

**ARIELA WERNECK DE CARVALHO**

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E QUALIDADE PROTEICA  
DO CULTIVAR DE SOJA UFVTN 105AP COM ELEVADO TEOR  
PROTEICO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência da Nutrição, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009**

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

T

C331b  
2009

Carvalho, Ariela Werneck, 1983-

Biodisponibilidade de ferro e qualidade proteica do  
cultivar de soja UFVTN 105AP com elevado teor proteico  
/ Ariela Werneck Carvalho. – Viçosa, MG, 2009.  
xvi, 82f.: il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas - Qualidade. 2. Proteínas - Análise.  
3. Urease. 4. Inibidores de tripsina. 5. Soja - Efeito  
de ferro. 6. Soja - Processamento. 7. Alimentos -  
Teor proteico. 8. Aminoácidos. 9. Farinha de soja. .  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.639

**ARIELA WERNECK DE CARVALHO**

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E QUALIDADE PROTEICA  
DO CULTIVAR DE SOJA UFVTN 105AP COM ELEVADO TEOR  
PROTEICO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência da Nutrição, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de junho de 2009



Prof<sup>a</sup>. Neuzamaria Brunoro Costa  
(Co-Orientadora)



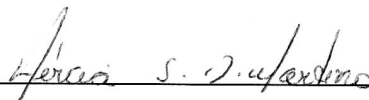
Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Co-Orientador)



Prof<sup>a</sup>. Ana Vlória Bandeira Moreira



Prof<sup>a</sup> Márcia Regina Pereira Monteiro



Prof<sup>a</sup>. Hércia Stampini Duarte Martino  
(Orientadora)

## *DEDICATÓRIA*

Aos meus queridos pais, Mário e Cecília, por cada passo da minha formação, pelo carinho, confiança, apoio incondicional e respeito, dedicados a todo o momento. E por compartilharem comigo, todas as emoções, alegrias e dificuldades desta fase.

Aos meus referenciais de vida, o meu eterno agradecimento!

“Hoje me sinto mais forte,  
Mais feliz quem sabe  
Eu só levo a certeza  
De que muito pouco eu sei,  
Eu nada sei.  
Conhecer as manhas e as manhãs,  
O sabor das massas e das maçãs...”  
*(Almir Sater)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades concedidas e possibilidade de aproveitá-las. Ofereço essa vitória primeiramente a Ele por ter me guiado e fortalecido diante das dificuldades.

Ao Marcel, pelo carinho, amor, dedicação, paciência, companheirismo e atenção em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus irmãos: Alessandro e Anselmo, por serem meus amigos e acreditarem em mim, dando-me conselhos, força e todo apoio necessário.

À Hércia minha honrada orientadora, pela orientação, conselhos, confiança, incentivo, pela amizade construída e oportunidade oferecida desde o início. Agradeço pelos ensinamentos acadêmicos e de vida.

Aos queridos amigos do mestrado: Gilson Júnior, Amanda Mello, Hudsara de Almeida, Mônica Sant`Anna, Caio Reis, Damiana Costa, Josie Oliveira, Denise Quintão, Igor Brito, Clarissa Nascimento, Vanessa Moraes, Lorena Barbosa, Karolina Gatti, Luís Júnior, Ana Cristina e Gláucia Andrade. Obrigada pelo incentivo, apoio, pela amizade, convivência, pelos felizes momentos compartilhados, troca de experiências, e é claro, pelos nossos encontros regados a boas risadas.

As colegas de disciplina que ajudaram nos ensaios biológicos.

Aos técnicos de laboratório, Cassiano Silva, Ricardo Antonucci e Teresinha que ajudaram muito nas análises em momentos de total desespero.

À minha amiga Soraya de Paula, por ter ouvido pacientemente sobre as minhas lutas para ingressar no mestrado e por ter me ajudado a fazer meu planejamento estratégico.

Aos meus professores da graduação que sempre me apoiaram a ingressar no mestrado.

Aos meus amigos e familiares, que mesmo de longe, acreditaram e torceram o tempo todo por mim.

À Márcia, Onícia e Manoel, que por tantas vezes me acolheram em Viçosa quando iniciei meu curso de especialização tentando ingressar no mestrado.

À Vânia e Dona Maria que me acolheram por quase um ano em sua casa, meu muito obrigado.

À Neuza Costa, Sônia Machado e Everaldo Barros pela co-orientação, sugestões, conselhos e ajuda nas dúvidas que surgiram no decorrer deste trabalho.

Aos convidados e suplentes pela gentileza com que aceitaram participar da banca examinadora, pelas colaborações, considerações e sugestões.

À Dorina Natal, Bruno Oliveira, Danilo Figo, Carlos Jason e Natália Won Rondon, meus estagiários, pela colaboração em diferentes etapas desse trabalho.

Ao Dr. Ralf Greiner pelas análises de ácido fítico que realizou na Alemanha.

A todos do BIOAGRO que muito me ajudaram com as análises que tive que realizar no departamento. Newton Piovesan, Naldo Pinto, Evandro Cássio e Gláucia, e também a todos os outros que passaram pelo meu caminho nesses meses de análises.

Ao professor José Benício, pela ajuda na parte estatística desse trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa parcial de estudos.

Aos funcionários da UFV e do DNS, em especial os do PPGCN UFV, que colaboram sempre.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

MUITO OBRIGADA!

## BIOGRAFIA

Ariela Werneck de Carvalho, filha dos professores Mário Anselmo de Carvalho e Maria Cecília Werneck de Carvalho, nasceu em Governador Valadares, Minas Gerais em 21 de novembro de 1983.

Em fevereiro de 2003, iniciou o curso de Nutrição pela Univale-Universidade do Vale do Rio Doce, concluindo-o em dezembro de 2006.

Em janeiro de 2007 atuou como nutricionista em academias e domicílio. De fevereiro a março foi representante dos produtos da Support em uma distribuidora da região. No período de março de 2007 a janeiro de 2008, foi nutricionista da equipe de Segurança Alimentar do projeto “Desenvolvimento Associativo: evolução do associativismo no município de Governador Valadares” fomentado pelo MDS-Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome.

Em agosto de 2007, iniciou a pós-graduação *Lato Sensu* em Nutrição Humana e Saúde com ênfase em Nutrição Materno Infantil, pela Universidade Federal de Viçosa, e obteve o título de Especialista em agosto de 2008.

Em março de 2008, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, nessa mesma instituição, submetendo-se à defesa de dissertação em junho de 2009.



## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	Xv
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
1.1 – Referências bibliográficas.....	02
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	03
2.1 – Objetivo geral.....	03
2.2 – Objetivos específicos.....	03
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
3.1 – Histórico.....	04
3.2 – Importância econômica da soja no Brasil.....	05
3.3 – Composição química.....	06
3.4 – Fatores antinutricionais.....	07
3.4.1 – Ácido fítico.....	07
3.4.2 – Inibidor de protease.....	08
3.4.3 – Urease.....	09
3.4.4 – Solubilidade.....	09
3.5 – Biodisponibilidade de ferro.....	10
3.6 – Proteína da soja.....	11
3.7 – Processamento térmico.....	12
3.8 – Justificativa.....	13
3.9 – Referências bibliográficas.....	14
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	19
4.1 – Aquisição e elaboração dos produtos.....	19
4.1.1 – Farinha de soja.....	20
4.2 – Caracterização dos produtos da soja.....	20
4.2.1 – Proteínas.....	20
4.2.2 – Lipídios.....	20
4.2.3 – Umidade.....	20
4.2.4 – Cinza.....	21
4.2.5 – Carboidratos.....	21
4.2.6 – Energia.....	21
4.2.7 – Minerais.....	21
4.2.8 – Ácido fítico.....	22
4.2.9 – Fibra alimentar.....	22
4.2.9.1 – Preparo de cadinhos.....	23
4.2.9.2 – Obtenção do hidrolisado.....	23
4.2.9.3 – Determinação da fibra alimentar total (FAT).....	23
4.2.9.4 – Determinação da fibra alimentar insolúvel (FAI).....	24
4.2.10 – Determinação e quantificação dos aminoácidos.....	25
4.2.11 – Determinação da atividade de urease.....	27
4.2.12 – Determinação da solubilidade proteica.....	27
4.2.13 – Determinação da atividade de inibidor de proteases.....	28
4.2.13.1 – Reagentes e soluções.....	28
4.2.13.2 – Extração dos inibidores.....	28
4.2.13.3 – Determinação da atividade inibitória de tripsina.....	28
4.3 – Informação nutricional e categorização por porção de farinha de soja com e sem casca.....	29

4.4 – Biodisponibilidade de ferro de farinhas de soja com casca e sem casca	30
4.4.1 – Preparo de dietas.....	30
4.4.2 – Ensaio biológico.....	31
4.4.3 – Fase de depleção.....	32
4.4.4 – Fase de repleção.....	32
4.4.5 – Ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), coeficiente de eficiência alimentar (CEA).....	32
4.4.6 - Valor Biológico Relativo (VBR).....	32
4.4.7 – Determinação de hemoglobina.....	33
4.4.8 – Determinação de ferro das dietas.....	33
4.5 – Avaliação da qualidade proteica das farinhas desenvolvidas.....	33
4.5.1 – Dietas experimentais.....	33
4.5.2 – Desenho experimental.....	34
4.5.3 - Determinação do ganho de peso(GP), consumo alimentar (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA).....	34
4.5.4 - Razão de eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV).....	35
4.5.5 – Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS).....	36
4.6 – Análises estatísticas.....	36
4.7 – Aspecto ético.....	37
4.8 – Referências bibliográficas.....	38
<b>5. ARTIGOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 – ARTIGO 1: A PRESENÇA DA CASCA DA FARINHA DE SOJA NÃO INTERFERE NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO.....	40
Resumo.....	40
5.1.1 – Introdução.....	41
5.1.2 – Material e Métodos.....	42
5.1.3 – Resultados .....	47
5.1.4 – Discussão.....	51
5.1.5 – Conclusão.....	53
5.1.6 – Referências bibliográficas.....	54
5.2 – ARTIGO 2: QUALIDADE PROTEICA DE FARINHA DE SOJA COM E SEM CASCA.....	57
Resumo.....	57
5.2.1 – Introdução.....	59
5.2.2 – Material e Métodos.....	60
5.2.3 – Resultados.....	64
5.2.4 – Discussão .....	70
5.2.5 – Conclusão.....	74
5.2.6 – Referências bibliográficas.....	75
<b>6. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>79</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>80</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>81</b>
8.1 – Aprovação do projeto pelo comitê de ética na experimentação animal (CEEA) da UFMG.....	82

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Aminoácidos  
AI: Ingestão Adequada  
AIN-93G: *American Institute of Nutrition for growth*  
ANOVA: Análise de Variância  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*  
AOCS: *American Oil Chemists' Society*  
BBI: Inibidor de tripsina e quimotripsina Browman-Birk  
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária  
CA: Consumo Alimentar  
CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar  
CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal  
COOPADAP: Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba  
DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado  
DP: Desvio Padrão  
DRI: *Dietary Reference Intakes*  
DV: Digestibilidade Verdadeira  
DV-R: Digestibilidade Verdadeira Relativa  
FAI: Fibra Alimentar Insolúvel  
FAO: *Food And Agriculture Organization*  
FAS: Fibra Alimentar Solúvel  
FAT: Fibra Alimentar Total  
FCC: Farinha de soja com casca  
FSC: Farinha de soja sem casca  
GP: Ganho de Peso  
GH: Ganho de Hemoglobina  
HB: Hemoglobina  
HPLC: Cromatógrafo líquido de alta eficiência  
IOM: *Institute of Medicine*  
IP<sup>5</sup>: Inositol pentafosfato  
IP<sup>6</sup>: Inositol hexafosfato  
KTI: Inibidor de Tripsina Kunitz  
LOX: Lipoxigenase

NPR: Razão Proteica Líquida  
NPR-R: Razão Proteica Líquida Relativa  
PDCAAS: Escore químico corrigido pela digestibilidade  
PER: Razão da Eficiência Proteica  
PER-R: Razão da eficiência proteica relativa  
pH: Potencial Hidrogeniônico  
RDA: Recommended Dietary Allowances  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
SAS: *Statistical Analysis Systems for Windows Software*  
TN: Triplo Nula  
VBR: Valor Biológico Relativo  
VD: Valores Diários de referência  
WHO: *World Health Organization*

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

Figura 1 – Partes estruturais da soja.....	07
--	----

### Artigo 1

Figura 1 – Ganho de hemoglobina de animais tratados com sulfato ferroso, farinha de soja com e sem casca elaboradas a partir de cultivar desenvolvido para alimentação humana.....	52
--	----

### Artigo 2

Figura 1 – Atividade de urease de farinha de soja com e sem casca, crua e tratada a 150° C por 30 minutos.....	67
Figura 2 – Solubilidade proteica de farinha de soja com e sem casca, crua e tratada a 150° C por 30 minutos.....	68
Figura 3 – Tripsina inibida em farinha de soja com e sem casca, crua e tratada a 150° C por 30 minutos.....	69

## LISTA DE TABELAS

### Metodologia

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de biodisponibilidade de ferro (g/100 g).....	33
Tabela 2 – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de qualidade proteica (g/100 g).....	36

### Artigo 1

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100 g).....	48
Tabela 2 – Caracterização química das farinhas de soja com casca e sem casca elaboradas a partir de cultivar desenvolvido para alimentação humana.....	50
Tabela 3 – Informação nutricional e categorização por porção de 50 g de farinha de soja com e sem casca e percentual de adequação de nutrientes.....	51
Tabela 4 – Ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e hematócrito em função de diferentes dietas nos diferentes níveis de ferro ao final da fase de repleção.....	52

### Artigo 2

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100g).....	64
Tabela 2 – Média e desvio padrão de ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos grupos que receberam dietas de caseína e dietas experimentais de soja (n=6).....	68
Tabela 3 – Média e desvio padrão de razão de eficiência proteica (PER) e razão proteica líquida (NPR) dos grupos experimentais (n=6).....	69
Tabela 4 – Média e desvio padrão de consumo de proteína, peso das fezes, nitrogênio fecal e DV e DV-R dos grupos experimentais (n=6).....	69
Tabela 5 – Teores de aminoácidos, escore químico e PDCAAS, segundo os padrões FAO/WHO, 2007; IOM, 2002 e FAO/WHO, 1985, das farinhas de soja com casca e sem casca	71

## RESUMO

CARVALHO, Ariela Werneck de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Biodisponibilidade de ferro e qualidade proteica de novo cultivar de soja UFVTN 105AP com elevado teor proteico.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-orientadores: Neuza Maria Brunoro Costa, Sônia Machado Rocha Ribeiro e Everaldo Gonçalves de Barros.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa de importante significado na alimentação humana em decorrência de suas propriedades nutricionais e funcionais. Com o melhoramento genético, surgem novos cultivares com sabor melhorado e com composição química modificada, conduzindo à necessidade de estudos para avaliar a concentração de nutrientes e de fatores antinutricionais. Neste estudo avaliou-se a composição centesimal, a concentração de minerais, de fitato, a atividade de urease e do inibidor de tripsina, a categorização nutricional por porção, o perfil aminoacídico, a solubilidade proteica, a biodisponibilidade de ferro e a qualidade proteica da farinha de soja, com e sem casca, do cultivar, UFVTN 105AP, tratadas a 150° C por 30 minutos. Para avaliar a biodisponibilidade de ferro utilizou-se o método de depleção-repleção de hemoglobina em ratos machos *Wistar*. Os animais receberam dieta de depleção de ferro por 21 dias. Na fase de repleção, que durou 14 dias, o grupo controle (sulfato ferroso) e os dois grupos testes (farinha de soja com casca e sem casca) foram tratados com 6, 12 e 24 ppm de ferro. A qualidade proteica foi avaliada em ratos machos *Wistar*, distribuídos ao acaso em 4 grupos (n= 6), durante 14 dias. Os dois grupos testes receberam dietas à base de farinhas de soja com e sem casca, um grupo recebeu dieta livre de nitrogênio e o grupo controle recebeu dieta à base de caseína. Avaliou-se o ganho de peso (GP), o consumo alimentar (CA), o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), a razão da eficiência proteica (PER), a razão proteica líquida (NPR), a digestibilidade verdadeira (DV) e o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS). A farinha de soja com casca apresentou maior teor de fibra alimentar total, cálcio e ferro e menor concentração de proteína e ácido fítico do que a soja sem casca. A razão molar fitato:ferro foi duas vezes menor que a farinha de soja sem casca e a razão molar fitato:zinco também foi menor. Para uma porção de 50 g do produto, as farinhas foram classificadas como excelente fonte de proteína, Cu, Mg, Zn e Mn, boa fonte de lipídio, fibra alimentar e K e fonte de Ca. Em relação ao Fe, a farinha com casca foi classificada como excelente fonte e a sem casca como boa fonte. O tratamento térmico reduziu a atividade de urease, inativou os inibidores de tripsina, e não superaqueceu as farinhas mantendo a solubilidade protéica superior a 85%. O perfil aminoacídico das farinhas de

soja com e sem casca foram semelhantes entre si, sendo limitante para valina, apenas pelo padrão da FAO/WHO de recomendação nutricional. O ganho de hemoglobina (GH) no grupo da farinha de soja com casca foi similar ao do grupo controle ( $p < 0,05$ ). A farinha de soja sem casca apresentou GH inferior comparado ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) na concentração de 24 ppm de ferro. O Valor Relativo de Biodisponibilidade (VRB) da farinha de soja com casca e sem casca foi 68,5% e 67,1%, respectivamente, em relação ao sulfato ferroso. No ensaio de qualidade proteica, o CEA e o NPR não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais. O PER da farinha de soja sem casca foi semelhante ( $p > 0,05$ ) ao da caseína. Embora o PER da farinha de soja com casca tenha sido inferior ( $p < 0,05$ ) ao da caseína, este não diferiu ( $p > 0,05$ ) da farinha de soja sem casca. A DV das farinhas de soja com e sem casca não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), mas foi inferior à caseína ( $p < 0,05$ ), e o PDCCAS foi menor que a DV, em função do aminoácido limitante. Os índices de qualidade proteica, PER e NPR, indicaram que as farinhas foram adequadas para promover o crescimento e o desenvolvimento dos animais. A digestibilidade verdadeira foi elevada, embora tenha sido inferior à caseína. O melhoramento genético proporcionou equilíbrio qualitativamente e quantitativamente dos aminoácidos essenciais, com exceção da valina. A produção de farinha de soja com casca pode representar uma valiosa estratégia para aumentar a ingestão de fibra alimentar, e suprir 35% a mais de ferro do que a soja sem casca. O novo cultivar pode ser usado para auxiliar a suprir a necessidade de ferro de indivíduos com baixa ingestão em dietas convencionais e não convencionais. Além disso, o processamento da soja favoreceu o aproveitamento biológico das proteínas, indicando que o grão de soja deve ser utilizado de forma integral, para a produção de farinhas.



## ABSTRACT

CARVALHO, Ariela Werneck de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2009.  
**Iron bioavailability and protein quality to a new soybean cultivar UFVTN 105AP with high protein content.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisers: Neuza Maria Brunoro Costa, Sônia Machado Rocha Ribeiro and Everaldo Gonçalves de Barros.

The soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is an important legume to human nutrition due to its nutritional and functional properties. It is important to establish and research a new cultivar of soybean to improve taste and chemical composition and decrease anti-nutritional factors. Therefore, the aim of this study was to evaluate the centesimal composition, mineral concentration, phytic acid, urease activity, trypsin inhibitor, nutritional categorization by serving size, amino acid profile, protein solubility, iron bioavailability and protein quality of a hull and hullless soybean flour from the UFVTN 105AP cultivar, heat-treated at 150° C for 30 minutes. Iron bioavailability was evaluated by the hemoglobin iron-depletion-repletion method in male *Wistar* rats. The animals were feed a depletion diet for 21 days and a repletion diet for 14 days. In the repletion phase, the control diet (ferrous sulphate) and the two test diets (hulled and hullless soy flour) were tested with 6, 12 and 24 ppm of iron. The protein quality was evaluated in male *Wistar* rats randomly to 4 groups (n= 6/group), for 14 days. Two groups (test) received their hulled and hullless soybean flour test meals, one group received a diet without protein and another received a casein diet. Weight gain (WG), feed intake (FI), food efficiency ratio (FER), protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR), true digestibility (TD) and protein digestibility–corrected amino acid score (PDCAAS) were determined. The hulled soy flour showed higher total alimentary fiber, calcium, iron, lower protein and phytic acid than the hullless soybean flour. The phytic acid:iron molar ration was two times lower that the hullless soy flour and the phytic acid: zinc molar ration was also lower. The serving size (50 g) of the flours was classified as an excellent source of protein, Cu, Mg, Zn and Mn, a good source of lipids, dietary fiber, and K and a source of Ca. For iron, the hulled soy flour was classified as an excellent source and the hullless soy flour as a good source. The heat-treatment decreased urease activity inhibited the trypsin inhibitor and increased protein solubility in both flours. The amino acid profile of hulled and hullless soy flour had been similar between themselves, being limiting only to valin by FAO/WHO nutritional requirements. A similarity of the hemoglobin serum gain between the control (ferrous sulphate) and test groups (hulled and hullless soybean flour) was observed.

However, the group treated with hullless soy flour contained iron at a 24 ppm level showing inferior values compared to the control ( $p < 0.05$ ). The relative iron bioavailability of the hulled soybean flour and hullless soybean flour was 68.5% and 67.1%, respectively, in relation to ferrous sulphate. In the protein quality assay, the PER and NPR did not differ ( $p > 0.05$ ) among experimental groups. The PER of the hullless soy flour appeared similar to casein ( $p > 0.05$ ). Although the PER of the hulled soy flour was inferior ( $p < 0.05$ ) to casein, it did not differ ( $p > 0.05$ ) from the hullless soy flour. The TD of hulled and hullless soy flour did not differ between themselves ( $p > 0.05$ ), but were inferior to casein ( $p < 0.05$ ). The PDCCAS was lower than the TD, probably by limiting amino acids. The protein quality from PER and NPR indicated that the flours promoted adequate growth and development of the animals. True digestibility was high, but was inferior to casein. The genetic improvement provided an adequate balance of essential amino acids, qualitatively and quantitatively, with the exception of valin. The hulled flour can represent a valuable strategy to increase the dietary fiber intake, and to supply 35% more iron than the hullless soybean flour. A new cultivar can be used to assist iron requirements of individuals with low iron intake in conventional and non conventional diets. Moreover, the soybean processing improved the proteins quality, indicating the use of the hulled soybean flour.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa de grande interesse na economia mundial e de importante significado na alimentação humana, em decorrência de suas propriedades nutricionais e funcionais. Dentre as fontes proteicas de origem vegetal, como os cereais e as leguminosas, a soja possui o maior conteúdo de proteínas (40%) e o segundo maior teor de lipídios (20%). Ela é fonte também de vitaminas, fosfolipídios, minerais e de compostos bioativos, como isoflavonóides que atuam no controle e diminuição de risco de doenças crônicas não transmissíveis (ACHOURI et al., 2005). Por outro lado, apresenta compostos com características antinutricionais, como o ácido fítico, inibidores de tripsina e oligossacarídeos que podem interferir negativamente na biodisponibilidade de minerais (ESTEVES e MONTEIRO, 2001; MANDARINO, 2008).

Os efeitos benéficos dessa leguminosa na saúde tem levado os consumidores à procura por produtos de soja na tentativa de incluir alimentos saudáveis nas refeições diárias, com intuito de promover a saúde (MONTEIRO e MARTINO, 2006).

Para aumentar essa procura dos consumidores, o melhoramento genético tem buscado desenvolver novos cultivares de soja sem lipoxigenases para amenizar seu *off flavor*, e com elevados conteúdos de proteína e isoflavonóides. Da mesma forma, a ciência da nutrição tem atentado para pesquisar a melhor forma de processamento da soja visando aumentar o aproveitamento de nutrientes, compostos bioativos e inativar fatores antinutricionais.

