

Avaliação da atividade dos inibidores de tripsina após digestão enzimática em grãos de soja tratados termicamente¹

Evaluation of trypsin inhibitors activity after enzymatic digestion in heat-treated soybean

Maria Regina Barbieri de CARVALHO²

Peter Gaberz KIRSCHNIK²

Kelli Cristina PAIVA²

Felipe Shindy AIURA²

RESUMO

Este trabalho avalia a reativação dos inibidores de tripsina, após proteólise *in vitro*, de grãos de soja tratados termicamente. Para a inativação térmica dos inibidores, os grãos foram embebidos em água destilada (1:5 p/v) durante 12 horas e aquecidos em placas sob refluxo por 30 minutos. A reativação dos inibidores foi avaliada em comparação com a atividade das amostras cruas e aquecidas. A digestibilidade *in vitro* das proteínas variou de 47% ('OC-13') a 59% (Paraná), apresentando uma melhora, em média, de 32,6% com o aquecimento. A atividade dos inibidores de tripsina para os grãos crus variou de 122 a 206 UTI/mg de amostra, e os valores correlacionaram-se negativamente com a porcentagem de digestibilidade ($r = -0,9177$). Os inibidores tiveram suas atividades totalmente inativadas com o aquecimento dos grãos, os quais apresentaram porcentagem de recuperação, em média, de 40%. Com o aquecimento, a inativação dos inibidores provavelmente ocorre por complexação com os componentes do grão, o que leva à recuperação da atividade com o processo de digestão enzimática.

Termos de indexação: inibidores de tripsina, inativação térmica, digestibilidade *in vitro*, reativação, digestão enzimática, feijão de soja.

ABSTRACT

This work evaluates the trypsin inhibitors reactivation, after in vitro proteolysis, of heat-treated soybean. For the inhibitors thermal inactivation, soybeans were soaked in distilled water (1:5 p/v) during 12 hours and

¹ Pesquisa parcialmente financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), Processo n. 98/06748-5.

² Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Rodovia Paulo Donato Castellani, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: M.R.B. CARVALHO. E-mail: mrbcar@fcav.unesp.br

heated on reflux plates for 30 minutes. The inhibitors reactivation was evaluated in comparison with the activity of raw and heated samples. The *in vitro* digestibility of proteins ranged from 47% ('OC-13') to 59% ('Parana'), showing an average progress of 32.6% with the heating. The trypsin inhibitors activity ranged from 122 to 206 UTI/mg for the raw sample, and the values correlated negatively with the digestibility percentage ($r = -0.9177$). The inhibitors had the activities totally inactivated with the heating of soybeans, which showed an average recovering percentage of 40%. With the heating, the inactivation of inhibitors probably takes place by complexing with the soybean components, which leads to the recovering of activity with the enzymatic digestion process.

Index terms: trypsin inhibitors, thermal inactivation, *in vitro* digestibility, reactivation, soybeans.

INTRODUÇÃO

Nos grãos das leguminosas verifica-se a ocorrência natural dos inibidores de tripsina. A sua presença no trato intestinal inibe a ação da tripsina, que é responsável pela digestão das proteínas, levando a um aumento na produção enzimática pelo pâncreas e à hipertrofia deste órgão.

Na nutrição humana tais fatores antinutricionais têm pequena consequência, pois são termolábeis e geralmente são destruídos nas condições normais de preparo, doméstico ou industrial, dos alimentos (Ojimelukwe *et al.*, 1995). No entanto, a utilização cada vez maior de alimentos naturais ou o uso de baixas temperaturas de cozimento podem expor a população aos seus efeitos deletérios.

Vários procedimentos têm sido adotados para o tratamento térmico dos grãos, implicando em inativação dos fatores antinutricionais e em mudanças na estrutura das proteínas, elevando a digestibilidade destes nutrientes.

