CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE ALGUNS FATORES NUTRICIONAIS E ANTINUTRICIONAIS EM FARINHAS DE SOJA E DE TEMPÊ

Maria Angélica C. Fonseca Stein

Orientador : **Prof. Dr. Rodolpho de Camargo**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro 1980

À meu esposo, CARLOS ALBERTO,
que por seu incentivo constante em
muito contribuiu para a realização
deste trabalho,

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

A autora expressa seus agradecimentos mais sinceros às seguintes pessoas e entidades:

- Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo, responsável primeiro por nossa iniciação científica, pelo apoio e segura orientação demonstrados no decorrer deste trabalho;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio concedido a partir de 1978, na forma de bolsa de estudos, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho;
- Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, na pessoa do Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, pelas facilidades concedidas na utilização de seus laboratórios e pelo fornecimento dos animais utilizados para a determinação do fator bociogênico;
- Ao Dr. Arlindo Moreira Salles, pela orientação das análises do inibidor de tripsina e da digestibilidade "in vitro";
- Ao Dr. Iovaldo B. Figueiredo, pela utilização de seu laboratório para análises diversas;
- Ao Prof. Dr. Franco Lajolo e Tulia Filisetti, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo planejamento e orientação na determinação do fator bociogênico;
- À Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento das amostras de soja;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, nas pessoas do Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo e Dr. Francisco José Krug, pelas análises de aminoácidos e proteínas;

Aos Funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela amizade e pela colaboração prestada.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Pág.
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 - Valor Nutricional do Tempê	5
2.2 - Fatores Antinutricionais da Soja	8
2.2.1 - Inibidores de Tripsina	8
2.2.1.1 - Efeitos fisiológicos em animais de laboratório	8
2.2.1.2 - Eliminação pelo calor úmido	10
2.2.1.3 - Importância para a nutrição humana.	12
2.2.2 - "Fator" Bociogênico	13
3 - MATERIAL	17
3.1 - Preparo do Material para Armazenamento	18
3.1.1 - Soja	18
3.1.2 - Farinha de soja	18
3.1.3 - Farinha de Tempê	19
4 - MÉTODOS	21
4.1 - Composição Centesimal	21

	Pág.
4.1.1 - Umidade	21
4.1.2 - Proteína	21
4.1.2.1 - Proteína total pelo método de Kjeldahl	21
4.1.2.2 - Proteína total pelo método de Jorgensen	22
4.1.2.3 - Proteína solúvel pelo método de Lowry	22
4.1.3 - Matéria graxa	22
4.1.4 - Cinzas	22
4.1.5 - Fibra	23
4.1.6 - Carboidratos	23
4.2 - Atividade Ureática	23
4.3 - Fatores Antinutricionais	23
4.3.1 - Inibidor de Tripsina	23
4.3.2 - "Fator" Bociogênico	24
4.3.2.1 - Material	24
4.3.2.1.1 - Obtenção do extrato de farinha de soja e de farinha de Tempê ...	24
4.3.2.1.2 - Animais	26
4.3.2.1.3 - Iodo radioativo	26
4.3.2.1.4 - Equipamento	27
4.3.2.2 - Método	27
4.3.2.2.1 - Análise estatística	28

	Pág.
4.4 - Digestibilidade "in vitro"	28
4.5 - Análise dos Aminoácidos	29
5 - RESULTADOS	30
6 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	42
7 - CONCLUSÕES	53
8 - LITERATURA CITADA	55

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Proteína total em soja, farinha de soja e farinha de Tempê	31
TABELA 2 - Composição centesimal da soja	32
TABELA 3 - Composição centesimal da farinha de soja ..	32
TABELA 4 - Composição centesimal da farinha de tempê .	33
TABELA 5 - Atividade ureática em soja, farinha de soja e farinha de tempê	33
TABELA 6 - Determinação da atividade do inibidor de Tripsina utilizando BAPA como substrato ...	34
TABELA 7 - Medida da radioatividade de glândulas tireóide no grupo controle	35
TABELA 8 - Medida da radioatividade de glândulas tireóide no grupo da farinha de soja, variedade Santa Rosa	36
TABELA 9 - Medida da radioatividade de glândulas tireóide no grupo da farinha de tempê, variedade Santa Rosa	37
TABELA 10 - Porcentagem de captação por 100 g de peso de rato, nos grupos controle, farinha de soja e farinha de tempê (Santa Rosa) ...	38

TABELA 11 -	Porcentagem média de captação por 100 g de peso de rato	38
TABELA 12 -	Composição em aminoácidos (mg por 100 g de produto) em farinha de soja, nas variedades Santa Rosa , Viçoja , IAC - 2 e PL - 1	39
TABELA 13 -	Composição em aminoácidos (mg por 100 g de produto) em farinha de tempê, nas variedades Santa Rosa , Viçoja , IAC - 2 e PL - 1	40
TABELA 14 -	Digestibilidade "in vitro" para farinha de soja e de tempê, nas variedades Santa Rosa , Viçoja , IAC - 2 e PL - 1 (% de hidrólise)	41
TABELA 15 -	Digestibilidade "in vitro" para farinha de soja e de tempê, nas variedades Santa Rosa , Viçoja , IAC - 2 e PL - 1 (μ g de α -aminoácidos liberados por mg de amostra)	41

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 -	Extração do "fator" Bociogênico	25
------------	---------------------------------------	----

CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE ALGUNS FATORES NUTRICIONAIS E ANTINUTRICIONAIS EM FARINHAS DE SOJA E DE TEMPÊ

MARIA ANGÉLICA C. FONSECA STEIN

PROF. DR. RODOLPHO DE CAMARGO
Orientador

RESUMO

Foram estudadas algumas características nutricionais e antinutricionais do Tempê em forma de farinha, comparativamente com a farinha de soja. Utilizou-se quatro variedades de soja (Santa Rosa , Viçoja , IAC-2 e PL-1) , relacionadas principalmente com a intensidade atual de cultura no Estado de São Paulo, ou para serem introduzidas na lavoura paulista.

A composição centesimal da soja e das farinhas foi determinada, bem como a atividade ureática e do inibidor de tripsina.

As farinhas foram analisadas quanto à sua composição em aminoácidos e à digestibilidade "in vitro".

A variedade Santa Rosa teve suas farinhas ensaiadas para a determinação do fator bociogênico.

Os resultados obtidos sugerem as seguintes conclusões:

- 1 - A maceração elimina parte dos sólidos solúveis da soja , notadamente os carboidratos.
- 2 - O processo de fermentação não altera grandemente a composição da farinha de tempê, quando comparada à farinha de soja.
- 3 - O tratamento térmico sofrido pelas farinhas é suficiente para inativar a urease em, no mínimo, 94,6%.
- 4 - As variedades de soja estudadas classificam-se na faixa de "baixa" atividade de inibidor de tripsina, sendo que duas das variedades estudadas, PL-1 e Santa Rosa estão abaixo do valor mínimo encontrado por KAKADE *et alii* (1972).
- 5 - Pelos resultados obtidos com a determinação da atividade do inibidor de tripsina, para as farinhas de soja e de tempê, não foi possível afirmar se durante a fermentação o que ocorre é a liberação dos inibidores de tripsina termo-resistentes ligados (inativos) ou a solubilização dos inibidores de tripsina desnaturados pelo calor ou, ainda, se os fenômenos estão ocorrendo conjuntamente.
- 6 - Existe um fator presente na farinha de tempê capaz de diminuir a captação de iodo pela glândula tireoide de ratos, 24 horas após sua administração.

- 7 - A composição em aminoácidos mostrou-se praticamente sem alterações nos dois produtos estudados.
- 8 - Embora algumas variedades tenham apresentado maior liberação de aminoácidos na farinha de tempê, a porcentagem de hidrólise foi bastante semelhante entre os dois produtos estudados.

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF SOME NUTRITIONAL AND ANTINUTRITIONAL FACTORS PRESENT IN SOYBEAN AND TEMPEH FLOURS

MARIA ANGÉLICA C. FONSECA STEIN

PROF. DR. RODOLPHO DE CAMARGO
ADVISOR

SUMMARY

Some nutritional and antinutritional characteristics of Tempeh Flour, comparatively with Soybean Flour, were studied.

Four soybean varieties were utilized (Santa Rosa, Viçoja, IAC-2 e PL-1), related to their crop intensity in the State of São Paulo, or in the process of being introduced as new varieties.

Chemical composition of soybeans and their flours, as well ureatic activity and soybean trypsin inhibitor activity were determined.

The flours were analysed for their aminoacid composition and "in vitro" digestibility.

Goitrogenic factor was determined in flours obtained from soybeans of Santa Rosa variety.

