

MARIA FERNANDA SPEGIORIN SALLA

**OBTENÇÃO DE UMA LINHAGEM DE SOJA SEM INIBIDOR DE
TRIPSINA KUNITZ E LECTINA E SUA AVALIAÇÃO
BIOQUÍMICO-NUTRICIONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do Título de "*Doctor Scientiae*".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

MARIA FERNANDA SPEGIORIN SALLA

**OBTENÇÃO DE UMA LINHAGEM DE SOJA SEM INIBIDOR DE
TRIPSINA KUNITZ E LECTINA E SUA AVALIAÇÃO
BIOQUÍMICO-NUTRICIONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do Título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 28 DE MARÇO DE 2005

**Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)**

**Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)**

Prof^a. Maria Cristina A. Barbosa

Prof^a. Maria do Carmo G. Peluzio

**Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro e Lourdes, pelo apoio e
confiança incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela constante proteção.

Aos meus pais, Pedro e Lourdes, pelo apoio, amor, incentivo e dedicação durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Maria Beatriz e Pedro Henrique, pela amizade e incentivo, e às minhas sobrinhas, Lúcia Maria e Maria Clara, pela paz e alegria que representam.

Ao meu namorado Max, pelo companheirismo, incentivo e, principalmente, por estar sempre presente em todos os momentos.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela competente orientação, confiança e incentivo nestes quatro anos de uma agradável convivência.

Aos professores conselheiros Elza Fernandes de Araújo e Maurílio Alves Moreira, pelas sugestões e ensinamentos durante todo o curso, nas disciplinas e também na minha Qualificação.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelas sugestões, apoio, orientação e participação durante o experimento biológico.

Aos professores Sérgio L. P. da Matta e José Lino Neto, pelas sugestões e ajuda nas análises histológicas.

Ao Newton, pelo apoio constante nas atividades da casa de vegetação, e também pelos esclarecimentos e ajuda durante todo o trabalho.

Ao estudante de iniciação científica Marcos de Oliveira Pinto, pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) e do Laboratório de Proteína, pela amizade e ajuda nas técnicas de Biologia Molecular e colaboração na compreensão dos resultados.

A todos os funcionários do BIOAGRO, especialmente Reginaldo, João Paulo e Jander, pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do Programa de Bioquímica Agrícola, pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA !!!

BIOGRAFIA

MARIA FERNANDA SPEGIORIN SALLA, filha de Pedro Salla Júnior e Aparecida de Lourdes Spegiorin Salla, nasceu em 17 de julho de 1976, em Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil.

Em janeiro de 1999, formou-se em Farmácia – Habilitação Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná.

Em março de 1999, ingressou no Programa de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, PR, tendo defendido tese em fevereiro de 2001.

Em março de 2001, ingressou no Programa de Doutorado em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em março de 2005.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Expressão de lectinas em sementes de soja.....	5
3.2. Expressão do inibidor de tripsina Kunitz (KTI) em sementes de soja.....	7
3.3. Seleção assistida por marcadores moleculares (MAS).....	9
3.4. Aspectos nutricionais da presença de KTI e lectina em soja.....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO I - “Introgressão de alelos que determinam a ausência de inibidor de tripsina Kunitz e de lectina em sementes de soja”	
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Material genético, cruzamentos e resumo da estratégia experimental.....	28
2.2. Construção de <i>primers</i> específicos para KTI e lectina.....	30
2.3. Seleção por meio de marcadores moleculares.....	31
2.4. Amplificação e separação dos fragmentos com <i>primers</i> de RAPD.....	32
2.5. Análise eletroforética de KTI e lectina.....	33
2.6. Análise dos dados obtidos por RAPD.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1. Seleção assistida por marcadores moleculares.....	35

3.2. Recuperação das características do progenitor recorrente durante os retrocruzamentos.....	38
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO II - “Avaliação da qualidade protéica de uma linhagem de soja com elevado teor protéico, ausência do inibidor de tripsina Kunitz e de lectina”	
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Material Vegetal.....	54
2.2. Obtenção e processamento térmico dos farelos de soja.....	55
2.3. Análise eletroforética de KTI e lectina.....	55
2.4. Caracterização físico-química dos farelos de soja.....	56
2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	57
2.6. Determinação da atividade de tripsina.....	57
2.7. Western blot.....	59
2.8. Avaliação biológica e delineamento estatístico.....	60
2.9. Análise histológica do intestino dos animais experimentais.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1. Análise da presença de KTI e/ou lectina em soja.....	66
3.2. Composição química centesimal.....	67
3.3. SDS-PAGE das proteínas totais de soja.....	68
3.4. Determinação de KTI em sementes de soja.....	70
3.5. Western blot para a determinação de lectina em sementes de soja.....	72
3.6. Determinação da qualidade protéica dos farelos de soja	74
3.6.1. PER, NPR e NPU.....	74
3.6.2. Digestibilidade “in vivo”.....	79
3.7. Análise Histológica.....	81
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

RESUMO

SALLA, Maria Fernanda Spegiorin, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2005. **Obtenção de uma linhagem de soja sem inibidor de tripsina Kunitz e lectina e sua avaliação bioquímico-nutricional.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Elza Fernandes de Araújo.

O presente trabalho está inserido no Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV e tem como objetivo principal a obtenção e caracterização bioquímico-nutricional de uma linhagem de soja com sementes livres de KTI (inibidor de tripsina Kunitz) e lectina. Foram construídos *primers* específicos para identificar os alelos recessivos dos genes que codificam KTI e lectina. Após a obtenção de uma linhagem contendo elevado teor de proteína e ausência de KTI e lectina, a eficiência de recuperação das características do genitor recorrente com elevado teor protéico foi avaliada. Para isso, utilizou-se a técnica de RAPD para o cálculo da distância genética entre os genótipos doadores do elevado teor de proteína (Monarca HyPro), ausência de KTI (BRM925297), ausência de lectina (Columbia) e a linhagem obtida. A similaridade genética média entre a linhagem final e a isolinha Monarca HyPro foi de 98%. Este resultado revelou um bom índice de recuperação do genoma do recorrente. Os valores de atividade de inibição de tripsina nos genótipos com presença e ausência de KTI foram, respectivamente,

390,33 e 134,40 mg de tripsina inibida/g de proteína, diferindo estatisticamente entre si. A composição química centesimal da isolinha com ausência de KTI e lectina mostrou-se de acordo com a literatura. A avaliação da qualidade protéica das sementes de soja livres de KTI e lectina foi conduzida por meio de ensaios biológicos com ratos Wistar, durante 14 dias. Os índices avaliados foram digestibilidade verdadeira, PER (coeficiente de eficiência protéica), NPR (razão protéica líquida) e NPU (utilização protéica líquida). Os ratos alimentados com a soja livre de KTI e lectina mostraram uma melhor digestibilidade em relação à variedade comercial, com valores próximos aos da caseína, considerada uma proteína padrão. A integridade das microvilosidades do epitélio intestinal de ratos alimentados com dietas à base de soja convencional ou soja livre de KTI e lectina foi avaliada. Os animais alimentados com soja convencional apresentaram um maior nível de alterações na morfologia das microvilosidades intestinais, quando comparados àqueles alimentados com a soja livre de KTI e lectina. Concluiu-se que a retirada genética do KTI e da lectina melhorou significativamente a digestibilidade das proteínas da soja, eliminando a necessidade de se empregar elevadas temperaturas no processamento da soja.

ABSTRACT

SALLA, MARIA Fernanda Spegiorin, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2005. **Obtaining of a soybean line without Kunitz trypsin inhibitor and lectin and its biochemical-nutricional evaluation.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Maurílio Alves Moreira and Elza Fernandes de Araújo.

This study is inserted into the “Programa de Melhoria da Qualidade e do Sabor da Soja”, Bioagro/UFV. It is mainly targeted to the obtainment and nutritional-biochemical characterization of a soybean line, which the seeds are free from KTI (Kunitz trypsin inhibitor) and lectin. Specific primers were obtained in order to identify the recessive alleles of the genes codifying the KTI and lectin. After the obtainment of a line with high protein content and absence of KTI and lectin, an evaluation was performed for the efficiency in recovering the characteristics of the recurrent genitor with high protein content. So, the RAPD technique was used to calculate the genetic distance among the genotypes giving the high protein content (Monarca HyPro), absence of KTI (BRM925297), absence of lectin (Columbia), and the obtained line. The average genetic similarity between the final line and the isoline Monarca HyPro reached 98%. This result revealed a good recovery index of the recurrent's genome. The values of the trypsin inhibition activity in genotypes with presence and absence of KTI were 390.33 and 134.40 mg of inhibited trypsin/g protein respectively,

therefore statistically differing from each others. The centesimal chemical composition of the isoline with absence of both KTI and lectin showed to be according to the available literature. The evaluation of the protein quality in the soy seeds KTI- and lectin-free was accomplished by biological 14-day assays with Wistar rats. The following indices were evaluated: true digestibility, PER (protein efficiency rate), NPR (net protein rate) and NPU (net protein utilization). The rats fed soybean without both KTI and lectin showed a better digestibility for the commercial variety, as the obtained values were near the casein's that is considered as a standard protein. The integrity of the brushborder microvillous in the intestinal epithelium of the rats fed diets based on either the conventional soybean or KTI- and lectin-free soybean were evaluated. The animals fed conventional soybean showed a higher level of changes in the morphology of their intestinal microvillous, compared with those fed the soybean without both KTI and lectin. According to the results, it is concluded that the genetic removal of both KTI and lectin significantly improved the digestibility of the soybean proteins, therefore eliminating the need for high temperatures in the soybean processing.

1. Introdução Geral

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é um dos alimentos básicos consumidos pela população dos países asiáticos, principalmente China e Japão. Nos países ocidentais, a soja tem sido cultivada para a produção de óleo comestível, ingredientes para ração animal e ingredientes funcionais para incorporação em alimentos industrializados (Anderson e Wolf, 1995).

Atualmente, o Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor e exportador mundial de soja (USDA, 2004). Cerca de 95% da produção nacional de soja destina-se à obtenção de óleo e farelo (Monteiro *et al.*, 2003). No Brasil, o consumo do farelo de soja está restrito às indústrias de rações para animais. Uma pequena percentagem da soja é processada e utilizada como ingrediente na alimentação humana, na forma de farinhas desengorduradas, flocos, concentrados, isolados e extratos hidrossolúveis.

Os principais constituintes da soja são a proteína e o óleo, numa proporção média de 40% e 20%, respectivamente, em peso seco (Vollmann *et al.*, 2000). Apesar de seu elevado teor protéico, a utilização “in natura” da soja é limitada devido à presença de fatores antinutricionais no grão, principalmente inibidores de proteases e lectinas.

Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, e compreendem cerca de 6% das proteínas totais dos grãos de soja (Monteiro *et al.*, 2003). Estes inibidores são representados pelo inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e inibidor de tripsina e quimiotripsina Bowman-Birk (BBI). Cerca de 80% da inibição da atividade trípica

de grãos de soja é causada pela ação do KTI. Em termos percentuais, a soja contém três vezes mais KTI do que BBI (Tan-Wilson, 1988).

Como o KTI liga-se de forma irreversível à tripsina, a diminuição da concentração desta enzima livre no intestino leva a um aumento da sua síntese e secreção pelo pâncreas (Hajós e Galencsér, 1995). Estudos com animais monogástricos, submetidos a uma alimentação à base de leguminosas, mostram hipertrofia e hiperplasia das células acinares do pâncreas, e conseqüente redução na taxa de crescimento dos animais (Vasconcelos *et al.*, 2001; Pisulewska e Pisulewski, 2000).

As lectinas presentes em grãos de soja, denominadas “SBA” (“soybean agglutinin”), são glicoproteínas de cerca de 120 KDa que se acumulam durante a embriogênese e constituem 1-2% da massa protéica dos grãos (Goldberg *et al.*, 1983). A atividade antinutricional desta classe de glicoproteínas deve-se à sua habilidade em se ligar a receptores glicosilados de células epiteliais, localizadas nas vilosidades da mucosa intestinal. As lectinas podem produzir ulcerações nas vilosidades intestinais, resultando na perda excessiva de nitrogênio endógeno, além da diminuição na taxa de crescimento de animais jovens (Hajós e Galencsér, 1995; Schulze *et al.*, 1995).

Os fatores antinutricionais presentes em leguminosas são geralmente removidos por processamento baseado em vários métodos de tratamento térmico. No entanto, tais procedimentos apresentam um custo elevado, e podem resultar na perda de aminoácidos essenciais e na alteração das propriedades da soja (Siddhuraju *et al.*, 2002). A eliminação genética de KTI e lectina pela transferência de alelos que determinam a ausência dessas proteínas é uma alternativa que vem

sendo considerada de modo a evitar os efeitos negativos advindos do tratamento térmico.

Recentemente, têm sido desenvolvidas linhagens de soja deficientes na expressão de genes específicos de proteínas da semente, como o inibidor de tripsina Kunitz e a lectina. Nessas linhagens, a não expressão desses genes ocorre devido a mutações que resultam em defeitos transcricionais ou pós-transcricionais (Armour *et al.*, 1998).

No Brasil, utilizando o método dos retrocruzamentos auxiliado por marcadores moleculares, o Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV tem desenvolvido, desde 1986, um germoplasma orientado para características especiais de qualidade da soja visando o seu uso na indústria de alimentos (Sediyama *et al.*, 1999).

2. Objetivos

O presente trabalho está inserido no Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV, tendo como objetivo geral a obtenção e caracterização bioquímica e nutricional de uma isolinha de soja com sementes de elevado teor de proteína e ausência de KTI e lectina.

