

Revista Brasileira de Nutrição Esportiva

ISSN 1981-9927 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbne.com.br

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM SUPLEMENTOS VENDIDOS NO COMERCIO INTERNACIONAL Á BASE DE PROTEÍNA VEGETAL

Leonardo Oliveira de Assis¹, Hygor Bruno de Moura Andrade¹
Fabiana Maria Coimbra de Carvalho¹, Raphael Paschoal Serquiz¹
Alexandre Coelho Serquiz^{1,2}

RESUMO

As proteínas são componentes importantes da dieta humana e exercem um papel essencial como elementos estruturais e funcionais de sistemas vivos. Seu valor nutricional dependerá, dentre outras características, do perfil de aminoácidos, biodisponibilidade, alergenicidade entre outros fatores, podendo, a presença de inibidores enzimáticos diminuir sua obtenção. Os inibidores de protease são reconhecidos tradicionalmente como fator antinutricional e podem ser desnaturados por processamento térmico, embora alguma atividade residual possa ainda permanecer em produtos produzidos comercialmente. O presente estudo teve como objetivo determinar a atividade específica de inibição para tripsina, quimiotripsina e pepsina em suplementos a base de proteína vegetal isolada através da obtenção do extrato bruto, determinação de proteínas solúveis e quantificação da atividade inibitória através de testes específicos. Todos os suplementos analisados apresentaram atividade inibitória para tripsina, quimiotripsina e pepsina sendo os suplementos de soja os que apresentaram maior atividade inibitória para proteases. Concluiu-se que a utilização destes suplementos sofre uma influência negativa em decorrência da presença de inibidores enzimáticos, diminuindo sua funcionalidade para fins de hipertrofia.

Palavras-chave: Inibidores de serino orotransaminase. Tripsina. Quimiotripsina. Pepsina. Suplementos nutricionais.

1-Universidade Potiguar, Rio Grande do Norte, Brasil.

2-Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Rio Grande do Norte, Brasil.

ABSTRACT

Determination of digestive enzymes inhibition activity in vegetable protein based supplements available in international commerce

Proteins are important components of the human diet and play an essential role as structural and functional elements of living systems. Their nutritional value will depend, among other characteristics, on the amino acid profile, bioavailability, allergenicity, among other factors, and the presence of enzymatic inhibitors may decrease it. Protease inhibitors are traditionally recognized as an anti-nutritional factor and can be easily denatured by thermal processing, although some residual activity may remain in commercially produced products. The present study aimed to determine the specific activity of inhibition for trypsin, chymotrypsin and pepsin in supplements based on isolated plant protein by obtaining the crude extract, determination of soluble proteins and quantification of inhibitory activity through specific tests. All supplements analyzed showed inhibitory activity for trypsin, chymotrypsin and pepsin, and soybean supplements showed the highest inhibitory activity for proteases. In this report, we concluded that the use of these supplements has a negative influence due to the presence of enzymatic inhibitors, reducing their functionality for hypertrophy purposes.

Key words: Serine proteinase inhibitors. Trypsin. Chymotrypsin. Pepsin. Nutritional supplements.

E-mails dos autores:

leoolivert@gmail.com

hygorbruno51@gmail.com

fabianacoimbra@hotmail.com

raphaserquiz@hotmail.com

alexandreserquiz@gmail.com

INTRODUÇÃO

As proteínas são componentes importantes da dieta humana e exercem um papel essencial como elementos estruturais e funcionais de sistemas vivos. São moléculas essenciais aos animais, devendo, portanto, estar presentes na alimentação em quantidades adequadas.

Além do aspecto quantitativo deve-se levar em conta o aspecto qualitativo, isto é, seu valor nutricional, que dependerá de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais (Boye, Wijesinha-Bettoni e Burlingame, 2012; Pires, 2006).

A busca por novas fontes alimentares tem despertado o interesse da comunidade científica a respeito de proteínas vegetais alternativas, englobando culturas tradicionais e subprodutos gerados a partir do beneficiamento de produtos in natura (Ferri, 2006).

Dentre todos os constituintes orgânicos vegetais, especificamente as proteínas são encontradas em altos percentuais em sementes de leguminosas (Richardson, 1991).