The results obtained suggest the following conclusions:

- 1 - Soaking overnight partially eliminates soybean soluble solids, mainly carbohydrates.
- 2 - The fermentation process doesn't significantly change the chemical composition of tempeh flour, in comparison with soybean flour.
- 3 - Heat treatment of all flours was sufficient to inactivate urease to a level of at least 94.6%.
- 4 - The soybean varieties under investigation are classified as with "low" activity of trypsin inhibitor, occurring that two of the varieties studied, (PL-1 and Santa Rosa) are below the minimum value found by KAKADE *et alii* (1972).
- 5 - From the results obtained with the determination of the trypsin inhibitor activity, for tempeh and soybean flours, it was not possible to affirm if during the fermentation period what occurs is the liberation of the bounded heat resistant trypsin inhibitors (inactivated) or the solubilization of the heat denaturated trypsin inhibitor or, if the two phenomena are occurring simultaneously.

- 6 - A factor is present in the tempeh flour capable of depressing iodine caption in rats, 24 hours after its administration.
- 7 - Aminoacid composition did not show significant alteration in the two products studied.
- 8 - Although some varieties showed greater aminoacid liberation in the tempeh flour, the percentual hydrolysis was very similar between the two products studied.

1 - INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem sido leguminosa amplamente consumida pelos povos orientais há milênios, os quais criaram diferentes maneiras de prepará-la de modo a modificar suas características organolépticas e obter produtos de melhor palatabilidade em comparação à matéria-prima original.

Com o desenvolvimento da tecnologia a soja tem sido apontada como uma das melhores fontes na solução do problema da necessidade de proteínas do mundo atual.

As estimativas indicam que, atualmente, existem um bilhão e meio de homens, mulheres e crianças que sofrem de desnutrição grave, moderada ou branda e que obviamente, a maioria dessas pessoas vive nos países em desenvolvimento. Dados recentes de uma pesquisa de cinco anos da "Inter-American Investigation of Mortality in Children" indicaram a desnutrição

como o mais importante fator contribuinte para a alta taxa de mortalidade infantil na América Latina.

Devido ao efeito sinérgico da combinação entre a desnutrição e infecção, as crianças desnutridas estão mais sujeitas a contrair doenças infecciosas sendo, também, menos capazes de resistir aos efeitos dessas doenças do que as crianças adequadamente nutridas. Por isso, a elevada taxa de mortalidade infantil causada por doenças infecciosas, nos países em desenvolvimento, constitui um reflexo do estado nutricional das mesmas. Na idade escolar, essas crianças afetadas pela subnutrição, irão mostrar sinais de subdesenvolvimento físico e mental.

A longo prazo, os efeitos da desnutrição podem relacionar-se ao desenvolvimento sócio-econômico de uma nação. A baixa produtividade, a má qualidade de vida, o aumento dos gastos com saúde e tratamento médico e os poucos retornos dos investimentos educacionais são alguns dos prejuízos enfrentados pelos países assolados pela desnutrição. Assim, por motivos econômicos e humanitários, a nutrição deve ter alta prioridade nos planos nacionais de desenvolvimento.

Vários esforços tem sido feitos no sentido de aumentar o consumo da soja pelo brasileiro. Alimentos orientais, adição em embutidos, juntamente com o desenvolvimento da tecnologia para obtenção do leite de soja são apenas algumas das formas sendo estudadas.

Há alguns anos concentrou-se a atenção em produtos orientais de soja, notadamente o tempê. Esse produto, originário da Indonésia, de sabor bastante aceito pelos orientais, pode ser obtido por meio de uma tecnologia simples e a baixo custo.

Estudos preliminares, realizados entre as principais variedades de soja do Estado de São Paulo, compararam as farinhas dessas sojas com farinhas de tempê, obtidas das mesmas variedades da leguminosa, por meio de técnicas apropriadas. Assim, foram estudadas variedades de soja e respectivas farinhas para composição centesimal, presença de aflatoxinas, valor biológico e análise sensorial, entre outras. Os resultados foram por demais estimulantes, de modo a conduzir-nos a estudos mais detalhados das farinhas obtidas.

Dessa maneira a autora propõe-se no presente trabalho a estudar algumas características do tempê, em forma de farinha, constituindo-se em objetivos principais a determinação da composição centesimal das farinhas de tempê em comparação com as farinhas de soja ; dos fatores antinutricionais (antitripticos e bociogênico) ; da atividade ureática ; do efeito do processamento no teor de aminoácidos das farinhas; e da digestibilidade "in vitro".

Assim, crê-se atingir um estudo abrangente para as principais variedades de soja cultivadas no Estado de

São Paulo, o que, espera-se, contribuirá para a introdução de novas alternativas que possam minorar o problema da desnutrição protéica em nosso país.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - VALOR NUTRICIONAL DO TEMPÊ

O valor nutricional do tempê parece estar intimamente relacionado ao seu método de preparo. A maceração da soja, cozimento, tempo e temperatura de fermentação são passos importantes a serem controlados de modo a se obter um produto final de alto valor alimentício.

HESSELTINE *et alii* (1963) estudando problemas pertinentes à fermentação observaram que o fungo utilizado para a fermentação do tempê, sob certas condições, é inibido, dando conseqüentemente uma fermentação muito pobre e um produto final muito ruim. Os autores concluíram pela existência de uma substância inibidora do fungo, que é liberada quando os grãos de soja são hidratados em pouco volume de água; quando

a própria água de hidratação, mesmo em volumes maiores é usada no cozimento ; ou quando pouca água, embora fresca é usada no cozimento.

HACKLER *et alii* (1964) estudaram a utilização da proteína do tempê através de ensaios com ratos em idade de aleitamento. Os autores concluíram que não houve melhora na eficiência protéica e nem no crescimento de ratos, em relação à soja não fermentada ; e que a aceitação da dieta contendo tempê diminuiu a cada aumento de 12 horas no tempo de fermentação, o qual variou de zero a 72 horas. Os autores fizeram o cozimento da soja na própria água de maceração, e o tempo de fermentação foi muito superior ao necessário (18 - 22 horas), o que poderia explicar os resultados pouco animadores obtidos.

MURATA *et alii* (1967) realizaram estudos sobre o valor nutricional do tempê, encontrando para o mesmo valores superiores de aminoácidos livres, vitamina B₆, riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantotênico, quando comparado à soja não fermentada. Os teores de fibra e proteína foram semelhantes para ambos produtos e houve uma ligeira diminuição no conteúdo de matéria graxa no tempê. Nesse experimento não foram realizados ensaios biológicos.

WANG *et alii* (1968) estudaram o efeito da fermentação sobre o valor nutricional do trigo, da soja e de uma mistura de trigo e soja (1:1). Observaram que o processo de

fermentação não afetou grandemente a composição em aminoácidos do trigo e soja, aumentando apenas levemente a quantidade de proteína nos produtos estudados. Os autores encontraram que houve diferença significativa ($P < 0,05$) no coeficiente de eficácia proteica entre o trigo não fermentado e o que sofreu fermentação, bem como entre a mistura trigo-soja fermentada e não fermentada, sendo que os produtos fermentados foram sempre os melhores. Não houve diferença significativa entre a mistura trigo-soja fermentada e o padrão caseína.

CAMARGO (1969) estudou quarenta e três culturas de fungos, compreendidas entre dois gêneros e oito espécies, ensaiadas quanto à sua atividade proteolítica, para a fermentação do tempê, concluindo que o fungo de maior atividade foi o *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, o que confirma o resultado encontrado por outros autores. Utilizando essa cultura para o preparo do tempê e sua farinha, o autor observou que para duas das cinco variedades de soja estudadas (L-1556 e Araçatuba) não houve diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao PER do padrão caseína.

Na década de 70 o interesse no estudo do valor nutricional da soja, fermentada ou não, medido apenas pelo teor proteico e avaliação biológica parece decrescer, e ceder lugar a estudos cada vez mais completos, que procuram relacionar fatores antinutricionais à diminuição do valor como alimento, da soja e seus produtos.

2.2 - FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA

2.2.1- INIBIDORES DE TRIPSINA

2.2.1.1 - Efeitos fisiológicos em animais de laboratório

Numerosos experimentos com galinhas e ratos tem demonstrado que os inibidores de tripsina presentes na soja crua interferem no crescimento desses animais, inibindo-o, e produzem hipertrofia pancreática, o que parece ser uma resposta adaptativa ao aumento da necessidade da referida enzima (HAINES e LYMAN, 1961 ; RACKIS, 1965 ; GERTLER *et alii*, 1967).

A farinha de soja crua, integral e desengordurada, inibe o crescimento, baixa a energia metabolizável e a absorção de gordura, reduz a digestibilidade de proteína, causa hipertrofia pancreática e reduz a disponibilidade de aminoácidos, vitaminas e minerais. Quase todos esses efeitos estão interrelacionados e representam antes uma incapacidade do animal em utilizar completamente esses nutrientes essenciais do que uma resposta a substâncias tóxicas.

RACKIS (1974) apresenta uma revisão bastante completa, abordando os principais fatores biológicos e fisiológicos presentes na soja, inclusive os efeitos inibitórios sobre o crescimento em diversos animais (cão, boi, porco, etc.), bem como sobre o tamanho e a secreção enzimica do pâncreas.