O aquecimento térmico tem-se mostrado bastante eficiente para os grãos inteiros, mas com efeitos reduzidos ou mesmo ineficientes quando se trata da farinha ou de inibidores purificados (Rayas-Duarte *et al.*, 1992; Carvalho & Sgarbieri, 1997). Ellenrieder *et al.* (1980) concluíram que componentes de alto peso molecular, separados dos extratos de soja por filtração em gel de Sephadex G-75, aceleraram a inativação térmica dos inibidores de tripsina. Segundo Tsukamoto *et al.* (1983), proteínas, polissacarídeos e ácidos

nucléicos provenientes do feijão são fatores inativantes, pela interação com os inibidores, e, de acordo com Galeazzi & Sgarbieri (1988), a ação do calor leva os inibidores a se complexarem com os componentes do grão, não sendo, portanto, eliminados. Desta forma, ainda não existe consenso das condições de aquecimento mais adequadas para a inativação dos inibidores de tripsina. Assim, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar a reativação desses inibidores após a proteólise *in vitro* de amostras de grãos de soja tratados termicamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill): IAC-17, IAC-31, Paraná, OC-13 e CAC-1.

Os grãos de soja, após maceração em água destilada (1:5 p/v) durante 12 horas em temperatura ambiente, foram aquecidos em água fervente, sob refluxo, por 30 minutos. Após resfriamento rápido em banho de gelo, as amostras foram secas em estufa (60°C) com circulação de ar e moídas até a granulometria de 70 mesh.

A extração dos inibidores foi realizada agitando-se, durante uma hora em temperatura ambiente, 0,5 g da amostra (previamente desengordurada a frio, com éter de petróleo) em 25 mL de HCl 0,025 M. A suspensão foi então filtrada em papel *Whatman* n.2 e o filtrado

utilizado para determinação da atividade dos inibidores de tripsina. Esta atividade, em amostras cruas, tratadas termicamente e hidrolisadas, foi determinada utilizando-se o benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato para a tripsina, conforme procedimentos descritos por Kakade *et al.* (1969).

Alíquotas do extrato protéico 0,2 a 1,0mL foram pipetadas, em triplicatas, e o volume final foi ajustado para 1mL com tampão Tris 50 mM, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20mM. A cada tubo, previamente acondicionado em banho-maria a 37°C, adicionaram-se 1mL da solução de tripsina (0,08 mg/mL de HCl 0,001 N) e, após 10 minutos, 7,0mL de BAPNA (0,3mg/mL de tampão Tris 50 mM, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20 mM), previamente aquecidos a 37°C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1,0 mL de ácido acético 30%. A absorbância foi lida a 410 nm, contra os brancos aos quais adicionou-se o ácido acético antes do BAPNA. Uma unidade de tripsina (UT) foi definida arbitrariamente como o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 410 nm por 10 mL do meio de reação. Os resultados foram expressos como unidades de tripsina inibida (UTI) por mg de amostra.

A digestibilidade *in vitro* foi determinada, basicamente, segundo o procedimento de Akesson & Stahman (1964), o qual utiliza um sistema enzimático composto por pepsina/pancreatina e ácido tricloroacético (TCA) para a precipitação da proteína não hidrolisada. No hidrolisado foram identificadas a quantidade de nitrogênio (método semi-microkjeldahl) e a atividade dos inibidores de tripsina.

A porcentagem de digestibilidade foi determinada correlacionando-se o nitrogênio total da amostra analisada com o nitrogênio contido no hidrolisado. A reativação dos inibidores de tripsina foi avaliada em comparação com a atividade das amostras cruas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade nutricional dos cultivares de soja em estudo foi avaliada através da digestibilidade *in vitro* das proteínas e os resultados obtidos (Tabela 1) evidenciam uma variação de 47% ('OC-13') a 59% ('Paraná'). Com o aquecimento dos grãos em água fervente, houve uma melhora na digestibilidade, ocorrendo um acréscimo, em média, de 32,6 ± 5,94%. Os cultivares OC-13 e CAC-1 apresentaram os menores valores, tanto para a amostra crua quanto para a aquecida; no entanto, obtiveram os maiores acréscimos após o tratamento térmico, ou seja, 38% e 39%, respectivamente. A melhora na digestibilidade com o tratamento térmico é atribuída às alterações estruturais das proteínas, aumentando a susceptibilidade à hidrólise enzimática (Deshpande & Damodaran, 1989; Carbonaro *et al.*, 1992).

