duas pontes dissulfeto e 2% de cisteína na molécula. Estudos de refração de raios-X

confirmaram as determinações feitas com dispersão óptico-rotatória e dicroísmo circular, que indicavam a ausência de α -hélice na molécula desse inibidor. A conformação se aproxima da esférica, com cerca de 35Å de diâmetro, enovelado por alças que protegem um núcleo de cadeias laterais hidrofóbicas. A estruturação secundária predominante é a folha pregueada e β -configuração. O centro de ligação com a tripsina está localizado nos resíduos de ARG-63 e ILE-64. O inibidor combina-se estequiometricamente com a tripsina formando um complexo 1:1 (LIENER, 1994; SGARBIERI, 1996).

O segundo inibidor é o de Bowman-Birk (IBB), com 71 resíduos de aminoácidos, peso molecular 7.975 Da e 7 pontes dissulfeto. Este inibe estequiometricamente 1 mole de tripsina e 1 mole de quimotripsina, de maneira independente e simultânea. O centro da ligação de tripsina envolve os resíduos LIS-16 e SER-17, enquanto o centro de ligação da quimotripsina envolve a LEU-43 e a SER-44. As seqüências de aminoácidos ao redor do centro de ligação para as duas enzimas são muito similares. Um elevado grau de homologia tem sido demonstrado entre o inibidor de Bowman-Birk da soja e os inibidores de baixos pesos moleculares de outras leguminosas (LIENER, 1994; WU et al., 1994; SGARBIERI, 1996).

2.3. Inativação dos inibidores de tripsina

Embora os inibidores de tripsina possam causar efeitos deletérios no animal (LIENER & KAKADE, 1980) e no homem

(LINSCHEE et al., 1980) eles também exibem propriedades anticarcinogênicas, devido à capacidade que eles apresentam de impedir a ação proteolítica tumoral (ANDERSON & WOLF, 1995).

Muitos pesquisadores têm estudado a melhor maneira de inativar os inibidores de tripsina, como o trabalho realizado por Wu et al. (1994). Os autores submeteram o inibidor de Bowman-Birk (IBB) à temperatura de 80°C por 1 hora, não observando diferença conformacional em relação à estrutura nativa e permanecendo com 96% da atividade. Entretanto, quando o inibidor foi submetido às mesmas condições e na presença de metassulfito, a atividade remanescente foi de 16%. Outro estudo realizado por Hogle et al. (1973) na presença de boroidreto de sódio, a perda das atividades antitriptica e anti-quimotriptica do IBB se mostrou diretamente dependente do número de ligações dissulfeto.

A inativação do inibidor de Kunitz purificado (ITK) e os inibidores de tripsina no extrato de soja foram estudados por Sessa & Ghantous (1987), utilizando metassulfito de sódio e glutaraldeído. A melhor performance de inibição do ITK foi obtida quando os reagentes estavam combinados, enquanto que a inativação dos inibidores de tripsina no extrato de soja foi mais efetiva utilizando somente metassulfito. Segundo Steiner (1966) e Hogle & Liener (1973). O sulfito ou metassulfito de sódio é conhecido por clivar ligações dissulfeto, desse modo destrói a conformação nativa das proteínas, sendo este o provável mecanismo para inativação dos inibidores de tripsina por estes agentes. Por outro lado o glutaraldeído não necessita de calor

para inativar os inibidores de tripsina no extrato de soja, provavelmente por reagir com os grupos α e ϵ -amina, grupos sulfidríla da cisteína, anel imidazol da histidina e fenol da tirosina (JANSEN et al., 1971; FRIEDMAN & GUMBMANN, 1986).

A combinação do ácido ascórbico com o sulfato de cobre, especialmente em temperatura moderada, inativou efetivamente os inibidores de Kunitz purificado e o de Bowman-Birk extraído e purificado da farinha desengordurada de soja. Entretanto, quando a farinha de soja foi tratada com ácido ascórbico e sulfato de cobre sob as mesmas condições, a atividade dos inibidores de tripsina foi preservada apesar do tratamento térmico. Este efeito de preservação pode ser consequência da habilidade do ácido ascórbico de agir como oxidante em outro componente presente na farinha de soja. A inativação dos inibidores de tripsina purificados deve ocorrer como resultado da ação pró-oxidante do ácido ascórbico com sulfato de cobre agindo diretamente nos inibidores (SESSA et al., 1990; SESSA & NELSEN, 1991).

2.4. Modificação química da proteína

O objetivo da modificação química é alterar as forças não covalentes que determinam a conformação da proteína de maneira que resulte na mudança estrutural e funcional desejada. As forças não covalentes que influem na conformação da proteína são: Van der Waals, pontes de

hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (KESTER & RICHARDSON, 1984).

A acilação e a succinilação têm sido as modificações mais utilizadas (KESTER & RICHARDSON, 1984). A primeira consiste na reação dos grupos amino, hidroxil e nucleofílico da proteína com grupos carbonílicos de um agente acilante, resultando na adição de um novo grupo funcional para a proteína. A acilação da proteína influencia na solubilidade, hidrofobicidade superficial, emulsificação e capacidade de absorção de gordura, além de proteger os resíduos de lisina.

Na succinilação ocorre a conversão de grupos amino catiônico para resíduos aniônicos na proteína. O aumento da carga negativa produzida pelos ânions succinato altera o caráter físico-químico da proteína, resultando no aumento da solubilidade e subseqüentes mudanças na capacidade emulsificante e formação de espuma (SHIH, 1992). No trabalho de Franzen & Kinsella (1976), o grau de succinilação de 90% dos grupos amino disponíveis da proteína de soja, causou mudanças no ponto isoelétrico de 4,5 para 4,0 e aumentou a solubilidade em pH acima de 4,0.

Acetilação feita com anidrido acético envolve atração covalente de funções acetil neutras com grupos amino da proteína, resultando no desdobramento da molécula de proteína, devido à redução da atração eletrostática entre os aminoácidos de cargas opostas da cadeia lateral (KESTER & RICHARDSON, 1984).

A fosforilação é outra modificação que utiliza oxicloreto de fósforo, trimetafosfato de sódio, pentóxido fosfórico, fosforamidato e ácido fosfórico combinado com tricloroacetoneitrilo (KESTER & RICHARDSON, 1984; MATHEIS & WHITAKER, 1984). Nesta reação também ocorre um aumento das cargas negativas na molécula de proteína onde o fosfato inorgânico é transferido para a proteína pela reação O- e N-esterificação. Na O-esterificação reação o fosfato reage com o grupo hidroxila primário e secundário da serina e treonina, respectivamente, e com hidroxil ácido da tirosina, formando ligações carbono-oxigênio-fósforo. Na segunda reação, N-esterificação o fósforo combina com o grupo ϵ -amino da lisina, imidazol da histidina ou guanidino da arginina, formando ligações carbono-nitrogênio-fósforo.(MATHEIS & WHITAKER, 1984).

A amidação e esterificação são outras formas de modificações da proteína. A primeira pode ser alcançada pelo reagente carbodiimida com condensação dos grupos carboxílicos com íon amônio que efetivamente converte resíduos de aspartato e glutamato em asparagina e glutamina, respectivamente e a esterificação dos grupos carboxílicos acontece em HCl alcoólico (KESTER & RICHARDSON, 1984).

O anidrido maléico é responsável pela reação de maleilação, que consiste numa modificação reversível dos grupos amino na proteína, sendo um instrumento para vários tipos de estudos tais como: (a) modificação dos resíduos de lisina na proteína para limitar a clivagem triptica para os resíduos arginila das cadeias COOH; (b) efeito de mascarar a proteína

reduzindo o número de cargas positivas ou introduzindo cargas negativas; (c) sistemas agregados e sua dissociação, tais como, proteína e subunidades; (d) solubilização das proteínas ou peptídeos com solubilidade limitada; (f) proteção dos grupos amino na modificação com outros reagentes.

Na maleilação o grupo desprotonado é evidentemente a espécie reativa na reação, por essa razão, é possível obter algum grau de especificidade dos grupos α -amino utilizando um pH menor (7,0-7,5). O pK_a dos grupos α -amino são geralmente menores que o pK_a dos grupos ε -amino. O pH utilizado na maleilação (pH 8,5-9,0) geralmente modifica os grupos ε -amino com maior grau de modificação. O pH alto é efetivo no grau de maleilação, que diminui pela competição da reação, na qual o anidrido maléico é hidrolisado a ácido maléico. A reação pode ser também realizada a altas temperaturas, e o reagente pode ser adicionado em solução de dioxana, outros grupos também são modificados pelo anidrido maléico, mas os produtos formados com o nitrogênio imidazólico dos resíduos histidila e os grupos fenólicos dos resíduos tirosila são instáveis e rapidamente quebrados para regenerar estes grupos (GLAZER et al., 1975).

A proteína maleilada apresenta excesso de cargas negativas (CHOI et al., 1982) em pH neutro, reduzindo a reação entre proteínas e favorecendo a interação proteína-água (BUTLER et al., 1969), resultando em repulsão eletrostática e apresentando efeito dissociante e solubilizante. Este efeito é particularmente importante para determinar o peso molecular das subunidades das proteínas multiméricas, desde que as subunidades possam ser

estudadas por ultracentrifugação ou filtração em gel no mesmo tampão da proteína nativa.

A maleilação dos resíduos da lisina permite especificar a clivagem das ligações da arginina pela tripsina, o grupo amino maleilado é muito estável a pH alcalino, portanto é pouco improvável que ocorra hidrólise durante a digestão enzimática prolongada a pH alcalino (BUTLER & HARTLEY, 1972).

Os anidridos bloqueiam os grupos de lisina, protegendo-os, quando submetidos à tratamentos térmico e alcalino, conseqüentemente as modificações químicas reversíveis das proteínas alimentares com os anidridos, melhoram as propriedades funcionais tais como, solubilidade em água, capacidade de emulsão e absorção de óleo e água (BRINEGAR et al., 1980, 1981).

A reversibilidade da proteína consiste na remoção dos grupos maleíla por hidrólise em pH ácido, geralmente pH 3,5 a 37°C por 11 horas, resultando o máximo de grupos desbloqueados com o mínimo de reação em cadeia (BUTLER et al., 1972). No estômago é possível que estes grupos sejam desbloqueados espontaneamente no estômago devido ao pH ácido, permitindo a digestão completa da proteína e absorção significativa de lisina. Conseqüentemente, a modificação reversível das proteínas alimentares com anidridos, melhora as propriedades funcionais, e diminui a reação em cadeia

da lisina durante o processo, sem prejudicar a qualidade nutricional (GLAZER et al., 1975).

2.5. Modificação enzimática da proteína

Um grande número de trabalhos de hidrólise enzimática, utilizando reatores com membranas de ultrafiltração, estão sendo realizados desde a década de 70. Alguns autores apontam, a otimização da utilização da enzima, como a principal vantagem do emprego deste sistema. O fato de a membrana permitir a remoção contínua de produto da reação, como peptídeo de baixo peso molecular, parece ser uma das maiores vantagens, já que sua presença é a principal causa de diminuição da reação, quando realizada em sistema descontínuo (SGARBIERI, 1996).

Outro aspecto importante em relação aos reatores com ultrafiltração é a possibilidade de controle, dentro dos limites de porosidade da membrana e conseqüentemente na distribuição dos pesos moleculares. Este controle é de extrema importância, pois algumas propriedades funcionais e nutritivas estão estreitamente relacionadas aos pesos moleculares. A solubilização da proteína de pescado em reatores de membrana tem sido muito estudada, bem como a obtenção de hidrolisados de proteínas de soja e de proteínas de soro de queijo. Apesar das vantagens oferecidas pelos reatores com membranas, como menores gastos de enzima, controle dos pesos moleculares, ausência de inibição pelo produto e a não contaminação do

produto pela enzima, a grande maioria dos processos de hidrólise enzimática de proteína são feitos em sistemas descontínuos (SGARBIERI, 1996).

Os processos proteolíticos para obtenção de alimentos de melhor palatabilidade e estabilidade durante a estocagem, de fontes protéicas variadas tem sido estudados por pesquisadores através dos séculos (ADLER-NISSEN, 1986). As indústrias estão produzindo fermentados a base de soja em grande escala, empregando tecnologia moderna (FUKUSHIMA, 1979). A tendência da indústria de alimentos é procurar fonte protéica alternativa para substituir ou complementar as proteínas de origem animal, nas formulações de seus produtos (FERREIRA & SERPE, 1991).

Devido à excelente absorção dos peptídeos de baixos pesos moleculares em relação à mistura de aminoácidos, muitos autores estão interessados em desenvolver hidrolisados para fins clínicos (INFANTE et al., 1992; SALADO, 1997). Os hidrolisados podem ser utilizados tanto para suprir as necessidades de indivíduos com problemas alimentares ao consumir proteínas intactas, assim como, para os portadores de doenças como: colite ulcerativa, síndrome do intestino curto, fístulas, pancreatite (KNIGHTS, 1985; ENA et al., 1995).

Outros grupos de pesquisadores estudam a elaboração de hidrolisados para crianças que apresentam problemas metabólicos hereditários, como os fenilcetonúricos (NAKHOST et al., 1982; ADACHI et al., 1991, MOSZCZYNSKI & IDZIAK, 1993; BAUTISTA et al., 1996).

Crianças com este distúrbio, não conseguem degradar os excessos do aminoácido fenilalanina, devido à atividade insuficiente da enzima *fenilalanina hidroxilase*, sendo que o excesso deste aminoácido causa retardamento mental grave (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991).

Os hidrolisados também estão sendo utilizados como ingrediente funcional em bebidas, em dietas para grupos especiais como controle de peso, idosos (ADLER-NISSEN, 1986; FRØKJAER, 1994) e de atletas que necessitam desempenho no exercício físico (TASSI et al., 1998). Os peptídeos, além do seu alto valor biológico, apresentam um metabolismo “*suis generis*” que os diferenciam das proteínas inteiras ou dos aminoácidos livres.

O conceito dos peptídeos bioativos, resultantes da hidrólise das proteínas alimentares, tem trazido novo interesse pelos peptídeos com propriedades fisiológicas, inclusive os opióides como as β -casomorfina (DANIEL et al., 1990).

2.6. Proteases empregadas na produção de hidrolisados

As proteases mais utilizadas nos processamentos de alimentos são as endopeptidases, as quais clivam as cadeias polipeptídicas. As quatro maiores classes de endopeptidases são as serino-proteases, cistino-proteases, aspártico-proteases e metalo-proteases (ADLER-NISSEN, 1993).

A quimotripsina é uma enzima proteolítica que pertence as serino-proteases, apresenta peso molecular 25 kDa, sendo constituída de três cadeias polipeptídicas conectadas por duas pontes dissulfeto intercadeias. Seu precursor inativo é o quimotripnogênio, o qual é sintetizado no pâncreas. Este é formado por uma cadeia polipeptídica constituída de 245 aminoácidos, interligados por cinco pontes dissulfeto, e não apresenta atividade enzimática, a não ser quando a tripsina quebra a ligação peptídica entre os aminoácidos ARG-15 e ILE-16. A enzima resultante da clivagem é denominada π -quimotripsina, a qual age com outras moléculas de π -quimotripsina. As três cadeias resultantes na α -quimotripsina permanecem interligadas por duas pontes dissulfeto. Portanto, a α -quimotripsina é uma enzima digestiva com função biológica de catalisar a hidrólise de proteínas no intestino delgado, mas sem clivar todas as ligações peptídicas com velocidades significativas. Apresenta seletividade para ligações peptídicas do lado carboxílico das cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, e radicais hidrofóbicos como a metionina (STRYER, 1995).

2.7. Hidrofobicidade superficial

Hidrofobicidade superficial (H_o) é a medida dos resíduos hidrofóbicos expostos de uma proteína ou peptídeo, além de ser um sensível indicador de mudanças conformacionais, da estrutura da molécula. Este índice tem sido usado para correlacionar estrutura da proteína à sua funcionalidade (KATO et al., 1980).

A hidrofobicidade da caseína e da proteína de soja utilizando isopropanol através de medidas cromatográfica foi realizada em 1985 por Hayakawa e colaboradores. Este solvente mostrou-se mais apropriado, quando comparado ao metanol ou a acetonitrila e os autores subclassificaram a hidrofobicidade da proteína em hidrofobicidade alifática e hidrofobicidade aromática. Kato et al. (1985) fizeram a mesma classificação, considerando o CPA (ácido cis-parinário) mais eficiente na determinação da hidrofobicidade alifática e o ANS (ácido 1-anilino-8-naftalenosulfônico) na determinação da hidrofobicidade aromática.

Para isolado o protéico sem aquecimento, a elevação do pH conduz ao aumento da hidrofobicidade. A combinação de pH 10-11 e tratamento térmico a 65°C provoca várias alterações, inclusive a exposição dos grupos hidrofóbicos, os quais poderá resultar em isolados com alta capacidade emulsificante. Contudo, a desnaturação térmica nestes valores de pH induz a destruição de aminoácidos (WHITAKER, 1980) e a agregação de proteínas, resultando na diminuição da H_o , pois esta não depende somente do processo de desnaturação, o qual tende a aumentá-la, mas também do fenômeno de agregação o qual tende a diminuí-la (PETRUCCELLI et al., 1996).

Quando se procede à desnaturação da proteína, os grupos hidrofóbicos podem apresentar diferentes comportamentos de acordo com a natureza da proteína e as condições de desnaturação. Segundo Kato et al. (1980), muitos resíduos hidrofóbicos que estão ocultos no interior das

proteínas nativas, poderão ficar expostos. Alguns grupos hidrofóbicos podem continuar expostos na superfície das moléculas ou nas fendas, principalmente nas regiões onde as proteínas se associam com lipídeos.

Na proteína intacta ou com baixo grau de hidrólise, a maioria das cadeias hidrofóbicas estão escondidas e indisponíveis e sendo portanto incapazes de causar amargor. Com aumento do grau de hidrólise, se formarão peptídeos menores, expondo os grupos hidrofóbicos, causando sabor amargo. Esta hidrofobicidade quando, determinada com ANS, apresenta correlação significativa com a solubilidade da proteína (NAKAI et al., 1988).

Geralmente quando a proteína é extensivamente hidrolisada com proteases produzem-se peptídeos amargos, os quais apresentam uma leucina no resíduo c-terminal e uma composição predominantemente hidrofóbica. A extração do hidrolisado enzimático de proteínas com solução azeotrópica de álcool butil secundário, etanol ou isopropanol aquosos são eficientes na remoção dos compostos amargos. Os peptídeos amargos são concentrados na fase alcoólica atingindo entre 40 e 70% de aminoácidos essenciais. Na fase alcoólica, a leucina, isoleucina, fenilalanina e triptofano, aumentam o amargor da fração solúvel, o que poderá ser reduzido aplicando interação hidrofóbica cromatográfica (LALASIDIS, 1978).