A inibição de crescimento em pintinhos isentos de germes ("germ-free") alimentados com soja crua é consideravelmente menor do que em pintinhos convencionais. A microflora parece intensificar as propriedades inibidoras de crescimento da soja crua. O modo de interação entre a microflora e os constituintes dietários no produto cru é desconhecido. Entretanto, os antibióticos tem um efeito benéfico no valor nutritivo da soja crua, embora não na mesma extensão do tratamento pelo calor úmido. A hipertrofia pancreática ocorre tanto nos pintinhos convencionais como nos livres de germes (COATES et alii, 1970).

A criação de variedades de soja geneticamente deficientes em fatores antinutricionais não parece promissora. KAKADE *et alii* (1972) encontraram uma larga faixa de variação na atividade do inibidor de tripsina e das hemaglutininas em cento e oito variedades e linhagens experimentais de soja. Os valores nutritivos foram aumentados de 61 a 180% após autoclavagem. A qualidade da proteína foi avaliada em termos de PER, o qual variou de 0,7 a 1,75 , comparados a um valor de caseína de 2,5. Apesar da evidência que implica inibidores de tripsina e fitohemaglutininas como fatores que contribuem para o pobre valor nutritivo da soja crua, nenhuma relação ficou evidenciada nesses estudos. Tendo em vista a falta de correlação entre a atividade do inibidor de tripsina e PER, o fato de haver um grau de correlação significativo entre o peso do pancrea e PER causou surpresa, desde que é geralmente aceito que

que os inibidores de tripsina são os principais responsáveis pela hipertrofia pancreática e pobre crescimento de animais alimentados com soja (GARLICH e NESHEIM, 1966 ; SAMBETH *et alii* , 1967).

Uma possível explicação seria de que o método utilizado para se medir a atividade antitriptica "in vitro" não reflete o conteúdo real de inibidor de tripsina da soja. Mas não se pode excluir a possibilidade de haver um fator totalmente não relacionado e, não obstante, capaz de causar hipertrofia pancreática e inibição de crescimento. Não houve correlação também entre o PER e o conteúdo de aminoácidos sufurados totais.

2.2.1.2 - Eliminação pelo calor úmido

Os produtos de soja devem receber, necessariamente, tratamento por calor úmido, afim de que possam ter seu valor nutritivo aumentado. A taxa de melhora no valor nutritivo depende da temperatura, duração do aquecimento e condições de umidade.

A maioria dos pesquisadores acreditam que a máxima eficiência protéica é conseguida por autoclavagem a 15 lb/pol² (1,05 kgf/cm²) de pressão, por não mais de trinta minutos (KLOSE *et alii*, 1948 ; BORCHERS *et alii*, 1948).

Com apenas 50 a 60% de destruição da atividade do inibidor de tripsina ocorre hipertrofia pancreática. A destruição da atividade de hemaglutininas é paralela à mostrada pelo inibidor de tripsina (LIENER, 1955).

SMITH *et alii* (1964) encontraram que apenas 10 a 15 minutos de aquecimento por vapor fluente resultou um PER máximo (2,50).

O tamanho das partículas e a umidade inicial da soja são os maiores fatores influenciando a velocidade de cocção, a inativação do inibidor de tripsina e o subsequente aumento no valor nutritivo. Com o grão de soja inteiro a maceração antes do tratamento térmico acelera grandemente a taxa de inativação do inibidor de tripsina (RACKIS, 1966 ; ALBRECHT *et alii*, 1966).

Um dado interessante com respeito ao valor nutritivo da soja é que não é necessário destruir toda a atividade do inibidor de tripsina para se obter um valor de PER máximo.

Segundo RACKIS (1974) o valor máximo de PER é conseguido quando 79% da atividade do inibidor de tripsina é destruída. Esses resultados foram similares quando os valores de peso corporal e digestibilidade serviram como índices de qualidade da proteína.

2.2.1.3 - Importância para a nutrição humana

Os inibidores enzimicos podem agir "in vivo" de diversas maneiras, quais sejam: a) afetando a ligação e transformação do substrato para produto final ; b) tornando o substrato não disponível ; c) interferindo com a biossíntese da enzima ; d) aumentando a taxa de renovação da enzima ; e) afetando um hormônio, o qual por sua vez afetará ao nível da atividade enzimica. O primeiro tipo tem sido o mais frequentemente descrito em alimentos. Soja, feijões de lima (*Phaseolus linensis*), ervilhas e batatas tem sido as principais plantas estudadas com relação à inibição de tripsina. Os inibidores de tripsina são, provavelmente, os mais amplamente distribuídos entre os inibidores de enzimas proteolíticas.

Em estudo preliminar, BUCK *et alii* (1962) mostraram que, enquanto o inibidor de tripsina da soja inibiu tripsina bovina, suína, ovina e humana, o ovomucoide de galinha inibiu a tripsina apenas das três primeiras espécies, não inibindo a tripsina humana.

Em estudo mais detalhado FEENEY *et alii* (1969) encontraram que a tripsina humana foi fortemente inibida por três inibidores aparentemente não relacionados, provenientes do feijão de lima (*Phaseolus linensis*) do colostro bovino e do inibidor pancreático KUNITZ, ao passo que os inibidores da soja, o inibidor do feijão "kidney" (*Phaseolus vulgaris*) e outros, inibiram-na em menor grau. Entretanto, a tripsina humana não foi inibida por inibidor pancreático bovino e suíno,

por inibidor de batata, de ovo de galinha e outros. Muitos desses inibidores provocaram forte inibição da tripsina bovina.

No mesmo ano TRAVIS e ROBERTS (1969) constataram que o inibidor de tripsina da soja não inibiu a tripsina humana. A declaração desses autores provocou imediatamente especulações de que a atividade do inibidor de tripsina da soja crua teria pouco ou nenhum significado para a nutrição humana.

Mais tarde, COAN e TRAVIS (1973) isolaram duas formas de tripsina do pâncreas humano. A forma aniônica é completamente inibida pelo inibidor de tripsina a uma relação molar de 1:1, enquanto que a forma catiônica é inibida em apenas 20%.

O único experimento realizado com humanos indica que a farinha de soja crua pode manter um balanço de nitrogênio positivo, mas não tão eficientemente quanto a farinha de soja autoclavada (LEWIS e TAYLOR, 1947).

2.2.2 - "FATOR" BOCIOGÊNICO

MCCARRISON (1933) foi o primeiro a relatar a ação bociogênica da soja.

Estudos nos mostram que inúmeros pesquisadores atribuem várias causas aos diferentes efeitos causados pela so

ja sobre a glândula tireoide.

Alguns como SHARPLESS *et alii* (1939) ; WILGUS *et alii* (1941) e HALVERSON *et alii* (1949), observaram a presença de bôcio em ratos e galinhas alimentados com soja crua, o que atribuem à deficiência de iodo na dieta. Segundo os autores essa propriedade era inibida, parcialmente, pelo tratamento térmico da soja ou, totalmente, pela administração de quantidades elevadas de iodo.

Segundo SHARPLESS *et alii* (1939) a propriedade bociogênica da soja crua podia ser parcialmente eliminada por tratamento com éter ou acetona. Os demais autores citados encontraram resultado discordante, segundo os quais o tratamento com solventes orgânicos como acetona, etanol, éter ou clorofôrmio não eliminava o "fator" bociogênico da soja crua.

Posteriormente, BLOCK *et alii* (1961), observaram que havia uma redução na capacidade bociogênica da soja crua quando a mesma era desengordurada.

VAN WYK (1959) observou efeitos bociogênicos em crianças alérgicas alimentadas com leite de soja, verificando que havia uma diminuição na retenção de iodo marcado. Esses efeitos puderam ser observados também em dois, de um grupo de quatorze adultos alimentados com leite de soja por um período de cinco dias, sugerindo que ocorre interferência com a sĩntese de hormônios tireoidianos de acordo com a susceptibilidade individual.

Efeito contrário, isto é, hipertireoidismo, foi observado em ratos (VANMIDDLESWORTH, 1957 ; BECK, 1958), e em crianças (HYDOWITZ, 1960 ; SHEPARD *et alii*, 1969 ; PINCHERA *et alii* , 1965), medido por um aumento na captação de iodo radioativo.

NORDSIEK (1962) realizando estudo em ratos alimentados com rações contendo de 35 a 60% de soja crua observou que os animais apresentavam um aumento de peso da glândula tireóide. Adicionando-se caseína à ração esse efeito era eliminado. O autor sugere que esse efeito bociogênico poderia estar relacionado com a presença de antitripsina.

KONIJN (1972) procurou extrair e caracterizar a atividade do "fator" bociogênico. Encontrou que o mesmo é solúvel a pH 4,2 , em dois volumes de acetona ou em ácido tricloroacético a 10% , e insolúvel em acetona a 90% , etanol a 90% e em éter etílico. Não é precipitado por sulfato de amônia e resiste à digestão pancreática e à ebulição por duas horas, mas, aparentemente, é destruído por autoclavagem. Quando adicionado à dieta de ratos diminui a captação de iodo pela glândula tireóide.

