

EFEITO DO TRATAMENTO SOB ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA SOBRE OS TEORES DE FITATO E INIBIDOR DE TRIPSINA DE SOJA

RENATA TORREZAN*
RICHARDA. FRAZIER**
MARCELO CRISTIANINI***

A soja constitui excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal, porém contém alguns componentes de ação antinutricional, como os inibidores de proteases, lectinas, fitatos e saponinas. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática, considerado brando em relação ao tratamento térmico, sobre os fatores antinutricionais como teor de fitato e inibidor de tripsina de solução com 5% de isolado proteico de soja, processada na faixa de 200 a 700 MPa. Foram realizadas duas extrações de fitato e inibidor de tripsina de bateladas diferentes, sendo as amostras analisadas em triplicata. Há indícios que o tratamento sob alta pressão isostática seja eficiente para eliminar o fitato presente nas amostras de isolado proteico de soja, mas não se mostrou efetivo para alterar os teores de inibidor de tripsina.

PALAVRAS-CHAVE: ISOLADO PROTEICO DE SOJA; FITATO; INIBIDOR DE TRIPSINA; ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA.

* Engenheira de Alimentos, Doutora em Tecnologia de Alimentos, Pesquisadora, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ (e-mail: torrezan@ctaa.embrapa.br).

** Químico, Ph.D. Food Chemistry, Lecturer, School of Food Biosciences, University of Reading, UK (e-mail: r.a.frazier@reading.ac.uk).

*** Engenheira de Alimentos, Doutor em Ciências de Alimentos, Professor, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, SP (e-mail: olecram@fea.unicamp.br).

1 INTRODUÇÃO

A soja constitui excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal. Porém, como a maioria das leguminosas, contém algumas proteínas tóxicas e outros componentes de ação antinutricional, como os inibidores de proteases, lectinas, oligossacarídeos, fitatos e saponinas (SGARBIERI, 1996; CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO, 1994).

O grão de soja crua apresenta naturalmente inibidores de proteases, como o de tripsina que inibe a ação da tripsina intestinal, estimulando maior secreção de enzimas digestivas que são eliminadas nas fezes e representando perda endógena importante de aminoácidos sulfurados. Essas perdas podem causar alterações metabólicas que resultam até mesmo em redução de crescimento, hipertrofia e hiperplasia pancreática (LAJOLO e TIRAPEGUI, 1998; LIENER, 1994).

Os grãos de soja contêm dois tipos de inibidores de tripsina, o de Kunitz e o de Bowman-Birk. Esses inibidores são sensíveis ao tratamento térmico, devido à presença de duas pontes dissulfeto na molécula do inibidor de Kunitz e de sete no inibidor de Bowman-Birk (VEM, MATSER e BERG, 2005). Esses fatores antinutricionais são eliminados normalmente pelo tratamento térmico e sua presença é controlada nos produtos industrializados (LAJOLO e TIRAPEGUI, 1998).

Os fitatos representam classe complexa de componentes naturais que ocorrem principalmente em cereais e leguminosas e que afetam as suas propriedades funcionais e nutricionais. A maior parte dos grãos de leguminosas contém de 0,5 a 5,0% de fitato, ou ácido fítico, pois podem armazenar o fósforo na forma de fitato. Os fitatos são sais do ácido fítico (mioinositol do ácido hexafosfórico – $C_6H_{18}O_{24}P_6$). Nutricionalmente, a presença de fitato é desfavorável, pois ocasiona a formação de complexos insolúveis com minerais e proteínas. Isso diminui a biodisponibilidade desses nutrientes, sendo recomendada a sua remoção ou redução em produtos de soja (MAGA, 1982; KNUCKLES, KUZMICKY e BETSCHART, 1985). O fitato pode ser eliminado mediante métodos químicos ou físicos, porém tais tratamentos podem afetar as propriedades físico-químicas das proteínas (BROOKS e MORR, 1985). Não se encontrou na literatura, trabalhos que avaliem o efeito do tratamento sob alta pressão sobre o teor de fitato em alimentos.