A interação hidrofóbica, leva à diminuição do número de resíduos hidrofóbicos expostos, e a reação de troca dos grupos sulfidríla pode ser responsável pela diminuição da hidrofobicidade superficial. Com a

hidrólise ocorre quebra das ligações peptídicas, e exposição dos grupos hidrofóbicos previamente envolvidos na agregação das moléculas, sendo que a hidrofobicidade superficial aumenta linearmente com o grau de hidrólise (KATO et al., 1980). Isto foi observado na hidrólise do isolado protéico de soro com α -quimotripsina, indicando o envolvimento de aminoácidos hidrofóbicos, como a fenilalanina, tirosina, triptofano e leucina. A liberação e exposição destes resíduos contribuíram para aumentar os valores da hidrofobicidade superficial dos hidrolisados (MUTILANGI et al., 1995).

A clivagem das ligações dissulfeto provoca aumento na solubilidade da glicinina, diminuição da hidrofobicidade superficial e digestibilidade. Quando estas ligações dissulfeto clivadas estão em polipeptídeos ácidos, há um aumento na hidrofobicidade superficial e digestibilidade da glicinina, apresentando efeitos opostos nos polipeptídeos básicos. Julgando pela composição aminoacídica e pelos altos valores hidrofóbicos, estes são mais hidrofóbicos em relação aos ácidos. A clivagem das ligações dissulfeto poderá expor muitos grupos não polares que estão escondidos no interior da proteína. Os grupos não polares expostos são favoráveis a interações proteína-proteína, especialmente a altas temperaturas e concentrações de sais, condições utilizadas nos estudos da digestibilidade. As interações envolvendo polipeptídeos básicos devem contribuir para um aumento total da hidrofobicidade superficial e digestibilidade da glicinina (KELLA et al., 1986).

O isolado protéico de soja apresenta capacidade de absorção de água em consequência da diminuição dos grupos sulfidrila e aumento da hidrofobicidade superficial, entretanto, com o aumento dos grupos sulfidrila essa absorção d'água é perdida (WAGNER & AÑÓN, 1990). As diferenças nesses grupos sulfidrila bem como a hidrofobicidade superficial podem resultar em diferentes composições aminoacídicas (associadas à proteólise) e/ou outras modificações da estrutura protéica, tal como a clivagem das ligações dissulfeto (GENOVESE et al., 1993).

Dentro desta revisão bibliográfica segue-se a proposta do presente trabalho com os objetivos a serem cumpridos.

3. Objetivos

3.1. Geral

- Estudo da proteólise limitada do isolado protéico de soja (IPS) após modificação química com anidrido maléico.

3.2. Específicos

- Avaliação da inativação do inibidor de tripsina em função do grau de maleilação das proteínas, mediante ao uso do substrato sintético benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA).
- Determinação da extensão da hidrofobicidade superficial do IPS em função da modificação química com anidrido maléico e da hidrólise enzimática.
- Estudo da eficiência da α -quimotripsina na proteólise do substrato IPS, prévia inativação dos inibidores de tripsina mediante modificação química.

4. Artigo 1

Efeito da maleilação do isolado protéico de soja na atividade dos inibidores de tripsina

V.S. Nunes-Silva, J. Amaya-Farfán

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Resumo

O calor é o meio mais utilizado na inativação dos inibidores de tripsina em alimentos e ingredientes protéicos, embora seu uso possa causar escurecimento e sabor desagradável ao produto. Para reduzir esses defeitos e estudar os efeitos bioquímicos da modificação do substrato, meios alternativos de inativação dos inibidores de tripsina, podem ser empregados, os quais dispensam as altas temperaturas. Dentro deste contexto, a proposta do presente trabalho consistiu em estudar o efeito da acilação com anidrido maléico sobre a atividade dos inibidores de tripsina do isolado protéico de soja (IPS). Este agente, não tóxico, se liga reversivelmente à lisina das proteínas, inclusive aos fatores anti-tríptico e anti-quimotríptico. O IPS foi tratado com anidrido maléico nas concentrações molares 0,0170 (IPSM1), 0,0505 (IPSM2), 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 (IPSM4). Via de comparação, uma amostra de IPS foi aquecida na temperatura de 80°C por 10 minutos (IPSTT). A quantificação dos inibidores foi realizada pela inibição da atividade de tripsina, utilizando o benzoila-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato. Os resultados demonstraram que a atividade dos inibidores variou inversamente ao grau de

maleilação. Excetuando o grau mais baixo de modificação, qualquer um dos tratamentos químicos, foi mais efetivo do que o tratamento térmico na inativação dos inibidores de tripsina.

Palavras chave: lisina disponível, kunitz, bowman-birk, glycine max, hidrolisado.

Effect of maleylation on the activity of the trypsin inhibitors of soy protein isolate

V.S. Nunes-Silva, J. Amaya-Farfán

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição
Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Abstract

Heat is the most common means of inactivating the trypsin inhibitors in protein foods and ingredients, despite the occasionally undesirable discoloration and odor imparted to the products. In order to minimize such effects and to study the biochemical effects of substrate modification, alternate means could be employed, which will avoid the use of high temperatures. Within this context, the objective of the present work was to investigate the effect of acylating a soy protein isolate (SPI) with maleic anhydride on the total trypsin inhibitory activity. This non-toxic reagent reversibly binds the lysine residues of proteins, including the antitryptic and antichymotryptic factors. The SPI suspension was reacted with maleic anhydride in the concentrations (mol/L) of 0.017 (SPIM1), 0.0505 (SPIM2), 0.0809 (SPIM3) and 0.1535 (SPIM4). For comparison, a sample of the isolate was heated at 80°C for 10 minutes. The extent of inhibition was quantified using the synthetic substrate benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanylide (BAPNA). The active inhibitor varied inversely with relation to the degree of maleylation. With the

exception of the least modified product, all of the chemical treatments were more effective than the thermal treatment in removing antitryptic activity.

Key-words: available lysine, kunitz, bowman-birk, glycine max, hydrolyzate

4.3. Introdução

Embora o calor seja um dos meios mais usados para inativar os inibidores de proteases em soja (JOHNSON et al., 1980; LIENER, 1981; DiPIETRO & LIENER, 1989; SAVAGE et al., 1995; RAMAMANI et al., 1996; OSELLA et al., 1997), o aquecimento pode provocar alterações indesejáveis nas características funcionais da proteína. Visando reduzir estes danos e explorando o efeito de métodos alternativos, modificadores químicos têm sido utilizados para atingir a inativação em baixas temperaturas (SESSA & NELSEN, 1991). Vários tióis como a L-cisteína; N-acetil cisteína, glutathione reduzida e mercaptopropionilglicina, apresentaram-se efetivos na inativação dos inibidores de tripsina da farinha de soja (FRIEDMAN et al., 1982; LIENER, 1994).

A inativação do inibidor de Kunitz purificado (ITK) e os inibidores de tripsina no extrato de soja foram estudados por Sessa & Ghantous (1987), utilizando metassulfito de sódio e glutaraldeído. A melhor performance de inibição do ITK foi obtida quando os reagentes estavam combinados, enquanto que a inativação dos inibidores de tripsina no extrato de soja foi mais efetiva utilizando somente metassulfito. Segundo Steiner (1966) e Hogle & Liener (1973), o sulfito ou metassulfito de sódio é conhecido por clivar ligações dissulfeto, desse modo destrói a conformação nativa das proteínas, sendo este o provável mecanismo para inativação dos inibidores de tripsina por estes agentes. Por outro lado o glutaraldeído não necessita de calor para inativar os inibidores de tripsina no extrato de soja, provavelmente por

reagir com os grupos α e ϵ -amina, grupos sulfidríla da cisteína, anel imidazol da histidina e fenol da tirosina (JANSEN et al., 1971; FRIEDMAN & GUMBMANN, 1986).

A combinação do ácido ascórbico com o sulfato de cobre, especialmente em temperatura moderada, inativou efetivamente os inibidores de Kunitz purificado e o Bowman-Birk extraído da farinha desengordurada de soja e purificado. Entretanto, quando a farinha de soja foi tratada com ácido ascórbico e sulfato de cobre sob as mesmas condições, a atividade dos inibidores de tripsina foi preservada apesar do tratamento térmico. Este efeito de preservação deve ser consequência da habilidade do ácido ascórbico agir como oxidante em outro componente presente na farinha de soja. A inativação dos inibidores de tripsina purificados deve ocorrer como resultado da ação pró-oxidante do ácido ascórbico com sulfato de cobre agindo diretamente nos inibidores (SESSA et al., 1990; SESSA & NELSEN, 1991).

Os anidridos têm sido considerados bons modificadores químicos de caráter reversível, pois protegem a lisina da formação de ligações cruzadas em condições alcalinas ou de elevada temperatura, diminuindo a perda do valor nutricional (BRINEGAR et al., 1980 e 1981). Estes grupos são facilmente desbloqueados no pH ácido do estômago, permitindo assim a digestão completa, com liberação e absorção significativa de lisina (BUTLER & HARTLEY, 1972). Consequentemente, as modificações reversíveis das proteínas alimentares com anidridos, melhoram as propriedades funcionais

como solubilidade em água, capacidade emulsificante e a absorção de óleo e água (CHOI et al., 1982).

A modificação química da proteína com anidrido maléico resulta no excesso de cargas negativas em pH neutro, diminuindo a interação proteína-proteína e favorecendo a interação proteína-água. O resultado é a repulsão eletrostática entre os domínios internos da molécula e um efeito dissociante entre as subunidades, ocasionando a solubilização da proteína como um todo. Este efeito tem sido utilizado para tornar específica a clivagem triptica nas ligações com arginina (BUTLER et al., 1969; BUTLER & HARTLEY, 1972).

A escolha do anidrido maléico para o trabalho proposto fundamentou-se no grau de estabilidade desejado ao produto, considerando que os grupos maleíla são mais estáveis e podem ser manipulados seguramente em ampla faixa de temperatura e pH, especialmente neutro e alcalino (BUTLER & HARTLEY, 1972). Adicionalmente, o isolado protéico maleilado pode ser facilmente revertido em comparação aos agentes modificadores, tais como: o sulfito de sódio e os anidridos: acético, succínico e dimetilglutárico (CHOI et al., 1982). A proposta do presente trabalho consistiu, sobretudo, em estudar o efeito da modificação química do IPS com anidrido maléico, na atividade dos inibidores de tripsina, comparado ao tratamento térmico na temperatura de 80°C, por 10 minutos.

4.4. Material e Métodos

Matéria-prima

Isolado protéico de soja (IPS) SAMPROSOY 90-NB foi obséquio da SANTISTA ALIMENTOS S.A. (Brasil).

Métodos

Caracterização centesimal do Isolado Protéico de Soja.

Determinou-se a umidade (A.O.A.C. 1975); lipídeos totais (BLIGH & DYER, 1959); Cinzas (A.O.A.C., 1980); e proteínas pelo método semi-micro Kjeldahl (A.O.A.C., 1975), utilizando dióxido de titânio como catalisador (WILLIAMS, 1973), e o fator de conversão de nitrogênio em proteínas de 6,25.

Maleilação. O Isolado protéico de soja (SAMPROSOY - 90NB - Santista alimentos S/A) foi disperso em água desionizada na temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ na concentração de 7,75%. A solução foi resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura de $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$, que se manteve constante durante toda a reação, sendo monitorada pelo “pH-stat” (DL-21 METTLER-TOLEDO). O anidrido maléico sólido foi adicionado gradativamente, sob agitação e mantido a pH 9,0-9,5 pela a adição de NaOH 1,0 N (BUTLER & HARTLEY, 1972; IKURA et al., 1984), o tempo estipulado para ocorrer a

reação foi de 1 hora. A concentração molar de anidrido maléico (BUTLER & HARTLEY, 1972), foi de 0,017 (IPSM1); 0,0505 (IPSM2); 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 (IPSM4). O excesso de reagente foi removido por diálise em água desionizada (pH ajustado para 8,0) durante 36 horas a 4 ± 1 °C sob agitação e sucessivas trocas de água. As amostras foram liofilizadas (VIRTIS, modelo n° 10-146MR-BA), e armazenadas sob refrigeração.

Tratamento térmico. O Isolado protéico de soja (SAMPROSOY-90NB - Santista alimentos S/A) foi disperso em água desionizada na concentração de 7,75%. Permaneceu em banho-maria na temperatura de 80 ± 1 °C/10', sob agitação (IPSTT). O produto foi posteriormente congelado e liofilizado.

Atividade dos inibidores de tripsina. O método da AACC (71-10), modificado por (HAMERSTRAND et al., 1981), onde de um grama de amostra de IPS, foram extraídos os inibidores de tripsina com 50 mL de NaOH 0,01N. A amostra foi mantida sob agitação em suspensão por um período de 3 horas e a seguir centrifugada a 3590xg por 30 minutos. Determinou-se a concentração de proteína (LOWRY, 1951) no extrato da amostra, o qual posteriormente foi diluído para inibir de 40 a 60% da tripsina. Alíquotas de 0,2-1,0 mL foram adicionadas aos tubos de ensaio e o volume aferido para 1 mL com água desionizada, adicionando 1 mL de tripsina e 7 mL de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato (KAKADE et al., 1969; KAKADE et al., 1974). A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido acético. No branco de amostra, foi adicionado o

ácido acético antes do BAPNA. Todos foram filtrados (papel Whatman nº3), e a leitura efetuada em espectrofotômetro (BECKMAN DU-70). As absorbâncias da amostra, obtidas em triplicata após subtração dos respectivos brancos das amostras, foram subtraídas das médias do padrão de tripsina. Uma unidade de tripsina (TU) foi definida como 0,01 unidade de absorbância a 410 nm em 10 mL de mistura de reação e a atividade do inibidor de tripsina foi definida como o número de unidades de tripsina inibida (UTI).

Análise de aminoácidos. Realizada através de cromatografia de troca iônica, com reação pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN et al., 1958). A mistura dos aminoácidos totais foi obtida por hidrólise ácida com HCl 6N a 110°C por 22 horas. Utilizando o analisador de aminoácidos automático (Thermo Separation Products, Vacuum Membrane Degasser P4000, reactor PCX 3100; Pickering Laboratories, UK).

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Realizado de acordo com o método de Laemmli (1970). Alíquotas de 8 mg de proteínas foram dissolvidas em 1,0 mL tampão (0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas a 90°C por 2 minutos. Depois de resfriadas, 20 µL foram aplicados no gel SDS-Tris-glicina sistema de tampão descontinuo. O gel de empilhamento foi de 4% para separação em gradiente de gel de 7,0-15,0%. Os pesos moleculares aproximados das proteínas foram apurados usando o kit padrão (LMW – Pharmacia), fosforilase B (94 kDa); albumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1

kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa). A eletroforese foi realizada em 80 mA/gel à temperatura ambiente por 4 horas. As bandas foram reveladas, utilizando o corante “Comassie Brilhante Blue” G-250 (0,2%). A densitometria do gel foi realizada com o vídeo-densitômetro da BIO-RAD modelo 620. A densidade óptica de cada banda foi medida por absorbância. Estes resultados foram analisados pelo programa *1-C Analyst Data Analysis Software* que calculou os pesos moleculares aparentes de cada banda comparada às mobilidades relativas das subunidades ou polipeptídeos com aquelas dos padrões.

Análise estatística. As médias dos resultados da atividade dos inibidores de tripsina foram submetidas à análise de variância e ao apresentar diferenças entre os resultados, completou-se o estudo com o teste de Tukey (COCKRAN & COX, 1957). Utilizou-se o programa STATISTICA para o windows, versão 6.0 (StaSoft, Inc.).

4.5. Resultados e Discussão

Caracterização do isolado protéico de soja. Os resultados estão expressos em porcentagem $\pm$ erro padrão. O isolado protéico de soja, Samprosoy 90-NB, utilizado neste estudo contém $91,75 \pm 0,18\%$ de proteína. O resultado encontra-se dentro dos valores indicados pela literatura, que varia entre 87,9 e 94,1% (GARCIA et al., 1997), a variação na concentração da proteína esta diretamente relacionada com as características químicas das farinhas e os reagentes utilizados na extração das proteínas (SINGH et al., 1994). Embora o fator de conversão de nitrogênio em proteína para soja seja de 5,71, utilizou-se o fator de 6,25 (GARCIA et al., 1997), o qual é utilizado nas indústrias. Este fator tem sido amplamente estudado, apesar das dificuldades de avaliação devido à presença de nitrogênio não protéico na soja (MOSSÉ, 1990). Os teores de umidade $6,26 \pm 0,10\%$; cinzas $3,69 \pm 0,02\%$ estão de acordo com os valores reportados (WOLF & COWAN, 1975; MARTINS, 1994), e o lipídeo $3,04 \pm 0,05\%$ esta de acordo com (BOATRIGHT & HETTIARACHCHY, 1995).

Composição em aminoácidos totais do IPS e do produto maleilado. Como parte da caracterização do IPS, é apresentado na Tabela 1, o perfil aminoacídico, mostrando a queda da maioria dos aminoácidos pela adição do grupo maleíla. Devido à reversibilidade da reação, a lisina não aparece diminuída, e apresenta proporção superior à dos outros aminoácidos. Já o aumento observado para a prolina é obviamente espúrio e deve ser atribuído ao alto erro na determinação destes aminoácidos.

Tabela 1 – Composição em aminoácidos totais do nativo (IPS), do modificado com 0,0809M anidrido maléico (IPSM3) e do tratado termicamente (IPSTT). Os resultados são expressos em miligramas de aminoácidos/100mg de amostra

<i>Aminoácidos</i>	<i>IPS</i>	<i>IPSM3</i>	<i>IPSTT</i>
<i>Totais</i>	<i>mgAA/100mg</i>		
Ac. Aspártico	10,4	9,72	9,28
*Treonina	3,36	3,00	4,44
Serina	4,82	4,64	5,10
Ác. Glutâmico	17,05	15,88	16,05
Prolina	5,82	6,58	5,42
Glicina	3,54	3,20	3,55
Alanina	3,74	3,23	4,09
Cistina	1,04	1,07	1,42
*Valina	4,71	3,26	4,62
*Metionina	1,14	1,14	1,65
*Isoleucina	4,28	3,28	4,98
*Leucina	7,29	6,41	6,59
Tirosina	3,53	3,38	3,13
*Fenilalanina	6,25	5,01	6,33
*Lisina	4,11	3,47	4,05
Amônia	1,39	1,47	1,24
*Histidina	2,73	2,36	2,87
Arginina	6,82	6,63	6,25

Valores médios de análise em duplicata.