Em trabalho posterior, KONIJN *et alii* (1973) conseguiram uma purificação parcial do "fator" bociogênico da soja, caracterizando-o como sendo um composto de baixo peso molecular, provavelmente um oligopeptídeo composto de dois ou três aminoácidos ou um glicopeptídeo constituído de um ou dois aminoácidos e uma molécula de açúcar. Os resultados mos

tram uma inibição na captação de iodo e um decréscimo da sua incorporação às moléculas orgânicas na glândula. Quando houve exposição "in vitro" da glândula ao agente depressor, verificou-se uma menor incorporação de iodo radioativo na forma de diiodotirosina (DIT) e a relação tetraiodotirosina / tirosina, tornou-se maior.

Recentemente, FILISETTI (1977) constatou a existência, na soja autoclavada, de um fator capaz de diminuir, entre 6 e 24 horas após sua administração, a captação de iodo pela tireoide de ratos ; esse fator não foi, porém, encontrado na soja crua. O mesmo fator existe também em produtos comerciais, como: concentrado protéico de soja, farinha de soja tostada e leite de soja, e é resistente ao tratamento térmico a 112°C por sessenta minutos. Em ensaios semicrônicos com animais o fator pode provocar tanto aumento como diminuição da captação, dependendo do tempo de ação.

Como se pode observar, através da revisão de literatura, alguns autores afirmam que a soja causa hipertireoidismo, outros, ao contrário, que a mesma causa hipotireoidismo, e outros ainda simplesmente negam qualquer ação bociogênica da soja (SOCOLOW e SUSUKI, 1964).

3 - MATERIAL

O material utilizado para a execução do presente trabalho constou de amostras de soja da safra de 1977, fornecidas pela Secção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo.

Foram utilizadas quatro variedades de soja, relacionadas principalmente com a intensidade atual de cultivo no Estado de São Paulo, ou para serem introduzidas na lavoura paulista sob o controle da entidade acima mencionada.

As variedades de soja estudadas foram:

- 1 - Variedade São Rosa
- 2 - Variedade Viçoja
- 3 - Variedade IAC-2
- 4 - Variedade PL-1

3.1 - PREPARO DO MATERIAL PARA ARMAZENAMENTO

3.1.1 - SOJA

Para todas as variedades de soja obedeceu-se à mesma técnica de preparo e armazenamento. Para isto foram os grãos de soja submetidos a tratamento térmico em estufa com circulação de ar (60°C) por duas horas de modo a permitir o descascamento, desintegrados em moinho e passados através de despulpador de café para completa remoção da casca. Em seguida procedeu-se à moagem, pulverização e acondicionamento em vidros, os quais foram guardados em geladeira.

3.1.2 - FARINHA DE SOJA

A soja foi tratada termicamente em estufa com circulação de ar (60°C), também por duas horas, desintegrada em moinho e passada através de despulpador de café para completa remoção da casca, macerada em excesso de água por uma noite, após o que foi lavada em abundância de água. A seguir foi cozida em ebulição por 30 minutos (a água foi adicionada em quantidade de cinco vezes o peso inicial da soja). Após o cozimento foi escorrida e levada novamente à estufa (60°C) até que estivesse com 3 a 7% de umidade. Em seguida foi moída, pulverizada, acondicionada em vidros com tampa de rosca, e guardada em geladeira.

3.1.3 - FARINHA DE TEMPÊ

Por tratar-se de técnica pouco difundida, daremos sua descrição detalhada.

O tempê e sua farinha foram obtidos como descrito por CAMARGO (1969):

- a - A soja fragmentada e livre de casca é lavada em água corrente e, em seguida, macerada por uma noite, à temperatura ambiente, em volume de água de três a cinco vezes o seu próprio.
- b - O excesso de água de maceração é eliminado e os grãos de soja novamente lavados em água corrente.
- c - Adiciona-se novamente água fresca em excesso e leva-se ao cozimento, contando-se trinta minutos após o início da ebulição.
- d - Drena-se a água de cozimento, recebendo-se a soja em toalhas (esterilizadas em autoclave por vinte minutos a 1 at.) .
- e - Deixa-se os grãos de soja envoltos nessas toalhas até que atinjam a temperatura ambiente, ponto em que terão perdido o excesso de umidade prejudicial à fermentação.
- f - Após o resfriamento, recolhe-se os grãos de soja em recipiente apropriado (aço inoxidável esterilizado), e procede-se à inoculação com esporos do agente de fermentação (*Rhizopus oligosporus* NRRL 2710), cuidando-se que a cultura seja jovem, isto é, tenha não mais que 6 - 8 dias de idade.

- g - Terminada a inoculação, os grãos de soja são colocados nos recipientes de fermentação (placas de Petri), sendo dispostos de forma a deixar um mínimo de espaço vazio entre a sua massa e a tampa, pois se isso não for observado haverá ar em excesso e o fungo tenderá a esporular, o que não é desejável.
- h - O material inoculado é imediatamente conduzido à incubação a 31°C. O tempo de fermentação foi de 18 a 22 horas.
- i - Após esse período há desenvolvimento abundante de micélio branco, compactando a massa toda como um bolo, o que dará a fermentação como concluída. Um pouco de esporulação pode eventualmente ocorrer nos bordos da massa fermentada, o que é considerado normal.
- j - Terminada a fermentação, o Tempê é cortado em pedaços e levado à estufa a 60°C para secar (até 3 a 7% de umidade), sendo depois moído e pulverizado, obtendo-se assim a farinha, a qual foi, em seguida, acondicionada em vidros e guardada em geladeira.

4 - MÉTODOS

4.1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

4.1.1 - UMIDADE

A umidade das amostras foi determinada de acordo com o A.O.A.C. (1970).

4.1.2 - PROTEÍNA

A determinação de proteína foi efetuada por três diferentes métodos, como segue:

4.1.2.1 - Proteína total pelo Método de Kjeldahl

As determinações de proteína total (nitrogênio

x 6,25) foram feitas de acordo com o método descrito pelo A.O.A.C. (1970).

4.1.2.2 - Proteína total pelo Método de Jorgensen

O método é uma modificação do Método Industrial "Technicon" Nº 218 - 72 A (JORGENSEN, s./d.).

4.1.2.3 - Proteína solúvel pelo Método de Lowry

Os resultados obtidos através desse método (LOWRY *et alii*, 1951) foram utilizados para os cálculos da digestibilidade "in vitro".

4.1.3 - MATÉRIA GRAXA

A determinação de matéria graxa foi feita de acordo com o A.O.A.C. (1970).

4.1.4 - CINZAS

O teor de cinzas foi obtido pelo método do A.A.C.C. (1969), modificado pelo Setor de Panificação do ITAL (VITTI, 1975), comunicação pessoal.

4.1.5 - FIBRA CRUA

A determinação de fibra crua foi feita no ITAL, de acordo com o método de DIEMAIR (1963).

4.1.6 - CARBOIDRATOS

O teor de carboidratos foi calculado com base na diferença entre a soma dos teores de proteína, matéria graxa, cinzas, fibra e o valor 100.

4.2 - ATIVIDADE UREÁTICA

A atividade ureática foi determinada segundo o método de SMITH *et alii* (1956).

4.3 - FATORES ANTINUTRICIONAIS

4.3.1 - INIBIDOR DE TRIPSINA

Os testes para inibição de tripsina foram realizados no Instituto de Tecnologia de Alimentos, de acordo com o método de KAKADE *et alii* (1974).

4.3.2 - "FATOR" BOCIOGÊNICO

Por tratar-se de método menos comumente utilizado daremos sua descrição detalhada.

A determinação do fator bociogênico foi realizada de acordo com KONIJN *et alii* (1972), modificada segundo FILISETTI (1977), como segue:

4.3.2.1 - Material

4.3.2.1.1 - Obtenção do extrato de farinha de soja e de farinha de tempê

As farinhas de soja e de tempê previamente obtidas, foram desengorduradas utilizando-se éter de petróleo e extrator Soxhlet. A seguir foram tratadas como sugerido por KONIJN *et alii* (1972), com as modificações descritas abaixo e esquematizadas na Figura 1.

- 100 g de Farinha de Soja Desengordurada (FSD) e de Farinha de Tempê Desengordurada (FTD) foram tratadas com 750 ml de água destilada, acidificadas com HCl 6 N até pH 4,2 (ponto isoelétrico das proteínas da soja), submetidas à agitação por uma hora, sendo, a seguir, a suspensão filtrada. O precipitado foi reextraído com 250 ml de água destilada, da mesma forma, e o sobrenadante resultante acrescentado ao anterior.

FIGURA 1 - Extração do "Fator" Bociogênico

O sobrenadante foi tratado com acetona na proporção de dois volumes de acetona para um volume de sobrenadante. Após repouso a 4°C por uma noite, o extrato cetônico foi filtrado, e o filtrado concentrado em evaporador rotatório a vácuo (50°C) até volume de 50 ml obtendo-se, assim, o Extrato de Farinha de Soja Desengordurada (EFS) e o Extrato de Farinha de Tempê Desengordurada (EFT).