A hipótese do trabalho baseia-se na premissa que a retirada da casca da soja para o processamento da farinha, comumente utilizada para eliminar ou reduzir fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e fitato, pode ser substituída pela soja com casca a um tratamento térmico adequado que promova a inativação desses fatores antinutricionais, preservando os nutrientes, como fibra alimentar e minerais. Espera-se que a farinha de soja com casca do cultivar UFVTN 105AP, com alto teor protéico, possa contribuir para o aporte de ferro e de proteína de elevada biodisponibilidade.

## 1.1 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOURI, A.; BOYE, J.I. e BELANGER, D. Soybean Isoflavones: efficacy of extration consition and an effect of food type on extractability. **Food Research International**, v.38, p.1199-1204, maio, 2005.

MANDARINO, J.M.G. Composto antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. In: COSTA, N.M.B. e PELUZIO, M.C. **Alimentos Funcionais: benefícios para a saúde**. Viçosa: UFV, 2008, p. 55-80.

ESTEVES, E.A. e MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, p.43-52, 2001.

MONTEIRO, M.R.P. e MARTINO, H.S.D. Avaliação nutricional e sensorial do extrato hidrossolúvel de soja. **Revista Mineira de Enfermagem**, v.10, p.113-117, 2006.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 - Geral**

Determinar a biodisponibilidade de ferro e a qualidade proteica de um novo cultivar de soja UFVTN 105AP, com elevado teor protéico, apropriado para a alimentação humana.

### **2.2 - Específicos**

- Desenvolver farinhas de soja com e sem casca a partir de um novo cultivar de soja, apropriado para o consumo humano;
- Determinar a composição centesimal e o teor de fibra alimentar, minerais e aminoácidos, de farinhas de soja com e sem casca;
- Avaliar a biodisponibilidade de ferro de farinhas de soja com e sem casca;
- Quantificar a atividade de urease e a concentração de fatores antinutricionais em farinhas de soja com e sem casca;
- Avaliar a solubilidade e a qualidade proteica de farinhas de soja com e sem casca.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Histórico

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa originária da China e está entre as plantas mais antigas do mundo. Há relatos na literatura de que a soja já era conhecida pelo homem há mais de 5.000 anos a.C. (BONETI, 1981). Nessa época, era considerado um dos grãos sagrados, ao lado do arroz, trigo, cevada e milho (MÜLLER, 1981). No Brasil, a soja chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908, mas foi introduzida oficialmente no Rio Grande do Sul, em 1914. Porém, a expansão aconteceu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional.

Até 1975, a maioria da produção brasileira de soja era realizada com cultivares e técnicas importadas dos Estados Unidos, onde as condições climáticas são bem diferentes das brasileiras. Assim, somente nos estados do Sul, onde os cultivares americanos encontravam condições semelhantes à de seu país de origem, eram obtidos produtividades rentáveis em termos comerciais (TEIXEIRA, 2003). A partir daí, pesquisadores desenvolveram inúmeras variedades adaptadas ao cultivo em diferentes latitudes, solo e condições climáticas, o que tem permitido o seu plantio em todas as regiões brasileiras. Hoje a soja está entre as espécies produtoras de grãos de maior relevância socioeconômica. Isto devido aos seus altos conteúdos de proteína e óleo, além da alta produtividade (2.823 kg ha<sup>-1</sup>) e baixo custo de produção (R\$ 1.100,00 a 1.400,00 ha<sup>-1</sup>) (CONAB, 2008). Essas excelentes características aliadas às suas múltiplas utilidades geram uma demanda mundial elevada e crescente, e com isso a produção mundial de soja na safra 2007/2008 foi em torno de 221,3 milhões de toneladas (USDA, 2008). Os maiores produtores são Estados Unidos, Brasil, Argentina e China. Os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar no *ranking* dos maiores produtores de soja, contribuindo com cerca de 71,2 milhões de toneladas, o que corresponde a 32% da produção mundial de soja. O Brasil ocupa a segunda posição no *ranking* dos maiores produtores, contribuindo com 62 milhões de toneladas, aproximadamente 28% da produção mundial total da leguminosa, em uma área plantada de aproximadamente 21,219 milhões de hectares (CONAB, 2008).

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira sempre estiveram associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias para o setor produtivo. Atualmente a soja é cultivada em ampla diversidade de ambientes, desde altas latitudes (regiões Sul e Sudeste) até as baixas latitudes

equatorial-tropicais (regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste). Essa expansão e estabelecimento das fronteiras agrícolas somente foram possíveis devido ao desenvolvimento de tecnologia nacional de produção e, principalmente, à criação de cultivares dotados de genes que expressam alta produtividade, boa resistência ou tolerância a diversos fatores, o que representa uma das mais significativas contribuições à eficiência do setor produtivo (EMBRAPA, 2007).

### **3.2. Importância econômica da soja no Brasil**

A soja é uma das principais fontes de proteína e óleo, sendo responsável por cerca de 60% do suprimento de proteína de origem vegetal e 25% do óleo do mundo. No Brasil, a soja é responsável por fornecer aproximadamente 94% do farelo proteico e 90% dos óleos vegetais aqui consumidos. Destacam-se como os principais estados produtores o Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (EMBRAPA, 2007).

A soja é a principal *commodity* agrícola do Brasil. O complexo soja, em 2007, exportou aproximadamente 23,8 milhões de toneladas de grãos, 12,9 milhões de toneladas de farelo e 2,5 milhões de toneladas de óleo, gerando em torno de 10,18 bilhões de dólares (CONAB, 2008). Com isso, a cadeia da soja destaca-se, tanto pela sua expressiva participação nas exportações sob a forma de farelo, óleo e grãos, como também para o suprimento do mercado interno de óleos comestíveis e derivados proteicos.

A soja é considerada uma das culturas de maior importância econômica mundial. É um dos produtos agrícolas que sofreu maior expansão do seu cultivo no Brasil e no mundo (MANDARINO, 2008). A combinação entre produtividade e características favoráveis à indústria de alimentos contribuiu para o aumento de utilização de produtos derivados da soja, tanto na ração animal quanto para a alimentação humana, principalmente devido ao seu elevado teor proteico.

Apesar da alta produtividade e de suas propriedades nutricionais e funcionais, a soja ainda não faz parte do hábito da alimentação do brasileiro. As razões para esse baixo consumo ainda são atribuídas ao sabor e odor indesejáveis ocasionados pela presença de diversos compostos orgânicos nos grãos; pela indução de flatulência gerada por oligossacarídeos do tipo estaquiose, rafinose e verbascose; e pelos seus componentes antinutricionais (VASCONCELOS et al., 2001; BEHRENS e SILVA, 2004).

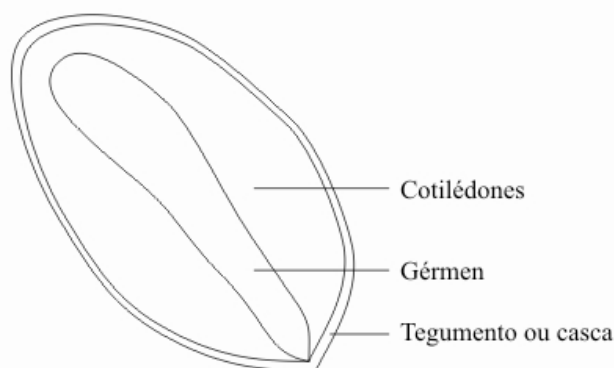
A eliminação genética das lipoxigenases (LOX) é considerada a forma mais eficiente de reduzir o *beany flavor*, porque o tratamento térmico utilizado para

inativação dessas isoenzimas, apesar de ter eficiência razoável, prejudica sensivelmente as propriedades funcionais das proteínas (KINSELLA, 1979). Na soja, as LOX constituem 1% do total de proteínas presentes no grão (AXELROD et al., 1981).

Como uma alternativa para melhorar as características sensoriais dos produtos derivados de soja, para aumentar sua aceitação pelo consumidor, programas de melhoramento, como o “Programa de Melhoramento de Soja para Consumo Humano”, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV) tem desenvolvido cultivares destituídos de LOX, por meio de retrocruzamentos.

### 3.3. Composição química

Em geral, os cultivares de soja possuem aproximadamente 8% de casca, 90% de cotilédones, onde está o maior percentual de proteínas e lipídios, e 2% de hipocotilédones. A composição da soja e de suas partes estruturais (Figura 1) depende de muitos fatores, incluindo cultivares, estação de crescimento, localização geográfica e estresse ambiental (CIABOTTI et al., 2006).



**Figura 1** – Partes estruturais da soja.

Entre os cereais e as leguminosas, a soja possui o maior conteúdo de proteínas, cerca de 40% e o segundo maior teor de lipídios, cerca de 23%, destes 85,7 % são de polinsaturados e 13,5 % de insaturados (VIEIRA et al., 1999).

A maioria dos cultivares apresenta de 30 a 45% de proteínas, de 15 a 25% de lipídios, de 20 a 35% de carboidratos e cerca de 5% de cinzas (MOREIRA, 1999). Geralmente a concentração de proteína nos cultivares convencionais é menor que 40%, portanto menor do que potencialmente pode ser conseguido, em torno de 50%, pelo



fato da concentração de proteína e de óleo serem negativamente correlacionados. Historicamente, a soja tem sido melhorada geneticamente com o objetivo de aumentar tanto a produtividade quanto a concentração de óleo no grão. Apenas recentemente alguns programas de melhoramento têm dado ênfase ao desenvolvimento de cultivares mais produtivas contendo altas concentrações de proteínas (YAKLINCH, 2001).

O teor de proteína encontrado em diversos cultivares variou de 31,3 a 44,1%, enquanto o teor de lipídios variou de 15,30 a 25,30% (VIEIRA et al., 1999; MONTEIRO et al., 2004; CIABOTTI et al., 2006; SILVA et al., 2006; MARTINO et al., 2007; MENDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; TOLEDO et al., 2007; FELIX e CANNIATTI-BRAZACA, 2008). Quanto ao teor de fibra alimentar, Vieira et al. (1999) encontraram de 5,24 a 6,38% em seis cultivares estudados.

Na soja encontram-se, também, vitaminas (tocoferol, filoquinona, tiamina, riboflavina e ácido fólico), fosfolipídios e minerais (potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloreto, sódio, silício, ferro, zinco, molibdênio, manganês e cobre), além de outros componentes, como ácido fítico, inibidores de tripsina, oligossacarídeos que são biologicamente ativos (ESTEVES e MONTEIRO, 2001; MANDARINO, 2008).

### **3.4. Fatores antinutricionais**

A soja contém componentes considerados antinutricionais, que podem influenciar a sua qualidade nutricional, como ácido fítico, oxalato, inibidores de proteases, saponinas, hemaglutininas, entre outros (MARTINO et al., 2007; MANDARINO, 2008).

Os primeiros estudos sobre o valor nutritivo da soja foram feitos com ratos no início do século passado. Kunitz (1945) citou que Osborne e Mendel (1917) provavelmente tenham sido os primeiros a identificar que a ingestão de soja crua causava um retardo no crescimento de ratos. Posteriormente, Read e Haas (1938) descobriram que o extrato aquoso do farelo de soja crua reduziu a atividade da tripsina, utilizada para hidrolisar as proteínas da gelatina.

Devido a grande importância da soja, os estudos foram intensificados no sentido de avaliar os fatores antinutricionais que agem sobre o metabolismo do animal.

#### **3.4.1. Ácido fítico**

O ácido fítico, também conhecido como fitato, inositol hexafosfato, mio-inositol, myo-inositol, mio-inositolfosfato e inositol, é a principal forma de estoque de fósforo na soja, e seu conteúdo varia de 1 a 2,3%. É localizado no corpo das proteínas, e

sua função fisiológica nas sementes das plantas é servir como fonte de fósforo para germinação (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Porém, tem sido relatado que esse ácido tem habilidade de formar quelatos com metais di e trivalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ , além de proteínas (DAVIDSSON et al., 2001; HURRELL et al., 2003; BOHN et al., 2008). O ácido fítico é fortemente ionizado no pH do intestino delgado e forma compostos insolúveis, que não são prontamente absorvidos (DOMÍNGUEZ et al., 2002; MARTINO et al., 2007; MANDARINO, 2008).

Durante o processamento, estocagem, fermentação, germinação e digestão dos grãos e sementes, o inositol hexafosfato ( $\text{IP}^6$ ) pode ser parcialmente desfosforilado para produzir compostos como pentafosfato ( $\text{IP}^5$ ), tetrafosfato ( $\text{IP}^4$ ), trifosfato ( $\text{IP}^3$ ) e possivelmente inositol difosfato ( $\text{IP}^2$ ) e monofosfato ( $\text{IP}^1$ ), por ação de fitases endógenas (SILVA e SILVA, 1999; DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Somente  $\text{IP}^5$  e  $\text{IP}^6$  tem efeito negativo na biodisponibilidade de minerais. Os demais compostos formados tem baixa capacidade de ligar-se a minerais ou os complexos formados são mais solúveis (DOMÍNGUEZ et al., 2002; MARTINO et al., 2007).

Vários estudos tem buscado eliminar o ácido fítico dos produtos de soja, visando melhorar o valor proteico, por meio de diversos processamentos, como diálise (DEAK e JOHNSON, 2007), adição de NaCl, (DERHAM e JOST, 1979), baixo pH em combinação com o  $\text{CaCl}_2$  (FORD et al., 1978), ultrafiltração (OMOSAIYE e CHERYAN, 1979), resinas da troca iônica (KUMAGAI et al., 2002) e adição de fitase (SAITO et al., 2001).

Martino et al. (2007) encontraram teores de 20,15 e 15,61  $\mu\text{mol/g}$  de ácido fítico em farinhas de soja de cultivar sem lipoxigenases e convencional, respectivamente. Lazzari e Beléia (2006) encontraram 18,03 a 27,42  $\mu\text{mol/g}$  para soja crua, 11,52 a 21,21  $\mu\text{mol/g}$  para soja macerada, e 15,76 a 22,73  $\mu\text{mol/g}$  para soja cozida.

#### **3.4.2. Inibidor de protease**

Os inibidores de protease são peptídeos capazes de se complexarem com as enzimas proteolíticas pancreáticas, tornando-as inativas. Localizam-se junto às principais proteínas de estoque, no cotilédone do grão de soja. Existem dois tipos de inibidores: o de tripsina Kunitz (KTI) e o inibidor de tripsina e quimotripsina Browman-Birk (BBI) (MONTEIRO et al., 2003; MONTEIRO et al., 2004; MIURA et al., 2005).

A soja crua cerca de 6% de inibidores de protease que atuam sobre as proteases no trato digestório, prejudicando a digestão das proteínas e conseqüentemente, limitando o fornecimento de aminoácidos essenciais para o organismo. Ao mesmo tempo, o pâncreas aumenta a produção enzimática podendo levar hipertrofia do órgão (BRANDON e FRIEDMAN, 2002; PENHA et al., 2007).

Segundo Carvalho et al. (2002), o aquecimento dos grãos de soja em água fervente por 30 minutos inativou completamente os inibidores de protease. Apesar de se desenvolver cultivares de soja sem inibidores de protease, o tratamento térmico por si só, é capaz de inativá-los, melhorando o valor nutricional da soja (MIURA et al., 2005).

### **3.4.3. Urease**

A urease é uma proteína comum em sementes de leguminosas. Existe uma correlação direta entre fatores antinutricionais e os níveis de urease, por serem termolábeis. Portanto, com a inativação da enzima urease possivelmente alguns fatores antinutricionais estariam destruídos (RUNHO, 2009).

A análise de urease indica se o processamento térmico foi suficiente para inativar os fatores antinutricionais presentes nos vegetais. A análise de atividade ureática é um bom indicativo de processamento térmico adequado quando se encontra entre os pontos de corte de 0,01 a 0,30 (MENDES, 2004; RUNHO, 2009).

Machado et al. (2008) encontraram atividade de urease de 0,10 e 0,12 em cultivares de soja submetidos a 15 minutos em autoclave. O valor de atividade ureática encontrado indicou boa inativação de fatores antinutricionais.

A lipoxigenase é mais termolábil que a uréase, que por sua vez é mais termolábil que inibidores de tripsina (BORGES et al., 2003).

### **3.4.4. Solubilidade**

A proteína solúvel é aquela disponível para a absorção pelo animal. Sendo assim, espera-se que quanto maior a quantidade de proteína solúvel, melhor seja sua biodisponibilidade. Existe uma correlação direta entre a forma de processamento da farinha de soja com a quantidade de proteína solúvel presente no produto (RUNHO, 2009).

O grão de soja pode apresentar até 100% de sua proteína bruta, solúvel em KOH. Contudo, observa-se que à medida que o grão é submetido ao processamento térmico para inativar os fatores antinutricionais, a solubilidade da proteína é reduzida (RUNHO, 2009). Wiriyampaiwong et al. (2004) verificaram que a redução da

solubilidade proteica depende basicamente do processo de aquecimento e das condições operacionais, como tempo e temperatura utilizados.

Para a classificação da farinha de soja em relação à quantidade de proteína solúvel encontrada, considera-se que a concentração entre 70 a 85% seja indicativa de processamento térmico adequado. Teores de proteína solúvel acima de 85% indicariam a ocorrência de diminuição da digestibilidade de aminoácidos (ARABA e DALE, 1990). Machado et al. (2008) encontraram solubilidade de 82,5% para o cultivar convencional e 84,1% para o cultivar sem Kunitz e lectina, ambos submetidos à 121° C por 15 minutos em autoclave.

### **3.5. Biodisponibilidade de ferro**

A anemia por deficiência de ferro é um problema de saúde pública que afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento, com graves conseqüências para a saúde humana, para o desenvolvimento econômico e social (WHO, 2008). Pode ser causada por ingestão inadequada, baixa absorção, perda sanguínea crônica ou aumento das necessidades, como na infância, adolescência e gravidez (BOCCIO e IYENGAR, 2003).

Considerando que as fontes vegetais apresentam o ferro em sua forma menos biodisponível, é interessante eliminar ou reduzir a concentração de qualquer fator antinutricional que possa complexar com tal elemento, especialmente em dietas vegetarianas.

Os estudos de biodisponibilidade tem mostrado que o metabolismo dos nutrientes não pode ser considerado de maneira isolada. Fatores nutricionais e fisiológicos podem interferir na absorção, no transporte e no armazenamento. A interação entre os nutrientes é um dos fatores que pode interferir na biodisponibilidade (LOBO e TRAMONTE, 2004).

Tais estudos de biodisponibilidade de ferro visam identificar a capacidade de determinado produto fornecer ferro biodisponível ao organismo para prevenir ou auxiliar na recuperação da anemia e que influenciará em um melhor planejamento alimentar e em intervenções dietéticas mais eficientes no tratamento da anemia ferropriva. Martino et al. (2007) observaram que cultivares de soja, convencional e sem lipoxigenases tiveram a biodisponibilidade de ferro comprometida, possivelmente pela concentração de ácido fítico nas farinhas de soja sem casca.

Johnson et al. (1987) encontraram em farinhas de soja com baixo teor de lipídios, Valor Biológico Relativo (VBR) de 96% em relação ao controle sulfato ferroso (100%), em estudo de biodisponibilidade de ferro em ratos.

Felix e Canniatti-Brazaca (2008) avaliaram por diálise a disponibilidade do ferro da soja em diferentes tratamentos térmicos. O tratamento prévio foi maceração dos grãos em água deionizada, descarte da água, retirada da casca, secagem em estufa por 8 horas e tostagem em forno a gás à temperatura de 220° C, por 10, 15, 45, 50 e 60 minutos. À medida que aumentou a temperatura melhorou a disponibilidade de ferro nas farinhas de soja, que variou de 95 a 122%. Entretanto, em estudo com animais, Tuyet Mai et al. (2002) encontraram VBR de 31% para proteína de soja em relação a caseína.

### **3.6. Proteína da soja**

Os primeiros nutrientes a serem considerados essenciais para o organismo foram as proteínas. A palavra vem do grego e significa “de primeira importância”. Podem ser de origem exógena, que são provenientes de dieta, ou endógena, que são aquelas derivadas da descamação das proteínas celulares do próprio organismo (STIPANUK, 2006).

Possuem funções estruturais, reguladoras, de defesa e de transporte nos fluidos biológicos, sendo indispensáveis para o crescimento e manutenção da vida (BORSOI, 2001).

As proteínas da dieta são envolvidas na síntese das proteínas teciduais e outras funções metabólicas. Nos processos anabólicos, fornecem os aminoácidos necessários para a construção e manutenção dos tecidos orgânicos. Também desempenham papel na formação de enzimas, anticorpos e hormônios. Contribuem para a homeostase por meio da manutenção de relações osmóticas normais entre os líquidos corpóreos (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2008).

As necessidades proteicas e de aminoácidos tem sido objeto de muitas discussões e vem sofrendo modificações ao longo do tempo. Segundo Angelis (1999), a necessidade de proteína é a quantidade que deve ser ingerida em um determinado período de tempo para contrabalancear os gastos orgânicos neste período (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2008).

Bressani (1993) mostrou que a reduzida digestibilidade das proteínas das leguminosas é multicausal, sugerindo a ação de fatores ligados à casca (taninos), aos cotilédones (inibidores de proteases, fitatos) e ao processamento e armazenamento.

As melhores fontes são de origem animal como carnes, leites e ovos. Dentre os alimentos de origem vegetal a soja é uma excelente fonte proteica. O teor de proteína entre os cultivares estudados (comercial, triplo nula, sem LOX e sem KTI, sem LOX e com KTI, com LOX e sem KTI, com LOX e com KTI) varia de 31,32 a 44,07%

(VIEIRA et al., 1999; MONTEIRO et al., 2004; CIABOTTI et al., 2006; SILVA et al., 2006; MARTINO et al., 2007; MENDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; TOLEDO et al., 2007; FELIX e CANNIATTI-BRAZACA, 2008). Entretanto, o seu aproveitamento biológico é inferior às proteínas de origem animal, por ser limitante em aminoácidos sulfurados e por conter fatores antinutricionais (WANG et al., 2000; MONTEIRO et al., 2004).

Monteiro et al. (2004) estudaram cultivares de soja isenta de inibidor de tripsina e, ou lipoxigenases, tratados a 89° C por 5 minutos em calor seco e com retirada da casca. Encontraram valores de PER baixos, variando entre 30,85 a 39,63 em relação à caseína. Entretanto, a digestibilidade verdadeira foi elevada, variando de 88,2 a 92,5% comparada a caseína. Machado et al. (2008) encontraram em dois cultivares de soja, tratados em autoclave a 121° C, por 5, 10, 15 e 25 minutos, melhores valores de PER (59,01 e 74,07), em relação à caseína. A digestibilidade verdadeira também apresentou bons resultados, 83,9 e 90,9% comparada à caseína.

Os programas de melhoramento de soja tem se concentrado no desenvolvimento de variedades mais produtivas, e mais recentemente, há também uma preocupação com características de qualidade, como conteúdo e composição da proteína de reserva. Esses novos cultivares necessitam ser caracterizadas sob o ponto de vista nutricional (GONÇALVES et al., 2007), pois o aproveitamento biológico de uma proteína vegetal está condicionado ao processamento do produto, ao seu perfil de aminoácidos essenciais e a presença de compostos antinutricionais.

### **3.7. Processamento térmico**

Para o emprego da soja na indústria de alimentos e na nutrição humana, existe a necessidade de submetê-la a processamentos que preservem e melhorem o aproveitamento de seus nutrientes, inativando ou reduzindo a concentração de fatores antinutricionais, como ácido fítico e inibidores de tripsina (MENDES et al., 2007).