Mundialmente, as proteínas vegetais mais comuns encontradas como produtos alimentícios são as derivadas de soja ou trigo (Egbert e Payne, 2009).

Há uma variedade de outras proteínas de plantas que são ou podem ser comercialmente disponíveis no futuro, inclusive de ervilha, batata, milho, canola, arroz entre outras proteínas de leguminosas ou sementes oleaginosas. Porém, a maioria desses ingredientes possui algum tipo de limitação ao uso, como fatores antinutricionais e baixos níveis de aminoácidos essenciais (Egbert e Payne, 2009; Proll, 1998).

Inibidores de protease, encontrados em alimentos de origem vegetal, são proteínas globulares que se ligam, por exemplo, a tripsina ou quimi tripsina formando complexos que inativam a capacidade proteolítica de enzimas, diminuindo a proteólise e o valor nutricional dos alimentos (Bonnet e colaboradores, 2007).

Os inibidores de protease são reconhecidos tradicionalmente, no alimento, como fator antinutricional (Giri e Kachole, 2004; Tur-Sinai e colaboradores, 1972).

A presença de níveis elevados de inibidores de tripsina em dietas com soja, feijão ou outras leguminosas têm sido relatados como causadoras de reduções substanciais em digestibilidade de proteínas e aminoácidos (até 50%) e qualidade proteica (até 100%) em ratos e/ou porcos (Araújo, 2011; Gilani, Xiao e Cockell, 2012).

Em contrapartida, exatamente devido a sua ação inibitória, também os inibidores têm se destacado, positivamente, no controle de vários processos biológicos, pelo seu amplo espectro de ações heterólogas, agindo na regulação da hiperatividade de certas enzimas ou mesmo as inativando e favorecendo diversos processos com efeitos benéficos para saúde. São reconhecidos como moléculas bioativas, com funções anticâncer, anti-inflamatória, antiobesidade, entre outras (Fang e colaboradores, 2010; Ribeiro, 2013; Serquiz, 2012).

Devido à sua natureza proteica específica, alguns inibidores de protease podem ser desnaturados por processamento térmico, embora alguma atividade residual possa ainda permanecer em produtos produzidos comercialmente (Giri e Kachole, 2004).

É notável que a produção de proteínas de alto valor à base de vegetais está amadurecendo, como mostrado pela recente aprovação de produtos inovadores (Sack e colaboradores, 2015).

Neste sentido, os inibidores enzimáticos proteicos estão sendo bastante estudados visando a sua identificação em alimentos e, principalmente, a determinação da concentração adequada para o consumo e as formas de inativação ou redução das suas atividades (Del-Vechio e colaboradores, 2005; Seibel, Beleia e Braz, 2009).

Com o presente estudo, espera-se constatar que a atividade de inibidores de enzimas digestivas como serinoproteinases e pepsina presentes em extratos proteicos vegetais mesmo após seu processamento influi diretamente na qualidade proteica e digestibilidade dos mesmos, ocasionando uma diminuição de sua funcionalidade para adeptos do consumo desse tipo de suplemento proteico.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo de caráter experimental em corte transversal utilizou como fonte amostras de 15 suplementos vegetais nacionais e importados adquiridos no mercado local da cidade do Natal-RN, sendo estes seis suplementos à base de soja, quatro suplementos a base de arroz, quatro suplementos a base de ervilha e um suplemento a base de arroz com ervilha.

Obtenção do extrato bruto

As amostras de suplementos foram extraídas separadamente em tampão Tris-HCl 0,05 M na proporção 1:10 (p/v). Na sequência, cada amostra foi mantida por cerca de 12 h a 8°C e centrifugada a 12.000 x g por 30 min, a 4°C para obtenção das proteínas precipitadas. O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido como extrato bruto.

Fracionamento Proteico dos Suplementos Vegetais

O extrato bruto foi fracionado após a separação das amostras de cada suplemento, por meio da precipitação sequencial com sulfato de amônio a 0-30% (F1), 30-60% (F2), e 60-90% (F3) de saturação.