** Aminoácidos essenciais.*

Atividade dos inibidores de tripsina. Os resultados relativos à concentração de inibidores de tripsina e a atividade destes podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 1. Analisando estes parâmetros verificou-se a redução da atividade do inibidor de tripsina em 28,60; 74,37; 74,55; 74,90 e 33,30% para IPISM1, IPISM2, IPISM3, IPISM4 e IPSTT, respectivamente, em relação ao IPS. Como resultado do curto período de desnaturação térmica, na temperatura de 80°C, este tratamento produziu inativação dos inibidores de tripsina apenas um pouco acima da inativação obtida para o nível mais baixo de maleilação.

As condições mais efetivas para o tratamento térmico do IPS são 90°C por 20 minutos, ou 121°C por 10 minutos, onde se obtém 90% de inativação dos inibidores (JOHNSON et al., 1980; SAVAGE et al., 1995). Essas condições, entretanto, sabe-se que levam à destruição da cistina, arginina e lisina (RIOS-IRIARTE & BARNES, 1966).

O tratamento com anidrido maléico, por sua vez, mostrou capacidade de inativar os inibidores de tripsina, provavelmente pela reação com os grupos α e ε -amina, anéis imidazol das histidinas e grupos fenólicos de tirosina expostos (JANSEN, 1971). Interações estruturais destes grupos são reconhecidamente responsáveis pela atividade dos inibidores de tripsina (STEINER, 1966). Gráficamente pode ser observado na Figura 1 que a variação da atividade em função da concentração do anidrido maléico foi grande para os dois primeiros níveis (IPISM1 e IPISM2); após os quais, as variações foram desprezíveis.

No nível molecular, sabe-se que o inibidor de Bowman-Birk (IBB), possui um resíduo lisila (lisina 16) que faz parte do sítio ativo antitriptico, o qual, além de estar exposto para reagir, comprometeria a atividade dos inibidores uma vez maleilado. Visto que as seqüências aminoacídicas da região do sítio antiquimotriptico ativo do IBB não contém lisina, embora sejam estas altamente constantes e homólogas em vários tipos de IBB (LIENER, 1994), não é possível *a priori* de se fazer qualquer afirmação quanto à perda de atividade antiquimotriptica do IPS tratado com anidrido maléico.

Tabela 2 - Efeito do tratamento químico e térmico na inativação dos inibidores de tripsina no IPS

<i>Tratamentos</i>	<i>Anidrido maléico [moles/L]</i>	<i>Inibidor de tripsina (mg/g proteína)**</i>	<i>UTI*/mg de proteína**</i>
IPS	0,0000	6,04 ± 0,06 ^a	11,47 ± 0,09 ^a
IPSM1	0,0170	4,20 ± 0,06 ^b	8,19 ± 0,11 ^b
IPSM2	0,0505	1,54 ± 0,63 ^c	2,94 ± 0,04 ^c
IPSM3	0,0809	1,53 ± 0,01 ^c	2,92 ± 0,02 ^c
IPSM4	0,1535	1,52 ± 0,11 ^c	2,88 ± 0,08 ^c
IPSTT	0,0000	3,80 ± 0,07 ^d	7,65 ± 0,13 ^d

*UTI: unidade de tripsina inibida.

**Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os valores consistem da média ± erro padrão, (IPS, n=9; demais grupos, n=6).

IPS: isolado protéico de soja, IPSM1 a M4: modificação com concentrações crescentes de anidrido maléico.

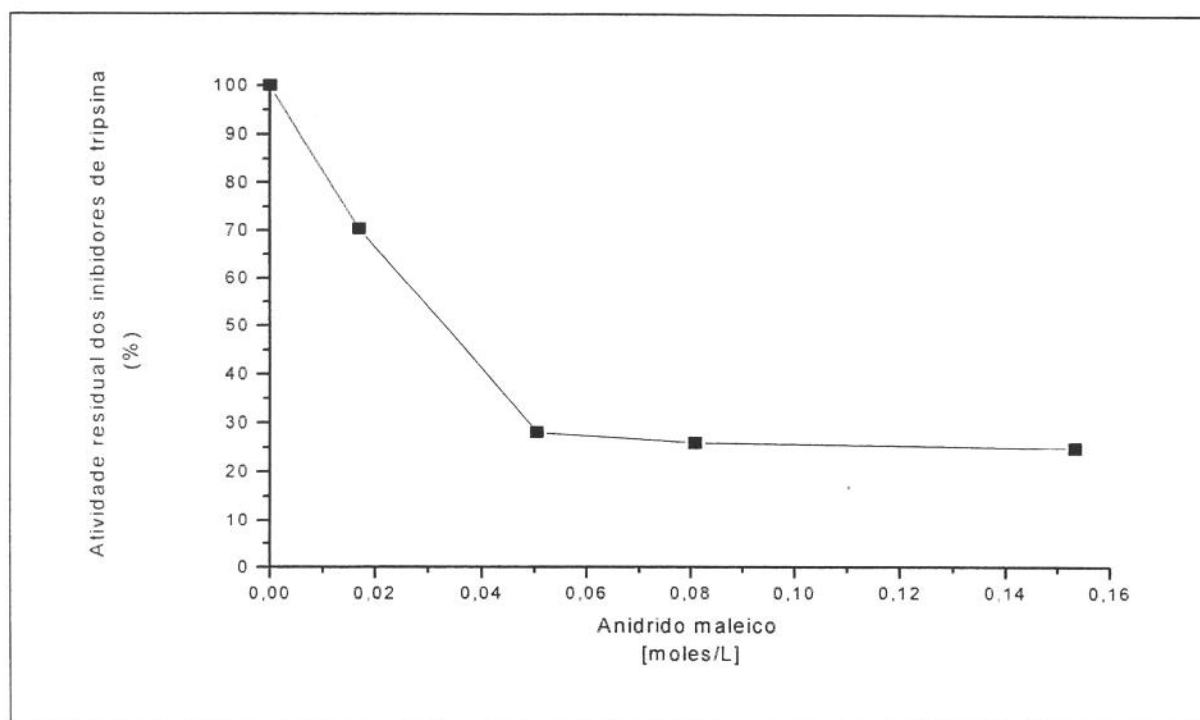


Figura – 1. Efeito da concentração do anidrido maléico na atividade residual dos inibidores de tripsina do IPS.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O padrão com pesos moleculares entre 14,4 e 94 kDa, apresenta-se na coluna A, da Figura 2. Nas colunas B, C, D, E, F e G apresentam-se o IPS, IPSM1, IPSM2, IPSM3, IPSM4 e IPSTT, respectivamente. Como os extratos foram reduzidos com β -mercaptoetanol, as bandas são compostas principalmente de α' , α , e β -subunidades (80, 76 e 50 kDa) da globulina 7S, as subunidades ácidas (38, 35, e 33 kDa) da globulina 11S, e as subunidades básicas (25, 22, e 18 kDa) da globulina 11S e o inibidor de tripsina de Kunitz, conforme relataram (NIELSEN, 1985; IWABUCHI & YAMAUCHI, 1987; SATHE et al., 1989; KIM et. al., 1990). Observa-se também na Figura 2 que com o aumento do grau de maleilação, há uma redução da intensidade da banda do inibidor de tripsina de Kunitz, sugerindo que os tratamentos foram particularmente eficientes sobre a atividade dos inibidores. A Tabela 3 mostra os pesos moleculares (PM) aparentes das bandas determinadas na análise densitométrica dos géis, os quais foram obtidos relacionando as mobilidades eletroforéticas das subunidades ou polipeptídeos, relativas àquelas dos padrões. Na Tabela 4 apresenta-se a porcentagem da área das subunidades em relação à área total das globulinas 7 e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

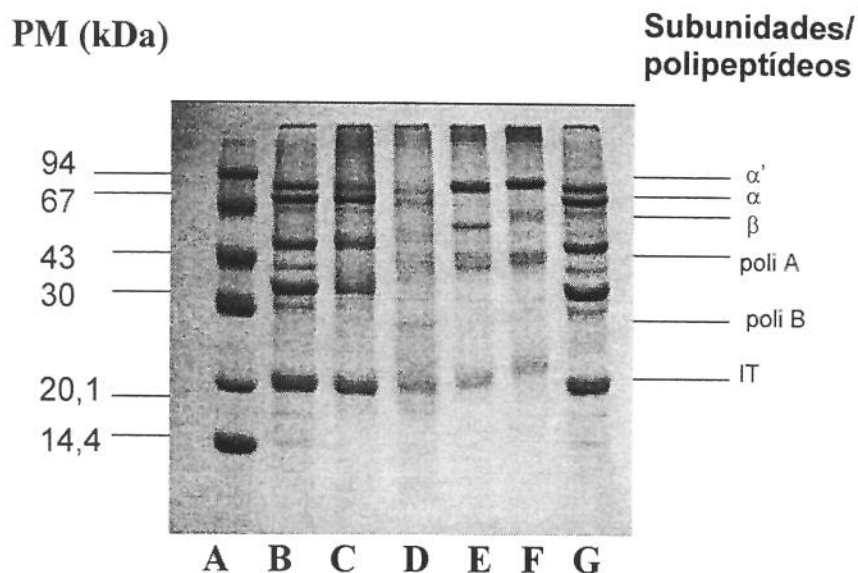


Figura – 2. Eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (7-15%; SDS e β -mercaptoetanol) mostrando o efeito da maleilação no perfil. coluna (A) – marcadores (fosforilase b [94 kDa]; albumina [67 kDa]; ovalbumina [43 kDa]; anidrase carbônica [30 kDa]; inibidor de tripsina [20 kDa]; α -lactalbumina [14,4 kDa]; (B) IPS; (C) = IPSM1; (D) = IPSM2; (E) = IPSM3; (F) = IPSM4; (G) = IPSTT. Migração: do cátodo (superior) para o ânodo (inferior).

Tabela 3 - Relação dos pesos moleculares aparentes (PM) das subunidades da globulina 7S e dos polipeptídeos da globulina 11S*.

Tratamentos	<i>Globulina 7S</i>				<i>Globulina 11S</i>		
	<i>(β-Conglicinina)*</i>				<i>(Glicinina)*</i>		
	α'	α	β		Ácido		Básico
<i>IPS</i>	76,1	70,8	51,2	44,9	38,9	34,1	20,2
<i>IPSM1</i>	73,7	68,5	50,8	ND	38,5	34,1	20,2
<i>IPSM2</i>	71,4	66,3	ND	ND	ND	29,7	20,7
<i>IPSM3</i>	73,7	66,3	56,9	43,9	ND	ND	20,5
<i>IPSM4</i>	74,9	63,7	54,6	45,7	ND	31,0	22,4
<i>IPSTT</i>	72,5	67,4	50,0	43,2	36,4	31,7	19,8

* valores expressos em kDa.

ND = Bandas não detectadas.

IPS = nativo, *IPSM1*=0,0170; *IPSM2*=0,0505; *IPSM3*=0,0809; *IPSM4*=0,1535 M de anidrido maléico e o *IPSTT* = tratamento térmico de 80°C/10 minutos.

Tabela 4 - Composição relativa das subunidades da globulina 7S e dos polipeptídeos da globulina 11S.

Tratamentos	<i>Globulina 7S</i>				<i>Globulina 11S</i>		
	<i>(β-Conglicinina)*</i>				<i>(Glicinina)*</i>		
	α'	α	β		Ácido	Básico	
<i>IPS</i>	38,41	35,74	25,85	32,51	28,17	24,69	14,63
<i>IPSM1</i>	38,19	35,49	26,32	ND	41,48	36,75	21,77
<i>IPSM2</i>	36,69	34,07	ND	ND	ND	58,93	41,07
<i>IPSM3</i>	37,43	33,67	28,90	68,17	ND	ND	31,83
<i>IPSM4</i>	38,77	32,97	28,26	46,12	ND	31,28	22,60
<i>IPSTT</i>	38,18	35,49	26,32	32,95	27,77	24,18	15,10

*Os valores expressos em porcentagem.

ND = Bandas não detectadas.

IPS = nativo, *IPSM1*=0,0170; *IPSM2*=0,0505; *IPSM3*=0,0809; *IPSM4*=0,1535 M de anidrido maléico e o *IPSTT* = tratamento térmico de 80°C/10 minutos.

4.6. Conclusões

Conclui-se que a reação do anidrido maléico com as proteínas do isolado protéico de soja resultou na diminuição da lisina disponível e na inativação dos inibidores de tripsina. Isto foi confirmado pela diminuição da intensidade da banda eletroforética correspondente e pelos testes de atividade inibitória. Nas condições do experimento, o tratamento térmico foi fator inativador menos eficiente do que a maleilação.

4.7. Referências Bibliográficas

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Aproved Methods of the A.A.C.C.**, Method 71-10, approved Nov., Saint Paul, 1973.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 12.ed. Washington, 1975.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis**. 13.ed. Washington, 1980.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.

BOATRIGHT, W. L.; HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.12, p.1439-1444, Dec., 1995.

BRINEGAR, A. C.; KINSELLA, J. E. Reversible modification of lysine in soybean proteins, using citraconic anhydride: Characterization of physical and chemical changes in soy protein isolate, the 7S globulin, and lipoxygenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.28, n.4, p.818-824, July-Aug., 1980.

- BRINEGAR, A. C.; KINSELLA, J. E. Reversible modification of lysine in β -lactoglobulin using citraconic anhydride. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 18, n.1, p.18-25, July, 1981.
- BUTLER, P. J. G.; HARRIS, J. I.; HARTLEY, B. S.; LEBERMAN, R. The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains. **The Biochemical Journal**, Great Britain, v. 112, n.679-689, 1969.
- BUTLER, P. J. G.; HARTLEY, B. S. Maleylation of amino groups. **Methods in Enzymology**, New York, v.25B, p.191-199, 1972.
- CHOI, Y. R.; LUSAS, E. W.; RHEE, K. C. Effects of acylation of defatted cottonseed flour with various acid anhydrides on protein extractability and functional properties of resulting protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n.5, Sept.-Oct., p.1713-1716, 1982.
- COCKRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Design**. 2.ed. New York: John Wiley, 1957, 611p.
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**: 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap:6, p.321-429.

- DiPIETRO, C. M.; LIENER, I. E. Soybean protease inhibitors in foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.3, p.606-609, 617, May-June, 1989.
- FRIEDMAN, M.; GROSJEAN, Ok-K. K.; ZAHNLEY, J. C. Inactivation of soy bean trypsin inhibitors by thiols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33, n.2, p.165-172, Feb., 1982.
- FRIEDMAN, M.; GUMBMANN, M. R. Nutritional improvement of soy flour through inactivation of trypsin-inhibitors by sodium-sulfite. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.5, p.1239-1241, Sep.-Oct., 1986.
- GARCÍA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.37, n.4, p.361-391, June, 1997.
- HAMERSTRAND, G. E.; BLACK, L. T.; GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.58, n.1, p. 42-45, Jan.-Feb., 1981.
- HOGLE, J. M.; LIENER, I. Reduction and reactivation of the Bowman-Birk soybean inhibitor. **Canadian Journal of Biochemistry**, Canada, v.51, n.7, p.1014-1020, July, 1973.

- IKURA, K.; GOTO, M.; YOSHIKAWA, M.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Use of transglutaminase. Reversible blocking of amino groups in substrate proteins for a high yield of specific products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.9, p.2347-2354, Sept., 1984.
- IWABUCHI, S.; YAMAUCHI, F. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.35, n.2, p.205-209, Mar.-Apr., 1987.
- JANSEN, E. F.; TOMIMATSU, Y.; OLSON, A. C. Cross-linking of α -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, California. v.144, n.1, p.394-400, May, 1971.
- JOHNSON, L. A.; DEYOE, C. W.; HOOVER, W. J.; SCHWENKE, J. R. Inactivation of trypsin inhibitors in aqueous soybean extracts by direct steam infusion. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.57, n.6, p.376-379, Nov.-Dec., 1980.
- KAKADE, M. L.; SIMONS, N.; LIENER, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.46, n.5, p.518-526, Sep., 1969.

- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.51, n.3, p.376-382, May-June, 1974.
- KIM, L. S. Y.; PARK, P. S. W.; RHEE, K. C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.3, p.651-656, Mar., 1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-686, 1970.
- LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, n.3, p.406-415, Mar., 1981.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.34, n.1, p.31-67, Jan., 1994.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARTINS M. T. S. **Obtenção e caracterização química e imunológica parcial de plasteína produzida a partir de hidrolisados de isolado protéico de soja e caseína.** Campinas, 1994. 95p. Tese (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.1, p.18-24, Jan., 1990.

NIELSEN, N. C. The Structure and Complexity of the 11S polypeptides in soybeans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.62, n.12, p.1680-1686, 1985.

OSELLA, C. A.; GORDO, N. A.; GONZALEZ, R. J.; TOSI, E.; RE, E. Soybean heat-treated using a fluidized bed. **Food Science and technology Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, London, v.30, n.7, p.676-680, 1997.

RAMAMANI, S.; CHANDRASEKHARA, H. N.; MURTHY, K. N. Efficiency of inactivation of trypsin inhibitors and haemagglutinins by roasting of soybean (*Glycine max*). **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.33, n.3, p.197-201, May-June, 1996.

- RIOS-IRIARTE, B. J.; BARNES, R. H. The effect of overheating on certain nutritional properties of the protein of soybeans. **Food Technology**, Champaign, v.20, n.6, p. 835-838, June, 1966.
- SATHE, S. K.; MASON, A. C.; WEAVER, C. M. Thermal aggregation of soybean (*Glicine max.* L) sulfur-rich protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.2, p.319-323, 342, May-Apr., 1989.
- SAVAGE, W. D.; WEI, L. S.; SUTHERLAND, J. W.; SCHMIDT, S. J. Biologically active componentes inactivation and protein insolubilization during heat processing of soybeans. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p.164-168, 180, Jan.-Feb., 1995.
- SESSA, D. J.; GHANTOUS, P. E. Chemical Inactivation of soybean trypsin inhibitors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.64, n.12, p.1682-1687, Dec., 1987.
- SESSA, D. J.; HANEY, J. K.; NELSEN, T. C. Inactivation of soybean trypsin-inhibitors with ascorbic-acid plus copper. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.7, p.1469-1474, July, 1990.
- SESSA, D. J.; NELSEN, T. C. Chemical inactivation of soybean protease inhibitors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.68, n.7, p.463-470, July, 1991.