Os objetivos específicos foram:

- ❖ Monitorar, por meio de marcadores moleculares e eletroforese em gel de poliacrilamida, o desenvolvimento de linhagens de soja, derivadas por retrocruzamentos, contendo elevados teores de proteínas e alelos recessivos que condicionam a ausência de KTI e lectina;

- ❖ Avaliar a eficiência da recuperação das características do progenitor recorrente durante os retrocruzamentos;

- ❖ Avaliar características bioquímicas de isolinha de soja com ausência de KTI e lectina;

- ❖ Avaliar parâmetros nutricionais da isolinha de soja com ausência de KTI e lectina.

3. Revisão de Literatura

3.1. Expressão de lectinas em sementes de soja

A soja, como a maioria das leguminosas, possui uma classe de substâncias biologicamente ativas denominadas lectinas. Os experimentos de Orf *et al.* (1978) indicaram que a presença de lectinas em sementes de soja era controlada por um único gene dominante designado *Le1*. O genótipo recessivo homocigoto (*le1*) resultava na ausência destas glicoproteínas na semente.

Goldberg *et al.* (1983) identificaram um gene diferente de *Le1* por meio de hibridização de DNA (*Southern blot*). Este gene, denominado *Le2*, é encontrado tanto em cultivares de soja com presença de lectina nas sementes como naqueles onde as lectinas estão ausentes.

Uma lectina presente em raízes de soja, produto do gene *Le2*, foi isolada e caracterizada por Gade *et al.* (1980), os quais concluíram que as lectinas presentes em sementes e raízes não são produtos do mesmo gene. A homologia entre os genes *Le1* e *Le2* é menor que 85% (Goldberg *et al.*, 1983). Em um estudo com lectinas presentes em sementes e tecido vegetativo de feijão, Borrebaeck (1984) também observou resultados semelhantes àqueles obtidos com a soja.

As lectinas presentes em tecidos vegetativos (SVL – soybean vegetative lectin) não foram tão bem estudadas quanto as lectinas presentes na semente de soja (SBA – soybean agglutinin). No entanto, Spilatro *et al.* (1996) sugeriram uma possível interação entre SVL e proteínas de reserva do tecido vegetativo (VSP), caracterizadas por Wittenbach (1983), as quais são importantes reservas

temporárias de N, utilizadas para suprir necessidades imediatas de N ou aminoácidos pela planta.

O gene *Le1* (acesso nº K00821) (NCBI, 2004) codifica lectinas presentes em sementes de soja, direcionando sua síntese durante o desenvolvimento da semente. Este gene é estruturalmente simples, não contém íntrons, produz um mRNA de 1,0 Kb o qual codifica uma seqüência sinal de 32 resíduos de aminoácidos, e uma proteína madura com 253 resíduos de aminoácidos (Goldberg *et al.*, 1983).

Em um estudo sobre estrutura e expressão do gene de lectina em sementes de soja, Goldberg *et al.* (1983) notaram que o gene mutante (*le1*) era interrompido por um segmento de DNA de 3,4 Kb, o qual reduz sua atividade transcricional, resultando no fenótipo com ausência de lectina (acesso nº K02837) (NCBI, 2004). Este elemento de inserção foi posteriormente denominado *Tgm1* ("transposable element" *Glycine max*). Com exceção de seis substituições de bases, a seqüência codificadora em *le1* é idêntica àquela no gene *Le1* (Rhodes e Vodkin, 1985).

Okamuro e Goldberg (1992) confirmaram que o responsável pelo decréscimo na transcrição de *le1* era o elemento *Tgm1*, excluindo a participação de qualquer outra mutação secundária na repressão da expressão do gene de lectina.

A inserção de elementos transponíveis em genes é considerada um fator importante na geração de mutações em populações naturais, e tem sido observada em várias espécies vegetais como milho (Burr e Burr, 1982; Geiser *et*

al., 1983), tomate (Emmanuel e Levy, 2002) e *Arabidopsis thaliana* (Lin *et al.*, 2004).

3.2. Expressão do inibidor de tripsina Kunitz (KTI) em sementes de soja

Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas. Duas classes de inibidores de proteases, Kunitz (KTI) e Bowman-Birk (BBI), estão presentes em sementes de soja. O inibidor de tripsina Kunitz (KTI) é o mais abundante, inibindo especificamente a tripsina, enquanto que o BBI possui especificidade para quimiotripsina, tripsina e elastase (Brandon *et al.*, 1987). O KTI, cristalizado por Kunitz (1945), é responsável por, aproximadamente, 80% da inibição trípica presente em sementes de soja.

Jofuku e Goldberg (1989) mostraram que o genoma da soja contém, no mínimo, dez genes que codificam KTI, os quais são diferencialmente expressos durante o ciclo de vida da soja. Destes, estima-se que ao menos seis genes sejam ativamente expressos em embriões de soja.

O sequenciamento de três genes que codificam KTI em soja (*Kti1*, *Kti2* e *Kti3*) mostrou uma divergência de aproximadamente 20% entre os genes *Kti1* e *Kti2* em relação ao *Kti3*. Além de serem expressos em sementes de soja, os genes *Kti1* e *Kti2* são também transcritos em outros órgãos da planta, como folhas, caules e raízes. Ao contrário, o mRNA de *Kti3* não foi detectado em caules ou raízes da soja (Krishnan, 2001).

As proteínas codificadas pelos genes *Kti1* e *Kti2* não possuem os aminoácidos Arg-63 e Ile-64, os quais são responsáveis pela atividade de inibição

de tripsina. Desta forma, os produtos destes genes contribuem pouco para a inibição de tripsina total (Jofuku e Goldberg, 1989; Krishnan, 2001).

Estudos genéticos indicaram que um único gene, *Kti3* (acesso nº S45092) (NCBI, 2004), codifica o inibidor de tripsina predominante em sementes de soja. Orf e Hymowitz (1979) identificaram três formas alélicas deste gene (Ti^a , Ti^b e Ti^c), as quais são controladas por um sistema co-dominante de alelos múltiplos em um único loco, codificando isoformas que diferem entre si em poucos aminoácidos (Kim *et al.*, 1985).

As isoformas codificadas pelos alelos Ti^a , Ti^b e Ti^c contêm 181 resíduos de aminoácidos e possuem o sítio de ligação com a tripsina na mesma posição (Arg-63 e Ile-64). A isoforma Ti^a difere de Ti^c em apenas um resíduo de aminoácido na posição 55, que é a mudança de glicina para ácido glutâmico. Ti^b possui o resíduo de glicina na posição 55, mas difere de Ti^a em outros oito resíduos de aminoácidos (Kim *et al.*, 1985).

O alelo Ti^a foi detectado em 89% da coleção de soja do USDA, correspondendo a todos os cultivares de importância comercial nos EUA. Os alelos Ti^b e Ti^c apresentaram uma ocorrência de 11% e 0,3%, respectivamente (Orf e Hymowitz, 1979).

Desta forma, o produto do gene *kTi3* é o principal responsável pela inibição de tripsina em sementes de soja, correspondendo ao alelo Ti^a identificado anteriormente (Orf e Hymowitz, 1979; Kim *et al.*, 1985; Krishnan, 2001).

Somente um membro da família do inibidor de tripsina Kunitz, *Kti3*, é afetado por mutações que resultam no fenótipo com ausência de KTI em sementes de soja. Segundo Jofuku e Goldberg (1989), trata-se de duas deleções

e uma transversão G→T que ocorrem na região codificadora do gene *kti3* (acesso nº AF314824) (NCBI, 2004). Estas mutações resultam em quatro códons de parada no mRNA de *kti3* e, conseqüentemente, numa proteína truncada.

3.3. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (MAS – Marker Assisted Selection)

Geralmente, os programas de melhoramento envolvem o processo de hibridação, seguido da seleção de recombinantes superiores na população segregante. Esse procedimento é normalmente demorado, envolvendo vários cruzamentos, várias gerações e uma rigorosa seleção fenotípica. Além disso, uma possível ligação entre o gene de interesse e genes indesejáveis pode dificultar o processo de seleção de recombinantes (Kumar, 1999).

Diferentes métodos têm sido aplicados ao melhoramento de plantas autógamas. Atualmente, no Brasil, o método de retrocruzamento tem sido utilizado para o desenvolvimento de novos cultivares de soja resistentes a doenças, com reduzido conteúdo de inibidores de proteases e com melhor sabor.

O procedimento de retrocruzamentos é utilizado na transferência de alelos a partir de um genótipo doador, o qual contribui com o gene desejável. Seu objetivo é a recuperação de todos os genes favoráveis do genitor recorrente, mantendo o gene desejável do genitor doador. Caracteres como rendimento de grão, resistência à debulha e outras características do novo cultivar, geralmente, serão os mesmos do cultivar original (Sediyama *et al.*, 1999).

No final do século XX foram desenvolvidos dois métodos para auxiliar no processo de melhoramento vegetal – a transformação genética e a seleção assistida por marcadores moleculares (MAS). Enquanto que o primeiro é um método relativamente rápido para combinar materiais genéticos de diferentes espécies, a MAS baseia-se na estrutura e função do genoma da planta, a fim de escolher o material parental de modo eficiente, acelerando a seleção das melhores progênies (Ovesná *et al.*, 2002; Frisch *et al.*, 1999).

Marcadores moleculares são moléculas (DNA ou proteína) que podem ser utilizadas para identificar um ou mais genes num dado genótipo. Ao contrário dos marcadores protéicos, os marcadores de DNA segregam de modo mendeliano simples e não são influenciados pelo ambiente (Ovesná *et al.*, 2002).

Marcadores de DNA têm sido utilizados, com sucesso, para monitorar a transferência de um ou mais alelos de interesse de um parental selvagem para um cultivar elite (Ribaut e Hoisington, 1998). Entre as vantagens desta técnica estão a análise precoce do material genético (no estágio de semente) e a rapidez na recuperação do genoma parental recorrente (Young, 1999).

Variedades de soja deficientes na expressão de genes de proteínas de reserva têm sido identificadas (Armour *et al.*, 1998). Esta coleção de mutantes naturais inclui variedades de soja livres de KTI (Orf e Hymowitz, 1979), de lectina (Goldberg *et al.*, 1983) e de lipoxigenases (Hildebrand e Hymowitz, 1981). Estudos genéticos indicaram que a não expressão desses genes é resultado de mutações que são herdadas como um alelo recessivo Mendeliano (Jofuku *et al.*, 1989).

A ocorrência desses mutantes naturais possibilita o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados a estes genes, e também a identificação dos

genótipos contendo os alelos recessivos para tais caracteres. O desenvolvimento de sementes de soja que não expressem KTI e lectina tem sido sugerido como uma estratégia para proporcionar uma melhora na sua qualidade nutricional, principalmente quando consumida “in natura” (Duranti e Gius, 1997).

Como auxílio aos programas de melhoramento, os marcadores moleculares estão sendo usados, por exemplo, no mapeamento de genes de resistência (Yu *et al.*, 1994; Brummer *et al.*, 1995), na introgressão gênica (Frisch e Melchinger, 2001) e na avaliação e caracterização de germoplasmas (Baranék *et al.*, 2002).

3.4. Aspectos nutricionais da presença de KTI e lectina em sementes de soja

O valor nutricional de uma planta é determinado pela reserva de carboidratos e proteínas presentes nas sementes (como em leguminosas e cereais) ou nos tecidos de armazenamento (como na batata e mandioca) (Pneumans & Van Damme, 1996). As proteínas de semente tendem a apresentar uma menor qualidade nutricional quando comparadas a proteínas de origem animal. Este fato pode estar relacionado ao seu baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, além da presença de compostos antinutricionais, os quais podem afetar a digestão de proteínas e de outros componentes (Duranti e Gius, 1997).

Os fatores antinutricionais presentes em leguminosas podem ser de origem protéica ou não, e sua presença deve-se, na maioria das vezes, a uma adaptação evolutiva que capacita a planta a sobreviver e completar seu ciclo de vida. Devido a suas propriedades antinutricionais ou até mesmo tóxicas, esses compostos têm se mostrado eficientes na proteção contra insetos, fungos, predadores e diversas condições de “stress” (Duranti e Gius, 1997). Os compostos antinutricionais mais

comumente encontrados em leguminosas são inibidores de proteases (tripsina e quimiotripsina), lectinas, taninos, saponinas, inibidores de amilases, fitatos e alcalóides.

A soja, em particular, contém quantidades significativas de componentes bioativos ou antinutricionais que podem alterar o metabolismo daqueles que fazem uso dela na sua alimentação. Em experimentos biológicos, observa-se que a diminuição no crescimento de ratos, alimentados com dietas à base de soja, tem como principal causa a presença de lectina (SBA – soybean agglutinin), e dois tipos de inibidores de tripsina, Kunitz (KTI) e Bowman-Birk (BBI) (Hajós e Gelencsér, 1995).