4.3.2.1.2 - Animais

Utilizou-se ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) obtidos de colônias mantidas no biotério do Instituto de Tecnologia de Alimentos e alimentados com ração padrão (comercial) do mesmo. Durante a experiência foram alojados em gaiolas individuais, no biotério da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da USP, recebendo água "ad libitum" e ração comercial padrão.

4.3.2.1.3 - Iodo radioativo

Usou-se iodeto de sódio (Na^{131}I) dissolvido em solução fisiológica e isento de carregador e de redutor.

4.3.2.1.4 - Equipamento

Além do equipamento convencional de laboratório, utilizou-se para as contagens um detector de cintilação, com cristal de poço de iodeto de sódio, ativado com tálio NaI (Tl), e contador modelo "Ultra Scaler II" (Nuclear Chicago).

4.3.2.2 - Método

- 2 ml do extrato anteriormente obtido, correspondentes à ingestão de 4 g de farinha de soja ou de farinha de tempê desengorduradas foram administradas através de sonda gástrica a grupos de ratos mantidos em jejum por 12 horas e alojados em gaiolas individuais. Os ratos do grupo controle recebiam, da mesma forma, 2 ml de solução fisiológica. Decorrida uma hora, injetava-se por via intraperitoneal cerca de $5 \mu\text{Ci}^{131}\text{I}$ / 100 g de peso de rato, num volume de 1 ml. Após a administração do radioiodo os animais eram alimentados com ração normal do biotério. Decorridas 24 horas os animais foram sacrificados por inalação de éter, as tireóides com a traqueia removidas, lavadas com solução fisiológica e sua radioatividade medida.

O efeito do fator bociogênico em estudo foi avaliado calculando-se a porcentagem de captação / 100 g de peso do animal. A porcentagem de captação foi calculada dividindo-se o número de contagens obtidas com a tireóide por aquelas obtidas contando-se, nas mesmas condições, 1 ml de uma diluição conveniente de solução padrão injetada nos animais e multiplicando-se a razão por 100. Em todos os casos as contagens foram superiores a 10.000 para manter-se o erro estatístico de contagem inferior a 1%.

4.3.2.2.1 - Análise estatística

Utilizou-se o teste "t" de Student, para comparação entre duas médias (SPIEGEL, 1967).

4.4 - DIGESTIBILIDADE "IN VITRO"

A digestibilidade "in vitro" foi estimada de acordo com o método de AKESON e STAHMANN (1964), e os aminogrupos determinados segundo FIELDS (1972).

4.5 - ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos foram determinados quantitativamente pela reação com ninhidrina, em analisador de troca iônica, modelo "Beckman 120 C", do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba, SP.

5 - RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se inscritos nas Tabelas de 1 a 15.

TABELA 1 - Proteína total em soja, farinha de soja e farinha de tempê

Variedades	Gramas por 100 gramas de matéria seca											
	Soja			Farinha de soja			Farinha de tempê					
	1	2	1	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Santa Rosa	44,51	41,85	50,23	44,62	30,19	52,45	47,09	31,48				
Viçôja	43,17	41,85	50,04	45,79	27,60	51,28	48,42	37,30				
IAC - 2	43,39	42,33	48,05	45,55	28,50	50,60	48,15	33,03				
PL - 1	48,25	46,85	53,97	48,73	31,18	57,40	49,25	31,87				

(¹) Kjeldahl

(²) Jorgensen

(³) Lowry

TABELA 2 - Composição centesimal da soja

Variedades	Gramas por 100 gramas de matéria seca				
	Proteína	Matéria graxa	Cinzas	Fibra	Carboi- dratos
Santa Rosa	41,85	24,54	3,35	2,71	27,55
Viçoja	41,85	24,34	3,22	3,62	26,97
IAC - 2	42,33	23,77	3,38	2,75	27,77
PL - 1	46,85	21,86	3,31	2,40	25,60

TABELA 3 - Composição centesimal da farinha de soja

Variedades	Gramas por 100 gramas de matéria seca				
	Proteína	Matéria graxa	Cinzas	Fibra	Carboi- dratos
Santa Rosa	44,62	30,97	3,36	3,68	17,37
Viçoja	45,79	29,61	3,19	4,05	17,36
IAC - 2	45,55	29,67	4,02	3,48	17,28
PL - 1	48,73	27,70	3,88	3,36	16,33

TABELA 4 - Composição centesimal da farinha de tempê

Variedades	Gramas por 100 gramas de matéria seca				
	Proteína	Matéria graxa	Cinzas	Fibra	Carboi- dratos
Santa Rosa	47,09	26,94	3,36	3,99	18,62
Viçoja	48,42	28,21	3,50	3,96	15,91
IAC - 2	48,15	26,62	3,53	3,41	18,29
PL - 1	49,25	24,23	3,34	3,87	19,31

TABELA 5 - Atividade ureática em soja , farinha de soja e farinha de tempê em variações de unidades de pH

Variedades	Atividade ureática		
	Soja	Farinha de soja	Farinha de tempê
Santa Rosa	2,00	0,05	---
Viçoja	2,05	0,11	0,02
IAC - 2	1,74	0,05	---
PL - 1	2,20	0,06	---

TABELA 6 - Determinação da atividade do inibidor de tripsina utilizando BAPA (*) como substrato

Produto	Variedade	UTI / mg amostras	UTI / mg proteína
Soja	Viçoja	29	69
	Santa Rosa	21	50
	IAC - 2	48	113
	PL - 1	21	44
Farinha de soja	Viçoja	5	10
	Santa Rosa	4	8
	IAC - 2	4	8
	PL - 1	6	12
Farinha de tempê	Viçosa	6	12
	Santa Rosa	4	8
	IAC - 2	9	18
	PL - 1	8	16

(*) BAPA = benzoil-DL-arginina p-nitroanilide

TABELA 7 - Medida da radioatividade de glândulas tireóide
no grupo controle

Rato Número	Peso (g)	Contagem média por 30 segundos
1	98	23.408
2	110	49.743
3	104,5	33.119
4	107	28.968
5	113	31.741
6	110	42.876
7	112,5	37.032
8	122	47.248
9	127	59.328
10	120	40.400

TABELA 8 - Medida da radioatividade de glândulas tireóide no grupo da farinha de soja, variedade Santa Rosa

Rato Número	Peso (g)	Contagem média por 30 segundos
11	101	25.171
12	102,5	39.236
13	108,5	27.126
14	107	36.204
15	105	48.641
16	111	27.802
17	111	50.045
18	111	21.345
19	120	23.324

TABELA 9 - Medida da radioatividade de glândulas tireóide
no grupo da farinha de Tempê, variedade Santa
Rosa

Rato Número	Peso (g)	Contagem média por 30 segundos
20	100	22.171
21	100	40.610
22	115	29.597
23	109	29.114
24	109	27.479
25	104	20.654
26	107	35.375
27	108	22.927
28	114	34.962
29	110	36.578

TABELA 10 - Porcentagem de captação / 100 g de peso de rato, nos grupos controle, farinha de soja e farinha de tempê, variedade Santa Rosa

% de captação / 100 g de rato		
Controle	Farinha de soja	Farinha de tempê
13,70	13,59	11,92
13,27	13,23	9,76
11,44	11,23	9,70
11,36	9,93	9,00
9,88	7,35	7,84
9,66	7,33	7,55
9,30	7,31	7,39
9,24	5,70	6,50
7,94	5,64	6,22
7,00	---	5,82

TABELA 11 - Porcentagem média de captação por 100 g de peso de rato

Grupos	% de captação / 100 g de rato (*)	
Controle	10.28 a	100%
Farinha de soja	9.03 a b	88%
Farinha de tempê	8.17 b	79%

(*) letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 12 - Composição em aminoácidos (mg / 100 g de produto) em farinha de soja, nas variedades Santa Rosa , Viçoja , IAC-2 e PL-1

Aminoácidos	Farinha de soja			
	Santa Rosa	Viçoja	IAC - 2	PL - 1
Lisina	3.242	2.902	2.827	2.972
Histidina	1.415	1.187	1.058	1.225
Arginina	2.547	2.638	2.585	2.506
Ácido aspártico	6.000	5.708	5.747	6.246
Treonina	1.342	1.486	1.548	1.248
Serina	1.096	1.315	1.535	937
Ácido glutâmico	8.979	8.233	8.791	8.070
Prolina	2.041	2.067	1.896	2.134
Glicina	2.223	2.238	2.091	1.856
Alanina	2.158	2.040	1.971	2.181
1/2 Cistina	---	---	---	---
Valina	1.839	1.790	2.651	1.988
Metionina	107	255	216	136
Isoleucina	2.434	2.432	2.390	2.558
Leucina	4.433	4.552	4.292	4.725
Tirosina	453	747	877	325
Fenilalanina	2.374	2.423	2.271	2.525