- SINGH, N.; SINGH, D., CHAUHAN, G. S. Effects of defatting, coagulants and coagulation pHs on soy protein isolates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n.6, p.117-121, Nov.- Dec., 1994.
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.3, p.1190-1206, June, 1958.
- STEINER R. F. Aecessibility and structural function of particular amino acid residues of soy bean trypsin inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London., v.115, n.1, p.257-270, July, 1966.
- WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, Mar., 1973.
- WOLF, W. J.; COWAN. J. C. **Soybean as a food source**. Food uses of soybean proteins. ed. revisada. Cleveland: CRC Press, 1975. 101p.

5. Artigo 2

Hidrofobicidade superficial do isolado protéico de soja modificado com anidrido maléico

V.S. Nunes-Silva, J. Amaya-Farfán

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Os efeitos físico-químicos e químicos da maleilação das proteínas de soja têm sido pouco estudados. O presente trabalho visou estudar o efeito da maleilação do isolado protéico de soja (IPS) no teor de lisina disponível, na mobilidade eletroforética e na hidrofobicidade superficial da proteína. Este agente modificador não tóxico se liga reversivelmente aos resíduos α -amino terminais da lisina e aos grupos ε -amino das proteínas. As proteínas do isolado protéico de soja foram tratadas com anidrido maléico nas concentrações molares de 0,0170 (IPSM1); 0,0505 (IPSM2); 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 (IPSM4), resultando em graus de modificação da lisina disponível de 3,2; 50,7; 86,7 e 92,4% respectivamente. Análise de lisina disponível e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) indicaram modificação dos grupos lisila e aumento da carga líquida negativa das proteínas. A hidrofobicidade superficial, determinada pela intensidade da fluorescência do ácido 1-anilino-8-naftaleno sulfônico (ANS) capaz de se associar à superfície da proteína, diminuiu consideravelmente com a

modificação (136,6; 135,9; 78,1; 52,6 e 34,7; para o IPS, IPSM1, IPSM2, IPSM3 e IPSM4, respectivamente), indicando perda da capacidade das proteínas do isolado de interagirem hidrofobicamente com a sonda.

Palavras chave: *proteínas, solubilidade, propriedades funcionais, desnaturação, acilação, lisina disponível.*

Surface hydrophobicity of soy protein isolate modified with maleic anhydride

V.S. Nunes-Silva, J. Amaya-Farfán

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Abstract

The physical and chemical effects of maleylation of soybean protein isolate (SPI) have been little studied. The purpose of the present work was to describe the effect of maleylation on the available lysine content, polyacrylamide-gel electrophoretic (SDS-PAGE) mobility and surface hydrophobicity of the components of an SPI. This reagent, a non-toxic modifier, reversibly binds most terminal α -amino and lysine ϵ -amino groups of proteins. SPI treated with maleic anhydride, at concentrations of 0.0170 (SPIM1), 0.0505 (SPIM2), 0.0809 (SPIM3) and 0.1535 M (SPIM4), showed corresponding lysine modification extents of (%) 3.2, 50.7, 86.7 and 92.4. The available lysine and SDS-PAGE data indicated modification of lysil residues and a consequent increase of the net negative charge of the protein components. Surface hydrophobicity, as determined by the fluorescence emitted by the hydrophobic probe 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid bound to the protein's surface, showed a linear decrease with the degree of maleylation ($[\lambda=464\text{ nm}]$ 136.6, 135.9, 78.1, 52.6 and 34.7, for the SPI, SPIM1, SPIM2, SPIM3 and SPIM4,

respectively), which were consistent with the loss of fluorescence and indicative of the reduced ability of hydrophobic amino acid residues on the protein's surface to bind the probe.

Key-words: *protein, solubility, functional properties, denaturation, acylation, available lysine.*

5.3. Introdução

O grau de desnaturação da proteína de soja na preparação de isolados consiste num fator importante, pois afeta diretamente as propriedades funcionais como solubilidade, absorção de água, viscosidade, capacidade de formação de gel (ARRESE et al., 1991; SORGENTINI et al., 1995). O estado avançado de desnaturação das proteínas 7S e 11S na fração insolúvel, leva à formação de agregados, resultando no aumento da capacidade de absorção e retenção de água. A proteína 11S é mais resistente, com tendência a formar agregados insolúveis quando a desnaturação atinge grau avançado, sendo que 7S capaz de igualar-se a esta, num estado de desnaturação menor (SORGENTINI et al., 1991).

As proteínas do IPS apresentam poucos grupos sulfidríla, embora a hidrofobicidade superficial seja elevada a capacidade de absorção de água é relativamente alta. Na medida em que os grupos sulfidríla são aumentados, Wagner & Añon (1990) notaram que esta propriedade torna-se reduzida. Diferenças tais como a clivagem das ligações dissulfeto ou a localização física dos grupos sulfidríla, bem como a hidrofobicidade superficial, podem eventualmente gerar peptídeos de diferentes composições aminoacídicas por ocasião da proteólise enzimática aliada à desnaturação protéica (GENOVESE et al., 1993).

A hidrofobicidade superficial é determinada pela natureza química dos resíduos aminoacídicos encontrados na proteína (HAYAKAWA

et al., 1985). Portanto, o ácido *cis*-parinárico (CPA) é considerado mais eficiente na determinação da hidrofobicidade alifática, enquanto que o ácido 1-anilino-8-naftalenosulfônico (ANS) na determinação da hidrofobicidade aromática (KATO et al., 1985).

O anidrido maléico reage reversivelmente com os grupos amina das proteínas, consequentemente modificando os resíduos lisila e protegendo-os durante a hidrólise ou modificação com outros reagentes (GLAZER et al., 1975). A acilação, de um modo geral, causa alteração das estruturas terciária e quaternária, além de repercutir no conjunto das propriedades funcionais, inclusive a acessibilidade da estrutura primária ao ataque de enzimas proteolíticas. Por exemplo, as proteínas succiniladas mostram capacidade gelificante diminuída, por causa da forte repulsão eletrostática, maior susceptibilidade à precipitação com íons cálcio, entre outras, devido aos numerosos grupos carboxilato (DAMODARAN, 1996). Dentro deste contexto, o presente trabalho consistiu em estudar o efeito da maleilação com anidrido maléico, verificando o grau de modificação através da lisina disponível, o comportamento eletroforético das frações protéicas e a hidrofobicidade superficial determinada com ANS.

5.4. Material e Métodos

Matéria-prima

O Isolado protéico de soja (IPS), SAMPROSOY 90-NB, foi obséquio da SANTISTA ALIMENTOS S.A (Brasil).

Métodos

Caracterização centesimal do isolado protéico de soja.

Determinou-se a umidade (AOAC, 1975); lipídeos totais (BLIGH & DYER, 1959); Cinzas (AOAC, 1980); e proteínas pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1975), utilizando dióxido de titânio como catalisador (WILLIAMS, 1973), e o fator de conversão de nitrogênio em proteínas de 6,25.

Maleilação. O Isolado protéico de soja (SAMPROSOY - 90NB - Santista alimentos S/A) foi disperso em água desionizada na temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ na concentração de 7,75%. A solução foi resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura de $3 \pm 1^\circ\text{C}$, que se manteve constante durante toda a reação, sendo monitorada pelo pH-stat (DL-21 METTLER-TOLEDO). O anidrido maléico sólido foi adicionado gradativamente, sob agitação e mantido a pH 9,0-9,5 pela a adição de NaOH 1,0 N (BUTLER & HARTLEY, 1972; IKURA et al., 1984), o tempo estipulado para ocorrer a reação foi de 1 hora. A concentração molar de anidrido maléico (BUTLER &

HARTLEY, 1972), foi de 0,017 (IPSM1); 0,0505 (IPSM2); 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 (IPSM4). O excesso de reagente foi removido por diálise em água desionizada (20X o volume; pH ajustado para 8,0) durante 36 horas à 4 ± 1 °C sob agitação e sucessivas trocas de água. As amostras foram liofilizadas (VIRTIS, modelo nº 10-146MR-BA), e armazenadas sob refrigeração.

Lisina disponível e grau de maleilação. A quantidade de grupos ϵ -NH₂ livres de lisina, determinada pelo ácido (TNBS) trinitrobenzenosulfônico (HALL et al., 1973), foi utilizada como indicação do grau de maleilação das proteínas. Para tanto, 100 mg de amostra foram dissolvidos em 30 mL de solução de NaHCO₃ a 4% (p/v) e aquecida a 50 ± 1 °C durante 10 minutos sob agitação ocasional. Posteriormente o volume foi aferido para 50 mL com NaHCO₃ 4% (p/v) e filtrado em lã de vidro. Uma alíquota de 1 mL foi colocada em tubo de polipropileno com tampa rosqueável e acrescentado 1 mL de TNBS 0,1% (p/v) em água desionizada. Os tubos foram incubados por 2 h a 40 ± 1 °C, e a reação interrompida pela adição de 6 mL HCl 8,0 N. Em seguida, os tubos foram autoclavados a 120°C por 1 hora. A solução obtida foi transferida quantitativamente (2 lavagens com água destilada) para tubo de ensaio e, os subprodutos formados extraídos com 10 mL de éter etílico. O resíduo de éter sobressalente foi evaporado a 80°C em banho-maria. As absorbâncias das amostras foram lidas em triplicata em espectrofotômetro (DU-70 BECKMAN) no comprimento de onda de 346 nm. A concentração de lisina disponível foi calculada em relação à curva padrão realizada com hidrocloreto de lisina (SIGMA), onde o grupo α -amino do

aminoácido livre foi previamente complexado com CuCO_3 como descrito por Ruiz (1985).

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Realizado de acordo com o método de Laemmli (1970), Alíquota de 8 mg de proteína foi dissolvido em 1,0 mL tampão (0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidos a 90°C por 2 minutos. Depois de resfriadas, 20 µL foram aplicados no gel SDS-Tris-glicina sistema de tampão descontínuo. O gel de empilhamento foi de 4% para separação em gradiente de gel de 7,0-15,0%. Utilizou-se padrão (LMW – Pharmacia), contendo fosforilase b (94 kDa); albumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa). A eletroforese foi realizada em 80 mA/gel à temperatura ambiente por 4 horas. As bandas foram reveladas, utilizando o corante “Comassie Brilhante Blue” G-250 (0,2%). A densitometria do gel foi realizada com o vídeo-densitômetro da BIO-RAD modelo 620. A densidade óptica de cada banda foi medida por absorbância. Estes resultados foram analisados pelo programa *1-C Analyst Data Analysis Software* que calculou os pesos moleculares aparentes de cada banda comparados às mobilidades relativas das subunidades ou polipeptídeos com aquelas dos padrões.

Hidrofobicidade superficial com ANS. Foi determinada usando o reagente 1-anilino-8-naftalenosulfônico (ANS) como sonda hidrofóbica (KATO & NAKAI, 1980). A dispersão de 1% (p/v), em água

destilada pH 7,0, foi agitada por 2 horas na temperatura ambiente, e centrifugada a 3590xg por 30 minutos. Determinou-se a concentração de proteína (LOWRY, 1951) no sobrenadante. A proteína foi diluída em série em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 obtendo concentração na faixa de 0,05 à 3,5%. Posteriormente 40 µL de ANS (8,0 mM em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0), foram adicionados a 3 mL da solução de proteína diluída. A intensidade da fluorescência (IF) da proteína foi medida em espectrofluorímetro (SPF-500C AMINCO), utilizando comprimento de onda de 365 nm de excitação e 484 nm de emissão. A IF foi padronizada ajustando a leitura de 15 µL de ANS em 3 mL de metanol para 80%. A IF líquida de cada diluição foi obtida pela subtração da IF da proteína sem ANS. A inclinação inicial (S_0) da IF líquida, *versus* a concentração de proteína (calculada pela análise de regressão linear) foi utilizada como índice de hidrofobicidade da proteína.

Análise estatística. As médias dos resultados da lisina disponível e intensidade de fluorescência foram submetidas à análise de variância e ao apresentar diferenças entre os resultados, completou-se o estudo com o teste de Tukey (COCKRAN & COX, 1957). Utilizou-se o programa STATISTICA para o windows, versão 6.0 (StaSoft, Inc.).

5.5. Resultados e Discussão

Caracterização do isolado protéico de soja. Os resultados estão expressos em porcentagem $\pm$ erro padrão. O isolado protéico de soja, Samprosoy 90-NB, utilizado neste estudo contém $91,75 \pm 0,18\%$ de proteína. O resultado encontra-se dentro dos valores indicados pela literatura, que varia entre 87,9 e 94,1% (GARCIA et al., 1997), a variação na concentração da proteína esta diretamente relacionada com as características químicas das farinhas e os reagentes utilizados na extração das proteínas (SINGH et al., 1994). Embora o fator de conversão de nitrogênio em proteína para soja seja de 5,71, utilizou-se o fator de 6,25 (GARCIA et al., 1997), o qual é utilizado nas indústrias. Este fator tem sido amplamente estudado, apesar das dificuldades de avaliação devido a presença de nitrogênio não protéico na soja (MOSSÉ, 1990). Os teores de umidade $6,26 \pm 0,10\%$; cinzas $3,69 \pm 0,02\%$ estão de acordo com os valores reportados (WOLF & COWAN, 1975; MARTINS, 1994), e o lipídeo $3,04 \pm 0,05\%$ esta de acordo com (BOATRIGHT & HETTIARACHCHY, 1995).

Lisina disponível. As concentrações de lisina disponível encontradas para os diversos níveis de modificação estão representadas na Tabela 1 e Figura 1. Como era de se esperar, aumentos sucessivos na concentração do agente maleilante resultaram em maiores graus de modificação protéica, embora não de forma linear. Para concentrações superiores a 0,1535 molar, o grau de maleilação pode se considerar como tendo atingido um *plateau*. A concentração da lisina disponível, usada como

indicador indireto do grau de maleilação, mostrou sua queda mais pronunciada na faixa de 0,0170 a 0,0505 molar do anidrido, ou seja, entre os níveis de modificação M1 e M2. Tal comportamento pode ser indicativo da relativa maior acessibilidade ou facilidade com que certos grupos ϵ -NH₂ disponíveis são atingidos pelo agente modificador. Mais do que o estado de transição de uma estrutura terciária, no processo de acilação, deve se considerar o fato que no IPS predomina uma população heterogênea de moléculas protéicas, as quais serão atingidas pelo reagente com susceptibilidades características de maleilação, dependendo da estrutura terciária de cada uma. Sendo assim, saltos na taxa de maleilação podem ser observados quando moléculas numericamente predominantes tiverem sido maleiladas.

Tabela 1 - Concentração de lisina disponível nas proteínas do IPS em função do grau de maleilação nos respectivos tratamentos.

<i>Tratamentos</i>	<i>Anidrido maléico</i> (moles/L)	<i>Lisina disponível*</i> (mg/100mg proteína)	<i>Modificação*</i> (%)
IPS	0,0000	4,08 ± 0,01 ^a	0,00 ^a
IPSM1	0,0170	3,95 ± 0,01 ^b	3,43 ^b
IPSM2	0,0505	2,02 ± 0,02 ^c	50,49 ^c
IPSM3	0,0809	0,54 ± 0,01 ^d	86,76 ^d
IPSM4	0,1535	0,31 ± 0,01 ^e	92,40 ^e

Os valores representam a média ± erro padrão, (n=6). (IPS: isolado protéico de soja, IPSM1 a M4: modificação com as concentrações crescentes de anidrido maléico).

* Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

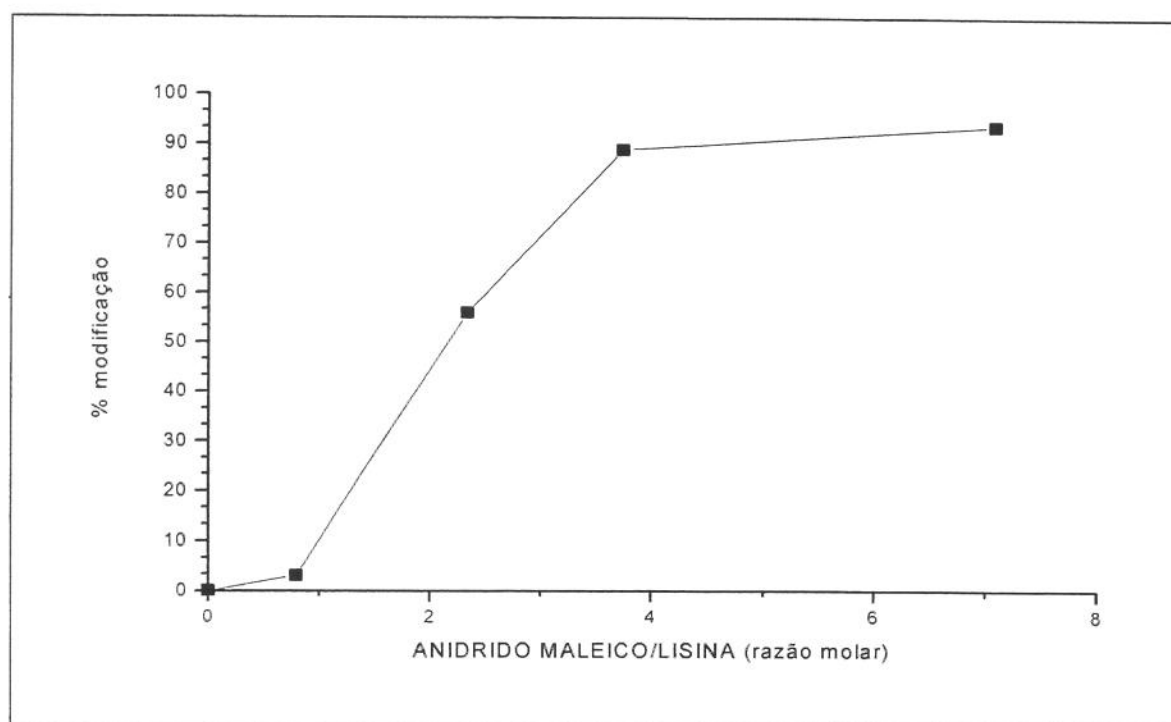


Figura – 1. Efeito da concentração de anidrido maléico na porcentagem de modificação dos grupos ϵ -amino do isolado protéico de soja (IPS).