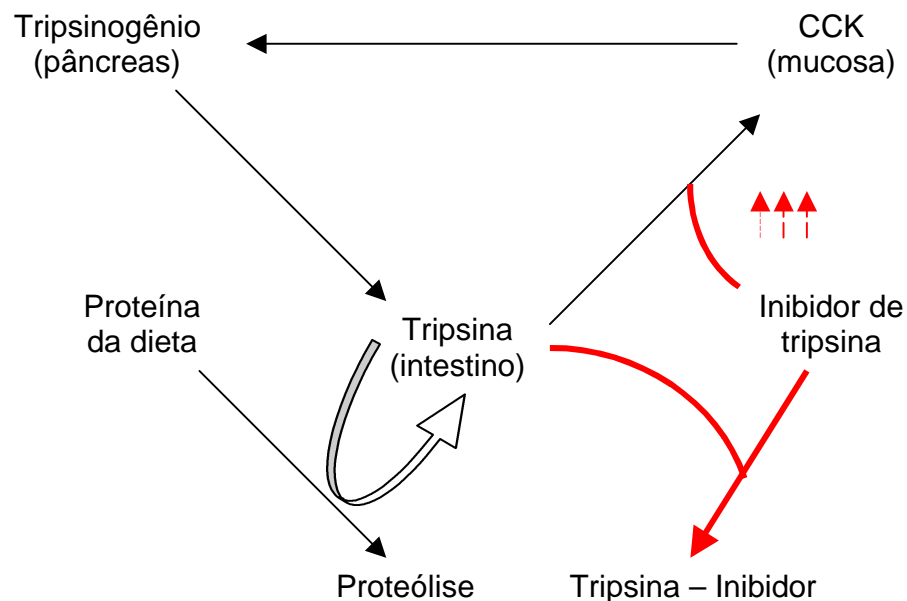
Em uma avaliação nutricional da farinha de soja, Vasconcelos *et al.* (2001) mostraram que o KTI e a lectina são os principais fatores responsáveis pela diminuição na qualidade nutricional desta leguminosa. No entanto, não se deve descartar a interferência, direta ou indireta, de outros compostos naturais na qualidade nutricional da soja. A eliminação genética de lipoxigenases presentes em sementes de soja, por exemplo, pode estar relacionada com a diminuição de seus níveis de KTI e BBI (CARVALHO *et al.*, 1999).

Os fatores antinutricionais podem ser parcialmente inativados utilizando processamento térmico. No entanto, o tratamento térmico oferece algumas desvantagens, dentre elas a diminuição da solubilidade protéica, a modificação e destruição de aminoácidos (Maenz *et al.*, 1999). Nesse caso, a eliminação genética dos principais fatores antinutricionais presentes em soja seria de grande interesse, tanto do ponto de vista nutricional como do econômico.

O primeiro inibidor de protease de plantas a ser bem caracterizado foi o inibidor de tripsina Kunitz de soja (KTI) (Laskowski e Kato, 1980). O mecanismo de inibição do KTI foi elucidado por Liener (1995), em um experimento conduzido em ratos. Devido às alterações que o autor observou no pâncreas desses animais, o autor propôs um mecanismo de “feedback” negativo no controle da secreção pancreática de tripsina, ou seja, a secreção desta enzima pelo pâncreas seria inversamente relacionada ao seu nível no intestino delgado. Assim, quando o nível de tripsina no intestino fosse reduzido, como ocorre na complexação tripsina-inibidor, o pâncreas responderia de uma maneira compensatória, produzindo mais enzima. O agente mediador entre a tripsina e o pâncreas é o hormônio colecistoquinina (CCK), o qual é liberado das células endócrinas do jejuno quando o nível de tripsina no intestino está diminuído. A relação entre tripsina, inibidor de tripsina, CCK e o pâncreas é ilustrada na Figura1.

Segundo Armour *et al.* (1998), os inibidores de tripsina Kunitz, quando incluídos na dieta, promovem uma diminuição na ingestão de alimento pelos animais, redução na digestão e absorção de proteínas, além de uma menor retenção de nitrogênio absorvido. A hipersecreção de enzimas pancreáticas promovida pelo KTI estimula o rápido crescimento do pâncreas.

A lectina é outro componente da soja considerado um fator antinutricional. Trata-se de uma glicoproteína de 120 KDa, composta por quatro subunidades idênticas com afinidade específica para os açúcares N-acetil-glicosamina e D-galactose (Silva e Silva, 2000). Ao contrário da maioria das proteínas da dieta,



Fonte: Liener, 1995

Figura 1. Mecanismo de “feedback” negativo no controle da secreção de tripsina pelo pâncreas. Complexação do inibidor de tripsina com a tripsina proveniente do intestino, e conseqüente hipersecreção de colecistoquinina (CCK).

as lectinas são resistentes à proteólise e degradação por bactérias e enzimas digestivas no intestino (Pneumans e Van Damme, 1996). Segundo Pusztai *et al.* (1990), cerca de 60% das lectinas presentes em uma dieta a base de soja crua permanecem intactas durante sua passagem pelo trato intestinal, ligando-se a glicoproteínas presentes nesta região. O reconhecimento e ligação de lectinas a receptores glicosilados de células epiteliais, localizadas nas vilosidades da mucosa intestinal, conferem a estas proteínas propriedades negativas nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes (Nevel *et al.*, 1998).

Douglas *et al.* (1999) mostraram que o valor nutricional da soja livre de lectina é maior do que o da soja convencional, e também menor quando comparado à soja com ausência de KTI, sugerindo que o inibidor de tripsina exerce um efeito antinutricional mais severo que a lectina.

Segundo Palacios *et al.* (2002), a utilização de variedades de soja geneticamente modificadas (ausência de KTI e lectina) na alimentação de leitões gera uma diminuição no crescimento dos animais devido a outros compostos distintos de lectina e KTI. Segundo os autores, um tratamento térmico da farinha de soja crua com ausência de KTI e lectina torna-se necessário para melhorar seu valor nutricional.

A medida exata da qualidade nutricional de uma proteína seria aquela realizada em estudos experimentais com humanos. Como por razões éticas e práticas isto nem sempre é possível, o ensaio biológico se realiza com animais experimentais. Considerando o estudo de fatores antinutricionais presentes em soja, os ensaios biológicos utilizam, na maioria das vezes, ratos como animais experimentais.

Esses animais são escolhidos em estudos de qualidade protéica principalmente por digerir a maior parte das proteínas de uma maneira semelhante ao homem (HERNÁNDEZ *et al.*, 1996). Além disso, o uso deste animal mostra uma série de vantagens, entre elas a facilidade no cuidado e manipulação desses animais, além de ciclos vitais curtos. Uma vez que a soja é bastante utilizada na formulação de rações animais, vários experimentos biológicos também avaliam sua contribuição para o crescimento de aves (Anderson-Hafermann *et al.*, 1992;

Wiryawan e Dingle, 1999), suínos (Schulze *et al.*, 1995), bovinos (Dréau e Lallés, 1999) e até mesmo de peixes (Refstie *et al.*, 1998).

Apesar de experimentos nos quais foram utilizadas altas concentrações de inibidores de proteases, em curtos períodos de tempo, terem indicado alterações na função normal do pâncreas, ainda permanece a questão se a ingestão crônica de baixas concentrações de inibidores constituiria riscos à saúde humana, principalmente para determinados grupos da população, como crianças e vegetarianos (Liener, 1994).

4. Referências Bibliográficas

- ANDERSON-HAFERMANN, J. C.; ZHANG, Y.; PARSONS, C. M. Effect of heating on nutritional quality of conventional and Kunitz trypsin inhibitor-free soybeans. **Poultry Science**, v. 71, p. 1700-1709, 1992.
- ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavonas related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, v.125, n.3, p.581-587, 1995.
- ARMOUR, J. C.; PERERA, R. L. C.; BUCHAN, W. C.; GRANT, G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 78 p. 225-231. 1998.
- BARANÉK, M.; KADLEC, M.; RADDOVÁ, J.; VACHUN, M.; PIDRA, M. Evaluation of the genetic diversity in 19 *Glycine max* (L.) Merr. accessions included in the Czech National Collection of Soybean Genotypes. **Czech Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.38, n.2, p.69-74, 2002.
- BORREBAECK, C. A. C. Detection and characterization of a lectin from non-seed tissue of *Phaseolus vulgaris*. **Planta**, v.161, p.223-228, 1984.
- BRANDON, D. L.; HAQUE, S.; FRIEDMAN, M. Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.35, p.195-200, 1987.
- BRUMMER, E. C.; NICKELL, A. D.; WIKOX, J. R.; SHOEMAKER, R. G. Mapping the *Fan* locus controlling linolenic acid content in soybean oil. **Journal of Heredity**, v.186, p.245-247, 1995.

- BURR, B; BURR, F. A. *Ds* controlling elements of maize at the shrunken locus are large and dissimilar insertions. **Cell**, v.29, p.977-986, 1982.
- CARVALHO, W. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M. A. Lipoxygenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, v.37, n.6, p.497-501. 1999.
- DOUGLAS, M. W.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. **Poultry Science**, v.78 p.91-95. 1999.
- DRÉAU, D.; LALLÉS, J. P. Contribution to the study of gut hypersensitivity reactions to soybean proteins in preruminant calves and early-weaned piglets. **Livestock Production Science**, v. 60, p. 209-218. 1999.
- DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v.53, p.31-45. 1997.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.112-117, 2002.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, v.39, p.1295-1301, 1999.
- FRISCH, M.; MELCHINGER, A.E. Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. **Crop Science**, v.41, p.1716-1725, 2001.
- GADE, W.; JACK, M. A.; DAHL, J. B.; SCHMIDT, E. L.; WOLD, F. The isolation and characterization of a root lectin from soybean (*Glycine max* (L), cultivar Chippewa). **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.24, p.12905-12910, 1981.

- GEISER, M.; WECK, E.; DORING, H. P. WERR, W.; COURAGE-TEBBE, U.; TILLMANN, E.; STARLINGER, P. Genomic clones of a wild type allele and a transposable element-induced mutant allele of the sucrose synthase gene of *Zea mays* L. **EMBO Journal**, v.1, p.1455-1460, 1983.
- GOLDBERG, R. B.; HOSCHEK, G.; VODKIN, L. O. An insertion sequence blocks the expression of a soybean lectin gene. **Cell**, v.33, p.465-475, 1983.
- HAJÓS, G.; GELENCSÉR, E. Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.165-170, 1995.
- HERNÁNDEZ, T.; HERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, C. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación. **Alimentaria**, p. 27-37, 1996.
- HILDEBRAND, D. F.; HYMOWITZ, T. Two soybean genotypes lacking lipoxigenase-1. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, p.583-586, 1981.
- JOFUKU, K. D.; GOLDBERG, R. B. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. **The Plant Cell**, v.1, p.1079-1093, 1989.
- KIM, S.; HARA, S.; HASE, S.; IKENAKA, T.; TODA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N. Comparative study on amino acid sequence of Kunitz-type soybean trypsin inhibitors, Ti^a, Ti^b, Ti^c. **Journal of Biochemistry**, v.98, p.435-448, 1985.
- KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v.160 p.979-986. 2001.

- KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, v.17, p.143-182, 1999.
- KUNITZ, M. Crystallization of trypsin inhibitor from soybeans. **Science**, v.101, p.668-669, 1945.
- LASKOWSKI, M.J.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.49 p.593-626. 1980.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, n.34, p.31-67. 1994.
- LIENER, I. E. Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. **Journal of Nutrition**, v. 125, p.744-750. 1995.
- LIN, M.; BEHAL, R. H.; OLIVER, D. J. Characterization of a mutation in the IDH-II subunit of the NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v.166, p.983-988, 2004.
- MAENZ, D. D.; IRISH, G. G.; CLASSEN, H. L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, p.335-343. 1999.
- MONTEIRO, M. R. P.; MOREIRA, M. A.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V. Avaliação da digestibilidade protéica de genótipos de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.99-107, 2003.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (GenBank). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>. Acesso em: 01/12/2004.

- NEVEL, V. C.; RYCKE, H.; BEECKMANS, S.; WILDE, R.; DRIESSCHE, E. V. Inhibitory action of spray dried blood plasma and whole egg powder on lectins extracts of several legume seeds: a qualitative approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.3, p.319-326, 1998.
- OKAMURO, J. K.; GOLDBERG, R. B. A mutant lectin gene is rescued from an insertion element that blocks its expression. **Plant Cell**, v.4, p.1141-1146, 1992.
- ORF, J. H.; HYMOWITZ, T.; PULL, S. P.; PUEPPKE, S. G. Inheritance of a soybean seed lectin. **Crop Science**, v.18, p.899-900, 1978.
- ORF, J. H.; HYMOWITZ, T. Genetics of the Kunitz Trypsin Inhibitor: an antinutritional factor in soybean. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, p.722-726, 1979.
- OVESNÁ, J.; POLÁKOVÁ, K.; LEISOVÁ, L. DNA analyses and their application in plant breeding. **Czech J. Genet. Plant Breed.**, v.38, n.1, p.29-40, 2002.
- PALACIOS, M.F.; EASTER, R. A.; SOLTWEDEL, K. T.; PARSONS, C. M.; DOUGLAS, M. W.; HYMOWITZ, T.; PETTIGREW, J. E. Effect of soybean variety and processing on growth performance of young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, v.82, n.4, p.1108-1114, 2004.
- PISULEWSKA, E.; PISULEWSKI, P. M. Trypsin inhibitor activity of legume seed (peas, chickling vetch, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. **Animal Feed Science and Technology**, v.86 p.261-265, 2000.
- PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.7 p.132-138. 1996.

- PUSZTAI, A.; EWEN, S. W. B.; GRANT, G.; PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; RUBIO, L.; BARDOCZ, S. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. **Digestion**, v.46, p.308-315, 1990.
- REFSTIE, S.; STOREBAKKEN, T.; ROEM, A. J. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced contents of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. **Aquaculture**, v. 162, p.301-312. 1998.
- RHODES, P. R.; VODKIN, L. O. Highly structured sequence homology between an insertion element and the gene in which it resides. **Proceeding National Academy Science USA**, v.82, p.493-497, 1985.
- RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. Marker-assisted selection: new tools and strategies. **Trends in Plant Science**, v.3, n.6, p.236 –239, 1998.
- SCHULZE, H.; SAINI, H. S.; HUISMAN, J.; HESSING, M.; BERG, W.; VERSTEGEN, M. W. A. Increased nitrogen secretion by inclusion of soya lectin in the diets of pigs. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.69 p.501-510, 1995.
- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M. S. Melhoramento da soja. *In*: BORÉM, A. **Métodos de melhoramento de plantas**. ed. UFV – Viçosa, 817p, 1999.
- SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionizing radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry**, v.78, p.187-205, 2002.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p.3-9, 2000.