A aplicação de calor é a maneira mais utilizada para se eliminar fatores antinutricionais termolábeis. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para inativar fatores antinutricionais, como extrusão, autoclavagem, tostagem com ar quente ou com vapor, cozimento e aplicação de microondas. Embora sejam diferentes, todas elas estão baseadas na aplicação de calor na matriz proteica da soja, resultando em desnaturação proteica de lectinas, inibidores de proteases (WHITE et al., 2000; WIRIYAUMPAIWONG et al., 2004; MACHADO et al., 2008) e inativação de ácido fítico (MARTINO et al., 2007).

Wiriyumpaiwong et al. (2004), estudando diferentes processamentos térmicos para a soja aplicando calor seco (radiação infravermelho) e úmido (extrusão), encontraram uma constante entre a temperatura e a umidade. Quanto menor o teor de umidade, melhor a inativação da urease. Isso explica por que a técnica de infravermelho utilizado no seu estudo foi melhor que a extrusão.

Segundo Machado et al. (2008) o tratamento térmico em autoclave a 121° C, por 5, 10, 15 e 25 minutos, foi eficaz na inativação da maioria dos fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e lectinas sem comprometer a qualidade proteica. O tempo de 15 minutos foi o mais adequado. Porém, se o tratamento térmico for inadequado e excessivo haverá perda da qualidade nutritiva da soja, uma vez que elevadas temperaturas podem provocar reações químicas com alguns aminoácidos, que afetarão a absorção e a solubilidade de certos aminoácidos (MENDES et al., 2007).

A lisina é um aminoácido sensível ao calor, por isso é considerado um indicador de qualidade proteica. Wiriyumpaiwong et al. (2004) avaliaram diferentes processamentos térmicos para a soja como radiação infravermelho, cama de secagem e extrusão. O teor de lisina da soja sem tratamento foi de 5,25%, e com os diferentes tratamentos foi de 4,05 a 4,45, não havendo diferença estatística.

### **3.8. Justificativa**

A soja é uma leguminosa de importante significado na alimentação humana em decorrência de suas propriedades nutricionais e funcionais. Com o melhoramento genético, surgem novos cultivares com sabor melhorado e com composição química modificada, conduzindo à necessidade de estudos para avaliar a concentração de nutrientes e de fatores antinutricionais. Acredita-se que o novo cultivar UFVTN 105AP desenvolvido no BIOAGRO, com alto teor proteico, possa contribuir com proteína e ferro de alta biodisponibilidade e que o tratamento térmico a 150° C por 30 minutos possibilite o uso da soja com casca, a fim de aumentar sua contribuição como fonte de fibra alimentar e de outros nutrientes.

### 3.9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARABA, M. e DALE, N.M. Evaluation of protein solubility as an indicator of underprocessing of soybean meal. **Poultry Science**, v.69, n.10, p.1749-1752, 1990.

ANGELIS, R.C.D. **Fome oculta: impacto para a população do Brasil**. São Paulo: Atheneu, p.236. 1999.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. e LAASKO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods Enzymology**, v.71, p.441-451, 1981.

BEHRENS, J.H. e SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.431-439, 2004.

BOCCIO, J.R. e IYENGAR, V. Iron deficiency: causes, consequences, and strategies to overcome this nutritional problem. **Biol Trace Elem Res**, v.94, n.1, p.1-32, 2003.

BOHN, L.; MEYER, A.S. e RASMUSSEN, S.K. Phytate: Impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v.9, n.3, p.165-191, 2008.

BONETI, L.P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S. e MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981, p.1-16.

BORGES, S.A.; SALVADOR, D. e IVANOVSKI, A. **Utilização da soja desativada na dieta de monogástricos**. Simpósio Sobre Ingredientes Na Alimentação Animal. Campinas: CBNA, 2003. 21-66 p.

BOUIS, H.E.; GRAHAM, R.D. e WELCH, R.M. The Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR) Micronutrients Project: Justification and objectives. **Food and Nutrition Bulletin**, v.21, n.4, p.374-381, 2000.

BRANDON, D.L. e FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6635-42, 2002.

BRASIL, A.P.R. **Avaliação bioquímica e nutricional de farinha de soja processada enzimaticamente para remoção dos oligossacarídeos de rafinose**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Reviews International**, v.9, p.237-297, 1993.

CARVALHO, M.R.B.; KIRSCHNIK, P.G.; PAIVA, K.C. et al. Avaliação da atividade dos inibidores de tripsina após digestão enzimática em grãos de soja tratados termicamente. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, n.3 2002.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G. et al. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxygenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.920-929, 2006.



**CONAB.** Companhia Nacional de Abastecimento. Central de Informações Agropecuárias. Safras. Disponível em: <[http://http://www.conab.gov.br/](http://www.conab.gov.br/)>. Acesso em: 10 de maio de 2008.

DAVIDSSON, L.; DIMITRIOU, T.; WALCZYK, T. et al. Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. **British Journal of Nutrition**, Switzerland, v.85, p.59-63, 2001.

DEAK, N.A. e JOHNSON, L.A. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.84, n.4, p.369-376, 2007.

DEMAEYER, E. **Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care. A guide for health administrators and programme managers.** Geneva: WHO, 1989.

DERHAM, O. e JOST, T. Phytate-protein interactions in soybean extracts and manufacture of low-phytate soy protein products. **Journal Food Science**, v.44, p.596-600, 1979.

DOMÍNGUEZ, B.M.; GÓMEZ, M.V.I. e LEÓN, F.R. Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. **ALAN**, Caracas, v.52, set. 2002.

EMBRAPA. **Sistema de produção 11: Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil.** Embrapa Soja. Londrina, p.225. 2007

ESTEVEZ, E.A. e MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12.** FAO/ WHO Expert Consultation, Rome, n.23, 1988.

FELIX, M.A. e CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Disponibilidade de ferro in vitro de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.78-83, 2008.

FORD, J.; MUSTAKAS, G.C. e SCHMUTZ, R.D. Phytic acid removal from soybeans by a lipid-protein concentrate process. **J Am Oil Chem Soc**, v.55, p.371-376, 1978.

GONÇALVES, C.A.; SOARES, N.S.; BOLINA, C.O. et al. Influência da Temperatura no Acúmulo de Proteínas em Sementes de Soja. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.1038-1040, 2007.

HURRELL, R.; REDDY, M.; JUILLERAT, M. et al. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v.77, p.1213-1219, 2003.

HURRELL, R.F. Bioavailability of iron. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.51, n.Suppl.1, p.4-8, 1997.

JOHNSON, C.D.; WEAVER, C.M. e GORDON, T.D. A comparison of the hemoglobin regeneration bioassay and absorption of a radio-iron test meal for assessing iron bioavailability. **Nutrition research**, v.7, p.183-196, 1987.

KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **Journal American of Oil Chemical Society**, v.56, p.242-258, 1979.

KUMAGAI, H.; ISHIDA, S.; KOIZUMI, A. et al. Preparation of phytate-removed deamidated soybean globulins by ion exchangers and characterization of their calcium-binding ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.172-176, 2002.

KUNITZ, M. Crystallization of trypsin inhibitor from soybeans. **Science**, v.101, p.668-669, 1945.

LAZZARI, E.N. e BELÉIA, A.D.P. **Análise de ácido fítico e minerais nos processos de maceração e cocção de soja** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

LOBO, A.S. e TRAMONTE, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, p.107-113, 2004.

MACHADO, F.P.P.; QUEIRÓZ, J.H.; OLIVEIRA, M.G.A. et al. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. **Food Chemistry**, v.107, n.2, p.649-655, 2008.

MACPHAIL, A. Iron deficiency and the developing world. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.51, n.1, p.2-6, 2001.

MAHAN, L.K. e ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia: 12ª**. São Paulo: Roca, p.1376. 2008.

MANDARINO, J.M.G. Composto antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. In: COSTA, N.M.B. e PELUZIO, M.C. **Alimentos Funcionais: benefícios para a saúde**. Viçosa: UFV, 2008, p. 55-80.

MARTINO, H.S.D.; MARTIN, B.R.; WEAVER, C.M. et al. Zinc and iron bioavailability of genetically modified soybeans in rats. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.689-695, 2007.

MENDES, F.Q.; OLIVEIRA, M.G.A.; CARDOSO, L.R. et al. Digestibilidade proteica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina Kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Journal of Biosciences**, v.23, p.14-21, 2007.

MENDES, W.S. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes tratamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.207-213, 2004.

MIURA, E.M.Y.; FERREIRA DA SILVA, R.S.D.S.; MIZUBUTI, I.Y. et al. Cinética de Inativação de Inibidores de Tripsina e de Insolubilização de Proteínas de Diferentes Cultivares de Soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1659-1665, 2005.

MONTEIRO, M.R.P.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.D.A. et al. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.195-205, 2004.

MONTEIRO, M.R.P.; MOREIRA, M.A.; COSTA, N.M.B. et al. Avaliação da Digestibilidade Proteica de Genótipos de Soja com Ausência e Presença do Inibidor de Tripsina Kunitz e Lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.6, n.1, p.99-107, out. 2003.

MOREIRA, M.A. **Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvida na UFV**. Congresso Brasileiro de soja: Embrapa-SPI: p.99-104, 1999.

MÜLLER, L. Taxionomia e morfologia. In: S. M. Miyasaka, J. C. **A soja no Brasil**. 1ª ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981, p.65-104.

NEUMAN, N.; TANAKA, O. e SZARFAC, S. Prevalência e fatores de risco para anemia no sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.34, n.1, p.56-63, 2000.

OLIVEIRA, M.I.P.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C. et al. Protein, oil, and isoflavone contents in lipoxygenase- and Kunitz trypsin inhibitor-deficient soybean seeds. **Chromatographia**, v.66, p.521-527, 2007.

OMOSAIYE, O. e CHERYAN, M. Low-phytate, full-fat protein product by ultrafiltration of aqueous extracts of whole soybeans. **Cereal Chemistry**. v.56, p.58-62, 1979.

OSÓRIO, M.M. Fatores determinantes da anemia em crianças. **J. Pediatr.**, v.78, n.4, p.269-278, 2002.

PENHA, L.A.O.; FONSECA, I.C.B.; MANDARINO, J.M. et al. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.25, p.91-102, jan/jun. 2007.

RUNHO, C.R. **Farelo de soja: Processamento e qualidade**. Disponível em: <[http://www.polinutri.com.br/conteúdo\\_artigos\\_anteriores\\_janeiro.htm](http://www.polinutri.com.br/conteúdo_artigos_anteriores_janeiro.htm)>. Acesso em: 08 de março 2009.

SAITO, T.; KOHNO, M.; TSUMURA, K. et al. Novel method using phytase for separating soybean b-conglycinin and glycinin. **Biosci. Biotechnol Biochem.**, v.65, p.884-887, 2001.

SILVA, M.R. e SILVA, M.A.A.P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v.12, n.1, p.21-32, 1999.

SILVA, M.S.; NAVES, M.M.V.; DE OLIVEIRA, R.B. et al. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.571-576, 2006.

STIPANUK, M.H. **Biochemical, Physiological & Molecular Aspects of Human Nutritions**. 2. ed. Philadelphia: W B Saunders Company, 1232 p, 2006.

TEIXEIRA, A.I. **Herdabilidade e correlação entre concentrações de proteína em soja avaliadas por diferentes metodologias**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003. 53 p.

TOLEDO, T.C.F.; BRAZACA, S.G.C.; ARTHUR, V. et al. Composição, digestibilidade proteica e desaminação em cultivares brasileiras de soja submetidas à radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.812-815, 2007.

TUYET MAI, T.T.; TAKASAKI, S.; YASUE, M. et al. Comparison of ingestive effects of brewer's yeast, casein, and soy protein on bioavailability of dietary iron. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.48, n.4, p.298-304, 2002.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 16 de março de 2009

VASCONCELOS, I.M.; MAIA, A.A.B.; SIEBRA, E.A. et al. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, n.1, p.55-62, 2001.

VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C. e PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.

WANG, S.H.; FERNANDES, S.M. e CABRAL, L.C. Solubilidade de nitrogênio, dispersibilidade de proteína e propriedades emulsificantes dos extratos hidrossolúveis desidratados de arroz e soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, 2000.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO global database on anaemia**. WHO, p.51. 2008.

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

YAKLINCH, R.W.  $\beta$ -conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.729-735, 2001.

## 4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Desenvolvidos de Novos Produtos e Análise Sensorial, Nutrição Experimental, Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde - UFV, laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos e laboratórios de Proteínas e de Análises Químicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa-MG. A determinação de aminoácidos foi realizada no Centro de Química de Proteínas no Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP. A determinação de ácidos fítics foi realizada no Centro de Biologia Molecular no *Federal Research Centre for Nutrition and Food* (Alemanha, Dr. Ralph Greiner).

### 4.1. Aquisição e elaboração de produtos de soja

O novo cultivar UFVTN 105AP destinado à alimentação humana foi fornecido pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. É um cultivar geneticamente melhorado, desenvolvido sem as enzimas lipoxigenases: LOX1, LOX2 e LOX3 em seus grãos, denominado triplo nula (TN), tornando-o de sabor mais adequado ao paladar dos consumidores ocidentais.

O novo cultivar foi desenvolvido utilizando o método dos retrocruzamentos. O progenitor recorrente utilizado foi o cultivar Monarca e os progenitores doadores para ausência das lipoxigenases LOX1, LOX2 e LOX3 foram cultivares japoneses, enquanto o genótipo doador de alelos para alto teor proteico foi a variedade americana BARC-8. Inicialmente foram desenvolvidas separadamente isolinhas de Monarca com ausência das lipoxigenases (seis retrocruzamentos) e com alto teor proteico (quatro retrocruzamentos), após a obtenção dessas isolinhas estas foram cruzadas e após quatro gerações de autofecundações foram selecionadas plantas com ausência de lipoxigenases e alto teor proteico. As sementes da UFVTN 105AP foram plantadas em campo experimental da COOPADAP em São Gortado, Minas Gerais, em novembro de 2006 e colhidas em abril de 2007.

O cultivar de soja foi submetido a dois tratamentos, para a elaboração de farinha de soja com casca e sem casca.

#### **4.1.1. Farinha de soja**

Os grãos de soja foram selecionados retirando as impurezas e sujidades e lavados em água corrente. Posteriormente, toda a água foi drenada e os grãos foram espalhados em tabuleiros, permanecendo à temperatura ambiente por uma noite. A seguir, foram submetidos à temperatura de 150° C por 30 minutos em estufa com circulação de ar (Nova Ética<sup>®</sup>, modelo 400/6ND, Vargem Grande Paulista, Brasil) resfriados e armazenados em sacos plásticos. Para a produção de farinha de soja com casca, os grãos foram moídos em um moinho de faca (Brabender<sup>®</sup>, modelo Rotary Mill, Duisburg, Alemanha) e passados por uma peneira de 20 mesh (0,84 mm).

Para a produção da farinha de soja sem casca, os grãos após tratamento térmico foram quebrados em um mini processador de forma a resultar em pedaços grandes, promovendo assim a separação das cascas secas. As cascas foram descartadas e os grãos em pedaços foram moídos por moinho de faca e passados por peneira de 20 mesh (0,84 mm).

A produção da farinha de soja com casca e sem casca foi realizada em três repetições.

### **4.2. Caracterização dos produtos de soja**

#### **4.2.1. Proteínas**

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método micro Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total, descrito pela AOAC (1997), utilizando fator de conversão igual a 6,25.

#### **4.2.2. Lipídios**

A determinação de lipídios foi realizada por extração em aparelho Soxhlet, utilizando éter etílico com extrator, por 8 horas, sob refluxo, de acordo com a AOAC (1997).

#### **4.2.3. Umidade**

A umidade foi determinada por secagem a 105° C em placas previamente taradas, e submetidas a aquecimento em estufa de circulação forçada de ar (Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 035, Piracicaba, Brasil), até peso constante, conforme o procedimento descrito pela AOAC (1997). Após a secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica gel e pesadas em balança analítica digital, com precisão de 0,0001g. A umidade foi calculada pela diferença entre a amostra úmida e seca.

#### **4.2.4. Cinza**

Para determinação do teor de cinzas, as amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados e submetidos à calcinação em mufla (Quimis<sup>®</sup>, modelo 318, Diadema, Brasil) à 550° C. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador com sílica gel e novamente pesados em balança analítica digital. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso antes e após a calcinação, segundo o método descrito pela AOAC (1997).

#### **4.2.5. Carboidratos**

O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, lipídio, fibra alimentar, umidade e cinza (ANVISA, 2001).

#### **4.2.6. Energia**

O conteúdo calórico foi determinado de acordo com a composição do alimento em termos de proteínas, lipídios e carboidratos, onde foram utilizados fatores de conversão 4, 9 e 4 kcal/g de alimento, respectivamente.

#### **4.2.7. Minerais**

A análise foi realizada de acordo com Gomes et al. (2003) com modificação para ácido nítrico. As amostras foram pesadas em balança analítica, aproximadamente 1 g, em triplicata, em papel manteiga e foi transferido para um tubo de digestão. Foi adicionado aos tubos, 10 mL de ácido nítrico em capela de exaustão de gases à temperatura ambiente. O bloco digestor foi ligado e a temperatura foi aumentada gradativamente, até atingir 150° C, durante 16 horas. Quando houve material aderido à parede do tubo ou uma diminuição excessiva do volume da mistura no tubo de digestão, foi adicionado mais 5 mL de ácido nítrico, e agitado em vortex.

Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco para esfriar. As amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, e os tubos foram lavados com água deionizada (3 vezes) e agitado em vortex. Diluições apropriadas foram realizadas utilizando água deionizada.

Todo material, como vidrarias, foram desmineralizados em solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 10% por 24 horas, com posterior lavagem (3 vezes) em água deionizada, para evitar contaminações durante a análise.

Após a digestão, foram adicionados 5 mL (10%) de solução de cloreto de estrôncio hexahidratado ( $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) às soluções minerais das amostras para a determinação de cálcio e magnésio, a fim de evitar a subestimação dos resultados que ocorrem quando esses íons se encontram complexados com silicatos e fosfatos.

A concentração de ferro, zinco, cálcio, manganês, magnésio e cobre foi determinada analiticamente nas soluções minerais preparadas, por espectrofotometria de absorção atômica (GBC<sup>®</sup>, modelo 908 AA, São Paulo, Brasil). Para os minerais sódio e potássio a leitura foi realizada em espectrofotômetro de chama (Corning<sup>®</sup>, modelo 400, São Paulo, Brasil).

#### **4.2.8. Ácido fítico**

Antes da extração dos diferentes mio-inositol fosfatos, as farinhas de soja foram liofilizadas em *freeze-drier*. A quantificação de ácidos fíticos foi realizada segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990) e o método cromatográfico (Ultrasep<sup>®</sup>, modelo, ES 100 RP18, Leonberg, Alemanha), proposto por Sandberg e Ahderinne (1986).

Foi pesado cerca de 1 g de farinha desidratada em triplicata e a extração foi feita com 20 mL de HCl 2,4% por 3 h, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 30.000 x g por 30 minutos, 1 mL do sobrenadante foi diluído com 25 mL de água e colocado na coluna (0,7 x 15 cm) contendo AG1-X8, resina 100-200 mesh. A coluna foi lavada com 25 mL de água e 25 mL de HCl 25 mM. Os mioinositois fosfatos foram eluídos com 20 mL de HCl 2 M. Os eluentes obtidos foram concentrados em evaporador rotatório até secagem completa e o resíduo foi dissolvido em 1 mL de água. 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), com uma velocidade de fluxo de 0,2 mL/min, 45°C, e ácido fórmico: metanol: água: hidróxido de tetrabutyl amônia (44:56:5:1,5 v/v), pH 4,25, como fase móvel. Uma mistura de ésteres de mioinositois fosfatos foi utilizada como padrão.

A razão molar fitato:ferro e fitato:zinco foi determinada dividindo o total de fitato das farinhas pelo teor de ferro e zinco.

#### **4.2.9. Determinação de fibra alimentar total e insolúvel**

A determinação dos teores de fibra alimentar total (FAT) e fibra alimentar insolúvel (FAI) das amostras de farinha de soja foi feita de acordo com o método enzimático gravimétrico (AOAC, 1992), utilizando-se para a hidrólise enzimática  $\alpha$ -amilase termoresistente, protease e amiloglicosidase (Total dietary fiber assay kit,



SIGMA), com modificações. Para a filtração utilizou-se cadinhos de vidro com placa de vidro sintetizado com porosidade nº. 2 (ASTM 40-60) e celite como auxiliar de filtração. As fibras solúveis (FAS) foram obtidas por diferença entre FAT e FAI.

#### **4.2.9.1. Preparo de cadinhos**

Os cadinhos foram deixados de molho com detergente neutro a 20% durante 24 horas. Foram enxaguados com água destilada e com vácuo, e também no sentido oposto. Foram secos em estufa a 105° C por 1 h e incinerados em mufla (Quimis<sup>®</sup>, modelo 318, Diadema, Brasil) a 525° C por 5 h. Foram resfriados até 105° C na mufla. Em seguida, foram lavados 5 vezes com 20 mL de HCl 0,5 N e posteriormente enxaguados três vezes com 20 mL de água destilada no sentido oposto. Os cadinhos foram secos em estufa a 105° C por 12 horas e pesados. Foi pesado 1 g de celite e adicionado aos cadinhos, que foram secos novamente a 105° C por 12 h e posteriormente pesados.

#### **4.2.9.2. Obtenção do hidrolisado**

Foi pesado em duplicata em torno de 1 g de amostra (com precisão de 0,1mg), em um béquer de 600 mL. Foi adicionado em cada béquer 50 mL de tampão fosfato pH 6,0. O pH foi ajustado para  $6,0 \pm 0,2$  adicionando se necessário NaOH 0,275 ou HCl 0,325 N. Na solução foi adicionado 0,1 mL de  $\alpha$ -amilase termoresistente. O béquer foi tampado com folha de alumínio e aquecido em banho-maria (Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 093, Piracicaba, Brasil) em ebulição por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. As amostras foram esfriadas a temperatura ambiente. O pH foi ajustado para  $7,5 \pm 0,1$  adicionando em torno de 10 mL de NaOH 0,275 N. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de protease (5 mg/0,1 mL) na solução pré-digerida e o béquer novamente tampado com folha de alumínio e incubado à 60° C por 30 minutos, com agitação horizontal (100 rpm). Após o hidrolisado ser resfriado à temperatura ambiente, foi adicionado em torno de 10 mL de HCl 0,325 N com a finalidade de ajustar o pH em  $4,3 \pm 0,3$ . Finalmente, foi adicionado 0,1 mL de amiloglicosidade na solução e o béquer foi novamente tampado com folha de alumínio e incubado a 60° C por 30 minutos com agitação horizontal (100 rpm), para obtenção do hidrolisado final. O mesmo procedimento foi realizado em duplicata para o branco.

#### **4.2.9.3. Determinação da fibra alimentar total (FAT)**

O hidrolisado foi transferido para uma proveta e o volume completado para 100 mL com água destilada. O conteúdo da proveta foi transferido para o béquer. A proveta

foi lavada com parte dos 400 mL de etanol 98% aquecido a 60° C, para remover a fibra que ficou aderida às suas paredes. Foi adicionado ao béquer o restante dos 400 mL de etanol. A mistura ficou em repouso à temperatura ambiente por 4 h para que toda a fibra alimentar solúvel se precipitasse. Os cadinhos com celite utilizados para filtração do hidrolizado foram lavados com etanol a 78% utilizando bomba de vácuo. A solução alcoólica contendo o resíduo e o precipitado formado foi filtrado, sem despejar o resíduo. O resíduo foi filtrado e lavado com 20 mL de etanol a 78% (3 vezes), 20 mL de etanol a 95% (2 vezes) e 20 mL de acetona (2 vezes). Os cadinhos com o resíduo foram colocados em estufa a 105° C por uma noite e, posteriormente pesados. Metade dos cadinhos foi levado a mufla a 525° C por 5 h para determinar cinza e a outra metade foi usado para determinar proteína do resíduo. O resíduo com o celite foi homogeneizado e utilizado 200 mg para a digestão e determinação de proteína. Os cadinhos submetidos à incineração foram resfriados em dessecador e pesados, para obtenção do teor de cinzas.