Avaliação da atividade inibitória de enzimas digestivas

Determinações de proteínas solúveis

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura de quantificação proteica foi realizada em espectrofotômetro (Amersham Biosciences - Ultrospec 2100 pro) a 595 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteínas solúveis/µL e utilizados para o cálculo da atividade específica expressa em UI (unidade inibição)/µg de proteínas solúveis. A UI foi definida como a quantidade de inibidor capaz de diminuir em 0,01 nm o valor de absorvância no ensaio anti-trípico.

Determinação da atividade anti-trípica do extrato e frações proteicas

As atividades anti-trípicas dos suplementos estudados foram determinadas utilizando a seguinte metodologia: alíquota de 20 µL da solução de tripsina bovina (0,3 mg/ml HCl 2,5 mM) foi pré-incubada com 560 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, 120 µL de HCl 2,5 mM e 100 µL de suplemento por 15 minutos a 37°C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 500 µL de solução de substrato específico (BAPNA 1,25 mM). A reação foi processada por mais 10 minutos, nas mesmas condições de incubação, e em seguida, interrompida adicionando-se 120 µL de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e provas em branco foram realizadas. A absorvância foi medida a 405 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

Determinação da atividade anti quimiotríptica do extrato e frações proteicas

A atividade anti quimiotríptica foi determinada incubando 100 mL do isolado proteico dos três produtos alimentícios analisados, a enzima quimotripsina a 0,02 mg mL⁻¹ e a azocaseína a 1% como substrato. A hidrólise do substrato foi mensurada por meio da leitura das absorvâncias em comprimento de onda a 440 nm medidas por espectrofotômetro. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

Análise estatística

Os dados foram tabulados por meio de estatística descritiva e expressos em mediana, analisado pelo Graph Pad Prism, versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade inibitória para tripsina

A análise realizada constatou que para atividade inibitória de tripsina nas amostras estudadas houve uma maior quantidade de inibição nos suplementos a base de soja, chegando a 100% de inibição no suplemento de Soja 4, superando os suplementos de arroz

e ervilha, que mantiveram percentuais de inibição em torno de 50%.

O resultado das análises encontra-se no gráfico 1.

Os suplementos a base de soja mantiveram de forma geral maiores percentuais de inibição para tripsina, o que era esperado, tendo em vista que em grãos de leguminosas, verifica-se a ocorrência natural dos inibidores de tripsina (Conceição, 2010) e que a soja tem sido descrita por conter antinutrientes que limitam a sua utilização, estando os inibidores de protease entre os mais importantes e extensivamente investigados dentre esses antinutrientes proteicos (Monteiro e colaboradores, 2004).

Esta relatividade entre os valores de inibição dos suplementos de soja e dos outros suplementos estudados deve-se também ao teor de proteínas solúveis presente em cada amostra, tendo em vista que com o aumento deste há também a elevação na extração.

Todos os suplementos a base de ervilha e arroz apresentaram atividade inibitória para tripsina, o que caracteriza também a ineficiência do processamento térmico durante a produção do suplemento.

Este fato pode ser evidenciado por estudos como o de Cazetta (2009) onde a atividade de inibição para tripsina foi maior em grãos de ervilha crus em relação aos que sofreram cocção, constatando-se que a inativação eficaz desses inibidores depende da ação simultânea de calor e umidade.

Estudos de Petrovic (2014), mostram que quanto maior a quantidade de inibidores presentes nas leguminosas menor será sua qualidade nutricional. Os inibidores presentes nesses suplementos atuam também de maneira prejudicial em relação ao aproveitamento de proteínas presentes nos mesmos, interferindo assim na biodisponibilidade além de inibir ou reduzir a digestão proteica e, assim, a absorção de nutrientes (Conceição e colaboradores, 2010).