SPILATRO, S. R.; COCHRAN, G. R.; WALKER, R. E.; CABLISH, K. L.; BITTNER, C. C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v.110, p.824-834, 1996.

STAHLHUT, R. W.; HYMOWITZ, T. Screening the USDA soybean germplasm collections for lines lacking the 120.000 daltons seed letin. **Soybean Genetic Newsletter**, v.7, p.41-43, 1980.

TAN-WILSON, A L.; COSGRIFF, S. E.; DUGGAN, M. C.; OBACH, R. S.; WILSON, K. A. Subclassification of soybean Bowman-Birk isoinhibitors. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v.65, p.1475-1478, 1988.

TRAINA, M. S.; BREENE, W. M. Composition, functionality and some chemical and physical properties of eight commercial full-fat soy flours. **Journal of Food Processing Preservation**, v.18, p.229-252, 1994.

USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.usda.gov/> Acesso em: 03/12/2004.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A. B.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12 p.55-62, 2001.

VOLLMANN, J.; FRITZ, C. N.; WAGENTRISTI, H.; RUCKENBAUER, P. Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under

Central European growing conditions. **Journal of the Science of food and Agriculture**, v.80, p.1300-1306, 2000.

WIRYAWAN, K. G.; DINGLE, J. G. Recent research on improving the quality of grain legumes for chicken growth. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76, p. 185-193. 1999.

WITTENBACH, V. A. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. **Plant Physiology**, v.73, p.125-129, 1983.

YOUNG, N. D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. **Molecular Breeding**, v.5, p.505-510. 1999.

YU, Y. G.; SAGHAI, M. M. A.; BUSS, G. R.; MAUGHAM, P. J.; TOLIN, S. A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, v.84, p.60-64, 1994.

CAPÍTULO I

“Introgressão de alelos que determinam a ausência de inibidor de tripsina Kunitz e de lectina em sementes de soja”

1. Introdução

O valor nutricional das leguminosas é limitado pela presença, na semente, de numerosos compostos naturais, os quais interferem com a digestão e absorção de nutrientes. A soja (*Glycine max* L. Merrill) possui quantidades variáveis destes compostos, denominados fatores antinutricionais, entre os quais estão os inibidores de proteases, as lectinas e o fitato. O inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e as lectinas são considerados os principais fatores antinutricionais da soja.

O KTI é responsável pela baixa digestão de proteínas da dieta, uma vez que interfere com a função da tripsina. Essa interferência resulta numa baixa retenção do nitrogênio e do enxofre, além de provocar um menor crescimento em animais experimentais (Pisulewska e Pisulewski, 2000).

Ao contrário da maioria das proteínas da dieta, as lectinas são resistentes à degradação por bactérias e por enzimas digestivas do intestino. O efeito tóxico das lectinas deve-se à sua interação com glicoproteínas, presentes na superfície das células epiteliais do intestino. Isto resulta em ulcerações nas microvilosidades intestinais, e conseqüentemente na diminuição na absorção de nutrientes pelo animal alimentado com soja crua (Pneumans e van Damme, 1996).

Com a finalidade de inativar ou reduzir os fatores antinutricionais presentes nos grãos de soja, vários métodos de processamento têm sido utilizados. No entanto, nenhum deles é capaz de remover completamente todos os fatores antinutricionais (Siddhuraju *et al.*, 2002). Uma maneira alternativa para eliminar tais fatores seria por meio de manipulação dos genes que codificam esses compostos.

Mutações naturais que condicionam a ausência de KTI e lectina em sementes de soja foram identificadas no germoplasma dessa leguminosa (Pull *et al.*, 1978; Orf e Hymowitz, 1979). Tais mutações levaram ao aparecimento de alelos recessivos (*k^{ti}3* e *le1*), os quais em homozigose, determinam a ausência de KTI e lectina na semente, respectivamente. Esses alelos sofreram mutações na região codificadora resultando em defeitos transcricionais ou pós-transcricionais (Jofuku *et al.*, 1989; Goldberg *et al.*, 1983).

A possibilidade de introduzir genes de interesse em um cultivar elite, com o objetivo de melhorar a qualidade nutricional da soja, tem despertado grande interesse dos programas de melhoramento (Bernard e Hymowitz, 1983; Hartwig, 1996; Sediyaama *et al.*, 1999; Clarke e Wiseman, 2000).

A existência de mutantes naturais com ausência de KTI ou de lectina em sementes de soja, juntamente com a técnica de seleção assistida por marcadores moleculares, tornaram viável a introgressão dos alelos recessivos em cultivares elite de soja. No Brasil, utilizando o método dos retrocruzamentos auxiliado por marcadores moleculares, o Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV tem desenvolvido, desde 1986, um germoplasma orientado para características especiais de qualidade da soja visando o seu uso

na indústria de alimentos (Sediyama *et al.*, 1999). Como parte desse programa de melhoramento, o objetivo do trabalho relatado neste capítulo foi o de monitorar, por meio de marcadores moleculares e eletroforese em gel de poliacrilamida, o desenvolvimento de linhagens avançadas de soja contendo elevados teores de proteínas e alelos recessivos que condicionam a ausência de KTI e lectina. Após a obtenção da linhagem livre de KTI e lectina, foi avaliada a eficiência da recuperação do genoma do progenitor recorrente.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material genético, cruzamentos e resumo da estratégia experimental

As cultivares de soja com ausência de KTI (BRM925297) e com ausência de lectina (Columbia) em sementes foram incorporados ao germoplasma da Universidade Federal de Viçosa. Na Figura 1 estão esquematizados os cruzamentos visando à obtenção de linhagens de elevado teor protéico e homocigotas recessivas para KTI e lectina.

Utilizando o método da seleção assistida por marcadores moleculares (MAS), foram produzidas linhagens derivadas de CAC-1 HyPro contendo elevado teor de proteína e ausência de KTI ou de lectina. A linhagem CAC-1 HyPro é derivada da variedade CAC-1, utilizando-se o acesso BARC-8 como doador de alto teor de proteína. Após a obtenção dessas linhagens com as características isoladas, estas foram inter cruzadas (geração F1) e autofecundadas, obtendo-se a geração F2. Sementes F2 foram analisadas para KTI e lectina (por eletroforese em gel de poliácridamida) com o objetivo de selecionar genótipos livres desses dois fatores.

Plantas F2, contendo as características acima mencionadas, foram cruzadas com a linhagem Monarca HyPro, a fim de se obter linhagens mais adaptadas às condições de cultivo do Brasil. A linhagem Monarca HyPro foi obtida a partir da variedade Monarca, utilizando a linhagem CAC-1 HyPro como doadora de alto teor de proteína. Monarca HyPro possui características agrônômicas desejáveis, como tipo de grão, elevado teor protéico e alta produtividade. Após a

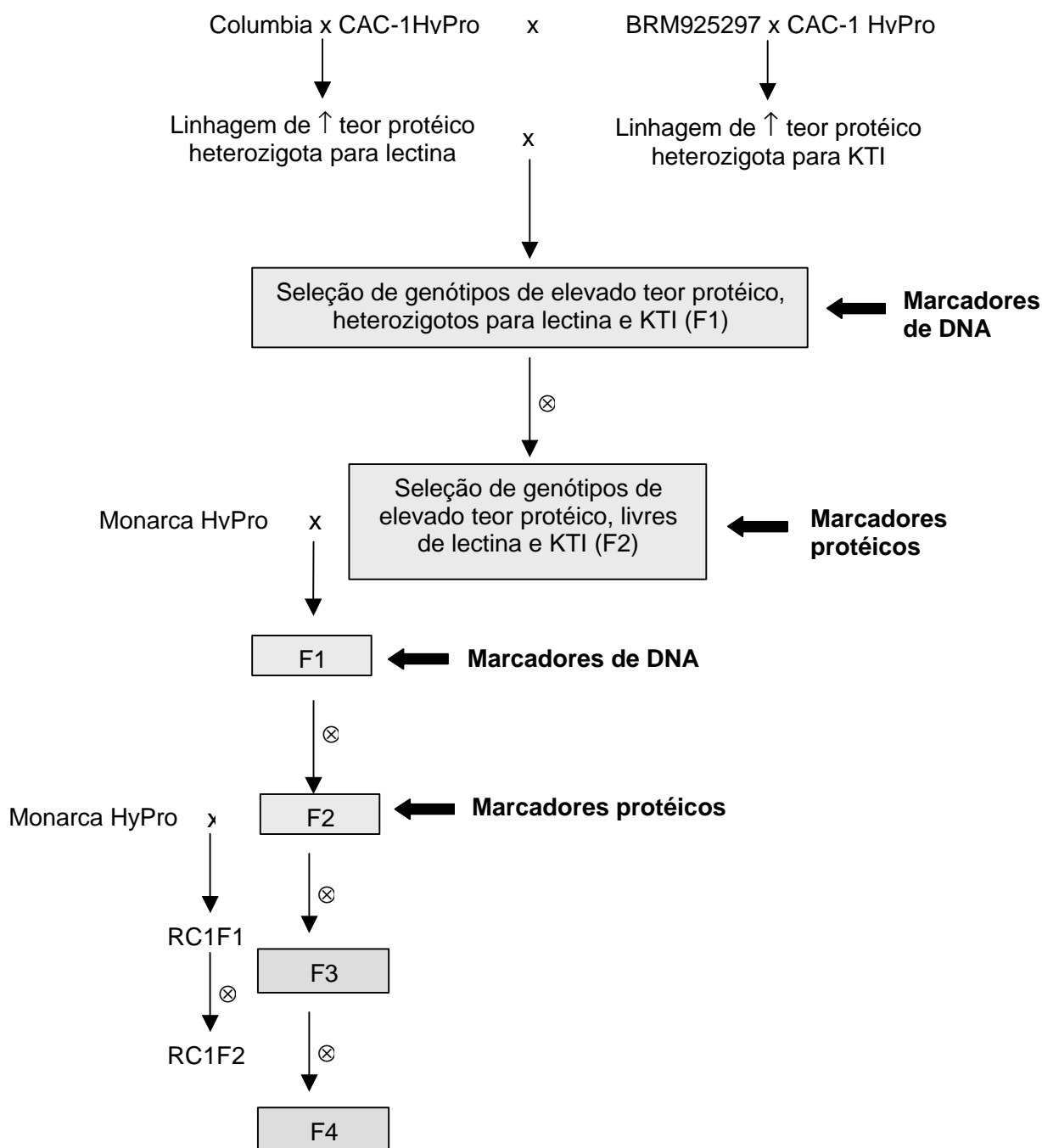


Figura 1. Esquema de cruzamentos visando à obtenção de linhagem de soja livre de KTI e lectina, com elevado teor de proteínas. A linhagem Monarca HvPro foi utilizada como progenitor recorrente. Columbia e BRM925297 foram doadores dos alelos recessivos para lectina e KTI, respectivamente. RC: retrocruzamentos. O símbolo (⊗) indica autofecundação.

obtenção das plantas F1, estas foram autofecundadas, obtendo-se plantas F2. As plantas F2 foram submetidas a sucessivas autofecundações, obtendo-se plantas F4. As plantas F2 também foram retrocruzadas com a linhagem Monarca HyPro, obtendo-se sementes da geração RC1F1, as quais foram autofecundadas obtendo-se a geração RC1F2. Ao longo do processo de autofecundação foi realizada a seleção de genótipos homozigotos recessivos para KTI e lectina, e também para elevado teor de proteína.

Com base nas seqüências dos alelos mutantes para KTI e lectina, foram construídos marcadores de DNA específicos para tais caracteres (*primers*). Os marcadores de DNA permitiram a seleção de genótipos heterozigotos ou homozigotos recessivos tanto para o KTI quanto para a lectina. A seleção dos fenótipos nulos para ambas as características foi realizada por análise de proteínas (SDS-PAGE).

Os cruzamentos entre as variedades de soja utilizadas neste trabalho foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa – MG, e fazem parte do Programa de Melhoramento da Qualidade e Sabor da Soja, desenvolvido pelo BIOAGRO-UFV.

2.2. Construção de *primers* específicos para KTI e lectina

Primers específicos foram construídos a partir das seqüências de DNA dos alelos mutantes para KTI e lectina, depositadas no GenBank (acessos K02837 e AF314824) (NCBI, 2004). Para a construção da seqüência dos *primers*, foi utilizado o programa “Primer 3 Input Program”, disponível no seguinte endereço eletrônico:

<http://www.genome.wi.mit.edu/genome.software/other/primers3.html>

2.3. Seleção por meio de marcadores moleculares

Os *primers* específicos para KTI e lectina foram utilizados para auxiliar a seleção de sementes contendo, no mínimo, um alelo recessivo para estes genes. O DNA total de soja foi extraído de acordo com procedimento proposto por McDonald *et al.* (1994), utilizando uma metodologia não destrutiva da semente. Para isso, a região do cotilédone da semente, oposta ao eixo embrionário, foi cortada com uma lâmina fina até a obtenção de cerca de dez miligramas de cada semente a ser analisada. A grande vantagem deste método é que as sementes analisadas ainda podem ser plantadas.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. A concentração de DNA foi estimada pela fórmula: $[DNA]_{\mu g/\mu l} = (A_{260} \cdot f \cdot 50) / 1000$, onde *f* é o fator de diluição (Sambrook *et al.*, 1989).