TABELA 13 - Composição em aminoácidos (mg / 100 g de produto) em farinha de tempê, nas variedades Santa Rosa, Viçoja , IAC - 2 e PL - 1

Aminoácidos	Farinha de tempê			
	Santa Rosa	Viçoja	IAC - 2	PL - 1
Lisina	3.223	3.854	3.618	3.028
Histidina	1.288	1.628	1.220	1.446
Arginina	2.967	2.705	2.702	2.524
Ácido aspártico	5.732	6.107	5.813	5.897
Treonina	1.472	1.477	1.592	1.530
Serina	1.414	1.205	1.537	1.455
Ácido glutâmico	8.480	8.664	8.925	8.053
Prolina	1.989	2.022	1.869	2.165
Glicina	2.105	2.313	2.159	2.365
Alanina	2.850	2.326	2.738	2.015
1/2 Cistina	---	---	---	---
Valina	1.822	2.026	1.818	1.922
Metionina	256	148	220	191
Isoleucina	2.428	2.516	2.361	2.566
Leucina	3.874	4.440	4.165	4.437
Tirosina	821	591	860	639
Fenilalanina	2.249	2.479	2.250	2.524

TABELA 14 - Digestibilidade "in vitro" para farinha de soja e de tempê, nas variedades Santa Rosa , Viçoja, IAC - 2 e PL - 1 (% de hidrôlise)

Variedades	% Hidrôlise	
	Farinha de soja	Farinha de tempê
Santa Rosa	27,1	27,0
Viçoja	29,8	25,0
IAC - 2	34,8	27,1
PL - 1	27,9	30,2

TABELA 15 - Digestibilidade "in vitro" para farinha de soja e de tempê, nas variedades Santa Rosa , Viçoja, IAC - 2 e PL - 1. (μ g de α -aminoácidos liberados por mg de amostra)

Variedades	μ g α -aminoácidos liberados / mg de amostra	
	Farinha de soja	Farinha de tempê
Santa Rosa	81,78	84,83
Viçoja	82,21	93,60
IAC - 2	99,26	89,65
PL - 1	87,03	96,20

6 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados de proteína, obtidos pelos métodos de Kjeldahl , de Jorgensen e de Lowry , na soja descascada. Conforme pode-se observar, houve uma pequena variação nos resultados obtidos pelos dois métodos, sendo que com o de Kjeldahl, os valores foram sempre maiores daqueles obtidos pelo método de Jorgensen.

Para as farinhas de soja e de tempê, pôde-se observar o mesmo fenômeno, isto é, os valores obtidos pelo método de Kjeldahl mostraram-se ainda superiores.

Julgou-se conveniente estimar os valores de proteína total pelos dois métodos anteriormente citados, desde que o de Kjeldahl é empregado universalmente em alimentos, e o de Jorgensen por ser extensivamente utilizado no Centro de Energia Nuclear da Agricultura, na medição de nitrogênio e ou

tros elementos em plantas, sendo ainda extremamente prático e rápido, por utilizar-se de analisador automático.

A variedade que mostrou valores mais altos para proteína total foi a PL-1, considerando-se os dois métodos utilizados, seguida das variedades Viçoja e IAC-2, com valores praticamente iguais. A variedade Santa Rosa foi a que apresentou menor teor proteico.

Vale dizer que a variedade PL-1 caracteriza-se por possuir grãos de tamanho aproximadamente três vezes maior que as variedades comuns. Essa variedade encontra-se atualmente em fase de multiplicação das sementes.

As demais variedades foram escolhidas por serem extensivamente cultivadas no Estado de São Paulo, principalmente a variedade Santa Rosa.

Ainda na Tabela 1, podemos observar que os valores encontrados para proteína solúvel mostraram pequena variação entre as variedades, para um mesmo produto, sendo ligeiramente mais elevados na farinha de tempê.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 temos a composição centesimal da soja, e das farinhas de soja e de tempê.

A soja mostrou um menor teor de óleo e um maior teor de carboidratos quando comparada às farinhas de soja e de tempê, o que poderia ser explicado pelo processamento sofrido pelas últimas. As farinhas de soja e de tempê, tiveram como etapa de seu processamento a maceração por uma noite e posterior lavagem em abundância de água. Em consequência, uma

parte dos carboidratos teria se perdido por solubilização na água de maceração e lavagem, ficando dessa maneira, o óleo mais concentrado nas farinhas de soja e de tempê.

Como se pode observar pelas Tabelas 3 e 4 , o processo de fermentação não afetou grandemente a composição aproximada da soja. Houve um acrêscimo no teor de proteína total, conforme anteriormente observado por WANG *et alii* (1968) e CAMARGO (1969) ; embora outros autores tenham descrito que não houve alteração na porcentagem de proteína da soja após a fermentação (STEINKRAUS *et alii*, 1960). Além disso, o acrêscimo no teor protéico reflete o decrêscimo do teor de óleo, o qual teria sido utilizado pelo fungo para seu crescimento, desde que o *Rhizopus oligosporus* é incapaz de aproveitar os carboidratos da soja (SORENSEN e HESSELTINE, 1966).

O teor de cinzas mostrou-se praticamente inalterado nas farinhas de soja e de tempê, quando comparado ao da soja, enquanto que o teor de fibra foi menor na soja do que nas farinhas.

A atividade ureática (Tabela 5 - expressa em unidades de variação de pH), foi determinada na soja e nas respectivas farinhas. Para a soja, a variedade que mostrou atividade mais alta foi a PL-1 , seguida pelas variedades Viçosa, Santa Rosa e IAC-2 , cuja atividade foi a menor. Esses resultados estão bastante próximos aos encontrados por TURATTI *et alii* (1979) num estudo que visou selecionar cultivares de soja para produção de leite.

Nas farinhas de soja a atividade ureática mostrou-se bastante diminuída, o que deveu-se, provavelmente, ao tratamento térmico sofrido pelas mesmas. Segundo ALBRECHT *et alii* (1966) a soja macerada necessita de apenas cinco minutos de cozimento em água fervente para completa destruição da atividade ureática, o que não pôde ser confirmado no presente trabalho. Nas farinhas de tempê a atividade ureática foi nula, exceto para a variedade Viçosa, que foi também a variedade que apresentou maior valor de atividade entre as farinhas de soja.

Na Tabela 6 estão os resultados obtidos na determinação da atividade do inibidor de tripsina (IT) utilizando BAPA como substrato. Os resultados estão expressos em Unidades de Tripsina Inibidas (UTI) por mg da amostra e em UTI por mg de proteína para que melhor possam ser comparados aos encontrados na literatura. Para a soja crua os valores de UTI por mg de proteína variaram de 44 a 113.

KAKADE *et alii* (1972) analisaram 108 variedades comerciais e experimentais de soja, inicialmente ensaiadas quanto à atividade antitriptica. Com base nos valores encontrados classificaram arbitrariamente as variedades como apresentando atividade baixa, média ou alta de IT. Segundo a classificação proposta por KAKADE *et alii* (1972), as variedades estudadas no presente trabalho encontram-se na faixa de "baixa" atividade de IT (66 - 121), sendo que duas das variedades PL-1 (44) e Santa Rosa (50), encontram-se abaixo do valor mínimo en

contrado por KAKADE.

Em 1972 , WANG *et alii* estudaram a atividade de IT da soja fervida e fermentada por *R. oligosporus* procurando estabelecer a sua natureza. Os extratos preparados a partir da soja fervida e fermentada mostraram maior atividade de IT do que os extratos preparados a partir da soja fervida. A partir desses estudos os autores puderam concluir que o aumento da atividade do IT na soja fermentada não era devido à síntese da mesma pelo fungo, pois nenhuma atividade inibitória pôde ser medida em filtrados da cultura crescendo em meios de leite ou trigo.

Os resultados tornaram aparente que um IT ativo era liberado de uma forma inativa termoresistente pelas proteases de *R. oligosporus*. Uma vez liberado, o inibidor era prontamente inativado pelo calor. A atividade do IT aumentou com o aumento do tempo de fermentação, atingido o máximo com 48 horas. Após esse período, a atividade decrescia, fato que pôde ser explicado, pela inativação do IT por proteases do *R. oligosporus*.

Nesse estudo, a atividade do IT foi medida de acordo com o método de Kunitz modificado por KAKADE *et alii* (1969), o qual utiliza caseína como substrato.

KAKADE *et alii* (1974) descreveram um método, o qual classificaram como mais adequado e reproduzível para se medir a atividade do IT em produtos de soja. Por ser particularmente indicado na determinação de produtos termo-processa-

dos, é recomendado para uso na avaliação da destruição do IT pelo calor, em amostras de soja. Esse método inclui algumas modificações, como a extração das amostras de soja em pH de 8,4 a 10,0 ao invés de pH 7,6, o uso de extratos não centrifugados ao invés de centrifugados e a utilização de BAPA como substrato.

Segundo os autores, as modificações introduzidas no método, aparentemente permitem medir a atividade dos IT insolúveis e expõem os seus resíduos de aminoácidos para interação com a tripsina.