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O padrão, com peso molecular (PM) entre 14,4 e 94 kDa, apresenta-se na coluna A, e nas colunas B, C, D, E, F e G apresentam-se o IPS, IPSM1, IPSM2, IPSM3, IPSM4 e o IPSTT (IPS aquecido a 80°C/10'), respectivamente. Devido à redução com β -mercaptoetanol, as bandas são compostas principalmente das subunidades α' , α , e β (80, 76 e 50 kDa) da globulina 7S, as subunidades ácidas (38, 35 e 33 kDa) da globulina 11S, e as subunidades básicas (25, 22 e 18 kDa) da globulina 11S, conforme relataram (NIELSEN, 1985; IWABUCHI & YAMAUCHI, 1987; SATHE et al., 1989; KIM et al., 1990). No comportamento eletroforético do IPS (Figura 2), nota-se a diminuição em mobilidade devida ao aumento progressivo das cargas negativas dos grupos maleato, apesar do efeito oposto causado pelo aumento do raio efetivo da molécula acilada e, ainda, a ligação de um número expressivo de moléculas de SDS à proteína. É sabido que 40 moléculas de SDS, ligadas hidrofobicamente à fração 7S, aumenta o seu peso molecular em aproximadamente 11.500 Da. O aumento aparente do PM se soma ao aumento da carga negativa efetiva das frações protéicas, atenuando o efeito eletroforético da maleilação.

A Tabela 2 mostra os pesos moleculares (PM) aparentes das bandas determinadas na análise densitométrica dos géis, os quais foram obtidos relacionando as mobilidades eletroforéticas das subunidades ou polipeptídeos, relativas àquelas dos padrões. Na Tabela 3 apresenta-se a porcentagem da área das subunidades em relação à área total das globulinas 7 e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese. Observa-

se que as subunidades ácidas tendem a coalescer ou a migrar de forma semelhante. Tal comportamento não tem sido relatado na literatura, mas pode ser entendido como um efeito compensatório às cargas positivas naturais, causado pelos grupos maleíla adicionados. Não foi encontrada explicação ao fato de a coluna D sempre mostrar bandas mais tênues do que, por exemplo, as colunas E e F, mesmo quando foi confirmado que todas as amostras continham quantidades equivalentes de proteína.

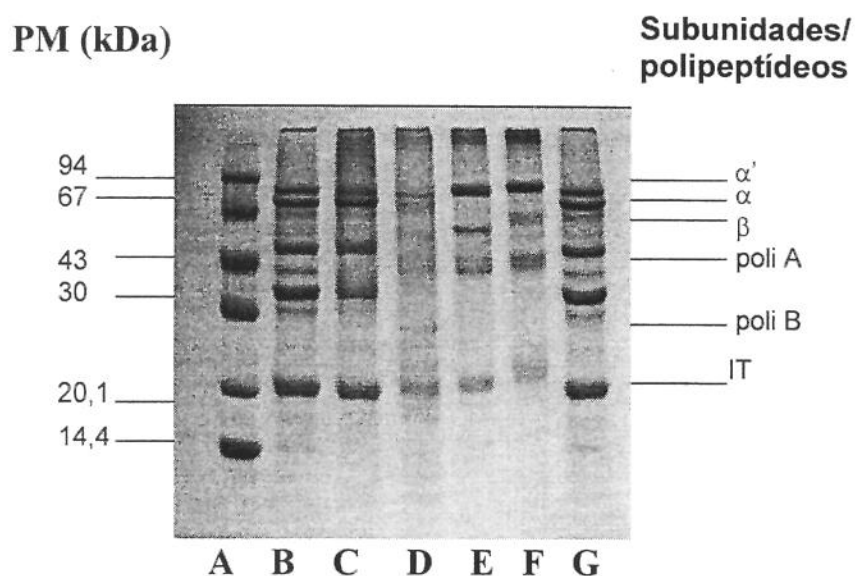


Figura – 2. Eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (7-15%; SDS e β -mercaptoetanol) mostrando o efeito da maleilação no perfil. coluna (A) – marcadores (fosforilase b [94 kDa]; albumina [67 kDa]; ovalbumina [43 kDa]; anidrase carbônica [30 kDa]; inibidor de tripsina [20 kDa]; α -lactalbumina [14,4 kDa]; (B) IPS; (C) = IPSM1; (D) = IPSM2; (E) = IPSM3; (F) = IPSM4; (G) = IPSTT. Migração: do cátodo (superior) para o ânodo (inferior).

Tabela 2 - Pesos moleculares aparentes (PM) das subunidades da globulina 7S e dos polipeptídeos da globulina 11S.

Tratamentos	<i>Globulina 7S</i>				<i>Globulina 11S</i>		
	<i>(β-Conglicinina)*</i>				<i>(Glicinina)*</i>		
	α'	α	β		Ácido	Básico	
<i>IPS</i>	76,1	70,8	51,2	44,9	38,9	34,1	20,2
<i>IPSM1</i>	73,7	68,5	50,8	ND	38,5	34,1	20,2
<i>IPSM2</i>	71,4	66,3	ND	ND	ND	29,7	20,7
<i>IPSM3</i>	73,7	66,3	56,9	43,9	ND	ND	20,5
<i>IPSM4</i>	74,9	63,7	54,6	45,7	ND	31,0	22,4
<i>IPSTT</i>	72,5	67,4	50,0	43,2	36,4	31,7	19,8

*valores expressos em kDa.

ND = Bandas não detectadas.

IPS = nativo, *IPSM1*=0,0170, *IPSM2*=0,0505; *IPSM3*=0,0809; *IPSM4*=0,1535 M de anidrido maléico e o *IPSTT* = tratamento térmico de 80°C/10 minutos.

Tabela 3 - Composição relativa das subunidades da globulina 7S e dos polipeptídeos da globulina 11S.

Tratamentos	<i>Globulina 7S</i>				<i>Globulina 11S</i>		
	<i>(β-Conglicinina)*</i>				<i>(Glicinina)*</i>		
	α'	α	β		Ácido	Básico	
<i>IPS</i>	38,41	35,74	25,85	32,51	28,17	24,69	14,63
<i>IPSM1</i>	38,19	35,49	26,32	ND	41,48	36,75	21,77
<i>IPSM2</i>	36,69	34,07	ND	ND	ND	58,93	41,07
<i>IPSM3</i>	37,43	33,67	28,90	68,17	ND	ND	31,83
<i>IPSM4</i>	38,77	32,97	28,26	46,12	ND	31,28	22,60
<i>IPSTT</i>	38,18	35,49	26,32	32,95	27,77	24,18	15,10

*Valores expressos em porcentagem.

ND = Bandas não detectadas.

IPS = nativo, *IPSM1*=0,0170, *IPSM2*=0,0505; *IPSM3*=0,0809; *IPSM4*=0,1535 M de anidrido maléico e o *IPSTT* = tratamento térmico de 80°C/10 minutos.

Hidrofobicidade superficial com ANS. Os espectros de emissão de fluorescência, mostrando a alteração da hidrofobicidade em função da modificação química, aparecem na Figura 3. O máximo de intensidade da fluorescência emitida no comprimento de onda de 464 nm, e os graus de maleilação do IPS nativo e modificado com anidrido maléico estão apresentados na Tabela 4, enquanto que a hidrofobicidade superficial, em função da maleilação, aparece na Figura 4. Apesar de os valores de hidrofobicidade terem mostrado similaridade, a análise estatística revelou diferenças significativas entre eles. Nota-se também que a diminuição da hidrofobicidade variou de forma quase linear, mesmo que o grau de maleilação tenha mostrado um salto entre 0,0170 e 0,0505 M de anidrido.

Na Figura 4 aparece também o espectro de emissão correspondente ao IPS tratado termicamente. A sua hidrofobicidade se situou entre aquela dos produtos IPSM1 e IPSM2, mostrando que a alteração foi relativamente pequena e sendo consistente com a proposta de outros autores quanto à formação de agregados que limitam a ligação da sonda. Foi interessante observar que, em trabalhos tanto de acetilação como succinilação de IPSs, a hidrofobicidade superficial variou de forma muito diferente. No primeiro caso, Kim e Rhee (1989) obtiveram primeiro um aumento e, depois diminuição, os dois de pequena magnitude. Já Kim e Kinsella (1986), observaram que a succinilação resultava em um aumento inicial e, com maiores graus de modificação, a fluorescência retornava a valor próximo do inicial. Até o momento, não temos uma interpretação exata para este comportamento *suis generis* da proteína maleilada. Todavia, é compreensível

que a forma *trans* do ácido dicarboxílico seja responsável pela criação de microambiente conducente à constante diminuição da hidrofobicidade ligada pela estrutura global das proteínas, o qual foi bem diferente dos casos de acilação ou tratamento térmico.

O conjunto destes resultados mostra a diminuição da intensidade de fluorescência como consequência do aumento do grau de maleilação. Wagner et al. (1996) têm sugerido que a diminuição da hidrofobicidade superficial nesses casos pode ser causada pela própria interação hidrofóbica da proteína 11S durante o processo de diálise em baixa temperatura. Entretanto, na medida em que a maleilação converte cargas positivas, ou eventualmente positivas, em negativas, a proteína modificada adquire carga líquida negativa aumentada, maior repulsão interna e maior solubilidade em água. Isto é, cada um dos três átomos de oxigênio do grupo maleato pode estabelecer de duas a três pontes de hidrogênio com a água, o que implica em maior hidrofilicidade.

Enquanto que, pela visão de Wagner et al. (1996), a diminuição da hidrofobicidade pode ser vista como resultado da ocultação de cadeias laterais hidrofóbicas, inicialmente de procedência superficial. Para Achouri et al. (1998) esta diminuição deve-se ao aumento da carga líquida negativa em função da modificação química. Embora estes autores não expliquem em detalhe, parece lógico que o aumento da polaridade superficial, aliado ao aumento de cargas de repulsão, force os grupos apolares a se “refugiarem” em interiores hidrofóbicos menos compactos.

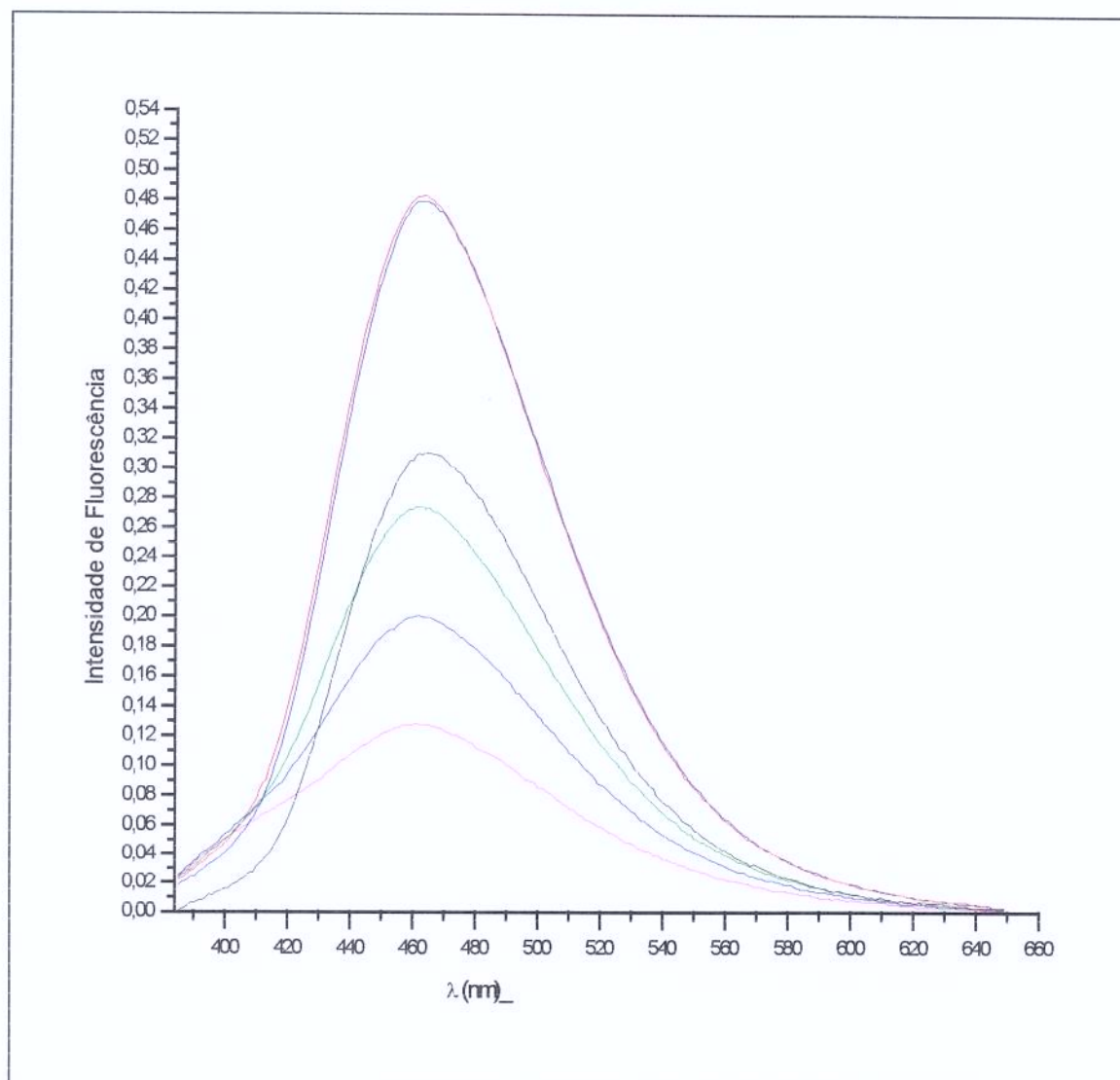


Figura – 3. Espectros da fluorescência emitida pelos IPS submetidos aos diversos graus de maleilação e tratamento térmico. De menor para maior intensidade: IPSM4 (92,4); IPSM3 (86,8); IPSM2 (50,5% de maleilação); IPSTT (tratamento térmico a 80°C/10'); IPSM1 (3,4) e IPS (0% de maleilação).

Tabela 4 - Intensidade da fluorescência observada nos IPSs nativo e modificado com anidrido maléico, assim como seus respectivos graus de maleilação.

<i>Tratamentos</i>	<i>Anidrido maléico (moles/L)</i>	<i>Intensidade da Fluorescência (H_0)*</i>	<i>Grau de Maleilação (%)</i>
IPS	0,0000	$136,48 \pm 0,05^a$	0,00
IPSM1	0,0170	$135,85 \pm 0,10^a$	3,43
IPSM2	0,0505	$78,09 \pm 0,05^b$	50,49
IPSM3	0,0809	$52,56 \pm 0,02^c$	86,76
IPSM4	0,1535	$34,65 \pm 0,02^d$	92,40
IPSTT	-	$99,10 \pm 0,01^e$	-

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão ($n=9$). (IPS: isolado protéico de soja; IPSM1 a M4: IPS maleilado em diferentes concentrações de anidrido maléico e IPSTT: tratamento térmico a $80^\circ\text{C}/10'$).

* Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

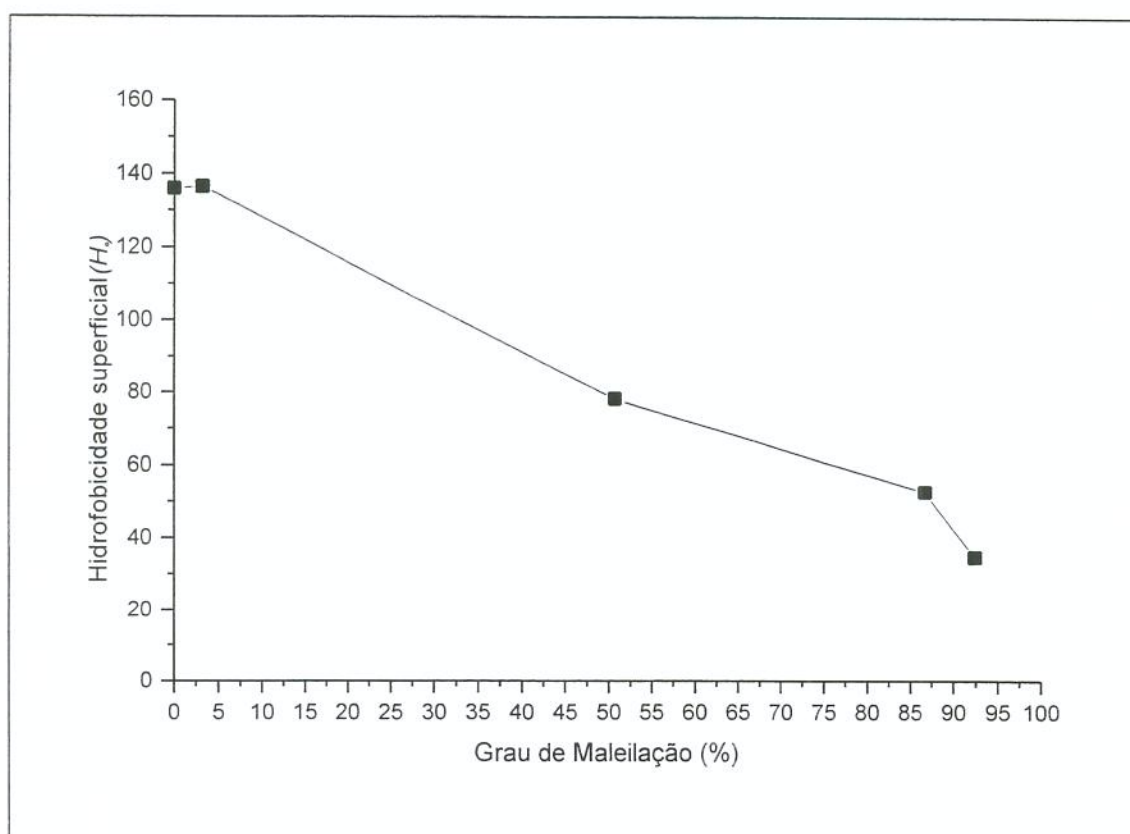


Figura 4 - Correlação da porcentagem de modificação química do isolado protéico de soja com a hidrofbicidade superficial (H_0).

5.6. Conclusões

Pelas alterações observadas, pode-se concluir que a maleilação das proteínas do isolado protéico de soja resulta em perda acentuada da hidrofobicidade superficial, provavelmente como resposta à redistribuição das cargas internas e rearranjos das estruturas terciárias das subunidades e polipeptídeos. Esta propriedade mostrou desvio do encontrado por outros pesquisadores quando a modificação foi com anidrido acético ou succínico, o qual acrescenta uma característica especial a maleilação. A alteração relatada também foi diferente daquela observada com a desnaturação térmica, mas consistente com a diminuição da mobilidade eletroforética das subunidades básicas e o inibidor de tripsina, assim como um aumento da mobilidade para as bandas correspondentes às subunidades ácidas.