As reações de amplificação com *primers* específicos foram feitas em um volume total de 25 μ l contendo: 50 ng de DNA genômico; uma unidade de *Taq* DNA polimerase; Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); KCl 50 mM; Triton X-100 0,4%; 100 μ M de cada um dos desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); MgCl₂ 2 mM e 0,3 μ M dos *primers* específicos para *lec1* ou *Kti3*.

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador “PE Applied Biosystems” modelo 9600. A amplificação do DNA de soja com o *primer* para KTI foi realizada em 35 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C. A amplificação do

DNA utilizando o *primer* para lectina consistiu de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 45°C e 30 segundos a 72°C. Após os ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (0,5µg/ml), submerso em tampão Tris-borato 90mM e EDTA 1 mM (TBE). A separação eletroforética foi realizada a 120 Volts por 3 horas em tampão TBE. Após a corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.4. Amplificação e separação dos fragmentos obtidos com *primers* de RAPD

Com o objetivo de determinar o grau de recuperação do genoma do recorrente e as distâncias entre os genótipos envolvidos no processo de melhoramento, após a extração do DNA de sementes de soja, segundo protocolo de McDonald *et al.* (1994), as amostras foram amplificadas pela técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1990). Os *primers* de RAPD, adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA), e suas respectivas seqüências estão descritos na Tabela 1.

As reações de amplificação foram feitas em uma mistura de 25µl contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios com *primers* específicos, exceto para o *primer*, que foi substituído por 0,4µM de *primer* de RAPD. O termociclador foi programado para 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 35°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos; e um passo final a 72°C durante 7

Tabela 1. *Primers* de RAPD utilizados e suas respectivas seqüências.

Primers	Seqüência (5'® 3')	Primers	Seqüência (5'® 3')
OPK1	CATTCGAGCC	OPAD17	GGCAAACCCT
OPK3	CCAGCTTAGG	OPAD18	ACGAGAGGCA
OPK4	CCGCCCAAAC	OPAD19	CTTGGCACGA
OPAA2	GAGACCAGAC	OPAD20	TCTTCGGAGG
OPAC3	CACTGGCCCA	OPAE2	TCGTTACACC
OPAC4	ACGGGACCTG	OPAE3	CATAGAGCGG
OPAC6	CCAGAACGGA	OPAE5	CCTGTCAAGT
OPAC7	GTGGCCGATG	OPAI15	GACACAGCCC
OPAC10	AGCAGCGAGG	OPAM17	CCTAACGTCC
OPAD1	CAAAGGGCGG	OPAW3	CCATGCGGAG
OPAD2	CTGAACCGCT	OPAW15	CCAGTCCCAA
OPAD5	ACCGCATGGG	OPAX3	CCAAGAGGCT
OPAD6	AAGTGCACGG	OPAX5	AGTGCACACC
OPAD8	GGCAGGCAAG	OPAX8	AGTATGGCGG
OPAD10	AAGAGGCCAG	OPAX15	CAGCAATCCC
OPAD12	AAGAGGGCGT	OPAX16	GTCTGTGCGG
OPAD13	GGTTCCTCTG	OPAX18	GTGTGCAGTG
OPAD14	GAACGAGGGT	OPAX20	ACACTCGGCA

minutos. A eletroforese e a fotodocumentação dos resultados foram realizadas conforme já descrito anteriormente, no item 2.3.

2.5. Análise eletroforética de KTI e lectina

A fim de selecionar as sementes de soja recessivas homozigotas para KTI e/ou lectina, e também confirmar os fenótipos envolvidos nos cruzamentos, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo SDS, segundo metodologia descrita por Monteiro (2000). A separação das proteínas foi baseada num sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970), envolvendo dois géis: (a) o gel de concentração contendo 6% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,15 M (pH 6,8) e 0,1% de SDS; (b) o gel de separação contendo 14% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,9M (pH 8,8) e 0,1% de SDS. A

corrida do gel foi realizada a 120 Volts por 4 horas em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,5) contendo glicina 0,192M e SDS 0,1%. As proteínas foram visualizadas após coloração com “Coomassie blue” 1,5% e descoloração em uma solução de ácido acético 7,5% e metanol 25%.

2.6. Análise dos dados obtidos por RAPD

Os produtos de amplificação de maior intensidade, e cuja amplificação pôde ser reproduzida, foram tabulados como 1 (presença) e 0 (ausência) para a confecção de uma matriz de dados binários. As distâncias genéticas entre as variedades e a linhagem livre de KTI e lectina foram calculadas com base no coeficiente de dissimilaridade definido por Nei e Li (1979), de acordo com a seguinte fórmula:

$$d_{ij} = 1 - \frac{2a}{2a + b + c}$$

Em que:

d_{ij} = distância genética

a = presença de banda nos indivíduos i e j (1,1)

b = presença de bandas apenas no indivíduo i (1,0)

c = presença de banda apenas no indivíduo j (0,1)

As medidas de dissimilaridade foram realizadas com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1997).

3. Resultados e Discussão

3.1. Seleção assistida por marcadores moleculares

Com o objetivo de desenvolver linhagens de soja de elevado teor protéico e ausência de KTI e lectina, as linhagens BRM925297 (livre de KTI) e Columbia (livre de lectina) foram incorporadas ao germoplasma de soja da UFV. Os alelos mutantes, tanto para os genes que codificam KTI quanto para os que codificam lectina, foram então transferidos para variedades comerciais de soja, utilizando o método de seleção assistida por marcadores moleculares (MAS).

Os *primers* utilizados na MAS foram desenhados de tal forma a se parearem com as regiões que contêm mutações nos genes *lec1* e *kti3*. O par de *primers* específicos para o gene de lectina reconhece regiões do *Tgm1*, elemento transponível responsável pela não expressão de lectina em sementes de soja (Goldberg *et al.*, 1983). A amplificação do DNA genômico de soja, utilizando este par de *primers*, gerou um fragmento de 584 pb (Figura 3). No entanto, foram observadas algumas bandas inespecíficas na região inferior do gel, possivelmente devido a dímeros de DNA formados pelos próprios *primers*, sob condições de baixas temperaturas de pareamento (Williams *et al.*, 1990; Ferreira e Keim, 1997). O marcador de tamanho de DNA possibilitou a identificação correta do fragmento de tamanho esperado.

A seqüência de cDNA do alelo mutante do gene *kti3*, depositada no GenBank (Jofuku *et al.*, 1989), foi utilizada na construção dos *primers* específicos para KTI em sementes de soja. Um dos *primers* reconhece a região do gene *kti3*

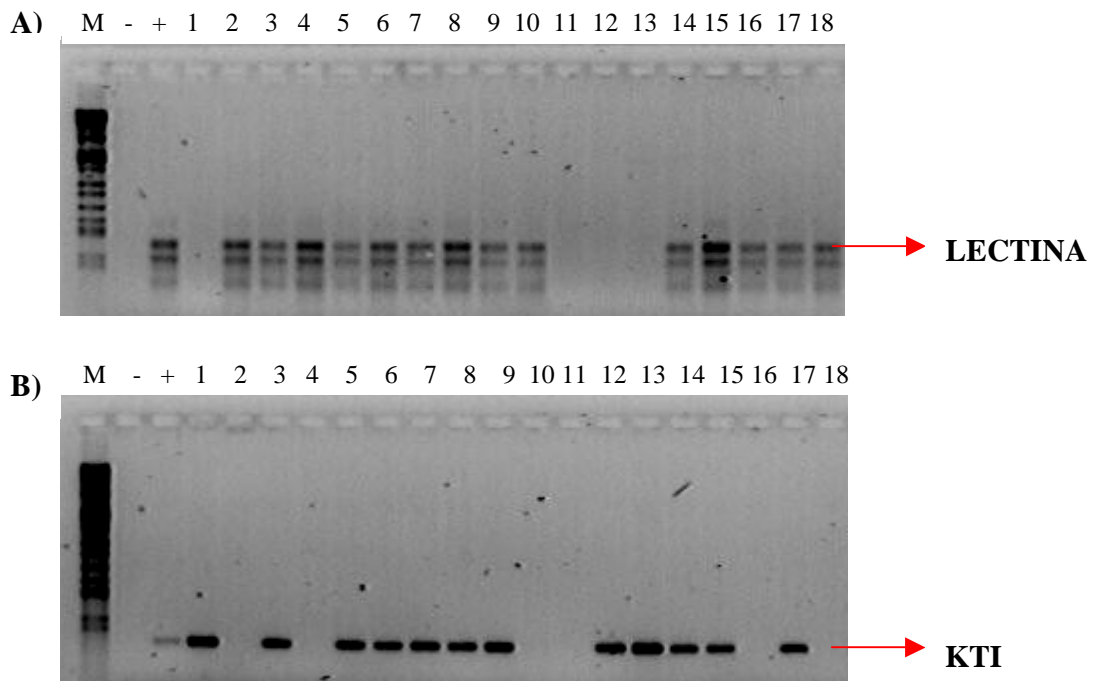


Figura 3. Produtos de amplificação de DNA de soja em reação de PCR utilizando *primers* específicos para o alelo mutante do gene de lectina (A) e para o alelo mutante do gene de KTI (B). A coluna **M** contém DNA de fago λ digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*. Os controles negativos (-) e positivos (+) indicam, respectivamente, a ausência e presença de alelos mutantes para lectina (A) ou KTI (B). As sementes contendo ou não alelo(s) recessivo(s) para KTI e lectina estão representadas pelas colunas de 1 a 18.

contendo as mutações responsáveis pelo fenótipo KTI nulo, correspondentes aos nucleotídeos presentes nas posições +481, +486 e +487 (Jofuku e Goldberg, 1989). O outro *primer* reconhece uma sequência do gene *Kti3* que está localizada a uma distância de 380 pb (“upstream”) da região que é reconhecida pelo *primer* anterior. Utilizando estes *primers* na amplificação do DNA genômico de soja, obteve-se um fragmento de 427 pb (Figura 3).

As bandas resultantes da amplificação do DNA de soja indicam a presença de, no mínimo, um alelo recessivo para os genes estudados. A extração de DNA genômico de sementes de soja utilizando uma metodologia não-destrutiva foi vantajosa durante este processo, permitindo que elas fossem analisadas e posteriormente plantadas. Esse procedimento foi possível porque o método de análise não destrutiva de sementes demanda pequena porção de amostra (cerca de 10 mg) (Silva, 2004).

Apesar de gerarem fragmentos de tamanhos diferentes, os *primers* para KTI e lectina não puderam ser utilizados simultaneamente na reação de PCR. Os *primers* apresentaram condições de amplificação distintas, principalmente em relação à temperatura de pareamento dos *primers*. Esta diferença entre os *primers* deve-se a variações nas proporções de nucleotídeos CG e AT, presentes nos mesmos (Breslauer *et al.*, 1986).

A utilização da MAS tem sido observada em diferentes etapas dos programas de melhoramento vegetal, como sinalização de genes de resistência a doenças e pragas (Young, 1996; Mudge *et al.*, 1997), associação com caracteres quantitativos (Zeng, 1993; Young, 1999) e recuperação de genótipos em processos de introgressão gênica (Visscher *et al.*, 1996; Frisch e Melchinger, 2001).

Segundo Ovesná *et al.* (2002), os marcadores moleculares são eficazes na seleção de características expressas por um único gene, além de acelerar a recuperação do genoma parental recorrente durante os retrocruzamentos. A identificação de plantas com uma maior proporção do genoma parental recorrente,

visando futuros retrocruzamentos, é também considerada uma vantagem da MAS (Frisch *et al.*, 1999).

A introgressão de alelos recessivos para o gene *kti3* em cultivares elite de soja já foi realizada anteriormente (Bernard e Hymowitz, 1986). No entanto, essas variedades têm sido utilizadas somente para a pesquisa científica. Considerando que o inibidor de tripsina Kunitz é o principal fator antinutricional presente na soja crua, sua eliminação genética mostra-se vantajosa, podendo levar a melhoria da qualidade nutricional e a diminuição nos custos destinados ao processamento térmico da soja. Embora existam mutantes naturais livres de BBI (Domagalski *et al.*, 1992), a eliminação genética desta proteína em cultivares elite de soja não seria interessante devido ao elevado conteúdo de cisteína presente no BBI (Clarke e Wiseman, 2000).

3.2. Recuperação das características do progenitor recorrente durante os retrocruzamentos

A recuperação do genoma da linhagem Monarca HyPro na geração RC1F2 foi avaliada pela técnica de RAPD. Os fenótipos dos genótipos de soja utilizados nos cruzamentos, assim como da linhagem livre de KTI e lectina, foram confirmados por eletroforese das proteínas presentes nos grãos (Figura 4).