Cálculo:

$$\text{FAT \%} = \frac{\text{RT} - \text{P} - \text{C} - \text{BT}}{\text{m}} \times 100$$

RT = Média do resíduo total da amostra (mg)

P = Média de proteína do RT (mg)

C = Média de cinzas do RT (mg)

m = Média do peso das amostras (mg)

BT = RT<sub>B</sub> - P<sub>B</sub> - C<sub>B</sub>

RT<sub>B</sub> = Média do resíduo total do Branco (mg)

P<sub>B</sub> = Média de proteína do RT<sub>B</sub> (mg)

C<sub>B</sub> = Média de cinzas do RT<sub>B</sub> (mg)

#### **4.2.9.4. Determinação da fibra alimentar insolúvel (FAI)**

Os cadinhos com celite foram lavados com água destilada usando bomba de vácuo. O hidrolizado contendo o resíduo foi transferido quantitativamente para os cadinhos e filtrados à vácuo. O resíduo nos cadinhos foram lavados com 10 mL de água destilada (3 vezes), 20 mL de etanol a 95% (2 vezes) e 20 mL de acetona (2 vezes). Os cadinhos com o resíduo foram colocados em estufa a 105° C, por uma noite e em seguida pesados. A quantificação de proteína e cinza dos resíduos seguiu o mesmo procedimento da FAT citado anteriormente, no item 4.2.9.3.

Cálculo:

$$\text{FAI \%} = \frac{\text{RI} - \text{P} - \text{C} - \text{BI}}{m} \times 100$$

RI = Média do resíduo insolúvel da amostra (mg)

P = Média de proteína do RI (mg)

C = Média de Cinzas do RI (mg)

m = Média do peso das amostras (mg)

BI = RI<sub>B</sub> - P<sub>B</sub> - C<sub>B</sub>

RI<sub>B</sub> = Média do resíduo insolúvel do branco (mg)

P<sub>B</sub> = Média de proteína do RI<sub>B</sub> (mg)

C<sub>B</sub> = Média de cinzas do RI<sub>B</sub> (mg)

#### **4.2.10. Determinação e Quantificação dos Aminoácidos.**

##### **4.2.10.1. Hidrólise ácida em solução**

A hidrólise ácida de proteínas e peptídeos foi realizada para se quantificar os aminoácidos: lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina.

Alíquotas de amostras contendo cerca de 20,0 a 60,0 nmoles em proteína (ou 5-10 mg de sólidos previamente desengordurados) foram transferidas para ampolas de borossilicato de 10x150 mm (Pyrex<sup>®</sup>) que foram previamente pirolisadas a 400° C por 8 horas. Nos casos em que o volume da solução foi maior que 0,1 mL, as amostras foram concentradas em concentrador rotatório (Savant<sup>®</sup>, modelos SpeedVac AS290 ou AS160). Foram adicionados 0,5 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 6 N, bidestilado a 104° C, contendo 0,1% de fenol (m/v). Cada ampola contendo amostra e HCl foi selada, sob vácuo. Estas ampolas foram colocadas em uma mufla a 110° C, por 22 horas (MOORE et al., 1958). Variações de tempo como 48 e 72 horas também foram realizadas, para verificar a liberação de aminoácidos hidrofóbicos.

Após a hidrólise ácida em solução, a amostra foi seca em concentrador rotatório e ressuspensa em solução tampão de citrato de sódio 0,17 M, pH 2,2, contendo polietilenoglicol 400 a 15% (v/v) e tioglicol 0,4% (v/v).

#### **4.2.10.2. Hidrólise alcalina**

Para a quantificação de triptofano foi necessária fazer uma hidrólise alcalina com hidróxido de lítio 4 N, segundo técnica descrita por Lucas e Sotelo (1980).

Amostras contendo aproximadamente 40-80 nmols de proteína (ou 10-20 mg de sólido) foram transferidas para ampolas de borossilicato de 10x150 mm (Pyrex<sup>®</sup>) que foram previamente pirolisadas a 400° C por 8 horas. Nos casos em que o volume da solução foi maior que 0,1 mL, as amostras foram concentradas em concentrador rotatório (Savant<sup>®</sup>, modelos SpeedVac AS290 ou AS160). Foram adicionados 0,5 mL de solução aquosa de hidróxido de lítio 4 N. Cada ampola contendo amostra e LiOH foi selada, sendo anteriormente feito vácuo na mesma. Estas ampolas foram colocadas em uma mufla à 110° C, por 24 horas. (LUCAS e SOTELO, 1980).

Após a hidrólise alcalina, a amostra foi neutralizada com 0,12 mL de ácido ortofosfórico e filtrada em membrana de 0,45 µm, para eliminar precipitados. Na amostra foi adicionado polietilenoglicol 400 para 15% (v/v), e uma solução tampão de citrato de sódio 0,17 M, pH 2,2, contendo tiodiglicol 0,4% (v/v) para completar o volume de 5,0 mL em balão volumétrico.

#### **4.2.10.3. Aplicação da amostra no aparelho**

O analisador de aminoácidos, Nicolas V (construído no Centro de Química de Proteínas), consiste de duas colunas de troca iônica, sendo uma longa que separa aminoácidos ácidos e neutros, e uma curta que separa aminoácidos básicos e triptofano. Alíquotas entre 0,01 e 0,9 mL foram aplicadas nas colunas de troca catiônica (Resina: PC 6A Amino acid Analysis Resin Pierce) e eluídas por diferenças de pH e força iônica (coluna curta pH 5,28; coluna longa pH 3,25 e posteriormente 4,25) (MOORE et al., 1958).

Após a separação cromatográfica, os aminoácidos eluídos da coluna reagiram com ninidrina a uma temperatura de aproximadamente 100° C (banho de água em ebulição), por 15 minutos e os produtos desta reação foram detectados colorimetricamente em dois comprimentos de onda: 440 nm para a prolina (cubeta de 6 mm de caminho óptico) e 570 nm para os demais aminoácidos (em uma cubeta de caminho óptico de 12 mm).

A identificação dos picos foi realizada com base nos tempos de retenção de cada resíduo. O aparelho foi padronizado com uma solução padrão de aminoácidos que continha 40 nmoles de cada resíduo injetado. A altura dos picos foi utilizada para calcular o fator, assumindo-se que cada pico apresenta uma forma gaussiana. Estas

medidas foram realizadas manualmente (ALONSO e HIRS, 1968) e os dados de linha de base e altura máxima foram processados por uma planilha desenvolvida no próprio Nicolas V. Este aparelho está otimizado para operar em uma faixa linear de 30 a 60 nmoles, dependendo do resíduo considerado, e para cálculos realizados com base na altura total dos picos.

#### **4.2.11. Determinação da atividade de urease**

A determinação da atividade ureática foi realizada em triplicata, de acordo com o método descrito pela AOCS (1978). O método consiste na avaliação da diferença de pH da amostra teste e do branco, que indica a atividade da urease.

Foram pesados 0,2 g de amostra com granulometria de 20 mesh (0,84 mm) e colocado em tubo de ensaio, onde foi adicionado solução tamponada de uréia (7,5 g de uréia por litro em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0). Foi preparado também um branco contendo 0,2 g de amostra em 10 mL de tampão fosfato. Ambas as misturas foram homogeneizadas e colocadas em banho-maria (Fanem<sup>®</sup>, modelo 100, São Paulo, Brasil) a 30° C ( $\pm 1$ ), durante 25 minutos com agitação manual a cada 5 minutos. Após este período os tubos foram retirados do banho-maria, deixados em repouso por 5 minutos e as leituras dos valores de pH foram efetuadas.

#### **4.2.12. Determinação da solubilidade proteica**

A determinação da solubilidade proteica foi realizada em triplicata, com base na metodologia publicada no Diário Oficial da União, seção 1-19818 (BRASIL, 1991). O método baseia-se na extração e determinação da fração de nitrogênio da amostra solúvel em solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2%, sendo o resultado expresso em percentagem de nitrogênio solúvel em relação ao nitrogênio total contido na amostra. A partir da concentração de nitrogênio, se calculou a porcentagem de proteína da amostra. O fator mais usado é 6,25, baseado no fato de que a maioria das proteínas contém 16% de nitrogênio.

Foram pesados cerca de 2 g de amostra com granulometria de 100 mesh (0,15 mm) e transferidos para erlenmeyer de 250 mL, acrescentando-se 100 mL de solução de KOH 0,2%. O erlenmeyer foi colocado em banho-maria com agitação a 150 rpm (Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 093, Piracicaba, Brasil), a 25° C por 20 minutos. Após agitação, as amostras foram centrifugadas (Beckman<sup>®</sup>, modelo J2 MI, São Paulo, Brasil) a 3840 x g por 15 minutos, à 25° C. Foram pipetados 15 mL do sobrenadante para a quantificação

da proteína solúvel com base no método *kjeldalh*, descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (PREGNOLATTO e PREGNOLATTO, 1985).

O cálculo da solubilidade proteica foi realizado utilizando a equação que segue:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Proteína solúvel em KOH}}{\text{Proteína Total}} \times 100\%$$

#### **4.2.13. Determinação da atividade de inibidor de proteases**

##### **4.2.13.1. Reagentes e soluções**

Tripsina pancreática bovina (tipo III) e o substrato sintético n-benzoil-D,L-arginina- $\rho$ -nitroanilida (D,L-BApNA) foram obtidos da Sigma Chemical Co. Soluções estoque de tripsina foram preparadas em HCl 0,001 M (1,25 mg de tripsina em 1 mL de HCl 0,001 M) e armazenadas a -20° C. Durante a determinação da atividade, a enzima foi mantida em banho de gelo.

Solução estoque de D,L-BApNA 60 mM foi preparada a partir de 130,47 mg de substrato em 5 mL de dimetilsulfóxido e armazenada a -20° C. A concentração da solução utilizada nos experimentos foi de 1,2 mM, sendo preparada a partir de 200  $\mu$ L do estoque diluídos em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM.

##### **4.2.13.2. Extração dos inibidores**

Em 100 mg da amostra desengordurada foram adicionados 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Esta suspensão foi agitada por 3 horas a temperatura ambiente em agitador de erlenmeyer. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 35.600 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi congelado a -20° C até o momento de ser utilizado para a determinação da atividade dos inibidores de protease com base na inibição da atividade de tripsina.

#### **4.2.13. Determinação da atividade inibitória de tripsina**

A determinação da atividade de tripsina foi realizada em triplicata, na presença e ausência de inibidores, segundo o método descrito por Erlanger et al. (1961) com modificações. Foram adicionados, em um tubo de ensaio, 450  $\mu$ L de tampão, 50  $\mu$ L da solução de tripsina e 100  $\mu$ L do extrato de soja. Essa mistura foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. O controle da enzima foi preparado

substituindo-se o extrato de soja por tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. O branco foi preparado adicionando todos reagentes, menos a enzima e o extrato de soja. Após 2 minutos, 500 µL dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl<sub>2</sub> 20 mM e 500 µL da solução D,L-BApNA. Esta mistura foi agitada e deixada à temperatura ambiente por 3 minutos. Logo em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL de ácido acético 60% (v/v).

A absorbância da solução foi determinada a 410 nm, em espectrofotômetro (PG Instrumental<sup>®</sup>, modelo T70+ uv/visível spectrometer, Leics, Reino Unido). A análise foi efetuada em triplicata. Os resultados foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína total da amostra, por meio da equação:

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

Onde:

A = (absorbância do controle enzimático – branco do controle) (410 nm) menos (absorbância da solução contendo extrato protéico – branco amostra) (410 nm);

B = fator de diluição da amostra;

C = fator de tripsina (0,019). Esse fator corresponde a absorbância em 410 nm do produto da atuação de 1 µg de tripsina sobre o substrato D,L-BApNA, nas condições do ensaio. Equivale dizer que 1 µg de tripsina pura atuando sobre o substrato fornece uma leitura de absorbância de 0,019, nas condições do ensaio.

P = concentração de proteína em g/mL de extrato.

#### **4.3. Informação nutricional e categorização por porção de farinha de soja com e sem casca**

Os resultados obtidos da composição centesimal e de minerais das farinhas de soja com e sem casca foram comparados com os níveis de Ingestão Dietética de Referência – DRI (IOM, 1998, 2001 e 2004), considerados na RDC 360 (BRASIL, 2003), para uma dieta de 2.000 kcal, para uma porção das farinhas. Foram consideradas as médias das recomendações das DRI para adultos de ambos os sexos. A classificação das farinhas como excelente fonte (>20 % da recomendação), boa fonte (10 a 20% da recomendação) e fonte (5 a 10% da recomendação) de nutriente foi de acordo com Philippi (2008).

#### **4.4. Biodisponibilidade de ferro de farinhas de soja com casca e sem casca**

##### **4.4.1. Preparo das dietas**

As dietas foram preparadas de acordo com a dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), indicada para animais em fase de crescimento. Foram devidamente ajustadas para fornecerem três níveis de ferro (6, 12 e 24 mg Fe/kg de dieta) procedente do sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) (dieta padrão) e da farinha de soja com e sem casca (dietas testes).

Para cálculo das dietas testes, foi utilizado o teor de ferro, fibra alimentar e a composição centesimal das farinhas de soja. A partir do teor de ferro da farinha de soja com casca e sem casca, foi estabelecida a quantidade de soja necessária para fornecer os níveis de ferro planejados. Nesta quantidade foi então calculado o teor de proteína adicionando-se albumina para completar em cada dieta a necessidade de proteína, a fim de obter dietas isoproteicas. Também os teores de fibras, carboidratos, lipídios presentes nas farinhas de soja foram usados no cálculo para preparo das dietas, para que com a complementação desses ingredientes, as dietas experimentais ficassem isocalóricas e balanceadas, segundo AIN-93G (REEVES et al., 1993).

Os ingredientes usados em maiores quantidades nas dietas foram pesados, individualmente, em balança com precisão de duas casas decimais (Marte<sup>®</sup>, modelo AS2000C, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Aqueles usados em menor proporção foram pesados em balança analítica (Shimadzu<sup>®</sup>, modelo AY220, São Paulo, Brasil). Inicialmente foram misturados manualmente em vasilhames plásticos previamente lavados e enxaguados com água deionizada, e a seguir em batedeira semi-industrial (Lieme<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), com baixa rotação, por um período de aproximadamente 15 minutos e armazenados a 10° C em sacos plásticos de polietileno, devidamente etiquetados. A composição das dietas é apresentada na Tabela 1. Albumina foi utilizada como fonte proteica nas dietas de depleção e de repleção devido ao seu teor mais baixo de ferro.



**Tabela 1** – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de biodisponibilidade de ferro (g/100g).

Ingredientes	Fase de Depleção				Fase de Repleção					
	AIN93-G modificada	Sulfato ferroso			Farinha de soja com casca			Farinha de soja sem casca		
		6 ppm	12 ppm	24 ppm	6 ppm	12 ppm	24 ppm	6 ppm	12 ppm	24 ppm
Albumina <sup>1</sup>	20,0	20,0	20,0	20,0	14,1	8,1	-	15,8	11,6	3,1
Amido Dextrinizado <sup>2</sup>	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose <sup>3</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de Soja <sup>4</sup>	7,0	7,0	7,0	7,0	4,9	2,9	-	5,6	4,1	1,2
Celulose microfina <sup>5</sup>	5,0	5,0	5,0	5,0	4,2	3,5	2,0	3,9	2,8	0,7
Farinha de soja com casca <sup>6</sup>	-	-	-	-	10,4	20,7	41,5	-	-	-
Farinha de soja sem casca <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	7,8	15,6	31,2
Mistura Mineral sem Ferro <sup>8</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica <sup>9</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Cistina <sup>10</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartrato de Colina <sup>11</sup>	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Amido de milho (qsp) <sup>12</sup>	39,8	39,8	39,8	39,8	38,1	36,5	28,3	38,7	37,6	35,5
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (mg/100g) <sup>13</sup>	-	3,0	6,0	11,9	-	-	-	-	-	-

Fonte: Adaptado de REEVES et al., 1993; isenta de ferro.

q.s.p.: quantidade suficiente para completar 1 kg.

Marca/Fornecedor:

1- Wenda Company Ltda./Agroquímica SP Comercial Ltda. 2- Amidex 182 /Com products Brasil. 3- Açúcar União / Comércio de Viçosa. 4- Soya / comércio de Viçosa. 5- Comprecel / Minjtai Chemical Company Ltda. Taiwan. 6,7- Laboratório de Novos Produtos e Análise Sensorial – UFV-MG-Brasil. 8-Laboratório de Nutrição Experimental – UFV-MG-Brasil. 9,10,11- Rhoster / Rhoster – Indústria e Comércio Ltda. 12- Pink Alimentos – Belo Horizonte / Comércio de Viçosa. 13- Vetec /Vetec – Química Fina Ltda.

#### 4.4.2. Ensaio biológico

Foram utilizados 72 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), linhagem *Wistar*, recém-desmamados, com 21 dias de idade, oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV, com peso inicial variando entre 50 e 60 g. O método utilizado para a avaliação da biodisponibilidade foi o de depleção-repleção, segundo a técnica da (AOAC, 1984), com a modificação da fase de depleção, que teve duração de três semanas. Este período foi suficiente para provocar anemia moderada.

#### **4.4.3. Fase de depleção**

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas.

Os animais receberam dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993) modificada, utilizando mistura de minerais isenta de ferro e água deionizada *ad libitum* para provocar anemia. Após o período de 21 dias de depleção foi quantificada a hemoglobina e os animais anêmicos foram divididos em grupos de 8 ratos, de acordo com a concentração de hemoglobina, de maneira que as médias dos grupos fossem as mais próximas possíveis, iniciando-se a fase de repleção.

#### **4.4.4. Fase de repleção**

Os animais receberam dietas com três níveis de ferro (6, 12, 24 ppm), sendo que o ferro do grupo controle foi proveniente do sulfato ferroso. O ferro das dietas testes foi proveniente das farinhas de soja com casca e sem casca. Nesta fase os animais foram mantidos em suas respectivas dietas experimentais por 14 dias (Tabela 1) e receberam água deionizada *ad libitum*. A ingestão de dieta foi controlada, fornecendo aproximadamente 16 g por dia. Ao final deste período, foram realizadas dosagens de hemoglobina e hematócrito dos animais e calculou-se o ganho de hemoglobina pela diferença entre os valores obtidos ao final das fases de repleção e depleção.

#### **4.4.5. Ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar**

Calculou-se o ganho de peso, o consumo alimentar dos animais durante o período de repleção por meio do monitoramento semanal do peso dos animais e do consumo alimentar. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação do ganho de peso do animal (g) pelo consumo de dieta (g).

#### **4.4.6. Valor relativo de biodisponibilidade**

O Valor Relativo de Biodisponibilidade (VRB) foi calculado estabelecendo-se a relação entre o coeficiente angular da reta obtida para farinha de soja com casca e sem casca e o coeficiente da reta referente à dieta padrão, contendo sulfato ferroso. Assim, o padrão de referência foi considerado igual a 100%, e o valor relativo de biodisponibilidade da farinha de soja com casca e sem casca foi calculado.

#### **4.4.7. Determinação de hemoglobina**

A hemoglobina foi dosada pelo método da cianometahemoglobina (HiCN), proposto pela AOAC (1984), usando kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro* (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil).

O sangue foi coletado após incisão na porção terminal da cauda do animal, por meio de gotejamento em vidro de relógio. O volume de 20 µL de sangue foi misturado a 5 mL do reagente de cor da solução de Drabkin, composta de cianeto de potássio e ácido cianídrico. Esse método baseia-se na reação colorimétrica, entre o ferro presente na hemoglobina e o cianeto da solução de Drabkin, formando cianometahemoglobina, de coloração vermelha, cuja intensidade varia de acordo com o teor de ferro presente no sangue analisado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível, (Shimadzu®, modelo UV-1601, Kyoto, Japan), no comprimento de onda de 540 nm.

Com base na média de três leituras de absorbância do padrão fornecido ( $0,5979 \pm 0,0466$  para depleção e  $0,3158 \pm 0,0323$  para repleção), calculou-se a concentração de hemoglobina (g/dL) em cada amostra de sangue a partir da concentração conhecida do padrão (10,0 g/dL).

#### **4.4.8. Determinação de ferro das dietas**

Foi realizado em triplicata, conforme metodologia descrita para determinação de ferro das farinhas de soja (Item 4.2.7).

### **4.5. Avaliação da qualidade proteica das farinhas de soja**

#### **4.5.1. Dietas experimentais**

A composição das dietas experimentais foi baseada na dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), modificada de modo a fornecer 9,5% de proteína. O teor de proteína das farinhas e das dietas foram determinados em triplicata, pelo método semi-micro *Kjeldahl* (AOAC, 1997), multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25.

O grupo padrão recebeu dieta com fonte proteica à base de caseína, o grupo controle dieta livre de nitrogênio e os outros grupos experimentais receberam dietas como fonte proteica as farinhas de soja com e sem casca (Tabela 2).

**Tabela 2** – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de qualidade proteica (g/100g).

	<b>Livre de nitrogênio</b>	<b>Caseína</b>	<b>Farinha de soja com casca</b>	<b>Farinha de soja sem casca</b>
Caseína <sup>1</sup>	-	11,5	-	-
Farinha de soja sem casca <sup>2</sup>	-	-	22,1	-
Farinha de soja com casca <sup>3</sup>	-	-	-	20,8
Amido dextrinizado <sup>4</sup>	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose <sup>5</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>6</sup>	7,0	7,0	2,9	3,1
Celulose microfina <sup>7</sup>	5,0	5,0	1,9	3,5
Mistura mineral <sup>8</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica <sup>9</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0
Bitartarato de colina <sup>10</sup>	0,6	0,6	0,6	0,6
L-cistina <sup>11</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3
Amido de milho <sup>12</sup>	59,6	48,3	44,8	44,4

Marca/Fornecedor:

1- Wenda Company Ltda./Agroquímica SP Comercial Ltda. 2,3- Laboratório de Novos Produtos e Análise Sensorial. 4- Amidex 182 / Com products Brasil. 5- Açúcar União / Comércio de Viçosa. 6- Soya / comércio de Viçosa. 7- Comprecel / Minjtai Chemical Company Ltda. Taiwan. 8,9,10,11- Rhoster / Rhoster – Indústria e Comércio Ltda. 12- Pink Alimentos – Belo Horizonte / Comércio de Viçosa.

#### **4.5.2. Desenho experimental**

A avaliação da qualidade proteica das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaio biológico, durante 14 dias, utilizando-se 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da linhagem *Wistar*, recém-desmamados com 23 dias de idade, com peso médio de 56 g, obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV-MG.

Os animais foram divididos em grupos de seis animais, de forma sistemática, de modo que a diferença entre as médias dos pesos não excedesse 2,2 g, atendendo a recomendação da AOAC (1997). Posteriormente, foram distribuídos em gaiolas de aço inoxidável individuais, mantidos em ambiente com temperatura controlada de 21° C  $\pm$  1° C, com ciclo de luz de 12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum*.

A eutanásia dos animais foi realizada imediatamente após o término do experimento, por asfixia em meio contendo CO<sub>2</sub>.

#### **4.5.3. Determinação do ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA)**

Calculou-se o ganho de peso, o consumo alimentar dos animais por meio do monitoramento semanal do peso e do consumo alimentar. O coeficiente de eficiência alimentar foi calculado por meio da relação de ganho de peso do animal (g) pelo consumo de dieta (g).

#### 4.5.4. Razão de eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV)

O PER foi modificado para 14 dias e foi determinado considerando-se o ganho de peso do grupo-teste em relação ao consumo de proteína do grupo-teste:

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

O NPR foi determinado no 14º dia do experimento, considerando o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo livre de nitrogênio, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, segundo o método de Bender e Doell (1957).