As mudanças estruturais produzidas pela maleilação podem ser de utilidade no planejamento de produtos com propriedades funcionais diferenciadas, especialmente com relação ao IPS desnaturado termicamente.

5.7. Referências Bibliográficas

- ACHOURI, A., ZHANG, W.; SHIYING, X. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Food Research International**, Amsterdam, v.31, n.9, p.617-623, Nov., 1998.
- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 12.ed. Washington, 1975.
- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis**. 13.ed. Washington, 1980.
- ARRESE, E. L.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Electrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, n.6, p.1029-1032, June, 1991.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa.37, p.911-917, 1959.

- BOATRRIGHT, W. L.; HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.12, p.1439-1444, Dec., 1995.
- BUTLER, P. J. G.; HARTLEY, B. S. Maleylation of amino groups. **Methods in Enzymology**, New York, v.25B, p.191-199, 1972.
- COCKRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Design**. 2.ed. New York: John Wiley, 1957, 611p.
- GARCÍA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.37, n.4, p.361-391, June, 1997.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.148-152, 157, Jan./Feb., 1993.
- GLAZER, A. N.; DELANGE, R. J.; SIGMAN, D. S.; In: **Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures**; WORK, T. S.; WORK, E.; (ed) Elsevier: New York, 1975.

HALL, R. J.; TRINDER, N.; GIVENS, D. I. Observations on the use of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates. **The Analyst**, Cambridge, v. 98, n.1170, p.673-686, Sept., 1973.

HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.2, p.486-491, Mar.-Apr., 1985.

IKURA, K.; GOTO, M.; YOSHIKAWA, M.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Use of transglutaminase. Reversible blocking of amino groups in substrate proteins for a high yield of specific products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.9, p.2347-2354, Sept., 1984.

IWABUCHI, S.; YAMAUCHI, F. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.35, n.2, p.205-209, Mar.-Apr., 1987.

KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.624, n.1, p.13-20, July, 1980.

- KATO, A.; KOMATSU, K.; FUJIMOTO, K.; KOBAYASHI, K.
Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.33, n.5, p.931-934, July,-Aug., 1985.
- KIM, S.H.; KINSELLA, J.E. Effects of progressive succinylation on some molecular properties of soy glycinin. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.63, n.4, p.342-345, Apr., 1986
- KIM, K.S.; RHEE, J.S. Effects of acetylation on physicochemical properties of 11S soy protein. **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v.13, n.3, p.187-199, Mar., 1989.
- KIM, L. S.Y.; PARK, P. S. W.; RHEE, K. C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.3, p.651-656, Mar., 1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-686, 1970.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.
Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARTINS M. T. S. **Obtenção e caracterização química e imunológica parcial de plasteína produzida a partir de hidrolisados de isolado protéico de soja e caseína.** Campinas, 1994. 95p. Tese (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factors for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.1, p.18-24, Jan.,1990.

NIELSEN, N. C. The Structure and Complexity of the 11S polypeptides in soybeans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.62, n.12, p.1680-1686, 1985.

RUIZ, W.A. **Proteólise do resíduo do extrato hidrossolúvel de soja. Tese de Doutorado** em Ciência de Alimentos (p.65). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, 199pp. 1985.

SATHE, S. K.; MASON, A. C.; WEAVER, C. M. Thermal aggregation of soybean (*Glicine max.* L) sulfur-rich protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.2, p.319-323, 342, May-Apr., 1989.

- SINGH, N.; SINGH, D., CHAUHAN, G. S. Effects of defatting, coagulants and coagulation pH's on soy protein isolates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n.6, p.117-121, Nov.- Dec., 1994.
- SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; ARRESE, E. L.; AÑÓN, M. C. Water imbibing capacity of soy protein isolates: Influence of protein denaturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, n.8, p.1386-1391, Aug., 1991.
- SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function Relationship of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.9, p.2471-2479, Sept., 1995.
- WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.3, p.765-770, May-June, 1990.
- WAGNER, J. R.; SORGENTINI, D. A.; AÑÓN, M. C. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity and some functional properties of acid-treated soy isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.7, p.1881-1889, July, 1996.

- WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, Mar., 1973.
- WOLF, W. J.; COWAN. J. C. **Soybean as a food source. Food uses of soybean proteins.** ed. Revisada. Cleveland: CRC Press., 1975. 101p.

6. Artigo 3.

Proteólise do isolado protéico de soja com α -quimotripsina após modificação com anidrido maléico

V.S. Nunes-Silva, J. Amaya-Farfán

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Resumo

O presente estudo teve como objetivo investigar a proteólise com α -quimotripsina do isolado protéico de soja (IPS) modificado com anidrido maléico, como método de inativação alternativo ao tratamento térmico na preparação de hidrolisados para a indústria de alimentos e cosméticos. O IPS foi tratado com anidrido maléico nas concentrações 0,0170 (IPSM1); 0,0505 (IPSM2); 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 M (IPSM4), os quais correspondentemente, resultaram em: 3,19; 50,74; 86,74 e 92,40% de modificação dos grupos ϵ -amina das lisinas. O IPSM3 foi destacado para hidrólise levando em consideração o alto grau de modificação. O IPSM3, previamente dialisado e liofilizado, foi então hidrolisado com α -quimotripsina tipo-II, nas seguintes condições: concentração de substrato 7,75% (N x 6,25), razão enzima/substrato de 1/460, temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH 8,0. A reação foi monitorada pelo “pH-stat”. Após 2 horas, a reação foi interrompida inativando a enzima a $72 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos e o grau de hidrólise determinado pelos métodos do “pH-stat” e do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). O IPS modificado e hidrolisado (IPSM3H) foi homogeneizado,

novamente liofilizado e desmaleilado (IPSM3HD) para verificar a reversibilidade da modificação, a atividade anti-tripsina e a variação da hidrofobicidade superficial. As análises realizadas mostraram que, nas condições escolhidas para desmaleilação, houve reversibilidade parcial da modificação, onde a lisina disponível aumentou de $0,86 \pm 0,01$ a $1,83 \pm 0,02$ mg/100 mg de proteína para o IPSM3H e o IPSM3HD, respectivamente; a atividade do inibidor de tripsina por sua vez foi ligeiramente recuperada de $0,56 \pm 0,01$ para $0,69 \pm 0,01$ mg/g de proteína, para o IPSM3H e o IPSM3HD, correspondentemente; enquanto a hidrofobicidade superficial apresentou pequena variação, onde a intensidade de fluorescência variou de $42,48 \pm 0,04$ para $50,61 \pm 0,02$, para o IPSM3H e o IPSM3HD, respectivamente. Conclui-se que o grau de 86,7% de maleilação das proteínas do IPS é suficiente para inativar os inibidores de tripsina em 74,5%, assim como aparentemente o inibidor de quimotripsina. Isto permitiu a obtenção de proteolisados com baixa relação α -quimotripsina:substrato e grau de hidrólise de 4,3%, com a geração de peptídeos de baixo a médio peso molecular.

Palavras chave: *acilação, proteolisado, desnaturação, proteína vegetal, propriedades funcionais.*

Proteolysis of Maleylated Soy Protein Isolate with α -Chymotrypsin

V.S. Nunes-Silva, J. Amaya-Farfán

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Abstract

The present study investigated the hydrolysis with α -chymotrypsin of soy protein isolate (SPI) after modification with maleic anhydride, as an alternate route to thermal inactivation of the protease inhibitors. The SPI was treated with four concentrations of maleic anhydride: 0.0170 (SPIM1), 0.0505 (SPIM2), 0.0809 (SPIM3) and 0.1535 molar (SPIM4), which correspondingly rendered 3.19, 50.74, 86.74 and 92.40% modification of the ϵ -amino groups of lysine residues. The modified isolate (SPIM3) was chosen for hydrolysis considering its high degree of maleylation, the significant reduction in trypsin inhibitor activity and the low concentration of maleic anhydride used. Dialyzed and lyophilized SPIM3 was hydrolyzed with type II α -chymotrypsin (substrate conc. 7.75% [Nx6.25], enzyme:substrate ratio 1:460, $40 \pm 1^\circ\text{C}$ and pH 8.0, monitored under a pH-stat. At two hours time, the reaction was interrupted by inactivating the enzyme ($72 \pm 1^\circ\text{C}$, 10 min) and the degree of hydrolysis determined by both the pH-stat and the trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) method, which showed 4.46 ± 0.007 and $4.25 \pm 0.07\%$ of hydrolysis, respectively. The modified and hydrolyzed SPI (SPIM3H, of light appearance) was homogenized, once again lyophilized and demaleylized

(SPIM3HD) in order to verify the reversibility of the reaction, the effect of hydrolysis upon the trypsin inhibitors and the changes on surface hydrophobicity. Under the conditions chosen for demaleylation, it was observed that 1) maleylation was partially reversed (available lysine varied from 0.86 ± 0.01 to 1.86 ± 0.02 mg of protein, for the SPIM3H and the SPIM3HD, respectively), 2) a minor recovery of the inhibitors activity occurred, from 0.56 ± 0.01 to 0.69 ± 0.01 mg/g of protein, for the same products accordingly, and 3) surface hydrophobicity increased also slightly, as determined from the increase in fluorescence intensity from 42.48 ± 0.04 to 50.61 ± 0.02 . It is concluded that maleylation of the SPI proteins to the extent of 86.7%, lowering trypsin inhibitor activity by 74.5%, can be performed in substitution of thermal inactivation of the trypsin and, most likely, chymotrypsin inhibitors, permitting the production of hydrolyzates with an ample range of low and medium molecular weight peptides, degree of hydrolysis of 4.3% and employing low α -Chymotrypsin -to-substrate ratios.

Key-words: *acylation, proteolyzate, denaturation, functional properties, vegetable protein.*

6.3. Introdução

Os hidrolisados protéicos ou proteolisados, surgidos durante a 2ª Guerra Mundial, têm servido para fins nutricionais, médicos e cosméticos. Os primeiros proteolisados apareceram nos anos 40 como produtos experimentais destinados a pessoas com problemas em digerir proteínas intactas e, em 1951, passaram a ter uso rotineiro em nutrição clínica. Estes proteolisados são constituídos predominantemente por peptídeos de baixo peso molecular e, para tal, apresentam grau de hidrólise acima de 10% (ADLER-NISSEN, 1986).

Os processos hidrolíticos de fontes protéicas para obtenção de alimentos de palatabilidade, propriedades funcionais e estabilidade à estocagem melhorada, têm sido pesquisados através dos séculos (ADLER-NISSEN, 1986). Esta tendência se deve em parte, a necessidade da indústria de alimentos desenvolver matéria-prima alternativa para substituição ou complementação de proteínas de origem animal na formulação de seus produtos, assim como à crescente procura de alimentos de características fisiológicas especiais.

De acordo com a literatura, qualquer processo que aumente as interações hidrofóbicas leva à diminuição do número de resíduos hidrofóbicos expostos ou superficiais numa proteína, enquanto que a reatividade óxido/redutiva dos grupamentos sulfidrila guarda uma relação inversa à hidrofobicidade superficial. A hidrólise de ligações peptídicas tende

a expor grupos hidrofóbicos previamente envolvidos na estruturação nativa (MUTILANGI et al., 1995). Sendo que durante a inativação térmica de enzimas ou no processo de reassociação de peptídeos maiores, poderá haver diminuição do número de grupos hidrofóbicos expostos e, conseqüentemente, dos valores de hidrofobicidade superficial. Portanto, qualquer variação observada na hidrofobicidade superficial dos proteolisados deverá ser considerada como o resultado conjunto da liberação de grupos polares (carboxílicos e aminas), assim como da reassociação dos grupos hidrofóbicos gerados ou expostos durante a hidrólise. Isto, por sua vez, será função da concentração da enzima e do grau de hidrólise do produto (MUTILANGI et al., 1996).

A dispersão ou solubilização do isolado protéico de soja é o primeiro passo para uma hidrólise eficiente, pois a suspensão inicial contém grandes agregados, pouco solvatados, consistindo cada de aproximadamente mil moléculas protéicas. A combinação de pH 8,0 e aquecimento solubilizam ou desdobram parcialmente os agregados protéicos da soja, condição esta que é especialmente importante na hidrólise com α -quimotripsina. Sendo que as cadeias aromáticas que devem ser reconhecidas pela enzima estão voltadas para as regiões hidrofóbicas do interior das moléculas (KIMBALL et al., 1981). Poucos são os estudos encontrados na literatura sobre o uso das modificações químicas com anidrido maléico e seus efeitos na proteólise enzimática. O presente trabalho objetivou estudar o efeito da maleilação na hidrólise do isolado protéico de soja com α -quimotripsina.

6.4. Material e Métodos

Matéria-prima e enzima. O isolado protéico de soja (IPS), SAMPROSOY 90-NB, foi obséquo da SANTISTA ALIMENTOS S.A (Brasil). A enzima usada foi a α -quimotripsina tipo-II (C-4129, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA).

Métodos

Caracterização do isolado protéico de soja. Determinou-se a umidade (AOAC, 1975); lipídeos totais (BLIGH & DYER, 1959); Cinzas (AOAC, 1980); e proteínas pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1975), utilizando dióxido de titânio como catalisador (WILLIAMS, 1973), e o fator de conversão de nitrogênio em proteínas foi 6,25.

Maleilação. O Isolado protéico de soja (SAMPROSOY - 90NB - Santista alimentos S/A) foi disperso em água desionizada na temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ na concentração de 7,75%. A solução foi resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura de $3 \pm 1^\circ\text{C}$, que se manteve constante durante toda a reação, sendo monitorada pelo pH-stat (DL-21 METTLER-TOLEDO). O anidrido maléico sólido foi adicionado gradativamente, sob agitação e mantido a pH 9,0-9,5 pela a adição de NaOH 1,0 N (BUTLER & HARTLEY, 1972; IKURA et al., 1984), o tempo estipulado para ocorrer a reação foi de 1 hora. A concentração molar de anidrido maléico (BUTLER & HARTLEY, 1972), foi de 0,017 (IPSM1); 0,0505 (IPSM2); 0,0809 (IPSM3) e 0,1535 (IPSM4). O excesso de reagente foi removido por diálise em água

desionizada (pH ajustado para 8,0) durante 36 horas a 4 ± 1 °C sob agitação e sucessivas trocas de água. As amostras foram liofilizadas (VIRTIS, modelo nº 10-146MR-BA), e armazenadas sob refrigeração.

Hidrólise enzimática. O isolado protéico de soja modificado com 0,0809 molar de anidrido maléico foi hidrolisado com α -quimotripsina tipo-II (C-4129, Sigma Chemical Co.). Os parâmetros de hidrólise foram: concentração de substrato 7,75% (N x 6,25), relação enzima:substrato de 1:460, na temperatura de 40 ± 1 °C, sendo a reação monitorada pelo pH-stat (DL-21 METTLER-TOLEDO). Após 2 horas, a reação foi interrompida inativando a enzima a 72 ± 1 °C, por 10 minutos. O hidrolisado foi liofilizado e estocado sob refrigeração. O grau de hidrólise foi determinado pelos métodos do “pH-stat” e TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico).

Determinação do grau de hidrólise por TNBS. O grau de hidrólise (GH) (ADLER-NISSEN, 1979), consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre o ácido trinitrobenzenosulfônico e as aminas primárias livres em condições levemente alcalinas; calculado pela seguinte fórmula:

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100$$

h = número de ligações peptídicas clivadas (expresso em meq NH_2^-Leu)

h_{tot} = número total de ligações peptídicas (calculado pela soma do conteúdo dos aminoácidos individuais em 1 g de proteína).

Os valores de GH foram obtidos em duplicata.

Desmaleilação. A reação de desmaleilação foi realizada no produto já hidrolisado, para o qual o mesmo foi dissolvido em água desionizada (7,75%), a solução aquecida em banho-maria até atingir a temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, pH para 2, e mantido nessas condições durante o curso da reação. Após 3 horas, o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 1,0 N.

Lisina disponível e grau de maleilação. A quantidade de grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ livres de lisina, determinada pelo ácido (TNBS) trinitrobenzenosulfônico (HALL et al., 1973), foi utilizada como indicação do grau de maleilação das proteínas. Para tanto, 100 mg de amostra foram dissolvidos em 30 mL de solução de NaHCO_3 a 4% (p/v) e aquecida a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos sob agitação ocasional. Posteriormente o volume foi aferido para 50 mL com NaHCO_3 4% (p/v) e filtrado em lã de vidro. Uma alíquota de 1 mL foi colocada em tubo de polipropileno com tampa rosqueável e acrescentado 1 mL de TNBS 0,1% (p/v) em água desionizada. Os tubos foram incubados por 2 h a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, e a reação interrompida pela adição de 6 mL HCl 8,0 N. Em seguida, os tubos foram autoclavados a 120°C por 1 hora. A solução obtida foi transferida quantitativamente (2 lavagens com água destilada) para tubo de ensaio e, os subprodutos formados extraídos com 10 mL de éter etílico. O resíduo de éter sobressalente foi evaporado a 80°C em banho-maria. As absorbâncias das amostras foram lidas em triplicata em espectrofotômetro (DU-70 BECKMAN) no comprimento de onda de 346 nm. A concentração de lisina disponível foi calculada em relação à curva padrão realizada com hidrocloreto de lisina (SIGMA), onde o grupo α -amino do

aminoácido livre foi previamente complexado com CuCO_3 como descrito por Ruiz (1985).

Atividade dos inibidores de tripsina. O método da AACC (71-10), modificado por (HAMERSTRAND et. al., 1981), onde de um grama de amostra de IPS, foram extraídos os inibidores de tripsina com 50 mL de NaOH 0,01N. A amostra foi mantida sob agitação em suspensão por um período de 3 horas e a seguir centrifugada a 3590xg por 30 minutos. Determinou-se a concentração de proteína (LOWRY, 1951) no extrato da amostra, o qual posteriormente foi diluído para inibir de 40 a 60% da tripsina. Aliquotas de 0,2-1,0 mL foram adicionadas aos tubos de ensaio e o volume aferido para 1 mL com água desionizada, adicionando 1 mL de tripsina e 7 mL de BAPNA (benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato (KAKADE et al., 1969; KAKADE et al., 1974). A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido acético. No branco de amostra, foi adicionado o ácido acético antes do BAPNA. Todos foram filtrados (papel Whatman nº3), e a leitura efetuada em espectrofotômetro (BECKMAN DU-70). As absorbâncias da amostra, obtidas em triplicata após subtração dos respectivos brancos das amostras, foram subtraídas das médias do padrão de tripsina. Uma unidade de tripsina (TU) foi definida como 0,01 unidade de absorbância a 410 nm em 10 mL de mistura de reação e a atividade do inibidor de tripsina foi definida como o número de unidades de tripsina inibida (UTI).