Os autores vão mais longe, citando o trabalho de WANG *et alii* (1972) e sugerindo que pode não ser necessário postular a existência de IT ligados na soja. Durante a fermentação poderia estar ocorrendo que as proteases do *R. oligosporus* solubilizariam os IT desnaturados pelo calor, expondo os resíduos de aminoácidos à inibição, pela interação com a tripsina.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram similares aos anteriormente obtidos por WANG *et alii* (1972), pois pôde-se constatar um aumento na atividade do IT na farinha de tempê para três, das quatro variedades de soja estudadas (Viçoja, IAC-2 e PL-1).

Como foi utilizado o método de KAKADE *et alii* (1974) para se ensaiar a atividade do IT, pode-se supor que durante a fermentação o que ocorre é realmente a liberação dos IT ligados, pela ação das proteases do *R. oligosporus*, embo-

ra sejam necessários mais estudos para que se possa esclarecer se realmente o que ocorre durante a fermentação é a liberação de IT termoresistentes ligados (inativos), ou a solubilização dos IT desnaturados pelo calor, ou ainda, se os dois fenômenos estão ocorrendo conjuntamente.

KAKADE *et alii* (1972) anteriormente citado, encontraram uma larga faixa de variação nas atividades do IT e das hemaglutininas em 108 variedades e "strains" experimentais de soja. As várias amostras de soja utilizadas nesse estudo mostraram diferenças marcantes no valor nutritivo, com um valor de PER variando de 0,75 a 1,75, comparados a um valor de caseína de 2,5. Uma variação tão ampla daria uma grande oportunidade de se estabelecer uma correlação entre um dado parâmetro e o PER, se essa existisse. Apesar da evidência que implica IT e fitohemaglutininas como fatores que contribuem para o pobre valor nutritivo da soja crua, nenhuma relação ficou evidenciada nestes estudos.

Tendo em vista a falta de correlação entre a atividade do IT e o PER, o fato de haver um grau de correlação significativo entre o peso do pâncreas e o PER causou surpresa, desde que é geralmente aceito que os IT são os principais responsáveis pela hipertrofia do pâncreas e pobre crescimento dos animais alimentados com soja. O método utilizado para se medir a atividade de IT foi o de KAKADE *et alii* (1969), utilizando BAPA como substrato. Os autores sugerem que os IT poderiam estar ligados de um modo tal que não poderiam ser

extraídos pelos solventes aquosos geralmente empregados para sua análise. Isso poderia explicar porque os resíduos insolúveis em água de soja, embora com atividade antitriptica baixa, inibem o crescimento e causam hipertrofia pancreática (GARLICH e NESHEIM, 1966). Não houve correlação também entre o PER e os aminoácidos sulfurados totais.

Temos, assim, mais um trabalho em que fica sugerida a existência de IT ligados, na soja.

Na Tabela 10 pode-se observar a porcentagem de captação por 100 g de peso de rato, comparativamente entre os grupos controle, farinha de soja e farinha de tempê. A porcentagem de captação foi maior no grupo controle, variando de 7,00 a 13,70 seguindo-se o grupo farinha de soja (5,64 a 13,59) e o grupo da farinha de tempê (5,82 a 11,92).

Na Tabela 11 temos a porcentagem média de captação por 100 g de peso de rato, comparativamente para os três grupos. Foi aplicado o teste "t" de Student para comparação entre duas médias. Encontrou-se que os grupos controle e farinha de soja não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade. Foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle e farinha de tempê.

Os resultados da composição em aminoácidos para as farinhas de soja e de tempê estão apresentadas nas Tabelas 12 e 13.

Para o produto farinha de soja podemos notar que a composição em aminoácidos para as diversas variedades mostrou apenas ligeira variação entre os resultados. De maneira geral as variedades assemelham-se bastante em sua composição.

Foram observadas maiores quantidades de lisina e histidina na farinha de tempê, nas variedades Viçoja, IAC-2 e PL-1.

Com relação à metionina houve um acréscimo na farinha de tempê, em relação à de soja, para as variedades Santa Rosa e PL-1.

HESSELTINE (1967) afirma que o tempê apresenta um teor de lisina e metionina decrescente na razão direta do tempo de fermentação.

CAMARGO (1969) observou os mesmos resultados para a lisina em quatro, das cinco variedades por ele estudadas, mas não para a metionina, que comportou-se de modo semelhante ao observado no presente estudo.

A treonina teve teores maiores na farinha de tempê em três, das quatro variedades de soja estudadas.

Quanto à isoleucina notou-se um aumento em seu teor, na farinha de tempê, para as variedades Viçoja e PL-1.

A leucina mostrou-se pouco alterada na farinha de tempê, embora com teores ligeiramente inferiores para todas as variedades.

Apenas a variedade Viçoja mostrou um teor maior de fenilalanina quando comparou-se a farinha de tempê com a de soja.

De maneira geral as variedades não sofreram grande alteração no seu teor de aminoácidos essenciais por efeito da fermentação.

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados da digestibilidade "in vitro" para as farinhas de soja e de tempê, medida através da porcentagem de hidrólise.

A variedade Santa Rosa apresentou resultado praticamente igual para as farinhas de soja e de tempê.

As variedades Viçoja e IAC-2 mostraram maior porcentagem de hidrólise na farinha de soja.

Apenas a variedade PL-1 apresentou maior porcentagem de hidrólise na farinha de tempê, quando comparada à farinha de soja.

Na Tabela 15 a digestibilidade "in vitro" é dada pela quantidade de aminoácidos liberados por mg de amostra.

Apenas a variedade IAC-2 apresentou maior teor de aminoácidos na farinha de soja. As demais variedades mostraram liberação de teores mais elevados na farinha de tempê, em comparação com a farinha de soja.

Sendo o fungo utilizado para o preparo do tempê, um fungo proteolítico, esperava-se que a digestibilidade da farinha de tempê fosse maior do que a da farinha de soja, desde que é sobejamente conhecida a natureza refratária das proteínas da soja.

Entretanto, os resultados obtidos através do método utilizado para medir a digestibilidade "in vitro" das farinhas sugere não haver praticamente diferença entre os tratamentos.

7 - CONCLUSÕES

- a - A maceração elimina parte dos sólidos solúveis da soja , notadamente os carboidratos.
- b - O processo de fermentação não altera grandemente a composição centesimal da farinha de tempê, quando comparada à farinha de soja.
- c - O tratamento térmico sofrido pelas farinhas é suficiente para inativar a urease em no mínimo, 94,6%.
- d - As variedades de soja estudadas classificam-se na faixa de "baixa" atividade do inibidor de tripsina, sendo que duas das variedades estudadas PL-1 e Santa Rosa, estão abaixo do valor mínimo encontrado por KAKADE *et alii* (1972).

- e - Pelos resultados obtidos com a determinação da atividade do inibidor de tripsina, para as farinhas de soja e de tempê, não foi possível afirmar se durante a fermentação o que ocorre é a liberação dos IT termoresistentes ligados (inativos), ou a solubilização dos IT desnaturados pelo calor, ou ainda, se os fenômenos estão ocorrendo conjuntamente.
- f - Existe um fator presente na farinha de tempê, capaz de diminuir a captação de iodo pela glândula tireóide de ratos, 24 horas após sua administração
- g - A composição de aminoácidos mostrou-se praticamente sem alterações nos dois produtos estudados.
- h - Embora algumas variedades tenham apresentado maior liberação de aminoácidos na farinha de tempê, a porcentagem de hidrólise foi bastante semelhante entre os dois produtos estudados.

8 - LITERATURA CITADA

- AKESON, W. R. e M. A. STAHPAN, 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein digestibility evaluation. J. Nutr., Philadelphia, 83: 257-261.
- ALBRECHT, W. J. ; C. G. MUSTAKAS e J. E. MCGHEE, 1966. Rate studies on atmospheric steaming and immersion cooking of soubeans. Cereal Chemistry, Minneapolis, 43(4): 400-407.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 1969. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul, AACC.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1970. Official Methods of Analysis. Ed. by William Horitz, 11^a ed. Washington, AOAC. 1015 p.
- BECK, R. N., 1958. Soy flour and fecal tyroxine loss in rats. Endocrinology, Springfield, 62: 587-592.