Para avaliação da digestibilidade proteica, no 8º dia do experimento, as dietas normais foram retiradas e substituídas por dieta marcada com 200 mg de índigo carmim/100 g de dieta. No 9º dia, as dietas marcadas foram retiradas e substituídas por dietas normais, sendo coletadas somente as fezes marcadas. Todas as fezes foram coletadas no 10º ao 11º dia do experimento. No 11º dia a dieta normal foi substituída novamente por dieta marcada e no 12º dia foram coletadas somente as fezes não marcadas. As fezes coletadas do 9º ao 12º dia do experimento foram acondicionadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar (Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 035, Piracicaba, Brasil) à 105º C, durante 24 horas. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e moídas em mini-processador (Arno<sup>®</sup>, modelo PRC, São Paulo, Brasil) para determinação, em triplicata, do teor de nitrogênio pelo método semi-micro *Kjeldahl* (AOAC, 1997). O teor de nitrogênio das fezes dos grupos experimentais foi utilizado para o cálculo da digestibilidade verdadeira.

O cálculo foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

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

em que:

D = digestibilidade;

I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste;

FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

#### 4.5.5. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS)

A determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi realizada nas farinhas de soja. Para o cálculo do PDCAAS, determinou-se o teor de nitrogênio e calculou-se o conteúdo proteico ( $N \times 6,25$ ) das farinhas de soja com e sem casca; determinou-se o perfil de aminoácidos conforme item 4.2.10. e determinou-se o escore de aminoácidos, como se segue:

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

O perfil aminoácido das farinhas de soja com e sem casca foram comparados com os padrões de referência de aminoácidos recomendados pelo Instituto de Medicina (IOM, 2002) para crianças de 1 a 3 anos e pela Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 1985; 2007) para crianças de 2 a 5 anos.

A digestibilidade verdadeira foi determinada conforme descrito no item 4.4.1.3. Calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade da proteína. Convencionou-se que a proteína cujo PDCAAS for igual ou superior a 1 é considerada de boa qualidade (HENLEY e KUSTER, 1994).

#### 4.6. Análises estatísticas

Para o fator qualitativo os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os tratamentos experimentais do ensaio de biodisponibilidade de ferro foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com oito repetições, utilizando um modelo fatorial  $3 \times 3$  (dietas vs níveis de ferro). Para avaliação do ganho médio de hemoglobina foi utilizada a análise de regressão. Os tratamentos experimentais do ensaio de qualidade proteica foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições.

As análises de proteínas, lipídios, umidade, cinza, minerais, urease e solubilidade foram realizadas em três repetições e em triplicata e foram expressos em média e desvio padrão (DP). Apenas fibra alimentar, ácido fítico, inibidor de tripsina e aminoácidos foram realizados sem repetição em triplicata, expressos pela média.

Para valores de F significativo, foi utilizado teste de Duncan a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias dos tratamentos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS-*Statistical Analysis Systems for Windows Software* versão 9.00 (SAS, 2002). Foi também utilizado o *software* Excel (2003) para confecção dos bancos de dados e execução de cálculos.

#### **4.7. Aspecto ético**

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética para Animais de Experimentação (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) protocolo nº 252/2008 (Anexo 01).

#### 4.8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARABA, M. e DALE, N.M. Evaluation of protein solubility as an indicator of underprocessing of soybean meal. **Poultry Science**, 69, n.10, p.1749-1752, 1990.

ALONSO, N. e HIRS, C.H.W. Automation of sample application in amino acid analysers. **Anal. Biochem.**, 23, p.272-278, 1968.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: 14. ed. Arlington: AOAC, p.1141p. 1984.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: 15. ed. Washington: AOAC, p.1298p. 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: 15. ed. Washington: AOAC, p.136-138. 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Maryland: AOAC, 1997. v.2.

AOCS. Tentative method Ba 9-58 - Urease activity. In. **Soybeans: Chemistry and technology**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1978.

BENDER, A.E. e DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, 11, p.138-143, 1957.

BRASIL. Diário Oficial da União (DOU). **Portaria de 4 de setembro de 1991 que estabelece os Métodos Analíticos para controle de Alimentos para uso Animal**. 17 de setembro de 1991, 19813.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 40 de 21 de março de 2001. **Regulamento técnico para rotulagem obrigatória de alimentos e bebidas embalados**. Anvisa: Brasília.

BRASIL. RDC nº 360. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional**. Brasília: Anvisa, 23 de dezembro de 2003.

ERLANGER, B. F.; KOKOWOSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, n.2, p.271-278, 1961.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Energy and protein requirements**. FAO. Geneva, p.724, 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. WHO/ FAO. Geneva, Switzerland, p.265. 2007.

GOMES, J.C.; SILVA, M.H.L. e SILVA, C.O. **Análise de Alimentos**: 2. ed. Viçosa: FUNARBE, p.153. 2003.



HENLEY, E.C. e KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technol**, 48, n.4, p.74-77, 1994.

IOM. **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. Washington: National Academy Press, 2002.

LUCAS, B. e SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperatures and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and foods. **Anal. Biochem.**, v.109, p.192-197, 1980.

MOORE, S.; SPACKMAN, D.H. e STEIN, W.H. Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins. **Anal. Chem.**, v.30, p.1185-1190, 1958.

NELSON, D. e MORRIS, M. Exame básico de sangue. In: J. B. Henry. **Diagnósticos clínicos e tratamento. Por métodos laboratoriais**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1995, p.641-699.

PREGNOLATTO, W. e PREGNOLATTO, N.P. **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz**. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 1985.

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

SANDBERG, A. e AHDERINNE, R. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates in foods and intestinal contents. **Journal of Food Science**, v.51, p.547-550, 1986.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide. Version 8.0**. SAS Institute. Cary. 2002

## 5. ARTIGOS

### 5.1 - ARTIGO 1

#### A PRESENÇA DA CASCA DA FARINHA DE SOJA UFVTN 105AP NÃO INTERFERE NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO

##### RESUMO

Neste estudo avaliou-se a composição centesimal, o teor de fitato e de minerais e a biodisponibilidade de ferro da farinha de soja com casca em comparação a farinha de soja sem casca de um novo cultivar UFVTN 105AP. O método usado foi depleção-repleção de hemoglobina em ratos *Wistar*. Os animais receberam dieta de depleção de ferro por 14 dias. O grupo controle (sulfato ferroso) e os dois grupos testes (farinha de soja com casca e farinha de soja sem casca) foram tratados com 6, 12 e 24 ppm de ferro. A composição centesimal da soja com casca e sem casca, respectivamente, foi: proteínas 43,2 e 45,9 g; lipídios 18,6 e 19,0 g; carboidratos 12,9 e 15,3 g; cinzas 5,0 e 4,9 g; umidade 6,38 e 7,58 g e fibra alimentar 9,85 e 7,20 g. A farinha de soja com casca apresentou maior concentração de fibra alimentar total, ferro e cálcio, e menor concentração de ácido fítico (mio-inositol hexafosfato e pentafosfato) que a farinha de soja sem casca. A razão molar fitato:ferro na farinha de soja com casca foi duas vezes menor do que a farinha de soja sem casca, sendo a razão molar fitato:zinco menor para a com casca. O ganho de hemoglobina no grupo da farinha de soja com casca foi similar ao do grupo controle ( $p < 0,05$ ). A farinha de soja sem casca apresentou valor inferior comparado ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) na concentração de 24 ppm de ferro. O Valor Relativo de Biodisponibilidade (VRB) da farinha de soja com casca e sem casca foram 68,5% e 67,1% respectivamente, em relação ao sulfato ferroso (100%). Conclui-se que a farinha de soja com casca representa uma estratégia para aumentar a ingestão de fibra alimentar, assim como pode suprir 35% a mais de ferro do que a soja sem casca.

Palavras chave: farinha de soja, soja com casca, soja sem casca, ácido fítico, biodisponibilidade, ferro.

## INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa de grande interesse na economia mundial e de importante significado na alimentação humana em decorrência de suas propriedades nutricionais e funcionais. Em função disso, há no mercado vários produtos alimentícios à base de soja, como o leite de soja, proteína texturizada e farinhas. Com o melhoramento genético, surgem novos cultivares com sabor melhorado e com composição química modificada (OLIVEIRA et al., 2007), conduzindo à necessidade de estudos sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais. A forma de processamento desses novos cultivares também é primordial para avaliar o aproveitamento de nutrientes, como por exemplo o ferro.

O ácido fítico está presente em alimentos como leguminosas e interfere negativamente na biodisponibilidade de ferro (DAVIDSSON et al., 2001; HURRELL et al., 2003; TROESCH et al., 2009). Estudo comparativo entre farinhas de soja sem casca de cultivar convencional, (com teor de ferro de 4,5 mg/g) e de farinha proveniente de cultivar não-convencional (4,4 mg/g) indicou haver menor biodisponibilidade de ferro na farinha de soja produzida a partir do não convencional, que possuía maior teor de ácido fítico (MARTINO et al., 2007).

A casca que envolve o grão da soja elevado teor de fibra alimentar, mas não é frequente o seu aproveitamento em produtos de soja, como no processamento da farinha. A elaboração de farinha de soja com casca submetida ao tratamento térmico adequado seria uma estratégia útil para aumentar do consumo de fibra alimentar na dieta humana. Entretanto, a biodisponibilidade de ferro poderia ser reduzida com o aumento de fibra alimentar e de ácido fítico presentes em novos cultivares.

Neste estudo verificou-se a biodisponibilidade de ferro da farinha de soja com casca em comparação à farinha de soja sem casca, elaboradas a partir do novo cultivar UFVTN 105AP. Para isso foram elaboradas farinhas de 20 mesh e foi conduzido ensaio biológico com ratos *Wistar*, utilizando modelo de depleção-repleção de hemoglobina (AOAC, 1984). O uso da farinha com casca poderá viabilizar o aproveitamento integral do grão, agregando valor nutricional, além de eliminar a etapa operacional de descasque no processamento do produto pela indústria.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Aquisição da matéria prima:** O novo cultivar UFVTN 105AP destinado à alimentação humana foi fornecida pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. É um cultivar desenvolvido sem as enzimas lipoxigenases: LOX1, LOX2 e LOX3, denominada triplo nula (TN). Foi desenvolvido utilizando o método dos retrocruzamentos. O progenitor recorrente utilizado foi o cultivar Monarca e os progenitores doadores para ausência das lipoxigenases LOX1, LOX2 e LOX3 foram cultivares japoneses, enquanto o genótipo doador de alelos para alto teor proteico foi o cultivar americano BARC-8. Inicialmente foram desenvolvidos separadamente isolinhas de Monarca com ausência das lipoxigenases (seis retrocruzamentos) e com alto teor proteico (quatro retrocruzamentos), após a obtenção dessas isolinhas estas foram cruzadas e após quatro gerações de autofecundações foram selecionadas plantas destituídas de lipoxigenases e com alto teor proteico. As sementes da UFVTN 105AP foram plantadas em campo experimental da COOPADAP em São Gortado, Minas Gerais, em novembro de 2006 e colhidas em abril de 2007.

**Elaboração da farinha de soja:** Para a elaboração das farinhas de soja com casca e sem casca os grãos de soja foram selecionados submetidos ao processo de limpeza, por meio de lavagem rápida com água e secos a temperatura ambiente. A seguir foram submetidos à temperatura de 150° C por 30 minutos em estufa com circulação de ar (Nova Ética<sup>®</sup>, modelo 400/6ND, Vargem Grande Paulista, Brasil), resfriados e armazenados em sacos plásticos. Para a produção de farinha de soja com casca, os grãos foram moídos em um moinho de faca e passados em peneira de 20 mesh (0,84 mm) (Telastem<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), por meio de agitador elétrico (W.S. Tyler<sup>®</sup>, modelo Rotap, Cleveland, EUA). Para o preparo da farinha de soja sem casca, os grãos após tratamento térmico, foram triturados em liquidificador semi industrial, (Lucre<sup>®</sup>, Catanduva, Brasil), utilizando ciclos curtos intermitentes de forma a promover a separação das cascas secas. As cascas foram descartadas e os grãos em pedaços foram triturados em moinho de faca (Brabender<sup>®</sup>, modelo Rotary Mill, Duisburg, Alemanha). Farinha de 20 mesh (0,84 mm) foi obtida utilizando-se agitador automático de peneiras. O preparo da farinha de soja com casca e sem casca foi realizado em três repetições.

## **Composição química**

**Composição centesimal:** os teores de proteínas, lipídios, cinzas e umidade foram determinados de acordo com técnicas descritas pela (AOAC, 1997). O teor de carboidrato foi determinado por diferença (ANVISA, 2001). O conteúdo calórico foi determinado de acordo com a composição do alimento em termos de proteínas, lipídios e carboidratos, utilizando-se os valores de conversão 4, 9 e 4 kcal/g de alimento, respectivamente. A determinação dos teores de fibra alimentar total (FAT) e fibra alimentar insolúvel (FAI) das amostras de farinha de soja foi feita de acordo com o método enzimático gravimétrico da AOAC (1992) com modificações em que a fibra alimentar solúvel (FAS) foi obtida por diferença entre FAT e FAI.

**Minerais:** a análise de minerais das farinhas de soja com casca e sem casca foi realizada de acordo com Gomes et al. (2003), com uso de ácido nítrico ao invés do se usar ácido clorídrico. Um grama de amostra foi pesado, utilizando-se papel manteiga e transferido para um tubo de digestão. Ao tubo adicionou-se 10 mL de ácido nítrico, em capela de exaustão de gases à temperatura ambiente. O bloco digestor foi ligado e a temperatura aumentada gradativamente, até atingir 150° C, durante 16 horas. Quando houve material aderido à parede do tubo de digestão ou uma diminuição excessiva do volume da mistura, foi adicionado mais 5 mL de ácido nítrico, e agitado em vortex.

Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco para esfriar. As amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL e os tubos foram lavados com água deionizada (3 vezes) e agitados em vortex.

Todo material, como vidrarias foram desmineralizados em solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 10% por 24 horas, com posterior lavagem (3 vezes) em água deionizada, para evitar contaminações durante a análise.

Para cálcio e magnésio, foi adicionado 5 mL de estrôncio no balão volumétrico, antes de ser feita a transferência do material.

A concentração de ferro, zinco, cálcio, cobre, manganês e magnésio foi quantificada por espectrometria de absorção atômica usando espectrofotômetro (GBC<sup>®</sup>, modelo 908 AA, São Paulo, Brasil).

Para os minerais sódio e potássio a leitura foi realizada em espectrofotômetro de chama (Corning<sup>®</sup>, modelo 400, São Paulo, Brasil).

**Informação nutricional e categorização por porção de farinha de soja com e sem casca:** Os resultados obtidos da composição centesimal e de minerais das farinhas

de soja com e sem casca foram comparados com os níveis de Ingestão Dietética de Referência – DRI (IOM, 1998, 2001 e 2004), considerados na RDC 360 (BRASIL, 2003), para uma dieta de 2.000 kcal, para uma porção das farinhas. Foram consideradas as médias das recomendações das DRI para adultos de ambos os sexos. A classificação das farinhas como *excelente fonte* (>20% da recomendação), *boa fonte* (10 a 20% da recomendação) e *fonte* (>5% da recomendação) de nutriente foi de acordo com Philippi (2008). Também foi utilizado a Anvisa (1998) para classificar as farinhas de soja quanto ao teor de proteína (mínimo de 20% da DRI de referência por 100 g) e fibra alimentar (> 6 g/100 g).

**Ácido fítico:** a quantificação de ácido fítico foi realizada segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990) e o método cromatográfico (Ultrasep<sup>®</sup>, modelo ES 100 RP18, Leonberg, Alemanha), proposto por Sandberg e Ahderinne (1986). Um grama de cada um dos dois tipos de farinha de soja foi pesado e a extração feita com 20 mL de HCl 2,4% por 3 h em temperatura ambiente. Após centrifugação a 30.000 x g por 30 minutos, 1,0 mL do sobrenadante foi diluído com 25 mL de água e colocado na coluna (0,7 x 15 cm) contendo AG1-X8, resina 100-200 mesh. A coluna foi lavada com 25 mL de água e 25 mL de HCl 25 mM. Os mio-inositois fosfatos foram eluídos com 20 mL de HCl 2M. Os eluentes obtidos foram concentrados em evaporador rotatório até secagem completa e o resíduo foi dissolvido em 1 mL de água. Vinte microlitros foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), com uma velocidade de fluxo de 0,20 mL/min, 45° C, e ácido fórmico: metanol: água: hidróxido de tetrabutyl amônia (44:56:5:1,5 v/v), pH 4,25 foi utilizado como fase móvel. Uma mistura de ésteres de mio-inositois fosfatos foi utilizada como padrão.

**Ensaio Biológico:** Foram utilizados 72 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), linhagem *Wistar*, recém-desmamados, com 21 dias de idade, com peso inicial variando entre 50 e 60 gramas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV-MG. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada (21° C ± 1° C) e fotoperíodo de 12 horas.

O método utilizado para a avaliação da biodisponibilidade foi o de depleção/repleção, segundo a técnica da AOAC (1984), com modificação da fase de depleção, com duração de três semanas.

**Fase de depleção:** Os animais receberam dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993) modificada, utilizando mistura de minerais isenta de ferro (Tabela 1) e água deionizada *ad libitum*, para induzir a anemia. Após o período de 21 dias de depleção foi quantificada a hemoglobina e os animais anêmicos (5,56 g/dL) foram divididos em grupos de oito ratos, de acordo com a concentração de hemoglobina, de maneira que as médias dos grupos fossem as mais próximas possíveis, para início da fase de repleção. Albumina foi utilizada como fonte proteica nas dietas de depleção e de repleção devido ao seu baixo teor de ferro.

**Fase de repleção:** os animais receberam as dietas experimentais com três níveis de ferro (6, 12 e 24 ppm) para os grupos controle (sulfato ferroso) e testes (farinha de soja com casca e farinha de soja sem casca). As dietas foram preparadas de acordo com AIN-93G (REEVES et al., 1993), indicada para animais em fase de crescimento, com modificações. A partir do teor de ferro da farinha de soja com casca e sem casca, foi estabelecida a quantidade de farinha necessária para fornecer os três níveis de ferro planejados. O teor de proteína, fibra alimentar, carboidrato e lipídio fornecidos pelas farinhas de soja foi calculado para balancear os ingredientes fornecidos pela dieta AIN-93G (Tabela 1). Os ingredientes foram pesados, individualmente, em balança com precisão de duas casas decimais (Marte<sup>®</sup>, modelo AS2000C, Santa Rita do Sapucaí, Brasil) e balança analítica (Shimadzu<sup>®</sup>, modelo AY220, São Paulo, Brasil). Inicialmente, os ingredientes foram misturados manualmente em vasilhames plásticos previamente lavados e enxaguados com água deionizada, e a seguir em bateadeira semi-industrial (Lieme<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), com baixa rotação, por um período de aproximadamente 15 minutos. As dietas foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno etiquetados e mantidos em 10° C, até utilização.

Os animais receberam durante 14 dias as dietas experimentais com quantidades controladas (16 g/dia) e água deionizada *ad libitum*.

**Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar:** o peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente para determinação do ganho de peso e do coeficiente de eficiência alimentar (CEA= ganho de peso do animal em gramas / consumo de dieta em gramas).

**Valor relativo de biodisponibilidade:** o Valor Relativo de Biodisponibilidade (VRB) foi calculado estabelecendo-se a relação entre o coeficiente angular da reta obtida para

farinha de soja com casca e sem casca e o coeficiente da reta referente à dieta padrão, contendo sulfato ferroso. Assim, o padrão de referência foi considerado igual a 100%, e o valor relativo de biodisponibilidade da farinha de soja com casca e sem casca foi calculado.

**Tabela 1** – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de biodisponibilidade de ferro (g/100g).

Ingredientes	Fase de Depleção				Fase de Repleção					
	AIN93-G modificada	Sulfato Ferroso			Farinha de soja com casca			Farinha de soja sem casca		
		6 ppm	12 ppm	24 ppm	6 ppm	12 ppm	24 ppm	6 ppm	12 ppm	24 ppm
Albumina <sup>1</sup>	20,0	20,0	20,0	20,0	14,1	8,1	-	15,8	11,6	3,1
Amido Dextrinizado <sup>2</sup>	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose <sup>3</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de Soja <sup>4</sup>	7,0	7,0	7,0	7,0	4,9	2,9	-	5,6	4,1	1,2
Celulose microfina <sup>5</sup>	5,0	5,0	5,0	5,0	4,2	3,5	2,0	3,9	2,8	0,7
Farinha de soja com casca <sup>6</sup>	-	-	-	-	10,4	20,7	41,5	-	-	-
Farinha de soja sem casca <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	7,8	15,6	31,2
Mistura Mineral sem Ferro <sup>8</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica <sup>9</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Cistina <sup>10</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina <sup>11</sup>	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Amido de milho (qsp) <sup>12</sup>	39,8	39,8	39,8	39,8	38,1	36,5	28,3	38,7	37,6	35,5
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (mg/100g) <sup>13</sup>	-	3,0	6,0	11,9	-	-	-	-	-	-

Fonte: Adaptado de REEVES *et al.*, 1993; isenta de ferro.

q.s.p.: quantidade suficiente para completar 1 kg

Marca/Fornecedor:

1- Wenda Company Ltda./Agroquímica SP Comercial Ltda. 2- Amidex 182 /Com products Brasil. 3- Açúcar União / Comércio de Viçosa. 4- Soya / comércio de Viçosa. 5- Comprecel / Minjtaí Chemical Company Ltda. Taiwan. 6,7- Laboratório de Novos Produtos – UFV-MG-Brasil. 8-Laboratório de Nutrição Experimental – UFV-MG-Brasil. 9,10,11- Rhoster / Rhoster – Indústria e Comércio Ltda. 12- Pink Alimentos – Belo Horizonte / Comércio de Viçosa. 13- Vetec /Vetec – Química Fina Ltda

**Determinação de hemoglobina:** a hemoglobina foi dosada no final das fases de depleção e de repleção para cálculo do ganho de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, proposto pela AOAC (1984), utilizando kit (Labtest®, Sete Lagoas, Brasil). O sangue foi coletado após incisão na porção terminal da cauda do animal, por meio de gotejamento em vidro de relógio. O volume de 20 µL de sangue foi adicionado a 5 mL do reagente de cor Solução de Drabkin, constituída de cianeto de potássio e de ácido cianídrico. Esse método baseia-se em reação colorimétrica entre o



ferro presente na hemoglobina e o cianeto da solução de Drabkin, formando cianometahemoglobina, de coloração vermelha, cuja intensidade varia de acordo com o teor de ferro presente no sangue analisado. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu<sup>®</sup>, modelo UV-1601, Kyoto, Japão), no comprimento de onda 540 nm.

Para cálculo da concentração de hemoglobina das amostras de sangue foi utilizado como referência, o valor de leitura da absorvância de uma solução padrão de hemoglobina de concentração correspondente a 10 g/dL.

**Determinação de ferro das dietas:** foi realizado em triplicata, conforme metodologia descrita para determinação de ferro das farinhas de soja (Item 4.2.7).

**Análises estatísticas:** para o fator qualitativo os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os tratamentos experimentais foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, utilizando um modelo fatorial 3x3 (níveis de ferro 6, 12 e 24 ppm vs dietas: caseína, farinha de soja com casca e farinha de soja sem casca).

Para valores de F significativo, foi utilizado teste de Duncan a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias dos tratamentos e a dispersão dos dados foi expressa em desvio-padrão (DP). Para avaliação do ganho médio de hemoglobina foi utilizada a análise de regressão.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS-*Statistical Analysis Systems for Windows Software* versão 9.00 (SAS, 2002).