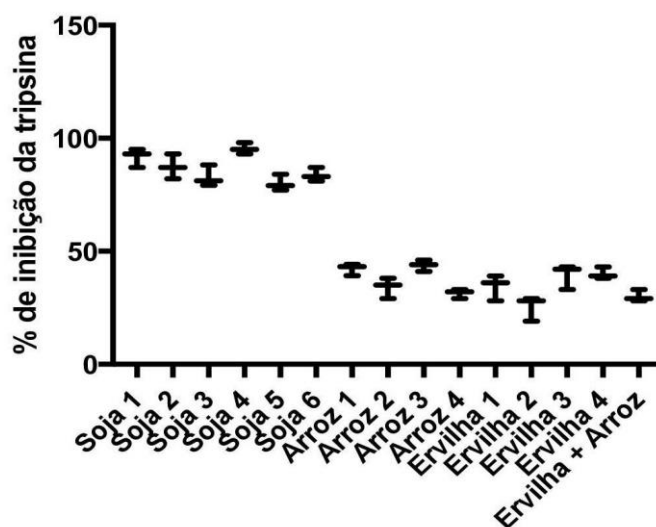


Gráfico 1 - Percentuais de inibição para tripsina em suplementos vegetais.

Atividade inibitória para quimi tripsina

Constatou-se percentuais de inibição de 65% nos suplementos de soja 1 e 3, seguidos pelos suplementos de soja 5 e 6 com 57% de inibição.

Dentre os suplementos de arroz e ervilha, o suplemento de ervilha 4 apresentou percentual de inibição de 45%.

Os resultados encontram-se no gráfico 2.

Os suplementos de soja apresentaram maior atividade inibitória para quimi tripsina em relação aos suplementos de arroz e ervilha. A forma de processamento das amostras influencia na quantificação da atividade inibitória para quimi tripsina como já estabelecido em estudo de Cardoso e colaboradores (2008) onde foi analisada a

quantidade de inibidores de protease em amostras de soja *in natura*, processada em diferentes temperaturas e constatou-se que o processo de obtenção do extrato bruto e a linhagem da soja interferem diretamente na atividade inibitória para quimiotripsina.

Já os suplementos de ervilha apresentaram faixas de inibição de quimiotripsina variáveis e condizentes com a presença de inibidores de tripsina já observada, tendo em vista que a maioria das variedades de inibidores de protease da ervilha são codificados por dois genes intimamente ligados a família de inibidores Bowman-Birk com sequências homólogas que possuem sítios de inibição para tripsina e quimiotripsina concomitantemente (Domoney e colaboradores, 1995).

Levando em consideração que os suplementos utilizados foram obtidos através de diferentes formas de processamento e linhagens de ervilha, nota-se que a atividade de inibição específica para quimiotripsina em sementes de ervilha depende de sua sequência de aminoácidos, como evidenciado

em estudo de Clemente (2004) onde sementes de ervilha com sequência recombinante de aminoácidos apresentaram maior atividade inibitória para quimiotripsina em relação a tripsina.

Os suplementos de arroz apresentaram atividade inibitória para quimiotripsina para todas as amostras, incluindo a amostra de suplemento contendo também proteína de ervilha em sua composição. A presença de inibidores de quimiotripsina em suplementos extraídos do arroz é complacente com a presença de 17 supostos membros da família do gene inibidor da quimiotripsina em seu genoma (variando em tamanho de 7,21 a 11,9 kDa) com diferentes localizações preditas (Singh, Sahi e Grover, 2009).

A presença de inibidores de quimiotripsina em associação aos inibidores de tripsina em todas as amostras de suplemento, quando associadas podem representar danos significativos na obtenção proteica para determinados fins.

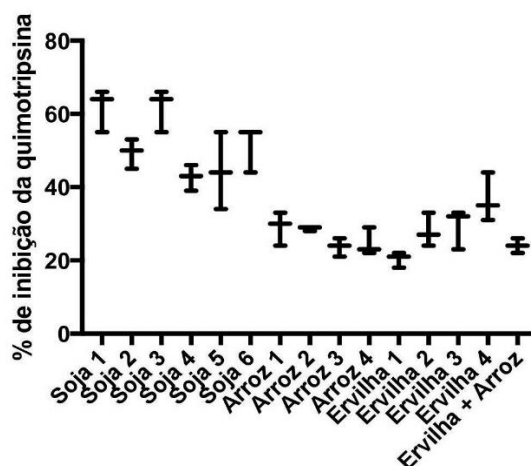


Gráfico 2 - Percentuais de inibição de quimiotripsina em suplementos vegetais.

Atividade inibitória para pepsina

A atividade de inibição para pepsina constatou que os suplementos de soja e arroz apresentaram um maior percentual de inibição, chegando a 33% no suplemento de soja 3 e 34% no suplemento de arroz 1, sendo este último o único suplemento de arroz a apresentar atividade inibitória significativa.