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos e estudados processos alternativos de preservação de alimentos para obtenção de produtos com características mais próximas às dos alimentos frescos, porém com a mesma segurança microbiológica dos produtos pasteurizados ou esterilizados. O processamento sob alta pressão encontra-se entre essas técnicas e, além de inativar microrganismos e enzimas, pode alterar as estruturas proteicas, porém afetando menos as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (VEM, MATSER e BERG, 2005). Segundo Messens, Van Camp e Huyghebaert (1997), o tratamento sob alta pressão pode afetar as proteínas, alterando a sua conformação e levando à desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, pH e força iônica), pressão aplicada, temperatura e duração do tratamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento sob alta pressão isostática, na faixa de 200 a 700 MPa, sobre os fatores antinutricionais da proteína de soja, como teor de fitato e fator anti-tripsina em soluções contendo 5% de isolado proteico de soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Isolado proteico de soja

Obteve-se o isolado proteico de soja (IPS) a partir da farinha desengordurada de soja (ProsamR®, Bunge Alimentos Ltda, Esteio, Brasil), mediante extração alcalina (pH 8,0) seguida de precipitação a pH 4,5 e neutralização, conforme Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) com modificações. Após o

seu preparo, esse produto foi congelado em câmaras apropriadas (-18°C) e, logo após, liofilizado e triturado.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 50 g de dispersão de 5% de IPS (p/p), sem ajuste de pH (pH do IPS original = 6,60) foram preparadas e submetidas individualmente a pressões de 200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa por 20 minutos. As amostras previamente preparadas foram colocadas em embalagens plásticas (Cryovac® W. R. Grace Ltd, Londres, Reino Unido), duplamente seladas e pressurizadas. Após o processamento sob alta pressão, as amostras foram armazenadas sob refrigeração.

2.2.2 Tratamento sob alta pressão

Realizou-se o tratamento das amostras em equipamento de alta pressão isostática, destinado a pressurização de alimentos (Food Lab HP Rig, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido), utilizando como meio líquido para a transmissão de pressão ao alimento a mistura de óleo de rícino e etanol (20:80), conforme Torrezan (2007). As amostras foram tratadas sob alta pressão individualmente a 200, 300, 400, 500, 600 ou 700 MPa, conforme a pressão requerida para cada uma durante 20 minutos. Operou-se o vaso de pressão via ar comprimido com mecanismo de elevação e retração do êmbolo, bomba de alta pressão e sistema de descompressão. A temperatura inicial do vaso de trabalho não foi alterada, sendo mantida nas condições ambiente (cerca de 20,0°C).

2.2.3 Análise estatística

As médias foram comparadas com o uso da análise de variância, sendo os dados levantados analisados com o auxílio do programa Statistica 5.5 (STATSOFT, 2001).

2.2.4 Caracterização do isolado proteico de soja (IPS)

O IPS foi analisado quanto a sua composição centesimal, sendo o conteúdo proteico determinado pelo método Macro Kjeldahl (AOAC, 1997), utilizando-se o aparato Buchi Macro Kjeldahl. Para a conversão de nitrogênio em proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 (SMITH e CIRCLE, 1972).

O teor de gordura foi determinado pelo método de extração de Soxhlet, a umidade por secagem em estufa e as cinzas por incineração em mufla conforme os métodos da AOAC (1997). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.5 Teor de fitato

Determinou-se o teor de fitato em triplicata, tanto na amostra de isolado proteico de soja como nas amostras submetidas ao tratamento sob pressão (200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa) por 20 minutos, segundo o método de Latta e Eskin (1980) que se baseia na propriedade do fitato de quelar metais. No caso do IPS foram realizadas quatro extrações e para as amostras pressurizadas efetuaram-se duas extrações de processamentos de bateladas diferentes. Todas as amostras foram analisadas com a mesma concentração de proteína, ou seja, 0,05 g de IPS / mL de HCl 0,65N.

Para a determinação da concentração de fitato nas amostras elaborou-se curva padrão de fitato na concentração de 10 a 60 µg/mL em água desionizada, utilizando-se fitato de sódio da

Sigma®(P3168 - St. Louis, EUA) e observando-se os procedimentos previstos no método adotado (LATTA E ESKIN, 1980).

Efetuiu-se a extração do fitato das amostras em solução de HCl 0,65N por uma hora, seguida de centrifugação a 15.000 g por 15 minutos. Filtrou-se a solução em papel de filtro Whatman n.3 e alíquotas do filtrado foram diluídas em água desionizada e passadas em coluna de troca iônica pré-preparadas AG 1 – X8 resina, da Bio-Rad® (Hemel Hempstead, Reino Unido) para a separação do fitato. Alíquotas de 3 mL foram retiradas e adicionadas de 1 mL do reagente de Wade (0,03% FeCl₃.6H₂O e 0,3% de ácido sulfossilicílico em água desionizada), realizando-se a leitura de absorbância a 500 nm em espectrofotômetro Ultravioleta/Visível (UV/Vis) Perkin Elmer Lambda 20 (Wiesbaden, Alemanha) controlado pelo “software” Winlab (Perkin Elmer, Waltham, EUA).

2.2.6 Atividade de inibidor de tripsina

Foram realizadas duas extrações de cada amostra de bateladas diferentes, sendo as determinações efetuadas em triplicata, segundo Kakade *et al.* (1974), tanto da amostra de IPS quanto das amostras submetidas ao tratamento sob pressão (200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa) por 20 minutos.