Os marcadores de DNA têm sido utilizados em estudos de diversidade genética por apresentarem vantagens sobre os marcadores morfológicos, pois não são afetados pelo ambiente e são praticamente ilimitados em número (Abdelnoor

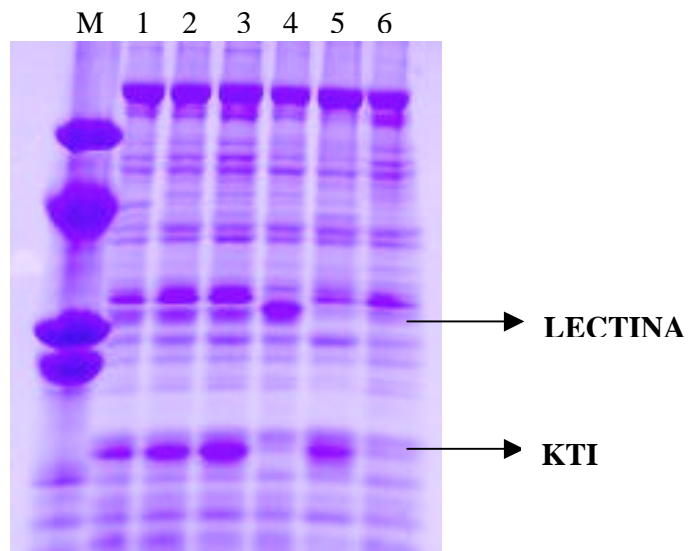


Figura 4. Análise de lectina e KTI por SDS-PAGE em sementes de soja. M: massa molecular (66KDa, 45KDa, 29KDa e 24KDa); 1-3: Linhagens de soja doadoras de elevado teor protéico (BARC-8; CAC-1 HyPro e Monarca HyPro, respectivamente); 4: BRM925297 (linhagem doadora da ausência de KTI em sementes de soja); 5: Columbia (linhagem doadora da ausência de lectina em sementes de soja); 6: linhagem livre de KTI e lectina.

et al., 1995; Baránek *et al.*, 2002). A determinação da distância genética visando avaliar a recuperação do genoma recorrente, em programas de retrocruzamento, utilizando marcas moleculares, tem sido observada em várias espécies cultivadas, como em soja (Barroso *et al.*, 2003), em feijão (Costa, 2004) e em milho (Pinto *et al.*, 2003), por exemplo.

A técnica de RAPD é uma modificação da reação em cadeia da polimerase, desenvolvida por dois grupos independentes (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). Para este estudo, foram utilizados somente os *primers* que geraram bandas nítidas e com repetibilidade no padrão de amplificação (Figura 5).

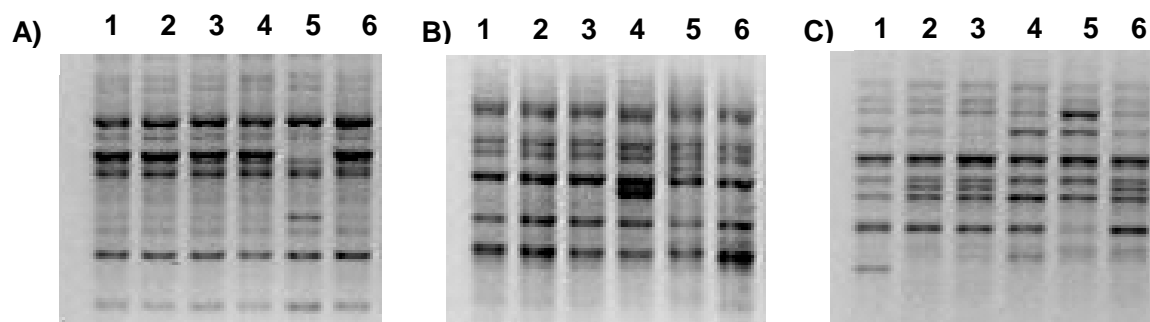


Figura 5. Análise eletroforética em gel de agarose 1,2%, dos produtos de amplificação do DNA de soja utilizando *primers* de RAPD. A) *Primer* OPAX-3; B) *Primer* OPAW-3; C) *Primer* OPAD-6; 1-3: Linhagens doadoras de elevado teor protéico (BARC-8; CAC-1 HyPro e Monarca HyPro, respectivamente); 4: BRM925297 (linhagem doadora da ausência de KTI em sementes de soja); 5: Columbia (linhagem doadora da ausência de lectina em sementes de soja); 6: Linhagem livre de KTI e lectina.

Foram obtidos 157 fragmentos utilizando 36 *primers*, uma média de 4,4 bandas por *primer*. Quarenta e quatro bandas foram polimórficas e 113 monomórficas. A similaridade genética entre os genótipos estudados variou entre 88% (linhagem KTI⁻ Lectina⁻ e Columbia) e 99% (Cac-1 e Monarca) (Tabela 2).

A linhagem Monarca HyPro foi utilizada como progenitor recorrente por possuir características agrônômicas desejáveis, tais como rendimento de grãos, alto teor protéico e boa produtividade. A linhagem CAC-1 HyPro mostrou uma elevada similaridade genética com relação à Monarca HyPro (99%) (Tabela 2). Este resultado era esperado, uma vez que a linhagem Monarca HyPro é derivada da variedade CAC-1.

Tabela 2. Similaridade genética (%) entre as variedades de soja utilizadas nos cruzamentos e a linhagem livre de KTI e lectina.

Acessos	BARC-8	Cac-1	Monarca	BRM 925297	Columbia	Linhagem KTI⁻Lec⁻
BARC-8	100					
Cac-1	93	100				
Monarca	94	99	100			
BRM925297	94	94	95	100		
Columbia	90	89	89	89	100	
Linhagem KTI⁻Lec⁻	94	97	98	94	88	100

As variedades doadoras dos alelos recessivos para KTI e lectina apresentaram uma baixa similaridade genética em relação à variedade Monarca com valores de 95% e 89%, respectivamente. Os valores de similaridade genética entre a linhagem livre de KTI e lectina e as variedades mutantes para estes fenótipos também foram baixos (94% e 88%, respectivamente) (Tabela 2). Estes valores são justificados uma vez que BRM925297 e Columbia não são adaptadas e foram utilizadas apenas como doadoras de alelos para ausência de KTI e lectina.

A similaridade genética entre a linhagem obtida após os retrocruzamentos e o progenitor recorrente (Monarca) foi de 98%, indicando um bom índice de recuperação do genoma do recorrente na linhagem de soja com ausência de KTI e lectina (Tabela 2).

O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de anelamento dos dois *primers* de seqüência arbitrária. Diferenças em apenas um

par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação (Lopes *et al.*, 2002). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na análise da diversidade genética entre genótipos vegetais por ser rápida e apresentar um baixo custo (Thompson e Nelson, 1998; Thompson *et al.*, 1998; Baránek, 2002).

4. Resumo e Conclusões

A utilização da soja “in natura” como ingrediente na ração animal é limitada pela presença de proteínas denominadas fatores antinutricionais, como o inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e as lectinas. Embora técnicas de processamento térmico sejam utilizadas para inativar essas proteínas, a seleção de genótipos de soja expressando baixos níveis destes fatores seria vantajosa para a indústria de alimentos. Este trabalho é parte integrante do Programa de Melhoramento de Qualidade e Sabor da Soja, desenvolvido pelo BIOAGRO (PMQS/UFV). Visando a obtenção de linhagens de soja livres de KTI e lectina, utilizou-se o método de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares para a introgressão de alelos recessivos para tais características na linhagem Monarca HyPro. Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- ❖ O uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento vegetal é uma estratégia vantajosa, que permite uma eficiente e rápida seleção de genótipos, com conseqüente redução dos custos;
- ❖ Os marcadores de DNA (*primers*) foram eficazes na monitorização dos cruzamentos entre as variedades de soja, selecionando com precisão sementes com alelo(s) recessivo(s) para KTI e lectina;
- ❖ Os *primers* sintetizados para este trabalho poderão ser utilizados para auxiliar futuros programas de melhoramento da qualidade nutricional da soja, reunindo em um mesmo genótipo, além da ausência de KTI e lectina, outras características de interesse para a indústria de alimentos;

❖ A similaridade genética média entre a linhagem livre de KTI e lectina e a variedade Monarca HyPro foi de 98%, indicando que a recuperação genética das características do progenitor recorrente após o retrocruzamento foi satisfatória.

5. Referência Bibliográfica

- ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, n.2, p.265-273, 1995.
- BARÁNEK, M.; KADLEC, M.; RADDOVÁ, J.; VACHUN, M.; PIDRA, M. Evaluation of genetic diversity in 19 *Glycine max* (L.) Merr. accessions included in the Czech National Collection of Soybean Genotypes. **Czech Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.38, n.2, p.69-74, 2002.
- BARROSO, P. A. V.; GERALDI, I.O.; VIEIRA, M. L. C.; PULCINELLI, C. E.; VENKOVSKY, R.; DIAS, C. T. S. Predicting performance of soybean populations using genetic distances estimated with RAPD markers. **Genetics and molecular Biology**, v.26, n.3, p.343-348, 2003.
- BERNARD, R. L.; HYMOWITZ, T. Registration of L81-4590, L81-4871 and L83-4387 soya bean germplasm lines lacking the Kunitz trypsin inhibitor. **Crop Science**, v.26, p.650-651, 1986.
- BRESLAUER, K. J.; FRANK, R.; BLÖCKER, H.; MARKY, L. A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, v.83, p.3746-3750, 1983.
- CLARKE, E. J.; WISEMAN, J. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**, v.134, p.125-136, 2000.

COSTA, M. R. **Introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular em cultivar de feijão do tipo preto.** 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa – MG, 2004.

CRUZ, C. D. **Programa genes aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa, MG:UFV, 442p., 1997

DOMAGALSKI, J. M.; KOLLIPARA, K. P.; BATES, A. H.; BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M.; HYMOWITZ, T. Nulls for the major soybean Bowman-Birk protease inhibitor in the genus *Glycine*. **Crop Science**, v.32, p.1502-1505, 1992.

FERREIRA, A. R.; KEIM, P. Genetic mapping of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.15, p.335-354, 1997.

FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, v.39, p.1295-1301, 1999.

FRISCH, M.; MELCHINGER, A.E. Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. **Crop Science**, v.41, p.1716-1725, 2001.

GOLDBERG, R. B.; HOSCHEK, G.; VODKIN, L. O. An insertion sequence blocks the expression of a soybean lectin gene. **Cell**, v.33, p.465-475, 1983.

- HARTWIG, E. E. Registration of soya bean germplasm line D90-7256 having high seed protein and low oligosaccharides. **Crop Science**, v.36, p.212, 1996.
- JOFUKU, K. D.; GOLDBERG, R. B. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. **The Plant Cell**, v.1, p.1079-1093, 1989.
- JOFUKU, K. D.; SCHIPPER, R. D.; GOLDBERG, R. B. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. **The Plant Cell**, v.1 p.427-435. 1989.
- KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v.160 p.979-986. 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p.680-685. 1970.
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; OLIVEIRA, A. V.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.56-60, 2002.
- McDONALD, M.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed and Technology**, v. 22, p.171-176. 1994.

- MUDGE, J. CREGAN, P. P.; KENWORTHY, J. P.; KENWORTHY, W. J.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, v.37, p.1611-1615, 1997.
- NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.76, p.5269-5273, 1979.
- ORF, J. H.; HYMOWITZ, T. Inheritance of the absence of Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans. **Crop Science**, v.19, p.107-109, 1979.
- PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, C. L. J.; SOUZA, A. P. Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.3, p.355-364, 2003.
- PISULEWSKA, E.; PISULEWSKI, P. M. Trypsin inhibitor activity of legume seed (peas, chickling vetch, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.261-265. 2000.
- PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.7 p.132-138. 1996.
- PULL, S. P.; PUEPPKE, S. G.; HYMOWITZ, T.; ORF, J. H. Soybean lines lacking the 120,000 dalton seed lectin. **Science**, n.220, p.1277-1279, 1978.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2^a ed., v.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1989.

- SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionizing radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry**, v.78, p.187-205, 2002.
- SILVA, M. F. **Melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) para alto teor de proteínas**. 76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa – MG, 2004.
- THOMPSON, J. A.; NELSON, R. L. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. **Crop Science**, v.38, p.1356-1362, 1998.
- THOMPSON, J. A.; NELSON, R. L.; VODKIN, L. O. identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. **Crop Science**, v.38, p.1348-1355, 1998.
- VISSCHER, P. M.; HALEY, C. S.; THOMPSON, R. Marker-assisted introgression in backcross breeding programs. **Genetics**, v.144, p.1923-1932, 1996.
- VODKIN, L. O.; RHODES, P. R.; GOLDBERG, R. B. A lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. **Cell**, v.43, p.1023-1031. 1983.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; KIVAK, J. A.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

YOUNG, N. D. QTL mapping and quantitative diseases resistance in plants. **Annu Rev Phytopathol**, v.34, p.479-501, 1996.

YOUNG, N. D. A caustiously optimistic vision for marked-assisted breeding. **Molecular Breeding**, v.5, p.505-510, 1999.

ZENG, Z. B. Theoretical basis of precision mapping of quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.90, p.10972-10976, 1993.

CAPÍTULO II

“Avaliação da qualidade nutricional de uma linhagem de soja com elevado teor protéico, ausência do inibidor de tripsina Kunitz e lectina”

1. Introdução

A produção nacional de soja (*Glycine max* L. Merrill) destina-se, em sua maior parte, à obtenção de óleo e farelo. No Brasil, o consumo do farelo de soja está restrito às indústrias de ração para animais (Monteiro *et al.*, 2003). Para esta finalidade, a soja não pode ser utilizada sem tostagem, principalmente quando utilizada na alimentação de animais monogástricos devido à presença de fatores antinutricionais no grão, que interferem na absorção e aproveitamento de nutrientes, limitando o valor nutricional dessa leguminosa.

Entre os fatores antinutricionais encontrados na semente de soja, os principais são os inibidores de tripsina Kunitz (KTI) e as lectinas (Pusztai *et al.*, 1997; Armour *et al.*, 1998), os quais afetam o crescimento e/ou metabolismo basal de diferentes espécies animais. Experimentos com animais de laboratório têm mostrado que a combinação de lectinas e inibidores de proteases, presentes em leguminosas, promovem um efeito antinutricional mais severo do que estas proteínas isoladamente (Pneumans & Van Damme, 1996).

A fim de minimizar os efeitos deletérios causados por estes fatores os derivados de soja são normalmente submetidos a tratamento térmico durante o seu processamento. No entanto, tem-se verificado que esse tipo de tratamento,

além de não eliminar totalmente a atividade de tais fatores, pode resultar na perda de aminoácidos essenciais e na alteração das propriedades da soja (Siddhuraju *et al.*, 2002).