Hidrofobicidade superficial com ANS. Foi determinada usando o reagente 1-anilino-8-naftalenosulfônico (ANS) como sonda

hidrofóbica (KATO & NAKAI, 1980). A dispersão de 1% (p/v), em água destilada pH 7,0, foi agitada por 2 horas na temperatura ambiente, e centrifugada a 3590xg por 30 minutos. Determinou-se a concentração de proteína (LOWRY, 1951) no sobrenadante. A proteína foi diluída em série em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 obtendo concentração na faixa de 0,05 a 3,5%. Posteriormente 40 µL de ANS (8,0 mM em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0), foram adicionados a 3 mL da solução de proteína diluída. A intensidade da fluorescência (IF) da proteína foi medida em espectrofluorímetro (SPF-500C AMINCO), utilizando comprimento de onda de 365 nm de excitação e 484 nm de emissão. A IF foi padronizada ajustando a leitura de 15 µL de ANS em 3 mL de metanol para 80%. A IF líquida de cada diluição foi obtida pela subtração da IF da proteína sem ANS. A inclinação inicial (S_0) da IF líquida, *versus* a concentração de proteína (calculada pela análise de regressão linear) foi utilizada como índice de hidrofobicidade da proteína.

Composição em aminoácidos livres no hidrolisado enzimático. Foram realizadas através de cromatografia de troca iônica, e reação pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN et al., 1958), utilizando o analisador de aminoácidos automático (Thermo-Separation Products Vacuum Membrane Degasser P4000, reactor PCX 3100, da Pickering Laboratories). Extratos dos proteolisados foram dissolvidos em tampão pH 2,2 e injetados diretamente no analisador. Os picos obtidos no aminograma foram bem definidos e com tempos de retenção claramente correspondendo a aminoácidos livres.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos hidrolisados. Foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). Aliquota de 8 mg de proteína foi dissolvida em 1,0 mL de tampão (0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidos a 90°C por 2 minutos. Depois de resfriadas, 20 µL foram aplicados no gel SDS-Tris-glicina, com sistema de tampão descontinuo. O gel de empilhamento foi de 4% para separação em gradiente de gel de 8,0-20,0%. Utilizou-se o padrão (LMW – Pharmacia) contendo, fosforilase B (94 kDa); albumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A eletroforese foi realizada em 80 mA/gel na temperatura ambiente por 4 horas. As bandas foram reveladas, utilizando o corante “Coomassie Brilliant Blue” G-250, (0,2%). A densitometria do gel foi realizada com o vídeo-densitômetro da BIO-RAD, modelo 620. A densidade óptica de cada banda foi medida pela absorbância. Estes resultados foram analisados pelo programa *1-C Analyst, Data Analysis Software*, que calculou os pesos moleculares aparentes de cada banda, comparando as mobilidades relativas das subunidades ou polipeptídeos com aquelas dos padrões.

Análise estatística. As médias dos resultados da lisina disponível e da atividade dos inibidores de tripsina foram submetidas à análise de variância e ao apresentar diferenças entre os resultados, completou o estudo com o teste de Tukey (COCKRAN & COX, 1957).

6.5. Resultados e Discussão

Caracterização do isolado protéico de soja. Os resultados estão expressos em porcentagem $\pm$ erro padrão. O isolado protéico de soja, Samprosoy 90-NB, utilizado neste estudo contém $91,75 \pm 0,18\%$ de proteína. O resultado encontra-se dentro dos valores indicados pela literatura, que varia entre 87,9 e 94,1% (GARCIA et al., 1997), a variação na concentração da proteína esta diretamente relacionada com as características químicas das farinhas e os reagentes utilizados na extração das proteínas (SINGH et al., 1994). Embora o fator de conversão de nitrogênio em proteína para soja seja de 5,71, utilizou-se o fator de 6,25 (GARCIA et al., 1997), o qual é utilizado nas indústrias. Este fator tem sido amplamente estudado, apesar das dificuldades de avaliação devido a presença de nitrogênio não protéico na soja (MOSSÉ, 1990). Os teores de umidade $6,26 \pm 0,10\%$; cinzas $3,69 \pm 0,02\%$ estão de acordo com os valores reportados (WOLF & COWAN, 1975; MARTINS, 1994), e o lipídeo $3,04 \pm 0,05\%$ esta de acordo com (BOATRIGHT & HETTIARACHCHY, 1995).

Determinação do grau de hidrólise. A hidrólise foi realizada em duplicata e o grau de hidrólise (*GH*) dos proteolisados foi determinado após duas horas de reação com quimotripsina. As determinações do *GH* pelo método do TNBS e pelo pH-*stat* renderam valores médios de 4,25 e 4,46%, respectivamente. Ao contrário do que ocorre com os hidrolisados de IPSs não modificados, estes valores foram muito próximos, um do outro, dado

que o substrato já possuía grande porção dos seus grupos ϵ -amina bloqueados e os valores obtidos pelo TNBS representarem algo mais próximo da quantidade real de grupos α -amina gerados durante a hidrólise das ligações peptídicas. O *GH* não foi considerado alto, em relação aos valores normalmente obtidos em substratos termicamente inativados. Entretanto, considerando a ausência do efeito da desnaturação de grandes regiões intramoleculares, a utilização de uma enzima purificada e de alta especificidade, além das evidências eletroforéticas apresentadas mais adiante, a extensão da reação foi satisfatória.

Lisina disponível. As concentrações de lisina disponível encontradas para o proteólisado do IPS modificado (IPSM3H) e para o produto desmaleilado, IPSM3HD, aparecem na Tabela 1. Estes valores foram usados como medida da extensão da maleilação das proteínas e indicaram que 1º) a proteólise foi capaz de expor alguns resíduos lisila inicialmente não atingidos pelo reagente e 2º) a desmaleilação do IPSM3H não foi um processo tão eficiente como para regenerar os teores originais de lisina disponível no IPS, ou seja, 4,08%. O grau de desmaleilação alcançado pelo hidrolisado enzimático (IPSM3HD) foi de $23,77 \pm 0,11\%$. Outros trabalhos relatam extensão de desacilação de 70%, contudo, empregando condições bem mais fortes de reação (50°C por 1 hora, ou a 37°C durante 11 horas; CHOI et al., 1982; GLAZER et al., 1975).

Tabela 1 – Conteúdo de lisina disponível (mg/100 mg proteína) e grau de maleilação (%) no IPS e seus produtos.

<i>Tratamentos</i>	<i>Anidrido maléico (moles/L)</i>	<i>Lisina disponível* (mg/100mg proteína)</i>	<i>Maleilação (%)</i>
IPS	0,0000	4,08 ± 0,01 ^a	0,00
IPSM3	0,0170	0,54 ± 0,01 ^b	86,76
IPSM3H	0,0170	0,86 ± 0,01 ^c	78,92
IPSM3HD	0,0170	1,83 ± 0,02 ^d	55,14

Os valores representam a média de modificação dos grupos lisila ± erro padrão (n=6), (IPS: isolado protéico de soja; IPSM3: IPS modificado com anidrido maléico 0,0809 M; IPSM3H: IPS modificado com anidrido maléico 0,0809 M e hidrolisado; IPSM3HD: IPS modificado com anidrido maléico 0,0809 M hidrolisado e desmaleilado).

**Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).*

Atividade dos inibidores de tripsina. Os resultados relativos à concentração de inibidores de tripsina e sua atividade são mostrados na Tabela 2. Analisando estes parâmetros, verificou-se redução da atividade, em relação ao IPS, em aproximadamente 74,5; 90,7 e 88,6%, para o IPSM3, IPSM3H e IPSM3HD, respectivamente.

A perda de atividade por parte do inibidor com a maleilação não foi surpresa, pois a modificação dos grupos ϵ -amina dos resíduos lisila do inibidor envolvido na ação inibitória torna a molécula incapaz de se ligar à enzima, e portanto, de inibi-la.

A diminuição da atividade inibidora observada entre o IPSM3 e o IPSM3H (correspondentes ao produto maleilado e maleilado-hidrolisado) de 2,94 para 1,07 UTI, sugere que, além da modificação bloquear a função do inibidor, o processo proteolítico foi altamente efetivo na inativação do fator anti-tríptico residual. Em adição, foi possível constatar que, uma vez fragmentado o fator anti-tríptico maleilado, a desmaleilação parcial dos peptídeos não restitui atividade inibidora aos peptídeos.

Observou-se que o aumento de 112% em lisina disponível decorrente da desmaleilação (Tabela 1), resultou em pouco mais que 20% no aumento da atividade dos inibidores (Tabela 2). Este achado é importante no estudo da inocuidade fisiológica dos inibidores.

Tabela 2 – Conteúdo de inibidor de tripsina e atividade residual do inibidor presente no IPS e seus produtos.

<i>Tratamentos</i>	<i>Inibidor de tripsina (mg/g proteína)**</i>	<i>Atividade (UTI*/mg proteína)**</i>
IPS	6,04 ± 0,06 ^a	11,47 ± 0,09 ^a
IPSM3	1,53 ± 0,01 ^b	2,92 ± 0,02 ^b
IPSM3H	0,56 ± 0,01 ^c	1,07 ± 0,01 ^c
IPSM3HD	0,69 ± 0,01 ^d	1,31 ± 0,02 ^d

* UTI = unidade de tripsina inibida.

**Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os valores representam a média ± erro padrão ($n=6$), IPS: isolado protéico de soja, IPSM3: IPS modificado com anidrido maléico 0,0809M; IPSM3H: IPS modificado com 0,0809 M de anidrido maléico 0,0809M e hidrolisado, IPSM3HD: IPS modificado com anidrido maléico 0,0809M hidrolisado e desmaleilado.

Hidrofobicidade superficial com ANS. Os valores de intensidade de fluorescência obtidos para o IPS; IPSM3; IPSM3H, IPSM3HD foram de $136,48 \pm 0,05$; $52,56 \pm 0,02$; $42,48 \pm 0,04$ e $50,61 \pm 0,02$ respectivamente, conforme mostra o espectro da Figura 1. Esperava-se que o tratamento proteolítico aumentasse a exposição dos sítios hidrofóbicos, mas os resultados demonstraram valores menores de hidrofobicidade. Esta diminuição pode ser atribuída a reassociação ou formação de novas interações hidrofóbicas entre os fragmentos ou peptídeos, formando agregados (LÓPEZ et al., 1998).

Os resultados indicam que durante a hidrólise formaram-se peptídeos pequenos, os quais têm poucos sítios ou regiões hidrofóbicas para ligar o ANS. A hidrólise, sendo um processo que aumenta o número de grupos polares por molécula (peptídeos), automaticamente tende a diminuir o tamanho das regiões hidrofóbicas e, conseqüentemente, a hidrofobicidade superficial global. À mesma conclusão chegaram Wu et al. (1998), com proteínas da soja, em função do grau de hidrólise com papaína.

Durante a inativação térmica da enzima no fim da reação poderá ocorrer interação hidrofóbica entre os peptídeos, ocasionando redução do número de grupos hidrofóbicos expostos e, conseqüentemente os valores da hidrofobicidade superficial, conforme resultados apresentados (MUTILANGI et al., 1996).

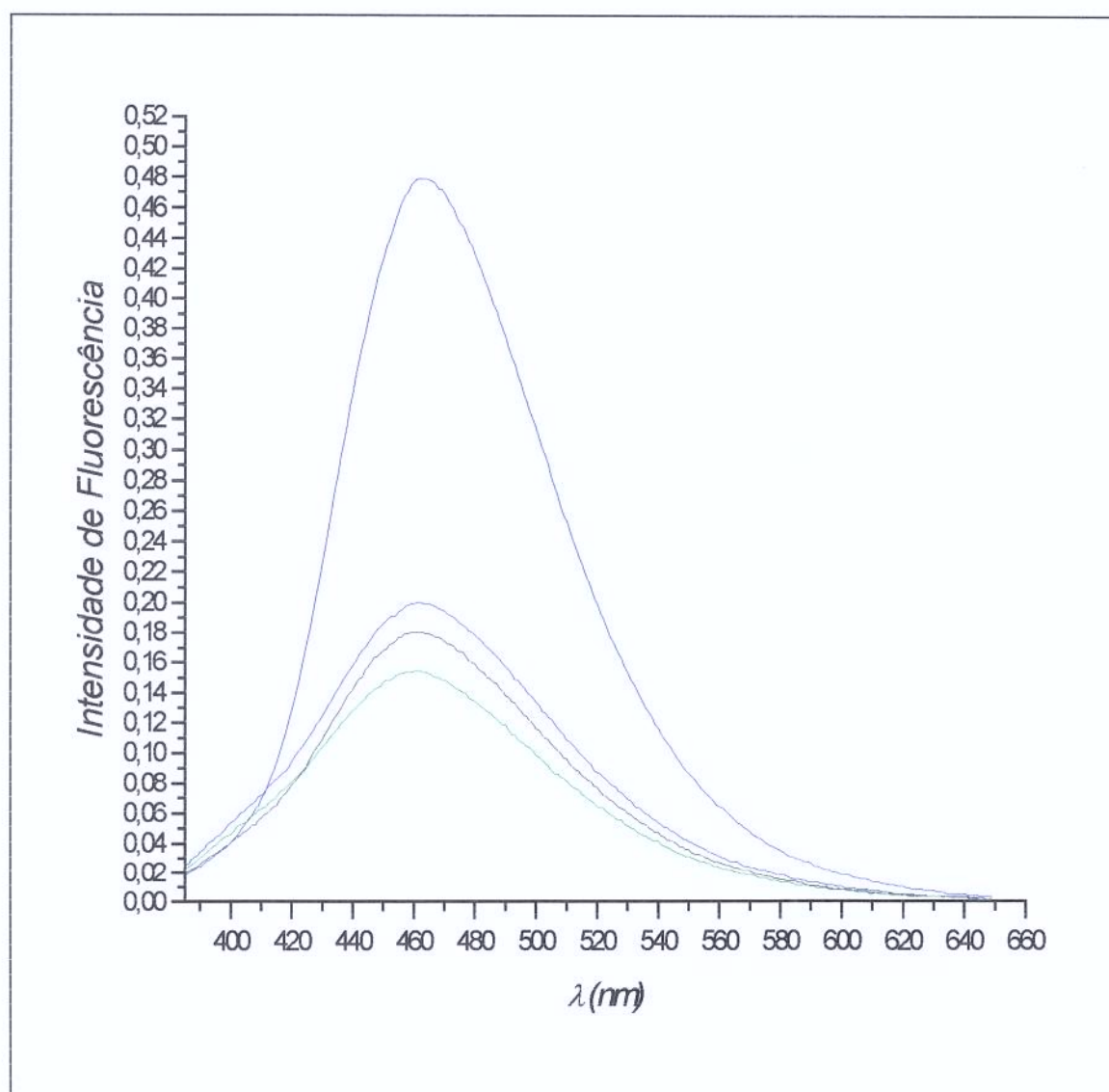


Figura – 1. Espectros da intensidade de fluorescência $\pm$ erro padrão ($\lambda_{ex}=365$ nm), De menor para maior intensidade: IPS; IPSM3; IPSM3HD, IPSM3H com os respectivos graus de maleilação 0,0; 86,8; 55,1; 78,9%. A concentração de proteína foi de 3,5% em tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0).

Aminoácidos livres presentes no hidrolisado. Na Tabela 3 observa-se que, de alguma forma, a hidrólise enzimática liberou quantidades consideráveis de lisina, metionina e cistina. Por outro lado, os aminoácidos acídicos foram os menos abundantes entre o total de aminoácidos do IPSM3H. Não se sabe se o fato de que a cisteína, além da lisina, tenha seu grupo funcional modificado pelo anidrido maléico (GLAZER et al., 1975), esteja relacionado com a alta concentração deste aminoácido no hidrolisado. Dadas as alterações *suis generis* provocadas pela modificação química com anidrido maléico, vários fenômenos podem ter ocorrido, gerando mudanças na polaridade e conformação das proteínas do IPS e alterando o mecanismo de ação da α -quimotripsina. Estes resultados, embora não esperados, introduzem um novo aspecto a ser estudado futuramente.

Tabela 3 - Composição em aminoácidos livres presentes no hidrolisado (IPSM3H).

<i>Aminoácidos livres</i>	<i>IPSM3H</i>	<i>IPSM3H</i>
	(%)*	(%)**
Ác. Aspártico	0,86	8,85
Treonina	0,71	23,67
Serina	0,72	15,52
Ác. Glutâmico	0,85	5,35
Prolina	0,44	6,69
Glicina	0,55	17,19
Alanina	0,66	20,43
Cistina	0,83	77,57
Valina	0,80	24,54
Metionina	0,93	81,58
Isoleucina	0,89	27,13
Leucina	0,88	13,73
Tirosina	0,94	27,81
Fenilalanina	0,99	19,76
Lisina	3,08	88,76
Amônia	0,27	18,37
Histidina	1,02	43,22
Arginina	2,31	34,84

Condições de hidrólise: [S] = 7,75% (p/v); E/S = 1/460; pH = 8,0, temp. = 40°C.

**mgAA livre/100mg de IPSM3H liofilizado.*

***% de AA livre em relação ao total no IPSM3 (isolado protéico de soja modificado com anidrido maléico 0,0809M)*

Valores médios de análise em duplicata.

IPSM3H: Hidrolisado do IPSM3.

Elektroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Os perfis eletroforéticos do proteólido proveniente do IPS maleilado (IPSM3H) e o proteólido desmaleilado (IPSM3HD), apresentados na Figura 2, mostram ambos o desaparecimento das bandas das proteínas de alto peso molecular, característico do IPS nativo, maleilado ou não, com o concomitante aparecimento de bandas peptídicas nas regiões de 26 – 28 kDa e na parte inferior do gel. É interessante observar, entretanto, que no IPSM3H foram constatadas duas bandas na altura dos 26 kDa, enquanto que nas duas corridas do hidrolisado desmaleilado (IPSM3HD) se evidenciou apenas uma banda. É provável que a desmaleilação tenha causado a reassociação de polipeptídeos, ao ponto de criar apenas uma banda.