A atividade variou de 122 a 206 UTI/mg de amostra, respectivamente, para os cultivares Paraná e OC-13. Os inibidores de tripsina estão envolvidos com as funções fisiológicas das plantas, e a sua presença, ainda que em proporções variáveis, durante o ciclo vital das sementes, sugere sua importância ao vegetal (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios obtidos para a digestibilidade *in vitro* das amostras cruas e aquecidas (%).

Cultivares	Digestibilidade		
	amostra crua (%)	amostra aquecida (%)	% de acréscimo
IAC-17	55	71	29
IAC-31	55	69	25
Paraná	59	78	32
OC-13	47	65	38
CAC-1	49	68	39

Tabela 2. Valores médios para atividades dos inibidores de tripsina e porcentagem de recuperação.

Cultivares	UTI ⁽¹⁾ /mg		% de recuperação
	amostra crua (%)	amostra aquecida e digerida (%)	
IAC-17	129	51	40
IAC-31	132	53	40
Paraná	122	46	38
OC-13	206	95	46
CAC-1	160	57	36

⁽¹⁾ UTI = unidades de tripsina inibidas.

Os inibidores de tripsina, presentes nos cultivares de soja analisados, tiveram suas atividades totalmente inativadas com o aquecimento dos grãos em água fervente por 30 minutos. A sua estabilidade térmica é bastante variada, estando na dependência, entre outros fatores, da temperatura, duração e forma de aquecimentos, do tamanho das partículas, do conteúdo de umidade, da conformação estrutural do inibidor. Em alguns cultivares de feijão a atividade dos inibidores é destruída em menos de 10 minutos, com aquecimento a 120°C, enquanto em outros ela pode ser detectada após 60 minutos de tratamento a 100°C (Sgarbieri & Whitaker, 1982). A resistência oferecida pelos inibidores à inativação térmica pode ser devida à sua configuração compacta, como consequência do elevado número de ligações dissulfídicas nas suas moléculas (Sgarbieri & Whitaker, 1982).

A presença dos inibidores de tripsina nos grãos de leguminosas contribuem para a redução da digestibilidade de suas proteínas (Liener, 1979). Esta situação também foi verificada neste estudo, pois os valores de atividade dos inibidores correlacionaram-se negativamente ($r = -0,9177$) com a porcentagem de digestibilidade. Deste modo, o cultivar OC-13, que apresentou a maior atividade para os inibidores (206 UTI/mg de amostra), obteve o menor valor para digestibilidade *in vitro* (47%).

Os resultados obtidos para a atividade dos inibidores de tripsina nos grãos tratados termicamente e submetidos à digestão enzimática, bem como as porcentagens de recuperação da atividade em relação à amostra crua, estão apresentados, também, na Tabela 2.

A atividade variou de 46 UTI/mg de amostra ('Paraná') a 95 UTI/mg de amostra ('OC-13'), havendo uma correlação positiva ($r = 0,9656$) com os valores de atividade dos grãos crus. A porcentagem de recuperação da atividade foi, em média, $40 \pm 3,74\%$, sendo o maior valor observado para o cultivar OC-13 (46%). Galeazzi & Sgarbieri (1988) também observaram a regeneração, em até 100% da atividade, após digestão enzimática de amostras de feijão autoclavadas.

O mecanismo de inativação pode ocorrer, portanto, pela complexação dos inibidores. Desse modo, com a ação do calor os inibidores se ligam com outros componentes do grão e se tornam inativos, indicando assim que essa inativação não deve ter ocorrido pela desnaturação térmica das moléculas dos inibidores. Ao serem submetidos à hidrólise enzimática, apresentam-se novamente ativos, mostrando que a ação do calor é benéfica na inativação dos inibidores, porém não os elimina completamente.

Os inibidores de tripsina apresentam características próprias em relação à sua hidrólise proteolítica. O inibidor do tipo Bowman-Birk não é hidrolisado pela papaína (Sgarbieri, 1979) nem pela pepsina (Tsukamoto *et al.*, 1983), enquanto o tipo Kunitz tem esta propriedade em relação a estas duas substâncias (Vaintraub & Yattara, 1995).

Em um estudo sobre a ação das enzimas pepsina e papaína sobre a atividade do inibidor de Kunitz da soja, foi observado que a hidrólise degradava os inibidores em peptídeos pequenos, os quais retinham toda a atividade inibitória (Vaintraub & Yattara, 1995). Esse inibidor possui baixos teores de meia cistina e de grupos ácidos

nas moléculas (Sgarbieri, 1979), conferindo-lhe a propriedade de sofrer alterações conformacionais e desnaturação parcial em meio ácido, de maneira a expor as ligações peptídicas à ação da pepsina.