Utilizou-se enzima de pâncreas suíno (T 7409 E.C. 3.4.21.4, Sigma®, St. Louis, EUA), tendo como substrato benzoil-DL-arginina-p-nitro-anilida (BAPNA). A atividade do inibidor de tripsina foi expressa em termos de unidades de tripsina inibida por miligrama de proteína (UTI/mg de proteína), sendo uma unidade de tripsina definida como o aumento de 0,01 unidades de absorbância a 410 nm em 10 mL de reação, sob as condições utilizadas para a análise. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20 (Wiesbaden, Alemanha), controlado pelo “software” Winlab (Perkin Elmer, Waltham, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal do IPS utilizado nos testes experimentais.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL MÉDIA DO ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS)

Determinação (%)	Amostra	Isolado protéico de soja (IPS)
Proteína ^{1,2,3}		94,65 ± 1,70
Lipídeos ^{1,3}		0,27 ± 0,12
Cinzas ^{1,3}		3,32 ± 0,07
Umidade ¹		2,10 ± 0,07

¹ Valores médios de três determinações ± desvio-padrão.

² N x 6,25.

³ Valores expressos em Base Seca.

Os valores de proteína encontrados para o IPS foram semelhantes aos observados (87,9 a 94,1%) por Henn e Netto (1998) em isolados comerciais e próximos aos reportados por Takeiti (2002) e Souza (2000) que encontraram, respectivamente, 96,88% e 96,90% para o IPS nativo. Os valores de cinzas estão compatíveis com os apresentados por Souza (2000) e Takeiti (2002) que obtiveram,

respectivamente, 2,65% e 3,22%. Os valores de umidade foram inferiores aos obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002), cuja diferença pode ser atribuída ao processo de liofilização da proteína. No caso da análise de lipídios, o valor encontrado ficou próximo de 0,28% obtido por García *et al.* (1998) utilizando o mesmo método de análise.

3.1 TEOR DE FITATO

A Tabela 2 apresenta os valores de fitato da amostra inicial de IPS e das amostras tratadas sob alta pressão isostática. O valor inicial de fitato mostrou-se muito inferior a 18,81 mg/g de proteína, relatado por Takeiti (2002), mas próximo a 5,44 mg/g de proteína encontrado por Souza (2000). Pelos dados obtidos há indícios de que o tratamento sob alta pressão pode afetar ou alterar o teor de fitato presente em amostras de isolado proteico de soja.

3.2 INIBIDOR DE TRIPSINA

Os resultados encontrados para os teores de inibidor de tripsina são apresentados na Tabela 3. Os valores obtidos para a amostra de IPS original estão de acordo com os citados por Souza (2000) de 81,4 UTI/mg de proteína para o IPS nativo, e Henn e Netto (1998) que, analisando o teor de inibidor de tripsina para IPS comerciais, encontram valores na faixa de 5,2 a 94,7 UTI/mg de proteína. O tratamento sob alta pressão não exerceu nenhuma influência para alterar significativamente ($p < 0,05$) esses teores em relação à amostra sem tratamento. Tal resultado está de acordo com o relatado por Ven, Matser e Berg (2005) que combinaram os efeitos da alta pressão e temperatura para a inativação de inibidor de tripsina em grãos e extrato hidrossolúvel de soja. Constataram que o tratamento sob alta pressão à temperatura ambiente resultou em menores valores e não ocorreram reduções de atividade do inibidor de tripsina. Verificaram ainda que a inativação do inibidor de tripsina só foi possível combinando-se o tratamento sob pressão com temperaturas mais elevadas (90% de inativação com tratamento, com menos de 2 minutos, a temperaturas entre 77 e 90°C e pressões entre 750 e 525 MPa). Observou-se que embora tenha havido aumento de temperatura durante o tratamento sob pressão em decorrência do efeito adiabático, o aquecimento promovido não foi suficiente para afetar a atividade do inibidor de tripsina.

TABELA 2 – CONTEÚDO DE FITATO (mg/g DE PROTEÍNA) EM AMOSTRAS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS) ORIGINAL E AMOSTRAS DE IPS TRATADAS SOB ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA (200 A 700 MPa), POR 20 MINUTOS, À TEMPERATURA AMBIENTE

Tratamento sob pressão das amostras de IPS (MPa)	Fitato ¹ (mg/g de proteína)
original, sem tratamento ²	3,02 ± 0,08
200 ³	Não detectado
300 ³	Não detectado
400 ³	Não detectado
500 ³	Não detectado
600 ³	Não detectado
700 ³	Não detectado

¹ Valores expressos em base seca.