**Aspecto Ético:** O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética para Animais de Experimentação (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) protocolo nº 252/2008 (Anexo 1).

## **RESULTADOS**

### **Composição química e valor nutricional de farinhas de soja com e sem casca**

Os dois tipos de farinhas de soja apresentaram teores similares ( $p > 0,05$ ) de carboidratos, lipídios, cinzas e umidade. Entretanto, a farinha de soja sem casca apresentou maior teor de proteína ( $p < 0,05$ ) que a com casca. As concentrações de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel foram 36,8%, 33,3% e 63,9%, respectivamente,

maiores na farinha de soja com casca. A concentração dos inositóis hexa e pentafosfatos foi 22,2% inferior para a farinha de soja com casca. A razão molar fitato:ferro foi duas vezes menor para a farinha de soja com casca quando comparada à farinha de soja sem casca. A razão molar fitato:zinco também foi menor na soja sem casca. Sódio, potássio, cobre e manganês foram os minerais em menores concentrações nas farinhas, enquanto magnésio, cálcio, ferro e zinco estiveram em maiores concentrações. Ao comparar a concentração de minerais entre as farinhas, os teores de ferro e cálcio foram superiores ( $p < 0,05$ ) para a farinha de soja com casca (Tabela 2).

**Tabela 2** – Caracterização química das farinhas de soja com casca e sem casca elaboradas a partir de cultivar desenvolvido para alimentação humana.

Composição	Farinha de soja com casca	Farinha de soja sem casca
Potássio (mg/100g)	1.802,4 ± 27,03 <sup>a</sup>	1.810,9 ± 19,17 <sup>a</sup>
Magnésio (mg/100g)	264,3 ± 27,81 <sup>a</sup>	265,8 ± 27,81 <sup>a</sup>
Cálcio (mg/100g)	166,5 ± 6,41 <sup>a</sup>	138,5 ± 2,25 <sup>b</sup>
Ferro (mg/100g)	6,8 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,24 <sup>b</sup>
Zinco (mg/100g)	4,6 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,07 <sup>a</sup>
Sódio (mg/100g)	3,0 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,10 <sup>a</sup>
Manganês (mg/100g)	1,7 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,02 <sup>a</sup>
Cobre (mg/100g)	1,3 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,15 <sup>a</sup>
Proteína (g/100g)	43,2 ± 1,11 <sup>a</sup>	45,9 ± 1,16 <sup>b</sup>
Lipídios (g/100g)	18,6 ± 1,11 <sup>a</sup>	19,0 ± 1,17 <sup>a</sup>
Cinza (g/100g)	5,0 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,03 <sup>a</sup>
Umidade (g/100g)	6,4 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,03 <sup>a</sup>
Carboidratos (g/100g)	12,9	15,3
Fibra alimentar total (g/100g)	9,85	7,20
Fibra alimentar insolúvel (g/100g)	8,49	6,37
Fibra alimentar solúvel (g/100g)	1,36	0,83
Inositol hexafostato (μmol/g)	10,10	12,67
Inositol pentafostato (μmol/g)	4,63	6,27
Inositol tetrafostato (μmol/g)	2,3	3,2
Inositol trifostato (μmol/g)	1,1	1,3
Razão molar Fitato:Ferro	12:1	24:1
Razão molar Fitato:Zinco	21:1	28:1

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de ANOVA, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 estão apresentadas a informação nutricional e a categorização por porção de 50 g de farinha de soja com e sem casca e o percentual de adequação de nutrientes. A farinha de soja com casca pode ser considerada *excelente fonte* de magnésio, ferro, zinco, cobre e manganês, *boa fonte* de potássio, lipídio e fibra alimentar e *fonte* de cálcio. Não contribui com a ingestão de sódio. A farinha de soja sem casca possui a mesma classificação, com a diferença apenas em ser *boa fonte* de ferro.

**Tabela 3** – Informação nutricional e categorização por porção de 50 g de farinha de soja com e sem casca e percentual de adequação de nutrientes.

	Farinha de soja com casca				Farinha de soja sem casca		
	DRI g/dia <sup>1</sup>	Porção de 50g <sup>2</sup> (1 xícara)	% VD <sup>1</sup>	Classificação <sup>3</sup>	Porção de 50g (1 xícara)	% VD <sup>1</sup>	Classificação <sup>3</sup>
Valor Calórico (kcal)	2000,0	195,9	9,8	-	207,8	10,4	-
Proteína(g)	75,0	21,6	28,8	Excelente fonte	23,0	30,7	Excelente fonte
Lipídio (g)	55,0	9,3	16,9	Boa fonte	9,5	17,3	Boa fonte
Fibras Alimentar (g)	25,0	4,9	19,7	Boa fonte	3,6	14,4	Boa fonte
	<b>mg/dia<sup>4</sup></b>						
Potássio (mg)	4700,0	901,2	19,2	Boa fonte	905,5	19,3	Boa fonte
Magnésio (mg)	420,0	132,1	31,5	Excelente fonte	132,9	31,6	Excelente fonte
Cálcio (mg)	1000,0	83,3	8,3	Fonte	69,3	6,9	Fonte
Ferro (mg)	14,0	3,4 (2,3) <sup>5</sup>	24,3	Excelente fonte	2,2 (1,5) <sup>5</sup>	15,7	Boa fonte
Zinco (mg)	7,0	2,3	32,5	Excelente fonte	2,2	31,4	Excelente fonte
Sódio (mg)	2400,0	1,5	0,1	-	1,5	0,1	-
Manganês (mg)	2,3	0,9	37,6	Excelente fonte	0,9	39,1	Excelente fonte
Cobre (mg)	0,9	0,7	72,2	Excelente fonte	0,7	77,8	Excelente fonte

1 Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000 calorias. RDC 360 (BRASIL, 2003)

2 RDC 359 (BRASIL, 2003)

3 (PHILIPPI, 2008).

4 Valores médios da recomendação de minerais para indivíduos adultos de ambos os sexos, baseado na RDA (Recomendação Diária Aceitável) ou AI (Ingestão Adequada) (IOM, 1998; 2001; 2004), propostos pela RDC 360 (BRASIL, 2003).

5 Ferro biodisponível = ferro total x biodisponibilidade relativa de ferro (farinha de soja com casca, 68,5% e sem casca 67,1%).

### Ensaio biológico

Os grupos controles e testes tratados com 6, 12 e 24 ppm de ferro não apresentaram diferença significativa para o consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar. O ganho de peso do grupo controle foi inferior ( $p < 0,05$ ) aos grupos tratados com soja com casca e sem casca nos níveis de 6, 12 e 24 ppm.

Foi observado uma similaridade no ganho de hemoglobina sérica entre os grupos controle e farinha de soja com casca e sem casca. Entretanto, os grupos tratados com farinha de soja sem casca ao nível de 24 ppm tiveram valores inferiores ao controle ( $p < 0,05$ ), enquanto que os animais tratados com farinha de soja com casca nesse mesmo nível apresentaram concentração de hemoglobina sérica similar ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). Os teores de ferro das dietas foram 11,70; 16,82 e 26,49 ppm para

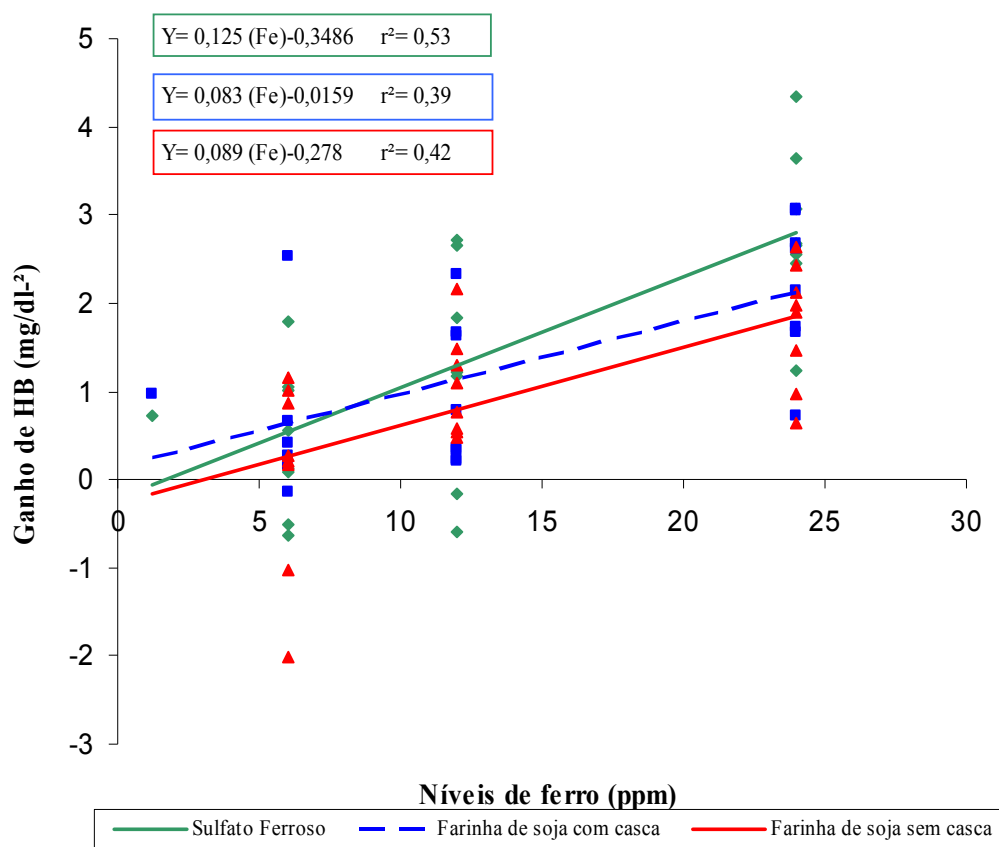
as dietas formuladas a partir da farinha de soja com casca e 9,70; 14,95 e 23,24 ppm para as dietas formuladas a partir da farinha de soja sem casca.

**Tabela 4** - Ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e hematócrito em função de diferentes dietas nos diferentes níveis de ferro ao final da fase de repleção.

Grupos experimentais	Concentração de Ferro (ppm)	Ganho de peso* (g)	CEA* (%)	Hemoglobina Sérica* (mg/dL)
Controle (FeSO <sub>4</sub> )		40,9 ± 13,34 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,5 ± 1,19 <sup>a</sup>
Soja com casca	6	52,7 ± 7,76 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,48 <sup>a</sup>
Soja sem casca		55,4 ± 7,11 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,89 <sup>a</sup>
Controle (FeSO <sub>4</sub> )		38,4 ± 9,43 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,4 ± 1,23 <sup>a</sup>
Soja com casca	12	64,9 ± 7,43 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,9 ± 1,07 <sup>a</sup>
Soja sem casca		59,4 ± 9,61 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,87 <sup>a</sup>
Controle (FeSO <sub>4</sub> )		51,8 ± 8,58 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,05 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,95 <sup>a</sup>
Soja com casca	24	65,0 ± 6,57 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,66 <sup>ab</sup>
Soja sem casca		66,5 ± 7,62 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,78 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra no mesmo nível (concentração de ferro) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

A biodisponibilidade relativa de ferro das farinhas de soja com casca e sem casca foi de 68,5% e 67,1%, respectivamente, em relação ao sulfato ferroso (Figura 1). A farinha de soja com casca contém 6,8 mg de ferro por 100g, sendo 4,6 mg biodisponível.



**Figura 1** – Ganho de hemoglobina de animais tratados com sulfato ferroso, farinha de soja com e sem casca elaboradas a partir de cultivar desenvolvido para alimentação humana.

## DISCUSSÃO

### **Composição química e valor nutricional de farinhas de soja com e sem casca**

As farinhas de soja com e sem casca apresentaram composição centesimal semelhante aos valores encontrados na literatura (VIEIRA et al., 1999; MONTEIRO et al., 2004; CIABOTTI et al., 2006; SILVA et al., 2006; MARTINO et al., 2007; MENDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; TOLEDO et al., 2007; FELIX e CANNIATTI-BRAZACA, 2008).

Ciabotti et al. (2006) encontraram para os minerais zinco, cobre, cálcio e potássio teores que estão de acordo com o nosso estudo. Apenas para ferro foram encontrados teores mais elevados. Vieira et al. (1999) também encontraram teores de magnésio, potássio, manganês de acordo com o presente estudo, mas para sódio, ferro e cálcio encontraram teores mais elevados. O baixo teor de sódio encontrado nas farinhas estudadas é uma característica benéfica importante desta leguminosa para reduzir o consumo de sódio, visto que a elevada ingestão de alimentos industrializados na população tem elevado o consumo desse nutriente.

Os teores de IP<sup>5</sup> e IP<sup>6</sup> estão abaixo dos encontrados por Andrade et al. (2008) e Martino et al. (2007). A menor razão molar fitato:ferro na farinha de soja com casca poderá favorecer a biodisponibilidade de ferro. Também a razão molar fitato:zinco foi menor na farinha com casca.

As farinhas de soja podem ser classificadas como fonte proteica e alto teor de fibra alimentar de acordo com a Portaria 27 da Anvisa (1998). No rótulo da farinha de soja poderá conter a informação sobre a alegação funcional de proteína e fibra alimentar, além dos teores de nutrientes, pois no Brasil, a Anvisa possui regulamentações de alegações de propriedades funcionais aprovadas, onde os rótulos podem trazer a informação: *“O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”* (ANVISA, 2005). Da mesma forma quanto à fibra alimentar, o rótulo pode trazer a informação: *“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”*, desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de fibra alimentar se o alimento for sólido (ANVISA, 2005).

## Ensaio biológico

Neste trabalho a recuperação de hemoglobina de animais tratados com dietas contendo farinhas de soja com e sem casca nos níveis de 6 e 12 ppm foi similar ao grupo controle (sulfato ferroso). Entretanto, a farinha de soja com casca, na concentração de 24 ppm, promoveu a melhor recuperação dos níveis séricos de hemoglobina nos animais anêmicos, quando comparados com a farinha sem casca. O potencial para recuperação da hemoglobinemia da farinha com casca foi similar ao sulfato ferroso. Este resultado foi positivo, uma vez que, existem evidências que produtos elaborados com grãos integrais reduzem a biodisponibilidade de minerais, por conter elevado teor de fatores antinutricionais, tais como fibra alimentar e fitato (DOMÍNGUEZ et al., 2002; CHIPLONKAR e AGTE, 2005; MARTINO et al., 2007).

Comparando as duas farinhas de soja, verificou-se que a farinha de soja com casca, apesar de conter maior teor em fibra alimentar, apresentou níveis inferiores em aproximadamente 22% de inositol hexa e pentafofato. Estas são as principais formas de inositol que interferem na biodisponibilidade de ferro (LÓPEZ e MARTOS, 2004). Martino et al. (2007) observaram que em farinha de soja com casca, sem lipoxigenases, com maior teor de fitato, apresentou menor biodisponibilidade de ferro e de zinco.

De fato, existem afirmações de que o ácido fítico está estruturalmente integrado com proteínas e, ou minerais na forma de complexo (ZHOU e ERDMAN, 1995; STIPANUK, 2006), estando, portanto, mais concentrado no interior do grão do que nos tecidos externos. Isto explicaria o maior teor de ácido fítico na farinha de soja sem casca, que pode ter interferido negativamente na biodisponibilidade de ferro.

A razão molar fitato:mineral é usada para prever os efeitos inibitórios na biodisponibilidade de minerais (MA et al., 2005). Halberg et al. (1989) relatam que a razão molar fitato:ferro  $> 1$  diminui a biodisponibilidade de ferro. Já Saha, Weaver e Manson (1994) mostram em seu trabalho contendo farinha de trigo, que a absorção de ferro é prejudicada diminuindo significativamente quando a razão molar fitato:ferro é maior que 14. No presente estudo foi observada razão molar fitato:ferro inferior para a farinha de soja com casca (12:1) e superior para a farinha de soja sem casca (24:1). Essa diferença pode explicar a biodisponibilidade de ferro superior da farinha de soja com casca.

Outro fator que pode ter otimizado a biodisponibilidade de ferro relativa das farinhas de soja com e sem casca em relação ao sulfato ferroso foi o tratamento térmico aplicado. Estudo prévio em nosso laboratório com diferentes tratamentos térmicos

detectou que a temperatura de 150° C por 30 minutos foi mais eficaz, pois promoveu menor índice de urease (ANDRADE et al., 2008), que é um indicador de inativação de fatores antinutricionais (WIRIYAUMPAIWONG et al., 2004).

## **CONCLUSÃO**

A farinha de soja com casca submetida ao tratamento térmico de 150° C por 30 minutos pode contribuir com maior teor de ferro biodisponível (4,6 mg/100g) e fibra alimentar, especialmente a sua fração insolúvel.

A farinha de soja com casca fornece 35% de ferro a mais do que a farinha de soja sem casca. Este é um dado relevante para populações carentes ou vegetarianas que apresentam baixo consumo de produtos de origem animal. Além disso, países em desenvolvimento como o Brasil apresentam elevada prevalência de anemia ferropriva (WHO, 2008), o que justifica o incentivo, a produção e consumo da farinha de soja com a casca.

## 5.1.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, G.F.; SILVA, C.O.; PELUZIO, M.C.G. et al. **Qualidade proteica de farinhas de soja desenvolvidas a partir de novas variedades de soja.** In: xx Congresso Brasileiro de Nutrição - CONBRAN. Anais do CONBRAN. Rio de Janeiro, 100 p, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 40 de 21 de março de 2001. **Regulamento técnico para rotulagem obrigatória de alimentos e bebidas embalados.** Anvisa: Brasília.

ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 01-06-2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis:** 14. ed. Arlington: AOAC, p.1141p. 1984.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis:** 15. ed. Washington: AOAC, 1298 p. 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis:** 15. ed. Washington: AOAC, p.136-138. 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis.** Maryland: AOAC, v.2, 1997.

BRASIL. Portaria nº27. **Estabelece o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes).** Anvisa, 13 de janeiro de 1998.

BRASIL. RDC nº 360. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional.** Brasília: Anvisa, 23 de dezembro de 2003.

BRASIL. RDC nº 359. **Estabelece o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional.** Anvisa: Brasília, 2003.

CHIPLONKAR, S. e AGTE, V. Predicting Bioavailable Zinc from Lower Phytate Forms, Folic Acid and Their Interactions with Zinc in Vegetarian Meals. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, p.26-33, 2005.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G. et al. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.920-929, 2006.

DAVIDSSON, L.; DIMITRIOU, T.; WALCZYK, T. et al. Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. **British Journal of Nutrition**, Switzerland, v.85, p.59-63, 2001.



- DOMÍNGUEZ, B.M.; GÓMEZ, M.V.I. e LEÓN, F.R. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. **ALAN**, Caracas, v.52, set, 2002.
- FELIX, M.A. e CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Disponibilidade de ferro in vitro de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.78-83, 2008.
- GOMES, J.C.; SILVA, M.H.L. e SILVA, C.O. **Análise de Alimentos**: 2. ed. Viçosa: FUNARBE, 153 p, 2003.
- HALLBERG, L.; BRUNE, M. e ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition. **American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v.49, p.140-144, 1989.
- HURRELL, R.; REDDY, M.; JUILLERAT, M. et al. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v.77, p.1213-1219, 2003.
- IOM. **Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline**. Washington, DC: National Academy Press, 1998.
- IOM. **Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC: National Academy Press, 2001.
- IOM. **Dietary reference intakes: guiding principles for nutrition labeling and fortification**. Washington (DC): National Academies Press, 2004.
- LÓPEZ, M. e MARTOS, F. Iron availability: An updated review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.5, p.597-606, 2004.
- MA, G.; JIN, Y.; PIAO, J. et al. Phytate, Calcium, Iron, and Zinc Contents and Their Molar Ratios in Foods Commonly Consumed in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.10285-10290, 2005.
- MARTINO, H.S.D.; MARTIN, B.R.; WEAVER, C.M. et al. Zinc and iron bioavailability of genetically modified soybeans in rats. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.689-695, 2007.
- MENDES, F.Q.; OLIVEIRA, M.G.A.; CARDOSO, L.R. et al. Digestibilidade proteica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina Kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Journal of Biosciences**, v.23, p.14-21, 2007.
- MONTEIRO, M.R.P.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.D.A. et al. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.195-205, 2004.
- OLIVEIRA, M.I.P.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C. et al. Protein, oil, and isoflavone contents in lipoxigenase- and Kunitz trypsin inhibitor-deficient soybean seeds. **Chromatographia**, v.66, p.521-527, 2007.

PHILIPPI, S.T. **Pirâmide dos alimentos: Fundamentos básicos da nutrição**. Barueri: Manole, 2008.

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

SAHA, P.R.; WEAVER, C.M. e MASON, A.C. Mineral Bioavailability in Rats from Intrinsically Labeled Whole Wheat Flour of Various Phytate Levels. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.2531-2535, 1994.

SANDBERG, A. e AHDERINNE, R. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates in foods and intestinal contents. **Journal of Food Science**, v.51, p.547-550, 1986.

SAS. **STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. User's guide. Version 8.0**. SAS Institute. Cary. 2002.

SILVA, M.S.; NAVES, M.M.V.; DE OLIVEIRA, R.B. et al. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.571-576, 2006.

STIPANUK, M.H. **Biochemical, Physiological & Molecular Aspects of Human Nutritions**. 2. ed. Philadelphia: W B Saunders Company, 1232 p, 2006.

TOLEDO, T.C.F.; BRAZACA, S.G.C.; ARTHUR, V. et al. Composição, digestibilidade proteica e desaminação em cultivares brasileiras de soja submetidas à radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.812-815, 2007.

TROESCH, B.; EGLI, I.; ZEDER, C. et al. Optimization of a phytase-containing micronutrient powder with low amounts of highly bioavailable iron for in-home fortification of complementary foods. **American Journal of Clinical Nutrition, USA**, v.89, p.539-544, 2009.

VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C. e PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO global database on anaemia**. WHO, p.51. 2008

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

ZHOU, J. e ERDMAN, J. Phytic acid in health and disease. **Critical Review Food Science Nutrition**, v.35, p.495-508, 1995.

## 5.2 - ARTIGO 2

### QUALIDADE PROTEICA DE FARINHA DE SOJA COM E SEM CASCA

#### RESUMO

O propósito do estudo foi avaliar os fatores antinutricionais, o perfil aminoacídico e a qualidade proteica de farinhas de soja com casca e sem casca, de um novo cultivar de soja, sem lipoxigenases e de elevado teor proteico. Grãos de soja foram submetidos à temperatura de 150° C por 30 minutos para produção de farinha de soja com e sem casca. Quantificou-se o perfil aminoacídico, a atividade de urease, a solubilidade proteica e a atividade de inibidor de tripsina das farinhas. Avaliou-se a qualidade proteica utilizando ratos machos *Wistar*, distribuídos em 4 grupos (n= 6), durante 14 dias. O grupo controle recebeu dieta à base de caseína, outro grupo recebeu dieta livre de nitrogênio e os outros dois grupos receberam dietas à base de farinhas de soja com e sem casca. Avaliou-se o ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), coeficiente de eficiência alimentar (CEA), razão da eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR), digestibilidade verdadeira (DV) e o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS). O tratamento térmico reduziu a atividade da urease e do inibidor de tripsina, e não superaqueceu as farinhas mantendo solubilidade protéica superior a 85%.