- BLOCK, R. J. e R. H. MANDL, 1961. The curative action of iodine on soybean goiter and the changes in the distribution of iodoamino acids in the serum and in thyroid gland digests. Arch. Biochem., New York, 93: 15-24.
- BORCHERS, R. A. ; C. W. ACKERSON e F. E. MUSSEHL, 1948. Trypsin inhibitor VI. Effect of various heating periods on the growth promoting value of soybean oil meal for chicks. Poultry Science, Columbus, 27: 601-604.
- BUCK, F. F. ; M. BIER e F. F. NORD, 1962. Some properties of human trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 98: 528-530.
- CAMARGO, R., 1969. Contribuição ao estudo de dois alimentos orientais – o tempeh e o tofu – obtidos da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). (Tese de Livre-Docência), Piracicaba, SP. 88 p.
- COATES, M. E. ; D. HEWITT e P. GOLOB, 1970. British J. Nutr. 24: 213, citado por RACZS, J. M., 1974. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem Soc., Chicago, 51: 161.A-174.A.
- COSTA, S. I. ; D. G. QUAST ; V. A. MORETTI ; W. L. CANTO e R. V. COBBE, 1976. O emprego da soja na alimentação humana. Boletim do ITAL, Campinas, 46: 1-24.
- DIEMAIR, W., 1963. Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker, 8-Auflage. Dresden und Leipzig, Verlag von Theodor Steinkopff, p. 28-29

- FEENEY, R. E. ; G. E. MEANS e J. C. BIGLER, 1969. Inhibition of human trypsin, plasmin and trombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. J. Biol. Chem., Baltimore, 244: 1957-1960.
- FIELDS, R., 1972. The rapid determination of aminogroups with TNBS. Methods in Enzimology, XXV, part. 6: 464-468.
- FILISSETTI, T. M. C. C., 1977. Efeito da ingestão de derivados da soja (*Glycine max*) sobre a tireóide de ratos. Estudo com o emprego de iodo radioativo. (Tese de Mestrado), S.P., 82 p.
- GARLICH, J. D. e M. C. NESHEIM, 1966. Relationship of fractions of soybeans and a crystalline soybean meal to chicks. J. Nutrition, Philadelphia, 88: 100-110.
- GERTLER, A. ; Y. BIRK e A. BONDI, 1967. A comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and ethanol - extracted soybean meals in chicks and rats. J. Nutrition, Philadelphia, 91: 358-370.
- HACKLER, L. R. ; K. H. STEINKRAUS ; J. P. VAN BUREN e D. B. HAND, 1964. Studies on the utilization of tempeh protein by weanling rats. J. Nutrition, Philadelphia, 82: 452-456..
- HAINES, P. C. e R. C. LYMAN, 1961. Relationship of pancreatic enzyme secretion to growth inhibition in rats fed soybean trypsin inhibitor. J. Nutrition, Philadelphia, 74: 445-452.

- HALVERSON, A. W. ; ZEPPLIN, M. e E. B. HART, 1949. Relation of iodine to the goitrogenic properties of soybeans. J. Nutrition, Philadelphia, 38: 115-129.
- HESELTIME, C. W. ; R. CAMARGO e J. J. RACKIS, 1963. A mould inhibitor in soybeans. Nature, London, 200(4912): 1226-1227.
- HESELTIME, C. W., 1967. A millenium of fungi, food and fermentation. Mycologia, New York, 57(2): 149-197.
- HYDOWITZ, J. D., 1960. Occurrence of goiter in an infant on soy diet. New Engl. J. Med., Boston, 262: 351-353.
- JORGENSEN, S. S., s/d. Some Methods Used for Routine Chemical Analysis, Division of Basic Sciences, Piracicaba, CENA (Laboratoy Manual).
- KAKADE, M. L. ; M. SIMONS e I. E. LIENER, 1969. An evaluation of natural vs. synthetic substrats for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chemistry St. Paul., 46: 518-526.
- KAKADE, M. L. ; N. R. SIMONS ; I. E. LIENER e J. W. LAMBERT, 1972. Biochemical and nutritional assesment of different varieties of soybenas. J. Agr. Food Chem., Washington, 20(1): 87-90.
- KAKADE, M. L. ; J. J. RACKIS ; J. E. McGREE e G. PUSKI, 1974. Determinations of tripsin inhibitor of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chemistry, St. Paul., 51(3): 376-382.

- KLOSE, A. A. ; B. HILL e H. L. FEVOLD, 1948. Food Tech., 2: 201, citado por RACKIS, J. J., 1974. Biological and physiological factors in soybeans. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 51: 161.A-174.A.
- KONIJN, A. M. ; S. EDELSTEIN e K. GUGGEHEIM, 1972. Separation of a thyroid-active fraction from unheated soya bean flour. J. Sci. Food Agric., London, 23: 549-555.
- KONIJN, A. M. ; B. GERSHON e K. GUGGEHEIM, 1973. Further purification and mode of action of a goitrogenic material from a soybean flour. J. Nutr., Philadelphia, 103: 278-383.
- LEWIS, J. H. e F. H. L. TAYLOR, 1947. Citado por RACKIS, J. J., 1974. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 51: 161.A-174.A.
- LIENER, I. E., 1955. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. Arch. Bioch. Biophys., New York, 54: 223-231.
- LIENER, I. E. e M. L. KAKADE, 1969. Protease inhibitors. In: I. E. LIENER, ed. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.
- LOWRY, O. H. ; N. J. ROSEBROUGH ; A. L. FARR e N. J. RANDALL 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, 193: 265-275.
- McCARRISON, R., 1933. The goitrogenic action of soybean and ground-nut. Indian J. Med. Res., New Delhi, 21: 179-181.

- MURATA, K. ; H. IKEHATA e T. MYIAMOTO, 1967. Studies on the nutritional value of tempeh. J. Food Sci., Chicago, 32: 580-586.
- NORDSIEK, F. W., 1962. Effects of added casein on goitrogenic action of different dietary levels of soybeans. Proc. Soc. Exp. Biol., New York, 110: 417-420.
- PINCHERA, A. ; M. H. MACGILLIVRAY ; J. D. GRAWFORD e A. G. FREEMAN, 1965. Thyroid refractoriness in an athyreotic cretin fed soybean formula. New Engl. J. Med., Boston, 273: 83-87.
- RACKIS, J. J., 1965. Physiological properties of soybean trypsin inhibitors and their relationships to pancreatic hypertrophy and growth inhibition of rats. Fed. Proceedings, Washington, 24: 1488-1493.
- RACKIS, J. J., 1966. Soybeans trypsin inhibitors: their inactivation during meal processing. Food Tech., Chicago, 20: 1482-1484.
- RACKIS, J. J., 1974. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 20: 161A-174A.
- SAMBETH, W. ; M. C. NESHEIM e J. A. SERAFIN, 1967. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. J. Nutr., Philadelphia, 92: 479-490.
- SHARPLESS, G. R. ; J. PEARSONS e G. S. PRATO, 1939. Production of goiter in rats with raw and treated soybean flour. J. Nutr., Philadelphia, 17: 454-555.

- SHEPARD, T. H. ; G. E. PYNE ; J. F. KIRSCHVINK e M. C. MCLEAN, 1960. Soybean goiter: report of three cases. New Engl. J. Med., Boston, 262: 1099-1103.
- SMITH, K. A. ; P. A. BELTER e R. L. ANDERSON, 1956. Urease activity in soybean meal products. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 8: 360-363.
- SMITH, K. A. ; J. J. RACKIS ; L. L. MCKINNEY ; D. J. ROBBINS e A. N. BOOTH, 1964. Feedstuffs, 36: 46, citado por RACKIS, J. J., 1974. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem. Soc., 51: 161.A-174.A.
- SOCOLOW, E. L. e M. SUZUKI, 1964. Possible goitrogenic effects of selected japanese foods. J. Nutr., Philadelphia, 83: 20-26.
- SORENSEN, W. G. e C. W. HESSELTINE, 1966. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. Mycologia, New York, 58: 681-689.
- SPIEGEL, M. R., 1967. Estatística. Rio de Janeiro. Livro Técnico, 580 p.
- STEINKRAUS, S. K. ; Y. B. HWA ; J. P. VAN BUREN ; M. I. PROVIDENTI e D. B. HAND, 1960. Studies on tempeh - an Indonesian fermented soybean food. Food Research, Champaign, 25(6): 777-788.
- TURATTI, J. M. ; A. M. SALLES ; L. C. SANTOS ; F. E. M. MORI e I. B. FIGUEIREDO, 1979. Estudos preliminares com cultivares de soja para produção de leite. Bol. ITAL, Campinas, 16(3): 289-305.

- VAN MIDDLESWORTH, L., 1957. Thyroxine excretion, a possible cause of goiter. Endocrinology, Springfield, 61: 570-573.
- VAN WIK, J. J. ; M. B. ARNOLD ; J. WYNN e F. PEPPER, 1959. The effects of s soybean product on thyroid function in humans. Pediatrics, Springfield, 24: 752-760.
- WANG, H. L. ; D. I. RUTTLE e C. W. HESSELTINE, 1968. Brotein quality of wheat and soybean after *Rhizopus oligosporus* fermentation. J. Nutr., Philadelphia, 96: 109-114.
- WANG, H. L. ; VESPA, J. B. e C. W. HESSELTINE. 1972. Release of bound trypsin inhibitor in soybean by *Rhizopus oligosporus*. J. Nutrienties. Philadelphia, 102: 1495-1500.
- WILGUS, J. R. ; H. S. GASSNER ; A. R. PATTON e R. G. GUSTAVSON 1941. The goitrogencity of soyeans. J. Nutr., Philadel - phia, 22: 43-52.