Os possíveis efeitos adversos do KTI e das lectinas têm sido estudados em animais de laboratório (Silva e Silva, 2000). O mecanismo de inibição do KTI foi elucidado por Liener (1995), que propôs um mecanismo de “feedback” negativo no controle da secreção pancreática de tripsina. Como o KTI se liga de forma irreversível na tripsina, quando a quantidade de tripsina livre no intestino diminui, o pâncreas aumenta a síntese e secreção desta enzima. Considerado o principal fator antinutricional em soja, o KTI está presente numa concentração média de 14g/kg de proteína total em grãos de soja (Clarke e Wiseman, 2000).

O conteúdo de lectinas em soja é considerado baixo, em torno de 2,2g a 4,0g/kg do peso seco do grão (Pusztai, 1990), correspondendo a apenas 10% a 20% do conteúdo total de lectinas presentes em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Hajós e Gelencsér, 1995). No entanto, estudos com animais alimentados com soja crua mostram uma acentuada perda de nitrogênio endógeno devido à ação dessas glicoproteínas na absorção e digestão de nutrientes (Schulze *et al.*, 1995; Pusztai *et al.*, 1997; Douglas *et al.*, 1999). As alterações fisiológicas causadas pela ação das lectinas no intestino animal são devidas à ligação destas substâncias com glicoproteínas presentes nas células da mucosa intestinal (Maenz *et al.*, 1999).

Com a finalidade de reduzir os custos com o processamento térmico, cultivares de soja contendo baixos teores de fatores antinutricionais têm sido desenvolvidos (Friedman *et al.*, 1991; Krishnan, 2001; Palácios *et al.*, 2004).

O Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV tem desenvolvido um germoplasma especialmente orientado para características especiais de qualidade da soja, visando o seu uso na indústria de alimentos (Sediyama *et al.*, 1999). O objetivo do presente estudo foi avaliar parâmetros biológicos de uma linhagem de soja com elevado teor protéico, ausência de KTI e lectina em suas sementes, desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa – MG.

2. Material e Métodos

2.1. Material Vegetal

No programa de melhoramento do BIOAGRO foram realizados cruzamentos múltiplos para incorporar os caracteres ausência de KTI e lectina em um progenitor de alto teor protéico (Monarca HyPro), derivado da variedade Monarca. Para isso, foi utilizado o método de seleção assistida por marcadores moleculares (MAS). Durante os cruzamentos, as fontes doadoras dos genes de elevado teor de proteínas foram CAC-1 HyPro e Monarca HyPro. A linhagem CAC-1 HyPro é derivada da variedade CAC-1, utilizando-se o acesso BARC-8 como doador de proteína. A linhagem Monarca HyPro foi obtida a partir da variedade Monarca, tendo a linhagem CAC-1 HyPro como fonte doadora de proteína. As fontes doadoras para ausência de KTI e lectina foram, respectivamente, a linhagem BRM925297 e o acesso Columbia.

Foram realizados cruzamentos e autofecundações em diversas etapas envolvendo os quatro genótipos (CAC-1 HyPro, Monarca HyPro, BRM925297 e Columbia), a fim de se obter linhagens contendo elevado teor protéico e ausência de KTI ou de lectina. Após a obtenção dessas linhagens com as características isoladas, estas foram intercruzadas (geração F1) e autofecundadas, obtendo-se a geração F2. Sementes F2 foram analisadas para KTI e lectina (por eletroforese em gel de poliacrilamida) com o objetivo de selecionar genótipos livres desses dois fatores. A seleção de genótipos de elevado teor protéico foi realizada pelo método semi-micro Kjeldhal (AOAC,

1984). As sementes oriundas da geração F2 foram autofecundadas obtendo-se sementes da geração F3, e posteriormente a geração F4.

2.2. Obtenção e processamento térmico dos farelos de soja

Os farelos de soja foram obtidos a partir de grãos da variedade comercial Monarca e da linhagem livre de KTI e lectina obtida na geração F4.

Após serem lavadas, as sementes selecionadas sofreram um tratamento térmico por calor seco (89°C por 5 minutos) para facilitar a retirada da casca (Gomes e Coelho, 1989). Os grãos foram quebrados em moinho de martelo para a separação das cascas secas. Após o descarte das cascas, os grãos em pedaços foram moídos em moinho de martelo, e o farelo resultante foi peneirado para garantir a uniformidade das partículas (0,85mm ou 20 mesh). Os materiais foram embalados em sacos plásticos e mantidos sob refrigeração a 4°C até o momento do uso.

Os farelos de soja originados a partir dos grãos da variedade Monarca e da linhagem livre de KTI e lectina foram processados termicamente, em estufa a 105° durante 40 minutos.

2.3. Análise eletroforética de KTI e lectina

A fim de selecionar as sementes de soja recessivas homozigotas para KTI e/ou lectina, e também confirmar os fenótipos envolvidos nos cruzamentos, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo SDS, segundo metodologia descrita por Monteiro (2000). A separação das proteínas foi baseada num sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970), envolvendo

dois géis: (a) o gel de concentração contendo 6% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,15 M (pH 6,8) e 0,1% de SDS; (b) o gel de separação contendo 14% de acrilamida-bisacrilamida em tampão Tris-HCl 0,9M (pH 8,8) e 0,1% de SDS. A corrida do gel foi realizada a 120 Volts por 4 horas em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,5) contendo glicina 0,192M e SDS 0,1%. As proteínas foram visualizadas após coloração com “Coomassie blue” 1,5% e descoloração em uma solução de ácido acético 7,5% e metanol 25%.

2.4. Caracterização físico-química dos farelos de soja

Com a finalidade de comparar a composição centesimal da linhagem com elevado teor protéico, livre de KTI e lectina, com a variedade Monarca, foi realizada a caracterização físico-química dos farelos de soja. A determinação do teor de proteína foi realizada pelo método semimicro Kjeldhal (AOAC, 1984), utilizando-se o fator 6,25 para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína.

O teor de lipídeos foi determinado conforme procedimento descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), em aparelho extrator tipo Soxhlet. Para a determinação do teor de cinzas foi utilizado o método descrito pela AOAC (1984). A concentração de carboidratos foi obtida por diferença em relação aos demais componentes.

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Para analisar o padrão eletroforético das proteínas totais da linhagem de soja com elevado teor protéico e livre de KTI e lectina, dez miligramas de sementes de soja foram maceradas com 500µl de tampão fosfato salino (PBS) 0,05M (pH 7,40) contendo NaCl 0,4M e β -mercaptoetanol 0,028%, e posteriormente centrifugadas a 13.600 g por 20 minutos à temperatura ambiente. A proteína no sobrenadante foi quantificada de acordo com o método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

Um volume de extrato referente a 100 µg de proteína foi adicionado a 60µl de tampão Tris 0,1875M (pH 6,8) contendo 30% de glicerol e 6,9% de SDS. Após incubação em banho-Maria a 100°C por 3 minutos, 25 µl dessa mistura foram aplicados no gel de poliacrilamida 12,5% (Soares, 2004). A corrida do gel e visualização das bandas foi realizada conforme descrito no item 2.3.

2.6. Determinação da atividade de tripsina

O teor do inibidor de tripsina Kunitz foi estimado pela determinação da atividade de tripsina na presença de extratos protéicos das sementes de soja, de acordo com o protocolo descrito por Erlanger *et al.* (1961). A enzima tripsina pancreática bovina (tipo III) e seu substrato D,L BApNA foram diluídos conforme instruções do fabricante (Sigma Chemical Co.).

Dez mg de sementes foram maceradas à temperatura ambiente com 500 µl de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,2) contendo CaCl₂ 20 mM e a mistura foi centrifugada a 13.600 g durante 15 min. O sobrenadante contendo o extrato protéico foi utilizado no ensaio enzimático. Para o procedimento analítico, foram pipetados 450 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, 50 µl da solução de tripsina (1,67.10⁻⁵ M) e 50 µl do sobrenadante contendo KTI. Os controles da atividade da enzima foram preparados substituindo-se o extrato por tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 min. Após esse período, 500 µl dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo contendo 500 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM e 500 µl da solução de N-benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilida (D,L-BapNA) (0,12mM). Após 2 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se 300 µl de uma solução de ácido acético a 60%.

A atividade de tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato D,L-BApNA, sob condições controladas. Durante a hidrólise, o produto p-nitroanilida liberado é determinado espectrofotometricamente a 410nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 8.800M⁻¹. cm⁻¹ (Erlanger *et al.*, 1961). Os resultados foram convertidos em mg de tripsina pura inibida por g de proteína, por meio da equação (Kakade *et al.*, 1974):

$$\text{mg de tripsina inibida / g de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1000 \times P}$$

Em que:

A = absorvância do controle enzimático (410nm) – absorvância da solução contendo o extrato protéico (410nm);

B = fator de correção da amostra;

C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de um μg de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BApNA dá uma leitura de absorvância de 0,019 em 410nm, nas condições do ensaio (Kakade *et al.*, 1974);

P = concentração de proteína em g/g da amostra, determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA).

2.7. Western blot

Para analisar a presença ou ausência de lectina, foi realizado um Western blot utilizando anticorpos específicos para lectinas presentes em sementes de soja. A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente, no item 2.3. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Life Technologies, EUA) a 40mV, durante 1 hora, sob refrigeração a 4°C, utilizando o aparelho Trans-blot (BIORAD). Após a transferência, o gel de proteína foi corado com solução de “Coomassie blue” para a confirmação de que todas as bandas haviam sido transferidas para a membrana.

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com caseína 5% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Após três lavagens com TBS-T

(Tris 0,1M, NaCl 0,015M e Tween 20 0,1%), a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-lectina de semente de soja (anti-SBA) (Vector Laboratories, EUA), na diluição de 1:1000 durante três horas e sob agitação constante. Após lavagem da membrana com TBS-T, foi realizada a incubação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Vector Laboratories, EUA), na diluição de 1:1000 durante 2 horas e sob agitação constante. As diluições dos anticorpos utilizados neste experimento foram feitas de acordo com as instruções do fabricante (Vector Laboratories, EUA).

A membrana foi revelada após incubação com 10ml de uma solução de NBT e BCIP (Life Technologies, EUA) em tampão Tris-HCl 0,1M (pH 9,80) contendo NaCl 0,1M e MgCl₂ 0,05M, segundo instruções do fabricante.

2.8. Avaliação biológica e delineamento estatístico

Os ensaios biológicos foram conduzidos nos laboratórios do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa. A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaios biológicos, durante 14 dias, utilizando-se 60 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus* var. Albinus, Rodentia), recém desmamados, com 23 dias de idade.

A composição das dietas foi baseada na dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993), porém com teor de proteína de 9 a 10%, exceto para a dieta aprotéica

(Tabela 1). Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta, pelo método semimicro Kjeldhal, com amostras em triplicata (AOAC, 1984).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e dez repetições, considerando cada animal como uma repetição. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais, onde receberam água e alimento “ad libitum” durante o período experimental. Os tratamentos foram: T1= aprotéico; T2= caseína (grupo controle); T3= linhagem livre de KTI e lectina; T4= variedade Monarca; T5= linhagem livre de KTI e lectina processada termicamente e T6= variedade Monarca processada termicamente.

Os índices avaliados foram digestibilidade verdadeira, PER (coeficiente de eficiência protéica), NPR (razão protéica líquida) e NPU (utilização protéica líquida).

Para a determinação da digestibilidade foram colhidas as fezes, em sua totalidade, do 5º ao 10º dia do experimento. As dietas foram marcadas com carmim (200mg/100g de dieta) e oferecidas aos animais no 4º e no 9º dias. Após o período de coleta, as fezes foram pesadas e moídas para a determinação do teor de nitrogênio. Para este fim, foi utilizado o método semimicro Kjeldhal das amostras em triplicata, segundo AOAC (1984). O cálculo foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

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

Ingredientes	Dietas					
	Aprotéica	Caseína	T3	T4	T5	T6
Caseína	---	12,19	---	---	---	---
Farelo de soja	---	---	23,75	33,86	25,50	34,20
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Fibra	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Amido de milho	59,75	47,56	36,0	25,89	34,25	25,55
% de proteína	Nd	9,54	9,50	9,87	9,64	9,80

Fonte: Reeves *et al.* (1993)

T3 = dieta de soja crua livre de KTI e lectina

T4 = dieta de soja crua contendo KTI e lectina

T5 = dieta de soja processada termicamente livre de KTI e lectina

T6 = dieta de soja processada termicamente contendo KTI e lectina

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

Em que:

D = digestibilidade;

I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste;

F_k = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

O NPR foi determinado tomando-se o ganho de peso do grupo teste mais a perda de peso do grupo de dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo teste, seguindo o método de Bender e Doell (1957). Para isso, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo teste} + \text{perda de peso (g) do grupo aprotéico}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo teste}}$$

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

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

Com relação ao NPU, a determinação foi feita pelo método da carcaça, segundo Miller e Bender (1955). Após serem sacrificados, as carcaças dos animais foram secas (24 horas em estufa a 105°C), trituradas e desengorduradas em extrator Soxhlet com éter de petróleo, durante 4 a 5 horas. O teor de nitrogênio retido nas carcaças foi determinado pelo método semimicro Kjeldhal das amostras em triplicata (AOAC, 1984). No cálculo do NPU foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{NPU} = \frac{B - B_k}{I} \times 100$$

Em que:

B = nitrogênio corporal dos animais em dieta teste;

B_k = nitrogênio corporal dos animais em dieta aprotéica;

I = nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

Para as análises estatísticas dos resultados utilizou-se o programa GENES (Cruz, 2001). Foram realizadas análises de variâncias e teste de Tukey para verificar diferenças significativas entre as médias dos resultados.