Entre os suplementos de ervilha os percentuais de inibição foram baixos, não ultrapassando os 20%. Os resultados são apresentados no gráfico 3.

A prevalência de atividade inibitória para pepsina nos suplementos de soja pode estar relacionada à grande presença de inibidores do tipo Bowman-Birk nestes suplementos. 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).

As atividades inibitórias de pepsina em suplementos proteicos de arroz, como demonstrado no resultado obtido, variam em decorrência de fatores como o pH, como observado em estudo de Latorres (2016) que constatou um aumento da solubilidade de isolado proteico de arroz por pepsina em pH alcalino e diminuição em pH ácido (7,4% em

pH 11 e 1,1% em pH 4,5), o que demonstra que a atividade inibitória está ligada também à especificidade química das reações de hidrólise dos isolados proteicos e não só a presença de inibidores de proteases.

Os suplementos de ervilha, por apresentarem menor resistência à hidrólise, representam, portanto, a melhor opção entre os tipos de suplemento analisados em relação à digestão por pepsina, enzima importante no processo de clivagem proteica para obtenção de aminoácidos.

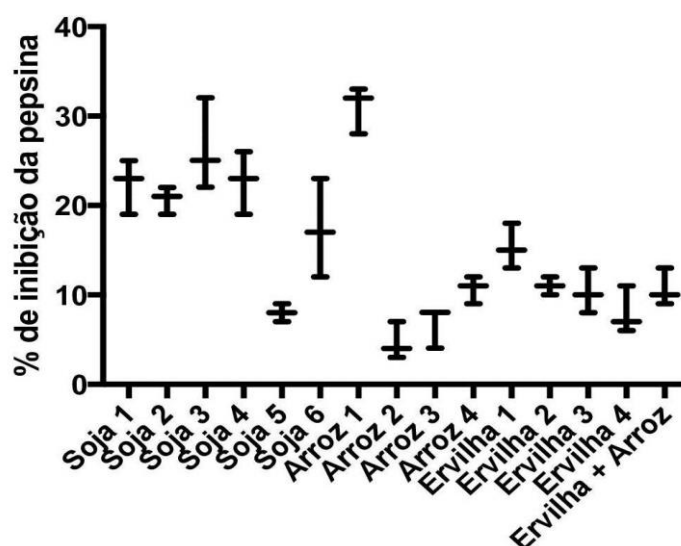


Gráfico 3 - Percentuais de inibição de pepsina em suplementos vegetais.

Provável influência desses fatores no uso de suplementos por desportistas

Embora a presença de inibidores de protease em sementes de leguminosas seja prioritariamente vista como um fator negativo do ponto de vista nutricional por minimizar o aproveitamento proteico do alimento em determinadas condições, destacam-se também suas propriedades estimulantes da hipersecreção de enzimas digestivas (Conceição e colaboradores, 2010).

A capacidade desses compostos bioativos também tem sido estudada por seus efeitos sacietogênicos, como constatado por Serquiz e colaboradores (2016) associando o consumo de inibidores de tripsina derivados do

amendoim com o aumento da saciedade, diminuição da glicose em jejum e perda de peso em decorrência do aumento dos níveis plasmáticos de colecistoquinina (CCK).

Fatores como aumento da saciedade e perda de peso inviabilizariam de múltiplas formas o consumo de suplementos vegetais para aumento do aporte proteico como estratégia de ganho de massa muscular, sabendo que a grande procura pelos suplementos pode ser associada a um dos principais objetivos dos praticantes de musculação, o aumento de massa corporal magra, onde imagina-se uma associação entre ingestão de proteína e ganho de massa muscular, feita pelo usuário (Gomes, 2008).

Altos percentuais inibitórios como os observados nas amostras de suplementos de soja chamam a atenção para os efeitos colaterais da grande presença de inibidores de enzimas, como a tripsina, avaliada em estudos posteriores com animais que constataram hiperplasia e hipertrofia do pâncreas (Barros e colaboradores, 2008), efeitos fisiológicos não prejudiciais por serem transitórios.