² Valores médios de 4 extrações analisadas em triplicata.

³ Valores médios de 2 extrações analisadas em triplicata.

TABELA 3 – CONTEÚDO DE INIBIDOR DE TRIPSINA (UTI/mg DE PROTEÍNA) DAS AMOSTRAS COM ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS) E IPS TRATADOS SOB ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA (200 A 700 MPa) POR 20 MINUTOS À TEMPERATURA AMBIENTE

Tratamento sob pressão das amostras de IPS (MPa)	Inibidor de Tripsina ^{1, 2, 3} (UTI/mg de proteína)
Original, sem tratamento	85,18 ± 1,75 ^a
200	80,81 ± 1,05 ^a
300	86,38 ± 3,09 ^a
400	85,72 ± 2,63 ^a
500	86,21 ± 4,84 ^a
600	85,39 ± 2,86 ^a
700	88,28 ± 2,27 ^a

¹ Valores expressos em base seca.

² Valores médios de 2 extrações analisadas em triplicata.

³ Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

4 CONCLUSÃO

Há indícios de que o tratamento sob alta pressão isostática seja eficiente para eliminar o fitato presente nas amostras com 5% de isolado proteico de soja em soluções aquosas (nas concentrações de até 3 mg de fitato/g de proteína). No entanto, não se mostrou efetivo para alterar os teores de inibidor de tripsina presentes nas amostras de isolado proteico de soja nas faixas de pressões estudadas de 200 a 700 MPa. Como foram realizadas duas extrações de cada amostra julga-se necessário realizar novos estudos com outras concentrações de fitato inicial e maior número de repetições das análises para se obter resultado mais abrangente.

ABSTRACT

EFFECT OF ISOSTATIC HIGH PRESSURE TREATMENT ON PHYTATE AND TRYPSIN INHIBITOR CONTENT OF SOY PROTEIN

Soybean is an excellent protein source for human and animal consumption but it has as well some antinutritional factors such as protease inhibitors, lectins, phytate and saponin. In this work, the effects of isostatic high-pressure treatment (200-700 MPa), an alternative to thermal treatment, on antinutritional factors phytate and trypsin inhibitor content in 5% soy protein isolate (SPI) solution were evaluated. Two extractions of phytate and trypsin inhibitor of different batch were carried out and the analyses were repeated three times. There is an indication that high-pressure treatment was efficient to eliminate the phytate but could not change trypsin inhibitor content.

KEY-WORDS: SOY PROTEIN ISOLATE; PHYTATE; TRYPSIN INHIBITOR; ISOSTATIC HIGH PRESSURE.

REFERÊNCIAS

- 1 AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Arlington, 1997.
- 2 BROOKS, J.R.; MORR, C.V. Effect of phytate removal treatments upon the molecular weight and subunit composition of major soy protein fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1128-1132, 1985.
- 3 CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G. Soybean for human consumption: nutritional quality, processing and utilization. In: TROPICAL soybean: improvement and production. Roma: FAO, 1994. (FAO Plant Production and Protection Series, 27). p.241-254.
- 4 GARCÍA, M.C.; MARINA, M.L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.
- 5 HENN, R.L.; NETTO, F.M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 8, p. 3009-3015, 1998.
- 6 KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 50, n. 3, p. 376-382, 1974.
- 7 KNUCKLES, B.E. ; KUZMICKY, D.D.; BETSCHART, A.A. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on *in vitro* protein digestibility. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 4, p. 1080-1082, 1985.
- 8 LAJOLO, F.M.; TIRAPÉGUI, J. Proteínas e aminoácidos. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. (Org.) **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.40-69.
- 9 LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.
- 10 LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.
- 11 MAGA, J.A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 1, p. 1-9, 1982.
- 12 MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.
- 13 MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D.A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.
- 14 SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.
- 15 SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybeans: chemistry and technology**. Connecticut: The AVI Publishing, 1972. 470 p.
- 16 SOUZA, A.S. de. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2000. 108 p. Dissertação (Mestrando em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- 17 STATSOFT Inc. **Programa Statistica 5.5**. Tulsa, OK, 2001.
- 18 TAKEITI, C.Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2002. 102 p. Dissertação (Mestrando em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- 19 TORREZAN, R. **Efeito do processamento à alta pressão nas propriedades funcionais da proteína de soja e suas misturas com polissacarídeos**. 2007. 281 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

- 20 VEN, C. van der; MATSER, A.M.; BERG, R.W. van den. Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1087-1092, 2005.

AGRADECIMENTO

À Capes/Ministério da Educação pela concessão de bolsa sanduíche de doutorado ao primeiro autor na Universidade de Reading, Reino Unido.