O perfil aminoacídico das farinhas de soja com e sem casca foram semelhantes entre si, sendo limitante para valina, apenas quando se utilizou o padrão FAO/WHO como referência. O CEA e o NPR não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os grupos experimentais. O PER da farinha de soja sem casca foi semelhante ( $p>0,05$ ) ao da caseína. Embora o PER da farinha de soja com casca tenha sido inferior ( $p<0,05$ ) ao da caseína, este não diferiu ( $p>0,05$ ) da farinha de soja sem casca. A DV das farinhas de soja com e sem casca não diferiram entre si ( $p>0,05$ ), mas foi inferior à da caseína ( $p<0,05$ ), e o PDCCAS foi menor que a DV, em função do aminoácido limitante. Os índices de qualidade proteica, PER e NPR, indicaram que as farinhas foram adequadas para promover o crescimento e o desenvolvimento dos animais. A digestibilidade verdadeira foi elevada, embora tenha sido inferior à da caseína. O melhoramento genético proporcionou equilíbrio qualitativo e quantitativo dos aminoácidos essenciais,

com exceção da valina. O processamento da soja favoreceu ao aproveitamento biológico das proteínas, indicando que o grão de soja pode ser utilizado de forma integral para produção de farinhas.

Palavras Chaves: qualidade proteica, PDCCAS, escore de aminoácidos, urease, inibidor de tripsina, solubilidade proteica, digestibilidade proteica.

## INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o alimento de origem vegetal que apresenta maior teor de proteína, com concentrações variando nos cultivares de 30 a 45%. Em função do seu valor nutricional, vem aumentando no mercado produtos à base de soja, como o leite de soja, proteína texturizada e farinhas.

Apesar de ser reconhecida pelo seu alto valor nutritivo, a soja contém ainda, componentes conhecidos como fatores antinutricionais, como os inibidores de proteases e o ácido fítico (MONTEIRO et al., 2004).

A soja crua contém cerca de 6% de inibidores de protease que atuam sobre as proteases no trato digestório, prejudicando a digestão das proteínas e conseqüentemente, limitando o fornecimento de aminoácidos essenciais para o organismo (BRANDON e FRIEDMAN, 2002; PENHA et al., 2007). Localizam-se junto às principais proteínas de estoque, no cotilédone do grão de soja. Existem dois tipos de inibidores: o de tripsina Kunitz (KTI) e o inibidor de tripsina e quimotripsina Browman-Birk (BBI). (STAHLHUT e HYMOWITZ, 1983; MONTEIRO et al., 2003; MONTEIRO et al., 2004; MIURA et al., 2005). Cultivares de soja sem inibidores de proteases estão sendo desenvolvidos (BARROS et al., 2008), mas o tratamento térmico de grãos de cultivares convencionais também tem sido utilizados para inativá-los (CARVALHO et al., 2002), apesar de não existir consenso das condições de aquecimento mais adequadas para a inativação dos inibidores de tripsina (CARVALHO et al., 2002).

Outro fator antinutricional, o ácido fítico está presente em alimentos como leguminosas e pode interferir negativamente na qualidade proteica (DEAK e JOHNSON, 2007). Assim, estudos tem buscado eliminar o ácido fítico dos produtos de soja, visando melhorar o valor proteico (SAITO et al., 2001; KUMAGAI et al., 2002; DEAK e JOHNSON, 2007).

A casca que envolve o grão da soja elevado teor de fibra alimentar, mas não é frequente o seu aproveitamento em produtos de soja, como no processamento da farinha. A elaboração de farinha de soja com casca submetida ao tratamento térmico adequado seria uma estratégia útil para aumentar o consumo de fibra alimentar na dieta humana. Entretanto, a qualidade proteica poderia ser reduzida com o aumento de fibra alimentar, presença de inibidor de protease e ácido fítico nos novos cultivares.

Historicamente, a soja tem sido melhorada geneticamente com o objetivo de aumentar tanto a produtividade quanto a concentração de óleo no grão. Apenas recentemente alguns programas de melhoramento tem dado ênfase ao desenvolvimento

de cultivares mais produtivos contendo altas concentrações de proteínas (YAKLINCH, 2001). Surge então, a necessidade de estudos para investigar o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais desses novos cultivares com composição química diferenciada, como o da presente pesquisa, que é um cultivar sem lipoxigenases e de elevada concentração proteica. Da mesma forma, é primordial avaliar o processamento para investigar o aproveitamento de nutrientes, como por exemplo, a proteína.

Neste estudo verificou-se se a qualidade da proteína da farinha de soja com casca em comparação com a farinha de soja sem casca, elaboradas a partir de um novo cultivar. Para isso, foram elaboradas farinhas de soja com e sem casca e avaliada a qualidade proteica por meio de ensaio biológico, visando verificar a possibilidade do aproveitamento integral do grão, agregando valor nutricional ao produto.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Matéria prima e produção da farinha de soja:** Foi realizada conforme descrita no artigo anterior (item Material e Métodos, artigo 1).

**Caracterização dos produtos de soja:** A composição centesimal foi realizada conforme descrita no artigo anterior (item Material e Métodos, artigo 1).

O teor de aminoácidos foi realizado por derivação em pós-coluna (MOORE et al., 1958; SPACKMAN et al., 1963; LUCAS e SOTELO, 1980) conforme descrita no artigo anterior (item Material e Métodos, artigo 1).

**Determinação da atividade de urease:** A determinação da atividade ureática foi realizada em triplicata, de acordo com o método descrito pela AOCS (1978). O método consiste na avaliação da diferença de pH da amostra teste e do branco, que indica a atividade da urease.

**Determinação da solubilidade proteica:** A determinação da solubilidade proteica foi baseada na solubilidade do nitrogênio em solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2% e o resultado foi expresso em porcentagem de nitrogênio solúvel em relação ao nitrogênio total, segundo metodologia publicada no Diário Oficial da União, 1991, com modificações (BRASIL, 1991).

**Determinação da atividade de inibidor de proteases:** Em 100 mg da amostra desengordurada foi adicionados 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Esta suspensão foi agitada por 3 horas a temperatura ambiente em agitador de erlenmeyer. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 35.600 x g por 20 minutos.

De acordo com o método descrito por Erlanger et al. (1961) com modificações, foram adicionados, em um tubo de ensaio, 450 µL de tampão, 50 µL da solução de tripsina e 100 µL do extrato de soja. Essa mistura foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após 5 minutos, 500 µL dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl<sub>2</sub> 20 mM e 500 µL da solução D,L-BApNA. Esta mistura foi agitada e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL de ácido acético 60% (v/v).

A absorvância da solução foi determinada a 410 nm, em espectrofotômetro (PG Instrumental<sup>®</sup>, modelo T70+ uv/visível spectrometer, Leics, Reino Unido). A análise foi efetuada em triplicata. Os resultados foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína total da amostra, por meio da equação:

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

Onde:

A = absorvância do controle enzimático (410 nm) menos absorvância da solução contendo extrato proteico (410 nm), B = fator de diluição da amostra, C = fator de tripsina (0,019). Esse fator corresponde a absorvância em 410 nm do produto da atuação de 1 µg de tripsina sobre o substrato D,L-BApNA, nas condições do ensaio. Equivale dizer que 1 µg de tripsina pura atuando sobre o substrato fornece uma leitura de absorvância de 0,019, nas condições do ensaio, P = concentração de proteína em g/mL de extrato.

**Dietas experimentais:** A composição das dietas experimentais foi baseada na dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), modificada de modo a fornecer 9,5% de proteína. O teor de proteína das farinhas e das dietas foram determinados em triplicata, pelo método semi-micro *Kjeldahl* (AOAC, 1997), descrito no artigo anterior (item 5.1.2, artigo 1). A composição centesimal foi utilizada para cálculo das dietas experimentais.

O grupo padrão recebeu dieta à base de caseína, um outro grupo recebeu dieta livre de nitrogênio e os outros dois grupos experimentais foram alimentados com dietas à base de farinhas de soja com ou sem casca (Tabela 1). Os teores de óleo de soja, fibra e de amido das dietas testes foram ajustados de acordo com a composição das farinhas de soja com e sem casca, de modo que as dietas fossem isocalóricas e isoproteicas.

**Tabela 1** – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100 g).

	Livre de nitrogênio	Caseína	Farinha de soja com casca	Farinha de soja sem casca
Caseína <sup>1</sup>	-	11,5	-	-
Farinha de soja sem casca <sup>2</sup>	-	-	22,1	-
Farinha de soja com casca <sup>3</sup>	-	-	-	20,8
Amido dextrinizado <sup>4</sup>	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose <sup>5</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>6</sup>	7,0	7,0	2,9	3,1
Fibra - Celulose microfina <sup>7</sup>	5,0	5,0	1,9	3,5
Mistura mineral <sup>8</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica <sup>9</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0
Bitartarato de colina <sup>10</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3
L-cistina <sup>11</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3
Amido de milho <sup>12</sup>	59,8	48,3	44,8	44,4

Marca/Fornecedor:

1- Wenda Company Ltda./Agroquímica SP Comercial Ltda. 2,3- Laboratório de Novos Produtos e Análise Sensorial – UFV-MG-Brasil. 4- Amidex 182 /Com products Brasil. 5- Açúcar União / Comércio de Viçosa. 6- Soya / comércio de Viçosa. 7- Comprecel / Minjtai Chemical Company Ltda. Taiwan. 8,9,10,11- Rhoster / Rhoster – Indústria e Comércio Ltda. 12- Pink Alimentos – Belo Horizonte / Comércio de Viçosa.

**Desenho experimental:** A avaliação da qualidade proteica das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaio biológico, durante 14 dias, utilizando-se ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da linhagem *Wistar*, recém-desmamados com 23 dias de idade, com peso médio de 56 g, obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Os animais foram divididos em grupos de seis animais, de forma sistemática, de modo que a diferença entre as médias dos pesos não excedesse 2,2 g, atendendo a recomendação da AOAC (1997). Posteriormente, foram distribuídos em gaiolas de aço inoxidável individuais, mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22° C ± 3° C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum*. O sacrifício dos animais foi realizado imediatamente após o término do experimento, por asfixia em meio contendo CO<sub>2</sub>.

Os procedimentos adotados no ensaio biológico atenderam à prática didático-científica da vivisseção de animais sendo aprovado pelo Comitê de Ética para Animais de Experimentação (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) protocolo n° 252/2008 (Anexo 1).



Calculou-se o ganho de peso, o consumo alimentar dos animais por meio do monitoramento semanal do peso e do consumo alimentar. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação ganho de peso do animal (g) pelo consumo de dieta (g).

O PER foi determinado considerando-se o ganho de peso do grupo teste em relação ao consumo de proteína do grupo teste.

O NPR foi determinado no 14º dia do experimento, considerando o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo livre de nitrogênio, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, segundo o método de Bender e Doell (1957).

Para a avaliação da digestibilidade proteica, no 8º dia do experimento, as dietas normais foram retiradas e substituídas por dieta marcada com 200 mg de índigo carmim/100 g de dieta. No 9º dia, as dietas marcadas foram retiradas e substituídas por dietas normais, sendo coletadas somente as fezes marcadas. Todas as fezes foram coletadas do 10º ao 11º dia do experimento. No 11º dia a dieta normal foi substituída novamente por dieta marcada e no 12º dia foram coletadas somente as fezes não marcadas. As fezes coletadas do 9º ao 12º dia do experimento foram acondicionadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar (Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 035, Piracicaba, Brasil) a 105º C, durante 24 horas. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e moídas em mini-processador (Arno<sup>®</sup>, modelo PRC, São Paulo, Brasil) para determinação em triplicata do teor de nitrogênio pelo método semi-micro *Kjeldahl* (AOAC, 1997). O teor de nitrogênio das fezes dos grupos experimentais foi utilizado para o cálculo da digestibilidade verdadeira (FAO/WHO, 1991).

**Determinação do PDCAAS:** A determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi realizada a partir da determinação e quantificação do perfil de aminoácido, e determinação do escore de aminoácidos. Foram comparados os padrões de referência de aminoácidos recomendados pelo Instituto de Medicina (IOM, 2002) para crianças de 1 a 3 anos e da Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 1985; 2007) para crianças de 2 a 5 anos. Calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade da proteína.

**Análises estatísticas:** As farinhas sem tratamentos térmicos utilizadas nas análises de urease, solubilidade e inibidor de tripsina foram realizadas em triplicata, e expressos

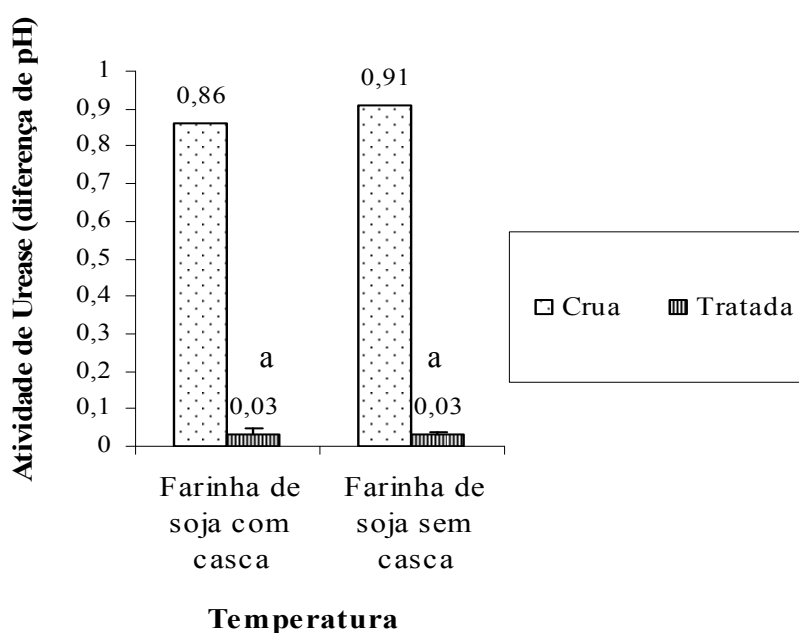
pela média, assim como a análise de aminoácidos. Os dados resultantes do ensaio biológico foram expressos pela média e desvio padrão.

O delineamento foi inteiramente casualizados (DIC) com seis repetições. Os dados qualitativos foram analisados por análise de variância (ANOVA). Para valores de F significativo, foi utilizado teste de Duncan a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias dos tratamentos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS-*Statistical Analysis Systems for Windows Software* versão 9.00 (SAS, 2002).

## RESULTADOS

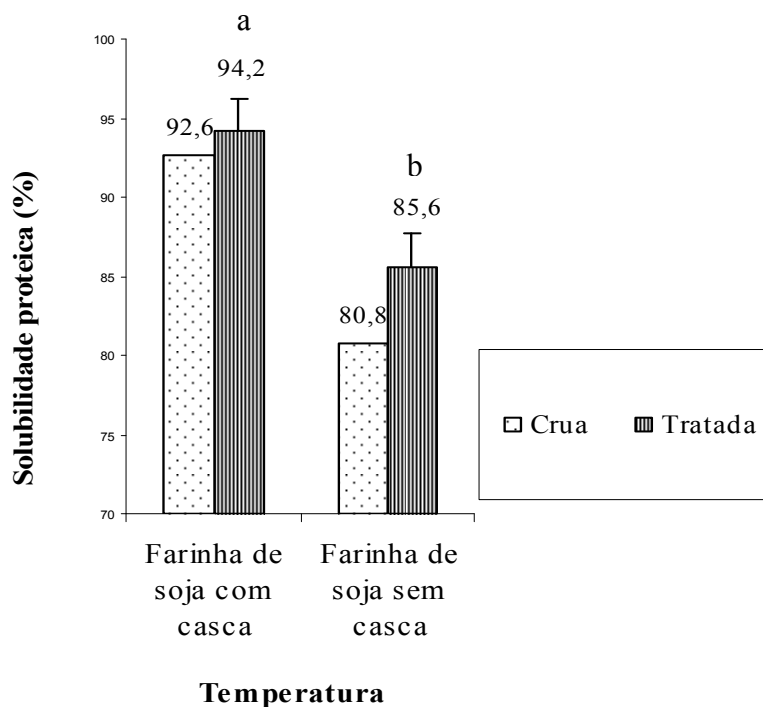
**Urease, Solubilidade e Inibidor de tripsina:** A atividade de urease das farinhas de soja com casca e sem casca, cruas e tratadas a 150° C por 30 minutos está mostrada na Figura 1. A atividade de urease das farinhas de soja crua foram superiores em relação à tratada. Não houve diferença entre as farinhas de soja com e sem casca ( $p < 0,05$ ). O tratamento térmico foi suficiente para inativar a atividade de urease.



**Figura 1** – Atividade de urease de farinha de soja com casca e sem casca, crua e tratada à 150° C por 30 minutos.

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

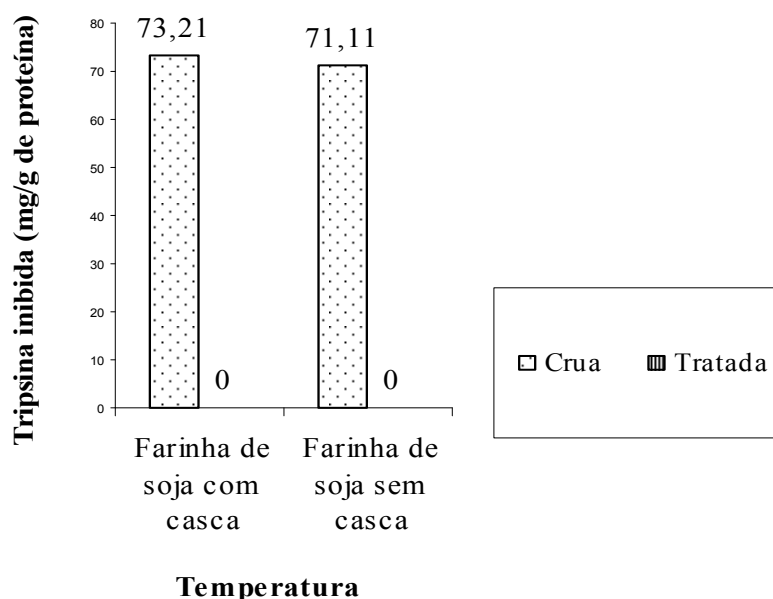
A Figura 2 mostra a solubilidade das farinhas de soja com e sem casca, cruas e tratadas a 150° C por 30 minutos. A farinha com casca apresentou maior solubilidade do que a sem casca ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2** – Solubilidade proteica de farinha de soja com casca e sem casca, crua e tratada à 150° C por 30 minutos.

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

A concentração de tripsina inibida nas farinhas de soja cruas e tratadas encontra-se na Figura 3. O binômio tempo x temperatura foi suficiente para inativar completamente os inibidores de tripsina.



**Figura 3** – Tripsina inibida em farinha de soja com casca e sem casca, crua e tratada a 150° C por 30 minutos.

**Avaliação biológica da qualidade proteica:** Os dados relacionados ao GP, CA e CEA estão apresentados na Tabela 2. O GP e o CA foram menores ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos testes em comparação à caseína, e os grupos testes não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). O CEA não diferiu entre os grupos experimentais indicando que as dietas isocalóricas utilizadas foram capazes de promover ganho de peso semelhante por grama de dieta consumida.

**Tabela 2** – Média e desvio padrão de ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos grupos que receberam dietas de caseína e dietas experimentais de soja (n=6).

	Ganho de Peso	Consumo Alimentar	CEA
Caseína	52,33 ± 8,87 <sup>a</sup>	167,05 ± 14,56 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>a</sup>
Farinha de soja com casca	30,83 ± 9,09 <sup>b</sup>	122,21 ± 29,86 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>a</sup>
Farinha de soja sem casca	29,5 ± 9,75 <sup>b</sup>	105,46 ± 19,43 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 são apresentados os valores de PER, PER relativo (PER-R), NPR e NPR relativo (NPR-R). Os animais tratados com farinha de soja sem casca apresentaram PER semelhante ( $p > 0,05$ ) ao grupo da caseína. Embora o PER da farinha de soja com casca tenha sido inferior ( $p < 0,05$ ) ao da caseína, este não diferiu ( $p > 0,05$ )

da farinha de soja sem casca. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) nos valores de NPR entre os grupos experimentais, equiparando a qualidade nutricional da proteína das farinhas de soja à caseína, em promover manutenção e crescimento dos animais.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão de Razão de eficiência proteica (PER) e Razão proteica líquida (NPR) dos grupos experimentais (n=6).

	PER	PER-R	NPR	NPR-R
Caseína	3,23 ± 0,40 <sup>a</sup>	100,00	4,01 ± 0,38 <sup>a</sup>	100,00
Farinha de soja com casca	2,48 ± 0,29 <sup>b</sup>	76,81	3,56 ± 0,25 <sup>a</sup>	88,77
Farinha de soja sem casca	2,73 ± 0,59 <sup>ab</sup>	84,69	3,97 ± 0,45 <sup>a</sup>	98,89

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

A Tabela 4 apresenta os valores do consumo de proteína, nitrogênio excretado, peso das fezes e digestibilidade verdadeira. O consumo de proteína entre os grupos testes não diferiu ( $p>0,05$ ). Entretanto, os animais que receberam dietas à base de farinha de soja sem casca apresentaram consumo proteico inferior à caseína ( $p<0,05$ ).

O peso das fezes não diferiu ( $p>0,05$ ) entre os grupos experimentais. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) para a excreção de nitrogênio entre caseína e farinha de soja sem casca. Entretanto, a farinha de soja com casca apresentou maior excreção de nitrogênio. As farinhas de soja com e sem casca apresentaram menor DV ( $p<0,05$ ) em relação à caseína, mas não diferiram entre si ( $p>0,05$ ). Quando consideramos a digestibilidade verdadeira relativa (DV-R) em relação à caseína (100%), as farinhas de soja ficaram acima de 90%, indicando elevada digestibilidade.

**Tabela 4** – Média e desvio padrão de consumo de proteína, peso das fezes, nitrogênio excretado e digestibilidade verdadeira e relativa dos grupos experimentais (n=6).

	Consumo de proteína (g)	Peso de fezes (g)	Nitrogênio excretado	DV	DV-R
Caseína	35,82 ± 3,92 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>	94,13 ± 0,89 <sup>a</sup>	100,00
Farinha de soja com casca	28,65 ± 7,69 <sup>ab</sup>	1,85 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	84,76 ± 2,46 <sup>b</sup>	90,05
Farinha de soja sem casca	23,71 ± 5,88 <sup>b</sup>	1,79 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	86,82 ± 2,61 <sup>b</sup>	92,24

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5 encontram-se os padrões de recomendações nutricionais de aminoácidos, o perfil aminoacídico, o escore químico (escore AA) e o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) das farinhas de soja com e sem casca tratadas à 150° C por 30 minutos. Os perfis aminoacídicos das farinhas de soja com e sem casca foram semelhantes entre si. Ao comparar o teor de aminoácidos essenciais das farinhas com o padrão de recomendações nutricionais da IOM (2002), as farinhas de soja com e

sem casca apresentaram concentrações superiores a 1, indicando a ausência de aminoácidos limitantes. Entretanto, pelo padrão FAO/WHO (1985 e 2007) as farinhas foram limitantes para o aminoácido de cadeia ramificada, valina.

O PDCAAS calculado pela recomendação da IOM (2002) foi superior à digestibilidade verdadeira. O inverso foi verificado para o padrão FAO/WHO (1985; 2007), sendo que, pela última publicação da FAO/WHO, os valores de PDCAAS foram menores, para as farinhas de soja com e sem casca.

**Tabela 5** – Teores de aminoácidos, escore químico (escore AA) e PDCAAS, segundo os padrões FAO/WHO (2007); IOM (2002) e FAO/WHO (1985), das farinhas de soja com casca (FCC) e sem casca (FSC).