O inibidor de tripsina é rico em cisteína, aminoácido sulfurado (AAS) semiessencial derivado da metionina.

Dessa forma, a resistência do inibidor de tripsina ao ataque de enzimas digestivas parece ser um fator importante para baixa disponibilidade da cisteína (Kakade e colaboradores,) que tem sido estudada como potencial recurso ergogênico (Schulpis e colaboradores, 2006) e demonstrou ser benéfica ao atleta, por diminuir a concentração de radicais livres após o exercício e possuir efeito benéfico sobre o dano muscular em indivíduos submetidos a treinamento estressante.

Diante do exposto, infere-se que os inibidores de tripsina só estão presentes em grande quantidade e podem representar danos se não houver um adequado processamento térmico de sua fonte, porém suplementos nutricionais utilizados por atletas nem sempre passam por esse processamento de forma adequada, tornando-os assim vulneráveis a atividade inibitória significativa ao fazer uso de suplementos vegetais em quantidade inadequada.

CONCLUSÃO

Todos os suplementos analisados apresentaram atividade inibitória específica para as enzimas tripsina, quimiotripsina e pepsina. As atividades inibitórias variam em decorrência de fatores como quantidade de proteínas solúveis na amostra, pH da reação de hidrólise proteica, forma de processamento e linhagem do cereal ou leguminosa utilizados.

Os suplementos de soja apresentaram maior atividade específica de inibição para enzimas proteolíticas como tripsina, quimiotripsina e pepsina em relação a todos os outros tipos de suplemento, tornando-se assim a alternativa menos viável em termos de síntese proteica e ganho de massa muscular, seguidos pelos suplementos de ervilha e arroz

que também apresentaram atividade inibitória variando de acordo com diferentes marcas.

Os suplementos vegetais podem representar uma forma de suprimento do aporte proteico em dietas específicas, mas quando utilizados para fins de hipertrofia podem não surtir os efeitos esperados, tendo em vista que esse estudo demonstrou a forte presença de inibidores de enzimas digestivas cujas funções são imprescindíveis no processo de obtenção de aminoácidos para síntese proteica e, conseqüentemente, ganho de massa muscular.

Evidencia-se também a necessidade de maiores estudos in vivo que quantifiquem essa inibição em parâmetros fisiológicos e suas possíveis alterações causada

Conflito de interesses

O presente trabalho não apresenta conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- 1-Araújo, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. Viçosa. UFV. 2011. 601p.
- 2-Barros, J. G. A.; Moraes, R. M. A.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Efeito do inibidor de protease Kunitz sobre níveis de lipoxigenases em sementes de soja. Ciência e Agrotecnologia. Vol. 32. Núm. 4. p. 1126-1132. 2008.
- 3-Bonett, L. P.; Baumgartner, M. S. T.; Klein, A. C.; Silva, L. I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). Arq. Ciênc. Saúde Unipar. Vol. 11. Núm. 3. p. 235-246. 2007.
- 4-Boye, J.; Wijesinha-Bettoni, R.I; Burlingame, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. British Journal of Nutrition. Vol. 108. Num. 2. p. 183-211. 2012.
- 5-Cardoso, L. R.; e colaboradores. Atividade de inibidores de proteases em linhagens de soja geneticamente melhoradas. Alimentos e Nutrição Araraquara. Vol. 18. Num. 1. p. 19-26. 2008.