Na literatura não se encontram relatos sobre o uso da maleilação como agente inativador dos fatores inibidores de tripsina e quimotripsina presentes na soja. Neste estudo ficou evidente que a maleilação das proteínas do IPS foi eficaz na inativação dos inibidores das proteases pancreáticas. Para o inibidor de tripsina, os testes de atividade indicaram claramente que os inibidores perdem a capacidade inibitória em relação inversa à extensão da maleilação. Já em tratando-se da atividade anti-quimotriptica, típica do inibidor de Bowman-Birk, a maleilação permitiu a proteólise com baixos níveis de quimotripsina. Testes preliminares confirmaram a virtual impossibilidade de se efetuar a proteólise deste substrato sem antes inativar o inibidor, mesmo com razões enzima:substrato 15 vezes maior do que a aqui utilizada.

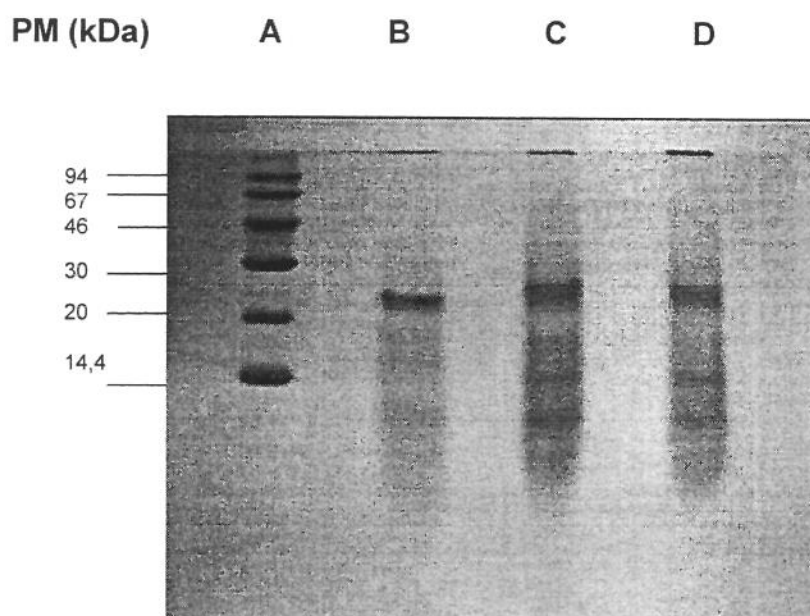


Figura - 2 Eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (8-20%), na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol; coluna (A) = marcadores de peso molecular (fosforilase b = 94 kDa; albumina = 67 kDa; ovalbumina = 43 kDa; anidrase carbônica = 30 kDa; inibidor de tripsina = 20 kDa; α -lactalbumina = 14,4 kDa); (B) = IP3M3H; (C e D) = IP3M3HD. Migração: do cátodo (superior) para o ânodo (inferior).

6.6. Conclusões

Observação destes resultados nos levam a concluir que esta modificação química das proteínas do IPS, na extensão que modifica 86,7% dos grupos lisila e inibe 74, 5% da atividade anti-tríptica e provavelmente também anti-quimotríptica, pode ser empregada em substituição da desnaturação térmica em casos especiais e resultando em produtos diferenciados, com peptídeos de baixo a médio PM, GH superior a 4% e utilizando relação enzima:substrato excepcionalmente baixa.

6.7. Referências Bibliográficas

- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.27, n.6, p.1256-1262, Nov.-Dec., 1979.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**: London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427p.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Aproved Methods of the A.A.C.C.**, Method 71-10, approved Nov., Saint Paul, 1973.
- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 12.ed. Washington, 1975.
- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis**, 13.ed. Washington, 1980.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.

- BOATRRIGHT, W. L.; HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.12, p.1439-1444, Dec., 1995.
- BUTLER, P. J. G.; HARTLEY, B. S. Maleylation of amino groups. **Methods in Enzymology**, New York, v.25B, p.191-199, 1972.
- CHOI Y.R.; LUSAS, E.W.; RHEE, C.K.. Effects of acylation of defatted cottonseed flour with various acid anhydrides on protein extractability and functional properties of resulting protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n.5, Sept.-Oct., p.1713-1716, 1982.
- COCKRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Design**. 2.ed. New York: John Wiley, 1957, 611p.
- FUKUSHIMA, D. **Deteriorative Changes of Proteins During Soybean Processing and their Use in Foods**. J. R. Whitaker e D. Fujimaki (eds), Chemical deterioration of proteins. ACS Symposium Series, n° 123, 1980, pp.213-240.
- GARCÍA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, New York, v.37, n.4, p.361-391, June, 1997.

GLAZER, A. N.; DELANGE, R. J.; SIGMAN, D. S.; In: **Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures**; WORK, T. S.; WORK, E.; (ed) Elsevier: New York, 1975.

HALL, R. J.; TRINDER, N.; GIVENS, D. I. Observations on the use of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates. **The Analyst**, Cambridge, v.98, n.1170, p.673-686, Sept., 1973.

HAMERSTRAND, G. E.; BLACK, L. T.; GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul. v.58, n.1, p. 42-45, Jan.-Feb., 1981.

IKURA, K.; GOTO, M.; YOSHIKAWA, M.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Use of transglutaminase. Reversible blocking of amino groups in substrate proteins for a high yield of specific products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.9, p.2347-2354, Sept., 1984.

KAKADE, M. L.; SIMONS, N.; LIENER, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.46, n.5, p.518-526, Sept., 1969.

- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; McGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.51, n.3, p.376-382, May-June, 1974.
- KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.624, n.1, p.13-20, July, 1980.
- KIMBALL, M. E.; HSIEH, D. S. T.; RHA, C. Chymotrypsin hydrolysis of soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.29, n.4, p.872-874, July-Aug., 1981.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-686, 1970.
- LÓPEZ, L. M. I.; BRULLO, A.; NATALUCCI, C. L.; CAFFINI, N. O., SORGENTINI, D. A., WAGNER, J. R. Thermal behavior, solubility and structural properties of soy concentrate hydrolyzed by new plant proteases. **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v.22, n.2, p.124-141, June, 1998.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

MARTINS M T. S. **Obtenção e caracterização química e imunológica parcial de plasteína produzida a partir de hidrolisados de isolado protéico de soja e caseína.** Campinas, 1994. 95p. Tese (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for tem cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n.1, p.18-24, Jan., 1990.

MUTILANGI, W. A. M.; PANYAM, D.; KILARA, A. Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.5, p.1104-1109, Sept.-Oct., 1995.

MUTILANGI, W. A. M.; PANYAM, D.; KILARA, A. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.2, p.270-274, 303, Mar.-Apr., 1996.

RUIZ, W.A. Proteólise do resíduo do extrato hidrossolúvel de soja. **Tese de Doutorado** em Ciência de Alimentos (p.65). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, 199pp. 1985.

SINGH, N.; SINGH, D., CHAUHAN, G. S. Effects of defatting, coagulants and coagulation pHs on soy protein isolates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n.6, p.117-121, Nov.- Dec., 1994.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.3, p.1190-1206, June, 1958.

WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, Mar., 1973.

WOLF, W. J.; COWAN. J. C. **Soybean as a food source. Food uses of soybean proteins.** ed. Revisada. Cleveland: CRC Press., 1975. 101p.

WU, Y. V.; SESSA, D. J. Conformation of Bowman-Birk inhibitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, n.10, p.2136-2138, Oct., 1994.

7. Conclusões

Os resultados desta pesquisa permitiram chegar as seguintes conclusões:

1. Reação do anidrido maléico com as proteínas do isolado protéico de soja (IPS) acilou, entre outros, os grupos amina resultando na diminuição da lisina disponível do IPS e na inativação efetiva dos inibidores de tripsina e quimotripsina. A atividade anti-tripsina do IPS diminuiu para 74,6% quando a extensão da maleilação era de 86%.
2. Após a maleilação, foi possível executar a proteólise do IPS com baixas relações de enzima-substrato (1/460), até o grau de 4,3% de hidrólise, em 120 minutos, demonstrando que a maleilação pode substituir a inativação térmica.
3. O processo proteolítico do IPS maleilado provavelmente se deu por caminho diferente do normalmente seguido pelo IPS inativado e desnaturado termicamente. Os peptídeos produzidos merecem estudo mais aprofundado.
4. A hidrofobicidade superficial do IPS diminuiu larga e linearmente em função do grau de modificação química. Tal comportamento foi muito diferente do relatado para a acetilação e succinilação, assim como do observado após tratamento térmico.
5. As condições empregadas no processo de desmaleilação, embora brandas demais para remover os grupos maleato das lisinas bloqueadas, serviu para confirmar a reversibilidade da reação de modificação.

6. Apesar da ausência de desnaturação térmica no IPS maleilado, os perfis eletroforéticos do IPS e o IPS modificado, sugerem que há diferenças entre os polipeptídeos gerados durante a proteólise com α -quimotripsina.
7. A hidrólise de misturas protéicas contendo inibidores de tripsina e quimotripsina inativados por modificação com anidrido maléico é factível e pode trazer vantagens no desenvolvimento de ingredientes para alimentos e cosméticos que requerem características especiais, diferentes das obtidas com os substratos inativados termicamente.

8. Referências Bibliográficas

- ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, n.4, p.925-932, Apr., 1991.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**: London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427p.
- ADLER-NISSEN, J. Proteases. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**: 3.ed. San Diego: Academic, 1993. cap:7, p.159-203.
- ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n.3, p.581S-588S, Mar., 1995.
- BAUTISTA, J.; HERNANDEZ-PINZON, I.; ALAIZ, M.; PARRADO, J.; MILLAN, F. Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.6, p967-971, Apr., 1996.

BRINEGAR, A. C.; KINSELLA, J. E. Reversible modification of lysine in soybean proteins, using citraconic anhydride: Characterization of physical and chemical changes in soy protein isolate, the 7S globulin, and lipooxygenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.28, n.4, p.818-824, July-Aug., 1980.

BRINEGAR, A. C.; KINSELLA, J. E. Reversible modification of lysine in β -lactoglobulin using citraconic anhydride. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 18, n.1, p.18-25, July, 1981.

BUTLER, P. J. G.; HARRIS, J. I.; HARTLEY, B. S.; LEBERMAN, R. The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains. **The Biochemical Journal**, Great Britain, v. 112, n. 679-689, 1969.

BUTLER, P. J. G.; HARTLEY, B. S. Maleylation of amino groups. **Methods in Enzymology**, New York, v.25B, p.191-199, 1972.

CHOI, Y. R.; LUSAS, E. W.; RHEE, K. C. Effects of acylation of defatted cottonseed flour with various acid anhydrides on protein extractability and functional properties of resulting protein isolates. **Journal of Food Science**. Chicago, v.47, n.5, p.1713-1716, Sept.-Oct., 1982.

- DANIEL, H.; VOHWINKEL, M.; REHNER, G. Effect of casein and β -casomorphins on gastrointestinal motility in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.120, n.3, p.252-257, Feb., 1990.
- DiPIETRO, C. M.; LIENER, I. E. Soybean protease inhibitors in foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.3, p.606-609, 617, May-June, 1989.
- ENA, J. M.; VAN, BERESTEIJN, E. C. H.; ROBBEN, A. J. P. M.; SCHMIDT, D. G. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatin combination. **Journal of Food Science**. Chicago, v.60, n.1, p.104-110, 116, Jan.-Feb., 1995.
- FERREIRA, S. M. R.; SERPE, E. R. Obtenção de leite condensado a partir de uma mistura com extrato hidrossolúvel de soja em pó e leite de vaca. **Archivos latinoamericanos de Nutrition**, Caracas, v.41, n.1, p.92-101, Mar., 1991.
- FRANZEN, L. K.; KINSELLA, J. E. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24, n.4, p.788-795, Apr., 1976.
- FRIEDMAN, M.; GUMBMANN, M. R. Nutritional improvement of soy flour through inactivation of trypsin-inhibitors by sodium-sulfite. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.5, p.1239-1241, Sept.-Oct., 1986.

- FRØKJAER, S. Use of hydrolysate for protein supplementation. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.86-88, Oct., 1994.
- FUKUSHIMA, D. Fermented vegetable (soybean) protein and related foods of Japan and China. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.56, n.3, p.357-362, Mar., 1979.
- GARCÍA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.37, n.4, p.361-391, June, 1997
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.148-152, 157, Jan.-Feb., 1993.
- GLAZER, A. N.; DELANGE, R. J.; SIGMAN, D. S.; In: **Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures**,; WORK, T. S.; WORK, E.; (ed) Elsevier: New York, 1975.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.2, p.486-491, Mar.-Apr., 1985.

- HOGLE, J. M.; LIENER, I. Reduction and reactivation of the Bowman-Birk soybean inhibitor. **Canadian Journal of Biochemistry**, Canada, v.51, n.7, p.1014-1020, July, 1973.
- INFANTE, J. L. Z.; ROUANET, J. M.; CAPORICCIO, B.; PEJOAN, C.; BESANÇON, P. Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di- and tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, New York, v.3, n.6, p.285-290, June, 1992.
- JANSEN, E. F.; TOMIMATSU, Y.; OLSON, A. C. Cross-linking of α -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, California, v.144, n.1, p.394-400, May, 1971.
- JOHNSON, L. A.; DEYOE, C. W.; HOOVER, W. J.; SCHWENKE, J. R. Inactivation of trypsin inhibitors in aqueous soybean extracts by direct steam infusion. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.57, n.6, p.376-379, Nov.-Dec., 1980.
- KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.624, n.1, p.13-20, July, 1980.

- KATO, A.; KOMATSU, K.; FUJIMOTO, K.; KOBAYASHI, K. Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.33, n.5, p.931-934, July-Aug., 1985.
- KELLA, N. K. D.; BARBEAU, W. E.; KINSELLA, J. E. Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of glycinin on solubility, surface hydrophobicity, and *in vitro* digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.34, n.2, p.251-256. Apr., 1986.
- KESTER, J. J.; RICHARDSON, T. Modification of whey proteins to improve functionality, **Journal Dairy Science**. Champaign, v.67, n.11, p.2757-2774, Nov., 1984.
- KNIES, G. Proteína isolada de soja. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**: 1.ed. 1981, p.978-979.
- KNIGHTS, R. J. Processing and evaluation of protein hydrolysates. In: LIFSHITZ, F., eds. **Nutrition for Special Needs in Infancy**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1985. p.105-115.
- LALASIDIS, G. Four new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with high content of essential amino acids. **Annales de la Nutrition et de L'Alimentation**, Paris, v.32, n.2-3, p.709-723, Feb.-Mar., 1978.

- LIENER, I. E.; KAKADE, M. L. **Protease inhibitors**. In: Toxic Constituents of plant foodstuffs; LIENER, I. E.; (ed). Academic Press: New York, 1980, p.7-71.
- LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, n.3, p.406-415, Mar.,1981.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional componentes in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.34, n.1, p.31-67, Jan., 1994.
- LINSCHER, W. G.; SMITH, N.; MAHANY, D. Physiologic effects of a trypsin inhibitor in soya protein on trypsin activity, and on digestion and absorption of protein in man. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.78, n.5, p.1209-1209, May, 1980.
- LOPEZ-BAJONERO, L. J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELAZQUES-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.4, p.938-942, July-Aug., 1991.

- MATHEIS G.; WHITAKER, J. R. Chemical phosphorylation of food proteins—an overview and a prospectus, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, n.4, p.699-705, Apr., 1984.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolyzates of casein depleted in phenylalanine. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Russian Original, v.29, n.3, p.302-306, May-June, 1993.
- MUTILANGI, W. A. M.; PANYAM, D.; KILARA, A. Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.5, p.1104-1109, Sept.-Oct., 1995.
- NAKAI, S.; LI-CHAN, E. **Hydrophobic interactions in food systems** Boca Raton CRC Press, Florida, 1988. 192p.
- NAKHOST, Z.; HSIEH, D. S. T.; SHIH, V.; RHA, C. K. Synthesis of low-phenylalanine polypeptides. **International Journal of Peptide Protein Research**, Copenhagen, v.20, n.3, p.267-275, Sept., 1982.
- OHREN, J. A. Process and product characteristics for soya concentrates and isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, n.3, p.333-335, Mar., 1981.

- PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M.; C. pH-induced modifications in the thermal stability of soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.10, p.3005-3009, Oct., 1996.
- SALADO, G. A. **Resposta nutricional de pacientes hospitalizados tratados com dieta formulada de hidrolisado protéico de soja.** Campinas, 1997, 159p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SAVAGE, W. D.; WEI, L. S.; SUTHERLAND, J. W.; SCHMIDT, S. J. Biologically active componentes inactivation and protein insolubilization during heat processing of soybeans. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p.164-168, 180, Jan.-Feb., 1995.
- SESSA, D. J.; GHANTOUS, P. E. Chemical Inactivation of soybean trypsin inhibitors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.64, n.12, p.1682-1687, Dec., 1987.
- SESSA, D. J.; HANEY, J. K.; NELSEN, T. C. Inactivation of soybean trypsin-inhibitors with ascorbic-acid plus copper. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.7, p.1469-1474, July, 1990.

- SESSA, D. J.; NELSEN, T. C. Chemical inactivation of soybean protease inhibitors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.68, n.7, p.463-470, July, 1991.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SHIH, F. F. Modification of food proteins by non-enzymatic methods. In: Hudson, B. J. F. **Biochemistry of food proteins**. (ed) Elsevier applied science. London. 1992, 419p.
- STEINER R. F. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, v.115, n.1, p.257-270. July, 1966.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman Company, 1995. 1064p.
- TASSI, E. M. M. AMAYA-FARFÁN, J. AZEVEDO, J. R. M. Hidrolyzed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**. Oxford, v.18, n.5, p.875-881, May, 1998.
- WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.3, p.765-770, May-June, 1990.

WOLF, W. J. What is soy protein? **Food Technology**, Chicago, v.26, n.5, p.44-45, 48, 50, 52-54, May, 1972.

WU, Y. V.; SESSA, D. J. Conformation of Bowman-Birk inhibitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, n.10, p.2136-2138, Oct., 1994.

Errata: *Proteólise com α -Quimotripsina do Isolado Protéico de Soja Maleilado*

Pág. 105, Tabela 1. segunda coluna, e linhas 2, 3, 4, onde está escrito “0,0170”, o correto é “0,0809”.

Pág. 109, Fig.1. Onde está escrito “De menor para maior intensidade”, o correto é: “De maior para menor intensidade”.

Pág. 122, item 5, o correto é: “As condições empregadas no processo de desmaleilação, embora brandas demais para remover todos os grupos maleato das lisinas bloqueadas, serviu para confirmar a reversibilidade da reação de modificação”.

Pág. 123, item 6, o correto é: “Apesar da não desnaturação térmica do IPS maleilado, os perfis eletroforéticos do IPS modificado, sugerem que há diferenças entre os polipeptídeos gerados durante a proteólise com α -quimotripsina”.