Aminoácidos	mg/g proteína		Padrão IOM (2002)	Escore AA		PDCAAS	
	FCC	FSC		FCC	FSC	FCC	FSC
<b>Essenciais</b>							
Fenilalanina + Tirosina	88,27	90,75	47	1,88	1,93		
Histidina	28,26	25,42	18	1,57	1,41		
Isoleucina	32,58	36,94	25	1,30	1,48		
Leucina	76,40	80,04	55	1,39	1,46		
Lisina	58,86	54,44	51	1,15	1,07		
Metionina + Cistina	27,07	26,29	25	1,08	1,05		
Treonina	41,24	42,38	27	1,53	1,57		
Triptofano	19,39	16,05	8	2,42	2,01		
Valina	32,28	34,66	32	1,01	1,08	85,50	94,04
Aminoácidos	mg/g proteína		Padrão FAO/WHO (2007)	Escore AA		PDCAAS	
	FCC	FSC		FCC	FSC	FCC	FSC
<b>Essenciais</b>							
Fenilalanina + Tirosina	88,27	90,75	46	1,92	1,97		
Histidina	28,26	25,42	18	1,57	1,41		
Isoleucina	32,58	36,94	31	1,05	1,19		
Leucina	76,40	80,04	63	1,21	1,27		
Lisina	58,86	54,44	52	1,13	1,05		
Metionina + Cistina	27,07	26,29	26	1,04	1,01		
Treonina	41,24	42,38	27	1,53	1,57		
Triptofano	19,39	16,05	7,4	2,62	2,17		
Valina	32,28	34,66	42	0,77	0,83	65,14	71,65
Aminoácidos	mg/g proteína		Padrão FAO/WHO (1985)	Escore AA		PDCAAS	
	FCC	FSC		FCC	FSC	FCC	FSC
<b>Essenciais</b>							
Fenilalanina + Tirosina	88,27	90,75	63	1,40	1,44		
Histidina	28,26	25,42	19	1,49	1,34		
Isoleucina	32,58	36,94	28	1,16	1,32		
Leucina	76,40	80,04	66	1,16	1,21		
Lisina	58,86	54,44	58	1,01	0,94		
Metionina + Cistina	27,07	26,29	25	1,08	1,05		
Treonina	41,24	42,38	34	1,21	1,25		
Triptofano	19,39	16,05	11	1,76	1,46		
Valina	32,28	34,66	35	0,92	0,99	78,17	85,98
<b>Não essenciais</b>							
Arginina	77,24	67,82	-	-	-	-	-
Alanina	48,18	46,15	-	-	-	-	-
Ac Aspartico	127,57	134,02	-	-	-	-	-
Ac. Glutâmico	198,95	200,00	-	-	-	-	-
Glicina	48,84	45,29	-	-	-	-	-
Prolina	59,31	62,97	-	-	-	-	-
Serina	54,94	54,60	-	-	-	-	-

<sup>(1)</sup> Escore de AA = coluna II/ coluna III; <sup>(2)</sup> PDCAAS: 1º aminoácido limitante (coluna IV) x digestibilidade verdadeira do experimento com ratos; Digestibilidade verdadeira: FCC = 84,76; FSC = 86,82.

## DISCUSSÃO

A escolha do método de avaliação da qualidade proteica depende de diversos fatores: reprodutibilidade de resultados, rapidez de obtenção de resultados e custos (MARTINS, 2005). Quando a qualidade proteica é interpretada em termos de nutrição humana, o rato é normalmente escolhido nos ensaios *in vivo*. Porém, o uso deste modelo experimental pode levar a uma subestimação dos valores da qualidade de uma proteína para o homem, pois este requer menores quantidades de proteína para o crescimento e maiores para a manutenção quando comparado com o rato. Além disso, o rato possui maiores necessidades de aminoácidos sulfurados e lisina que o homem, sendo importante os estudos em humanos. Estas diferenças entre as duas espécies podem ser devidas à maior velocidade de crescimento do rato e também à maior quantidade de pêlos, fato este que explica a maior necessidade de aminoácidos sulfurados. Contudo, apesar das limitações nesse modelo experimental, os ensaios biológicos com o rato continuam sendo a principal técnica de laboratório, *in vivo*, para experimentos de determinação de qualidade proteica (AZEREDO, 2002).

O binômio tempo x temperatura foi adequado para reduzir a atividade da urease, pois ambas as farinhas atingiram valores desejáveis dentro da classificação recomendada (0,05 a 0,30 unidades de pH), enquanto as farinhas de soja cruas apresentaram índices indesejáveis (>0,30) (RUNHO, 2009). Tal resultado encontrado indica que o tratamento térmico foi suficiente para inativar fatores antinutricionais. Os resultados desse estudo corroboram aqueles encontrados por Wiriyampaiwon et al. (2004) que observaram atividade de urease de 0,10 a 0,16 unidades de pH em soja após tratamento com infravermelho.

Observou-se na análise de solubilidade que as farinhas de soja com casca e sem casca não foram superaquecidas, pois apresentaram solubilidade superior a 85% que é indicativo de subaquecimento (ARABA e DALE, 1990). Nossos resultados para farinha de soja com casca são superiores aos encontrados por Wiriyampaiwong et al. (2004) que para soja com casca tratada com infravermelho em diferentes tempos e temperaturas encontraram solubilidade proteica de 74,1 a 85,9%.

O tratamento térmico inativou completamente o inibidor tripsina, corroborando os resultados de Machado et al. (2008), que utilizaram tratamento térmico a 121° C por 10 minutos em grãos de soja, conseguindo inativar os inibidores em níveis desejáveis. A eficiente eliminação dos inibidores de tripsina depende de vários fatores, dentre eles, níveis de umidade antes do processamento (WHITE et al., 2000), tipo de



processamento (OLGUIN et al., 2003; WIRIYAUMPAIWONG et al., 2004) e do binômio tempo x temperatura (QIN et al., 1996). O calor também promove desnaturação parcial das proteínas da soja, aumentando a hidrólise, por enzimas digestivas (TRUGO et al., 2000). Contudo, o calor excessivo pode resultar em inativação completa da urease, mas em contrapartida poderá diminuir a solubilidade proteica afetando o valor nutricional da proteína (IWE et al., 2001). O binômio tempo x temperatura 150° por 30 minutos, utilizado no nosso estudo foi suficiente para inativar fatores antinutricionais e preservar a qualidade da proteína. A atividade de urease mostrou ser um bom indicador da inibição de tripsina, podendo ser usado como um método indireto, barato e rápido.

O menor ganho de peso dos grupos que receberam farinha de soja provavelmente ocorreu em função do menor consumo alimentar em relação à caseína. Silva et al. (2006) também observaram ganho de peso inferior ao da caseína em grupos tratados com subprodutos resultantes da extração de óleo do grão de soja, porém o consumo não difeiu entre os grupos testes.

O fornecimento de dieta *ad libitum* pode levar ao consumo alimentar além das necessidades do animal. Com isso, ele poderá produzir reserva de gordura e acúmulo de água. Tal fato pode mascarar a qualidade da proteína a ser testada pelo PER e NPR, em que o aumento de peso não seria apenas pela eficiência da proteína.

O CEA indicou resultado igual para as farinhas de soja com casca, sem casca e caseína, o que demonstra que as dietas eram isocalóricas. Além disso, a pequena diferença entre os valores de PER e NPR (12,0% e 14,2% para com casca e sem casca, respectivamente) indicou que as proteínas das dietas com farinha de soja apresentaram valor biológico adequado para crescimento e manutenção dos tecidos corporais. Proteínas com PER acima de 2 são consideradas de alto valor nutricional (AOAC, 1975).

O PER não diferiu entre as farinhas testadas, entretanto a farinha de soja sem casca não diferiu da caseína. Na dieta de farinha de soja com casca a fibra alimentar foi proveniente somente da farinha, e na dieta com farinha de soja sem casca a fibra celulose microfina foi adicionada para completar a necessidade. A complexação da fibra alimentar com a proteína na farinha com casca pode ter dificultado o ataque enzimático causando um pequeno comprometimento da qualidade proteica. No grupo à base de farinha de soja sem casca a celulose está livre e não dificultando o ataque das enzimas hidrolíticas, favorecendo o aproveitamento biológico da proteína.

Monteiro et al. (2004) encontraram valores de PER inferiores ao do presente estudo, para grãos de soja sem casca tratados em estufa a 89° C por 5 minutos, da mesma forma que Miura et al. (2000) que obtiveram PER inferiores em farinhas com baixas atividades residuais de inibidores de tripsina. Machado et al. (2008) também encontraram valores inferiores.

Andrade et al. (2008) encontraram valores de PER para farinhas de soja sem casca com baixo teor de inibidor de tripsina sem lipoxigenases, tratadas a 150° C por 30 minutos inferiores aos encontrados no presente trabalho, exceto para o cultivar convencional. Também Mendes et al. (2007) encontraram valores de PER para três cultivares de soja inferiores aos encontrados no presente trabalho, exceto o cultivar com KTI e com LOX, que apresentou resultados superiores.

Também, os valores de NPR das farinhas de soja com casca e sem casca encontrados no nosso estudo foram superiores aos cultivares de soja testados por Machado et al. (2008), Mendes et al. (2007), Monteiro et al. (2004) e Miura, et al. (2000).

Segundo Monteiro et al. (2004), a medida da digestibilidade indica a eficiência com a qual as proteínas são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo, constituindo o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização proteica da dieta. As proteínas da soja apresentam estruturas mais organizadas que a caseína, o que as tornam mais resistentes ao ataque enzimático, logo, proporcionam menor digestibilidade. Estudos do metabolismo animal sugerem que a qualidade da proteína de soja seja inferior a qualidade da caseína, mas faltam estudos comprobatórios em humanos (LUIKING et al., 2005). A digestibilidade verdadeira das farinhas de soja testadas foram acima de 80%, indicando elevada digestibilidade da proteína do novo cultivar de soja, corroborando os resultados de DV para farinha de soja citado pela FAO/WHO (2007). Nossos resultados foram superiores aos encontrados por Mendes et al. (2007) e Andrade et al. (2008), para os cultivares sem inibidor de tripsina e sem lipoxigenases.

As farinhas de soja apresentaram perfil aminoacídico adequado para todos os aminoácidos essenciais (IOM, 2002), exceto para o aminoácido de cadeia ramificada, valina, segundo as recomendações nutricionais de aminoácidos pela FAO/WHO (1985, 2007). Este resultado foi contrário aos usualmente reportados em literatura, em que as proteínas das leguminosas tem como fator limitante os aminoácidos sulfurados, como metionina + cistina e triptofano.

Morais et al. (2006) determinaram a composição aminoacídica dos grãos da soja UFVTN 105, de teor normal de proteína, que é o cultivar que originou a UFVTN 105AP, de elevado teor proteico. Ao compararmos o perfil aminoacídico da UFVTN 105 com o padrão FAO/WHO (2007) encontramos que esse cultivar tinha como limitante os aminoácidos metionina + cistina, lisina, histidina, treonina e valina. Com o desenvolvimento do cultivar de alto teor proteico, foi possível melhorar o balanço de aminoácidos, tendo como limitante apenas a valina.

Os valores de PDCAAS para as farinhas de soja foram inferiores aos encontrados para DV, utilizando os padrões FAO/WHO (1985, 2007). Entretanto, os valores de PDCAAS foram superiores quando utilizou-se o padrão IOM (2002) que apesar do escore químico ter sido superior a 1 para todos os aminoácidos essenciais, calculou-se o PDCAAS para saber quanto desse aminoácidos serão digeridos para a utilização no organismo.

Os valores de PDCAAS encontrados neste trabalho foram próximos aos encontrados por Monteiro et al. (2004) que avaliaram cultivares sem inibidor de Kunitz e lipoxigenases, uma vez que o aminoácido limitante foi a lisina. Vieira et al. (1999) encontraram para seis farinhas cruas testadas, apenas deficiência em lisina para o cultivar Embrapa-4, segundo padrão FAO/WHO (1985).

O melhoramento genético alterou favoravelmente o perfil de aminoácidos essenciais da proteína do novo cultivar, promovendo crescimento e desenvolvimento adequado dos animais, demonstrado pelo PER, NPR e digestibilidade proteica, mesmo quando a DV foi corrigida pelo escore químico, PDCAAS, segundo IOM (2002) e FAO/WHO (1985). Entretanto, quando calculou-se o escore químico pelo padrão FAO/WHO (2007), que apresenta recomendação maior para valina, o PDCAAS reduziu, indicando comprometimento da digestibilidade verdadeira em função do aminoácido limitante valina. Tal fato pode indicar a menor digestibilidade das farinhas de soja em relação à caseína, que é uma proteína de origem animal sem aminoácidos essenciais limitantes.

A soja, por ser uma leguminosa, apresenta fatores antinutricionais, que podem também comprometer sua qualidade proteica.

O ácido fítico pode diminuir a biodisponibilidade da proteína por se ligar aos peptídeos aminoácidos, inibindo a ação de enzimas proteolíticas (DEAK e JOHNSON, 2007). Vários estudos tem buscado eliminar o ácido fítico dos produtos de soja, visando melhorar o valor proteico, por meio de diversos processamentos, como diálise (DEAK e JOHNSON, 2007), adição de NaCl, (DERHAM e JOST, 1979), baixo pH em

combinação com o  $\text{CaCl}_2$  (FORD et al., 1978), ultrafiltração (OMOSAIYE e CHERYAN, 1979), resinas da troca iônica (KUMAGAI et al., 2002) e adição de fitase (SAITO et al., 2001). O tratamento térmico utilizado neste estudo foi eficaz para diminuir a concentração do ácido fítico presente nas farinhas. Os teores de  $\text{IP}^5$  e  $\text{IP}^6$ , foram 14,73 e 18,94  $\mu\text{mol}$  (Tabela 2, artigo 1) para as farinhas de soja com casca e sem casca, respectivamente. Concentrações superiores em farinhas de soja foram encontrados por Martino et al. (2007) e Andrade et al. (2008). Acredita-se que a baixa concentração de ácido fítico favoreceu ao aproveitamento da proteína nos índices encontrados no ensaio biológico.

Também, neste estudo pode se perceber que o tratamento térmico empregado foi capaz de inativar fatores antinutricionais, observados por meio da atividade de urease e da atividade de inibidor de tripsina, sem comprometer a solubilidade proteica. Todos estes fatores contribuíram para o adequado aproveitamento biológico da proteína de soja, com índices biológicos de PER, NPR, DV e PDCAAS superiores a outros estudos utilizando farinha de soja (MONTEIRO et al., 2004; MORAES et al., 2006; MENDES et al., 2007; MACHADO et al., 2008).

## **CONCLUSÃO**

O tratamento térmico aplicado aos grãos de soja, do novo cultivar de elevado teor proteico inativou urease, indicador de inativação de fatores antinutricionais. Tal fato foi confirmado pela inativação do inibidor de tripsina e pela concentração dos níveis de inosítois hexa e pentafosfato nas farinhas de soja com e sem casca.

Os índices de qualidade proteica, PER e NPR, indicaram que as farinhas foram adequadas para promover o crescimento e desenvolvimento dos animais. A digestibilidade verdadeira foi elevada, embora tenha sido inferior à caseína. O perfil aminoacídico indicou a soja limitante em um aminoácido essencial de cadeia ramificada, por apenas um dos padrões de recomendações nutricionais.

O melhoramento genético proporcionou equilíbrio qualitativo e quantitativo dos aminoácidos essenciais, com exceção da valina. Ao contrário dos aminoácidos sulfurados, que são usualmente reportados como limitantes na literatura.

Além disso, o processamento adequado dos grãos de soja favoreceu ao aproveitamento biológico das proteínas numa matriz alimentar contendo nutrientes e não nutrientes, indicando que o grão de soja pode ser utilizado de forma integral, para a produção de farinhas.

## 5.2.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, G.F.; SILVA, C.O.; PELUZIO, M.C.G. et al. **Qualidade proteica de farinhas de soja desenvolvidas a partir de novas variedades de soja**. In: xx Congresso Brasileiro de Nutrição- CONBRAN. Anais do CONBRAN. Rio de Janeiro: 100 p. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, p.1094. 1975.

ARABA, M. e DALE, N.M. Evaluation of protein solubility as an indicator of underprocessing of soybean meal. **Poultry Science**, v.69, n.10, p.1749-1752, 1990.

AZEREDO, E.M.C. Efeitos de lactobacillus acidophilus sobre a biodisponibilidade de zinco, de cálcio e sobre a qualidade proteica de bebidas probióticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.12-33, 2002.

BARROS, J.G.A.; DE MORAES, R.M.A.; PIOVESAN, N.D. et al. Efeito do inibidor de protease Kunitz sobre níveis de lipoxigenases em semente de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1126-1132, 2008.

BENDER, A.E. e DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v.11, p.138-143, 1957.

BRANDON, D.L. e FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6635-6642, 2002.

BRASIL. Portaria nº 108, de 04 set. 1991. **Estabelece os Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal**. **Diário Oficial [Da União]**: Brasília, 17 set. 1991, Seção I, p.19813-19842.

CARVALHO, M.R.B.; KIRSCHNIK, P.G.; PAIVA, K.C. et al. Avaliação da atividade dos inibidores de tripsina após digestão enzimática em grãos de soja tratados termicamente. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, n.3, 2002.

DEAK, N.A. e JOHNSON, L.A. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.84, n.4, p.369-376, 2007.

DERHAM, O. e JOST, T. Phytate-protein interactions in soybean extracts and manufacture of low-phytate soy protein products. **Journal Food Science**, v.44, p.596-600, 1979.

ERLANGER, B. F.; KOKOWOSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, n.2, p.271-278, 1961.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Protein quality evaluation**. FAO/WHO. Rome, 66 p, 1991.

- FORD, J.; MUSTAKAS, G.C. e SCHMUTZ, R.D. Phytic acid removal from soybeans by a lipid-protein concentrate process. **J Am Oil Chem Soc**, v.55, p.371-376, 1978.
- IWE, M.O.; VAN ZUILICHEM, D.J.; NGODDY, P.O. et al. Amino Acid and Protein Dispersibility Index (PDI) of Mixtures of Extruded Soy and Sweet Potato Flours. **Food Science and Technology**, v.34, n.2, p.71-75, 2001.
- KUMAGAI, H.; ISHIDA, S.; KOIZUMI, A. et al. Preparation of phytate-removed deamidated soybean globulins by ion exchangers and characterization of their calcium-binding ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.172-176, 2002.
- LUCAS, B. e SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperatures and hydrolyses times on tryptophan determination of pure proteins and foods. **Anal. Biochem.**, v.109, p.192-197, 1980.
- LUIKING, Y.C.; DEUTZ, N.E.P.; JAKEL, M. et al. Protein Meals Differentially Affect Whole-Body and Splanchnic Protein Metabolism in Healthy Humans **J. Nutr**, v.135, p.1080-1087, 2005.
- MACHADO, F.P.P.; QUEIRÓZ, J.H.; OLIVEIRA, M.G.A. et al. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. **Food Chemistry**, v.107, n.2, p.649-655, 2008.
- MARTINO, H.S.D.; MARTIN, B.R.; WEAVER, C.M. et al. Zinc and iron bioavailability of genetically modified soybeans in rats. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.689-695, 2007.
- MARTINS, M.T.S. Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolizado proteico de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.683-690, 2005.
- MENDES, F.Q.; OLIVEIRA, M.G.A.; CARDOSO, L.R. et al. Digestibilidade proteica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina Kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Journal of Biosciences**, v.23, p.14-21, 2007.
- MIURA, E.M.Y.; BINOTTI, M.A.R.; CAMARGO, D.S. et al. Avaliação Biológica de Linhagem de Soja com Baixa Atividade de Inibidores de Tripsina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1754-1758, 2000.
- MIURA, E.M.Y.; FERREIRA DA SILVA, R.S.D.S.; MIZUBUTI, I.Y. et al. Cinética de Inativação de Inibidores de Tripsina e de Insolubilização de Proteínas de Diferentes Cultivares de Soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1659-1665, 2005.
- MONTEIRO, M.R.P.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.D.A. et al. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.195-205, 2004.
- MONTEIRO, M.R.P.; MOREIRA, M.A.; COSTA, N.M.B. et al. Avaliação da Digestibilidade Proteica de Genótipos de Soja com Ausência e Presença do Inibidor de

Tripsina Kunitz e Lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.6, n.1, p.99-107, out, 2003.

MOORE, S.; SPACKMAN, D.H. e STEIN, W.H. Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins. **Anal. Chem.**, v.30, p.1185-1190, 1958.

MORAES, R.M.A.; JOSÉ, I.C.; RAMOS, F.G. et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesq. agropec. bras.**, v.41, p.725-729, 2006.

OLGUIN, M.C.; HISANO, N.; D'OTTAVIO, A.E. et al. Nutritional and antinutritional aspects of an Argentinian soy flour assessed on weanling rats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, n.4, p.441-449, 2003.

OMOSAIYE, O. e CHERYAN, M. Low-phytate, full-fat protein product by ultrafiltration of aqueous extracts of whole soybeans. v.56, p.58-62, 1979.

PENHA, L.A.O.; FONSECA, I.C.B.; MANDARINO, J.M. et al. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.25, p.91-102, jan/jun, 2007.

QIN, G.; TER ELST, E.R.; BOSCH, M.W. et al. Thermal processing of whole soya beans: Studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.313-324, 1996.

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

RUNHO, C.R. Farelo de soja: Processamento e qualidade. Disponível em: <[http://www.polinutri.com.br/conteúdo\\_artigos\\_anteriores\\_janeiro.htm](http://www.polinutri.com.br/conteúdo_artigos_anteriores_janeiro.htm)>. Acesso em: 08 de março 2009.

SAITO, T.; KOHNO, M.; TSUMURA, K. et al. Novel method using phytase for separating soybean b-conglycinin and glycinin. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.65, p.884-887, 2001.

SAS. **STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. User's guide. Version 8.0.** SAS Institute. Cary. 2002.

SILVA, M.S.; NAVES, M.M.V.; DE OLIVEIRA, R.B. et al. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.571-576, 2006.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. e MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, v.30, p.1190-1206, 1963.

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

TRUGO, L.C.; DONANGELO, C.M.; TRUGO, N.M.F. et al. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.6, p.2082-2086, 2000.

VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C. e PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.

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

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

YAKLINCH, R.W.  $\beta$ -conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.729-735, 2001.



## 6 – CONCLUSÃO GERAL

Pode-se concluir que o tratamento térmico 150° C por 30 minutos nas farinhas de soja do cultivar UFVTN 105AP inativou completamente o inibidor de tripsina.

A produção de farinha de soja com casca pode representar uma valiosa estratégia para aumentar a ingestão de fibra alimentar, e suprir 35% a mais de ferro do que a soja sem casca. O novo cultivar pode ser usado para auxiliar a suprir a necessidade de ferro de indivíduos com baixa ingestão em dietas convencionais e não convencionais. Além disso, países em desenvolvimento como o Brasil apresentam elevada prevalência de anemia ferropriva (WHO, 2008), o que justifica o incentivo à produção da farinha de soja com a casca.

O melhoramento genético proporcionou equilíbrio qualitativo e quantitativo dos aminoácidos essenciais, com exceção da valina, ao contrário dos aminoácidos sulfurados, que são usualmente reportados na literatura.

Os índices de qualidade proteica, PER e NPR, indicaram que as farinhas foram adequadas para promover o crescimento e o desenvolvimento dos animais. A digestibilidade verdadeira e PDCAAS foram elevadas, quando comparados a outros estudos com soja.

O processamento da soja favoreceu o aproveitamento biológico das proteínas e a biodisponibilidade de ferro, indicando que o grão de soja pode ser utilizado de forma integral, para produção de farinhas.

## 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados, evidencia-se que são necessárias medidas educativas para a população de técnicas de preparo adequadas da soja visando à melhor utilização de seus nutrientes.

É importante o desenvolvimento de novos produtos e pesquisas de análise sensorial, utilizando a farinha de soja com casca do novo cultivar, visando sua inserção no mercado com produtos de boa aceitação.

Novos estudos serão importantes para investigar o efeito funcional de farinha de soja integral nos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis, associados ou não à ingestão de alimentos inadequados.

Também é importante o trabalho do profissional nutricionista de conscientizar o valor nutricional da soja, visando aumentar seu consumo no País, uma vez que além do valor nutritivo, possui valor funcional.

# **ANEXO**