- 6-Cazetta, J. O.; e colaboradores. Comparação de aspectos químicos e tecnológicos de grãos verdes e maduros de guandu com os de feijão-comum e ervilha. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. Vol. 6. Num. 1. 2009.
- 7-Clemente, A.; e colaboradores. The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Protein expression and purification*. Vol. 36. Num. 1. p. 106-114. 2004.
- 8-Conceição, L. L.; Duarte, M. S. L.; Pereira, C. A. S.; Souza, E. C. G. Determinação da atividade in vitro de Inibidores de Tripsina em feijão (*Phaseolus Vulgaris L.*)-preto, albumina e globulina. *Alimentos e Nutrição, Araraquara*. Vol. 21. Num. 3. p. 373-376. 2010.
- 9-Del-Vechio, G.; Corrêa, A. D.; Abreu, C. M. P.; Santos, C. D.; *Cienc. Agrotecnol.* Vol. 29. 2005.
- 10-Domoney, C.; e colaboradores. Multiple isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *FEBS letters*. Vol. 360. Num. 1. p. 15-20. 1995.
- 11-Egbert, W. R.; Payne, C. T. Plant proteins. In R. Tarte (Ed.), *Ingredients in meat products, properties, functionality and applications*. Berlin: Springer. p. 111-131. 2009.
- 12-Fang, E. F.; Wong, J. H; Bah, C. S. F.; Lin, P.; Tsao, S. W; Ng, T. B.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 396. Num. 806. 2010.
- 13-Ferri, P. Extração de proteínas de folhas de mandioca (*Manihot esculenta Crants*) para obtenção de concentrado protéico. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel-PR.
- 14-Gilani, G. Sarwar; Xiao, Chao Wu; Cockell, Kevin A. Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*. Vol. 108. Num. 2. p. 315-332. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/s0007114512002371>>.
- 15-Giri, A. P.; Kachole, M.S. Amylase inhibitors of pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds. *Phytochemistry*. Vol. 47. p. 197-202. 2004.
- 16-Gomes, G. S.; e colaboradores. Caracterização do consumo de suplementos nutricionais em praticantes de atividade física em academias. *Medicina (Ribeirão Preto Online)*. Vol. 41. Num. 3. p. 327-331. 2008.
- 17-Kakade, M. L.; Simons, N.; Liener, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry*. Vol. 46. Num. 5. p. 518-526. 1969.
- 18-Latorres, J. M.; e colaboradores. Isolado protéico de farinha de arroz: caracterização e propriedades funcionais. *VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias*. Vol. 24. Num. 1. p. 53-65. 2016.
- 19-Monteiro, M. R. P.; e colaboradores. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de tripsina kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. *Revista de Nutrição*. Vol. 17. Num. 2. p. 195-205. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732004000200006.X>>
- 20-Petrovic, G.; Nikolic, Z.; Dordevic, V. Endonuclease heteroduplex mismatch cleavage for detecting matation genetic variation of trypsin inhibitors in soybean. *Institute of Field and Vegetables Crops*. Vol. 49. Num. 2. p. 102-108. 2014.
- 21-Pires, C. V.; e colaboradores. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Vol. 26. Num. 1. p. 179-187. 2006.
- 22-Proll, J., Petzke, J., Ezeagu, E.I., Metges, C.C. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. *Journal of Nutrition*, Bethesda. Vol. 128. Num. 11. p. 2014-2022. 1998.
- 23-Ribeiro, A. N. C. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2013.
- 24-Richardson, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: L.J. Rogers. *Methods in*

plant biochemistry. London: Academic Press. Vol. 5. p. 259-305. 1991.

Recebido para publicação em 31/03/2017
Aceito em 19/06/2017

25-Sack, M.; e colaboradores. The increasing value of plant-made proteins. Current Opinion In Biotechnology. Vol. 32. p. 163-170. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.008>>.

26-Schulpis, K. H.; e colaboradores. L-cysteine supplementation protects the erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity from reduction induced by forced training. Clin. Biochem. Vol. 39. Num. 10. p. 1002-1006. 2006.

27-Seibel, N. F.; Beléia, A. D. P.; Braz. J. Food Technol. Vol. 12. Num. 113. 2009.

28-Serquiz, A. C.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2012.

29-Serquiz, A. C.; e colaboradores. Supplementation with a new trypsin inhibitor from peanut is associated with reduced fasting glucose, weight control, and increased plasma CCK secretion in an animal model. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. Vol. 31. Num. 6. p.1261-1269. 2016.

30-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.

31-Singh, A.; Sahi, C.; Grover, A. Chymotrypsin protease inhibitor gene family in rice: Genomic organization and evidence for the presence of a bidirectional promoter shared between two chymotrypsin protease inhibitor genes. Gene. Vol. 428. Num. 1-2. p. 9-19. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.09.028>.

32-Tur-Sinai, A.; Birk, Y.; Gertler, A.; Rigbi, M.; Biochim. Biophys. Acta. Vol. 263. Num. 666. 1972.