Os inibidores do tipo Bowman-Birk, em virtude da predominância de grupos ácidos na molécula e do elevado teor de pontes dissulfeto, apresentam resistência à desnaturação, tanto térmica como pela ação da pepsina (Sgarbieri, 1979).

Como na soja estão presentes os dois tipos de inibidores, tem-se a possibilidade de estes alcançarem o trato gastrointestinal nas suas formas ativas, pois se apresentam resistentes à hidrólise enzimática, ou, quando fragmentados, retêm a atividade inibitória.

A regeneração da atividade de inibidor de tripsina em amostras tratadas termicamente e hidrolisadas *in vitro* pode ser conseqüência dos seguintes fatores: interação dos inibidores, por ação do calor, com outras substâncias próprias do grão, levando-os à inativação; e retenção da atividade inibitória pelos fragmentos obtidos com a degradação proteolítica.

CONCLUSÃO

O tratamento térmico inativou os inibidores de tripsina e elevou a digestibilidade *in vitro* da proteína. Esta inativação, com o aquecimento, parece ocorrer por complexação com os componentes do grão, o que leva à recuperação da atividade com o processo de digestão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKESON, W.R., STAHMAN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.83, n.3, p.257-261, 1964.
- CARBONARO, M., MARLETTA, L., CARNOVALE, E. Factors affecting cystine reactivity in proteolytic digests of *Phaseolus vulgaris*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington DC, v.40, n.2, p.32-42, 1992.
- CARVALHO, M.R.B., SGARBIERI, V.C. Heat treatment and inactivation of trypsin: chymotrypsin inhibitors and lectins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Food Biochemistry*, Westport, v.21, n.3, p.219-233, 1997.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Structure: a digestibility relationship of legume 7S proteins. *Journal Food Science*, Chicago, v.54, n.1, p.108-113, 1989.
- ELLENRIEDER, G., GERONASO, H., DE BOJARSKI, A.B. Thermal inactivation of trypsin inhibitors in aqueous extracts of soybeans, peanuts and kidney beans: presence of substances that accelerate inactivation. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.57, n.1, p.25-27, 1980.
- GALEAZZI, M.A.M., SGARBIERI, V.C. Inactivation and reactivation of trypsin inhibitors in different bean varieties. In: ORGANIZATION of the American States. *Advances in bean research: chemistry, nutrition, technology*. São Paulo : EDUSP, 1988. p.15.
- KAKADE, M.L., SIMONS, N., LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substract for measuring the antitryptic of soybean samples. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.46, n.4, p.518-526, 1969.
- LIENER, I.E. The nutritional significance of plant protease inhibitor. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, v.38, n.1, p.109-113, 1979.
- OJIMELUKWE, P.C., ONUOHA, C.C., OBANU, Z.A. Effect of processing in vivo proteolytic digestion on soybean and yambean hemagglutinins. *Plant Foods for Human Nutrition*, Doidrech, v.47, n.3, p.293-299, 1995.
- RAYAS-DUARTE, P., BERGERON, D., NIELSEN, S.S. Screening of heat-sable inhibitor trypsin in dry beans and their partial purification from great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin sepharose affinity chromatography. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington DC, v.40, n.2, p.32-42, 1992.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*,l.) var. Rosinha G2. Campinas, 1979. 207p.

- Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 1979.
- SGARBIERI, V.C., WHITAKER, J.R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advance Food Research*, Orlando, v.28, n.1, p.93-166, 1982.
- TSUKAMOTO, I., MIYOSHI, M., HAMAGUCHI, Y. Purification and characterization of trypsin inhibitors from beans *Phaseolus vulgaris* 'Kintoki'. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.60, n.3, p.281-286, 1983.
- VAINTRAUB, I.A., YATTARA, H.B. Proteolysis of kunitz soybean trypsin inhibitor. Influence on its activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington DC, v.43, n.4, p.862-866, 1995.
- Recebido para publicação em 5 de setembro de 2000 e aceito em 7 de novembro de 2001.