2.9. Análise histológica do intestino dos animais experimentais

Após o sacrifício dos animais experimentais, o intestino de cada animal foi coletado para análise. O intestino foi lavado com PBS gelado para a remoção de partículas fecais, fixado em solução de formalina tamponada a 10% e incluso em parafina. Após a inclusão, o material foi seccionado em um micrótomo "Olympus

Cut 4055”, obtendo-se cortes de aproximadamente quatro micrômetros de espessura para a montagem das lâminas, as quais foram coradas com hematoxilina/eosina, de acordo com metodologia padrão (Luna, 1968).

As análises histológicas dos cortes foram realizadas em um microscópio óptico da marca Olympus BX50 e analisador de imagem “Image – Pro Plus 1.3.2.”. Para a análise qualitativa da integridade da mucosa intestinal dos ratos, foram observados dez campos por lâmina, tomados aleatoriamente, com a única restrição de que houvesse, no mínimo, dez microvilosidades no campo escolhido.

3. Resultados e Discussão

Antes da realização do ensaio biológico, foram realizadas análises bioquímicas nas sementes da linhagem livre de KTI e lectina contendo alto teor de proteína. Os resultados dessas análises foram comparados àqueles obtidos com a variedade Monarca. Assim, garantiu-se que a diferença entre os genótipos de soja utilizados na avaliação biológica era devido à presença ou ausência de KTI e lectina nas sementes.

3.1. Análise da presença de KTI e/ou lectina em soja

Utilizando a seleção assistida por marcadores moleculares, o Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV desenvolveu uma linhagem de soja com elevado teor protéico e livre de KTI e lectina, visando o seu uso na indústria de alimentos. Para isso, foram incorporados linhagens para ausência de KTI (BRM925297) e lectina (Columbia) no germoplasma da Universidade Federal de Viçosa. Pode ser observado na Figura 1 que houve confirmação dos fenótipos para presença de KTI e/ou lectina nas sementes de soja utilizadas nos cruzamentos, assim como na linhagem final.

3.2. Composição química centesimal

Com a finalidade de comparar a composição centesimal da linhagem com elevado teor protéico, livre de KTI e lectina, com a linhagem Monarca HyPro, e

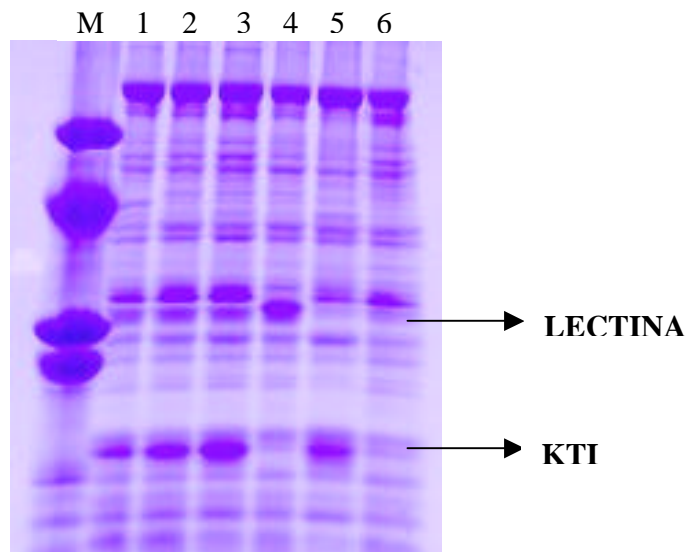


Figura 1. Análise de lectina e KTI por SDS-PAGE de extratos protéicos obtidos das variedades de soja utilizadas no programa de cruzamentos, visando obter uma linhagem livre de KTI e lectina. M: marcador de massa molecular (66KDa, 45KDa, 29KDa e 24KDa); 1-3: Variedades de soja doadoras de elevado teor protéico (BARC-8; CAC-1 HyPro e Monarca HyPro, respectivamente); 4: BRM925297 (linhagem doadora da ausência de KTI em sementes de soja); 5: Columbia (acesso doador da ausência de lectina em sementes de soja); 6: Linhagem livre de KTI e lectina.

assim confirmar a recuperação genética da linhagem obtida após os cruzamentos, foi realizada a análise físico química das sementes de soja.

A composição química da soja pode variar com as condições climáticas, tipos de solo, localização geográfica, práticas agrônômicas, entre outros fatores (Vieira *et al.*, 1999). Os dados referentes à composição centesimal da linhagem de soja Monarca HyPro (presença de KTI e lectina) e da linhagem livre de KTI e lectina encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química centesimal da linhagem de soja Monarca HyPro e da linhagem livre de KTI e lectina (g / 100g em base seca).

Amostras	Lipídeos	Cinzas	Proteínas	Carboidratos
Monarca	14,43	4,48	38,48	33,00
KTI ⁻ Lectina ⁻	13,18	5,77	41,96	39,09

Os resultados obtidos em relação à composição centesimal da soja estão de acordo com os padrões observados na literatura (USDA, 2004; Vieira *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2003). Considerando a soja cultivada no Brasil, a quantidade de proteína varia de 29,2% a 57,9% e a de lipídeos pode variar de 14,7% a 28,4%, de acordo com a variedade (Yamada *et al.*, 2003).

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais de soja

As proteínas de reserva da soja são compostas de frações 11S (glicinina) e 7S (α -conglucina), correspondendo por, aproximadamente, 40% e 30% do conteúdo total de proteínas nas sementes, respectivamente. O termo proteína de reserva é dado às proteínas que estão localizadas no cotilédone, em partículas denominadas “corpos protéicos”, os quais são preenchidos com proteínas sem nenhuma função catalítica (Duranti e Gius, 1997; Mujoo *et al.*, 2003). O padrão eletroforético das proteínas totais (SDS-PAGE) dos genótipos de soja envolvidos nos cruzamentos e da linhagem livre de KTI e lectina é mostrado na Figura 2.

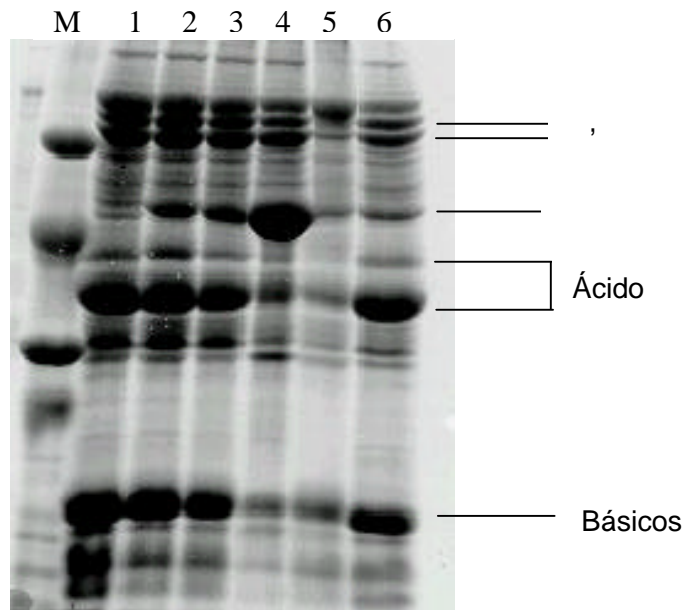


Figura 2. SDS-PAGE para análise do padrão eletroforético das proteínas presentes nas variedades de soja BARC-8 (1), CAC-1 HyPro(2), Monarca HyPro (3), BRM925297 (4), Columbia (5) e na linhagem livre de KTI e lectina (6). As variedades BARC-8; CAC-1 e Monarca possuem elevado teor protéico e presença de KTI e lectina. As variedades BRM925297 e Columbia são nulas para KTI e lectina, respectivamente. As principais subunidades da α -conglucina são α_1 , α_2 e α_3 , enquanto os principais polipeptídeos da glicinina são os polipeptídeos ácidos (A_3 e $A_{1,2,4}$) e os básicos. M: marcador de peso molecular (66KDa, 45KDa, 29KDa e 24KDa). Em cada canaleta foram aplicados 100 μ g de proteína.

O padrão eletroforético das proteínas totais de soja foi semelhante entre todas as amostras analisadas. No entanto, nota-se uma menor intensidade das bandas correspondentes às subunidades ácidas $A_{1,2,4}$ e básicas da fração 11S (glicinina) nas variedades BRM925297 e Columbia (Figura 2). Esta diferença pode

estar relacionada com a menor concentração de proteína apresentada por estas variedades em relação às demais, sendo em média 30,45% e 29,67% para BRM925297 e Columbia, respectivamente. Segundo Yaklich (2001), as proteínas glicinina e β -conglucina encontram-se em maior concentração nas sementes de soja de elevado teor protéico. No entanto, estudos têm mostrado que as concentrações de 11S e 7S podem variar de acordo com a variedade de soja e com o ambiente (Cai e Chang, 1999; Mujoo *et al.*, 2003).

3.4. Determinação do inibidor de tripsina Kunitz (KTI) em sementes de soja

Para analisar a presença de KTI em sementes de soja, foram estimados os teores de inibição trípica nos farelos derivados da linhagem Monarca e da linhagem livre de KTI e lectina, com e sem processamento térmico. Nessas análises utilizou-se o método de inibição da atividade de tripsina na presença do seu substrato, de acordo com metodologia descrita por Erlanger *et al.* (1961).

Os conteúdos estimados de inibição de tripsina, expressos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, estão na Tabela 3.

Os valores para inibidores de protease no presente trabalho estão próximos aos valores encontrados por Carvalho *et al.* (1999), que analisaram a presença de KTI em 13 cultivares de soja, obtendo valores que variaram de 31 a 679 mg de tripsina inibida por grama de proteína.

Os valores de inibição de tripsina dos extratos protéicos da linhagem Monarca HyPro, crua e tratada termicamente, foram 391,83 e 132,63 mg de tripsina inibida/g de proteína, respectivamente, diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 3. Inibição da tripsina por extratos protéicos obtidos das sementes da linhagem livre de KTI e lectina e da linhagem Monarca HyPro.

Amostras	mg de tripsina inibida por g de proteína²
Monarca crua	391,83 a
KTI ⁻ Lectina ⁻ crua	137,32 b
Monarca processada ¹	132,63 b
KTI ⁻ Lectina ⁻ processada ¹	134,53 b

¹ O processamento foi realizado em estufa (calor seco) a 105° durante 40 minutos.

² O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método BCA (Smith *et al.*, 1985).

³ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Já os valores de inibição de tripsina entre extratos protéicos da linhagem Monarca Hypro processada e da linhagem livre de KTI, crua e processada termicamente, não diferiram entre si (Tabela 3). Juntos, estes resultados indicam que o tratamento térmico aplicado às sementes de soja (105°C por 40 minutos em calor seco), mostrou-se eficaz na inativação de KTI.

A estabilidade térmica do KTI tem sido bastante discutida em diversos estudos (Palácios *et al.*, 2002; Roychaudhuri *et al.*, 2003; Wiriyaumpaiwong *et al.*, 2004). O tratamento térmico aplicado à soja, além de reduzir a atividade de inibição de tripsina, também reduz sua solubilidade protéica, considerada um importante parâmetro que caracteriza a qualidade nutricional da soja (Wiriyaumpaiwong *et al.*, 2004). Considerando os principais inibidores de proteases em soja, KTI e BBI (inibidor de tripsina e quimiotripsina Bowman-Birk), o segundo apresenta uma maior estabilidade térmica em relação ao primeiro (Martinez e Rincón, 1996).

Considerando a soja “in natura”, as sementes livres de KTI e lectina apresentaram uma inibição trípica significativamente menor quando comparada às sementes da soja convencional. No entanto, é possível observar uma inibição de tripsina tanto na linhagem onde o KTI foi eliminado geneticamente, quanto na variedade de soja convencional submetida a tratamento térmico. Essa inibição trípica residual pode ocorrer devido à presença do inibidor de protease Bowman-Birk (BBI) (Monteiro *et al.*, 2003).

A inibição trípica estimada na variedade Monarca crua foi de 391,83 mg de tripsina inibida por grama de proteína (Tabela 3). Esse valor está acima daquele encontrado por Kumar *et al.* (2003) para extratos protéicos de soja crua contendo KTI, que variou de 42-113 mg de tripsina inibida por grama de amostra. Porém, fica difícil a comparação entre esses dados por se tratarem de metodologias distintas para a extração de proteínas de soja. Segundo Barbosa (1997), a metodologia usada para extração de proteínas em grãos de soja pode influenciar os valores de inibição de tripsina expressos em mg de tripsina inibida por grama de proteína.

3.5. Western blot para a determinação de lectina em sementes de soja

Para a detecção de lectina em sementes de soja, a metodologia comumente utilizada baseia-se em testes de atividade hemaglutinante (Nachbar e Oppenheim, 1980), pela habilidade dessas glicoproteínas em aglutinar eritrócitos. No entanto, esses testes são semi-quantitativos e sujeitos à interferência por outros compostos capazes de aglutinar eritrócitos, como a “soyatoxin”, descrita por

Vasconcelos *et al.* (1994). Recentemente, novas metodologias para a análise de lectinas em soja têm sido descritas (Maenz *et al.*, 1999; Rizzi *et al.*, 2003).

Visando confirmar a ausência de lectina nas sementes da linhagem livre de KTI e lectina, foi realizada a técnica de Western blot (Figura 4). Para isso, foram utilizados anticorpos específicos contra lectinas presentes em sementes de soja (anti-SBA). A ausência de lectina na linhagem de soja livre de KTI e lectina foi confirmada conforme mostrado na Figura 4.

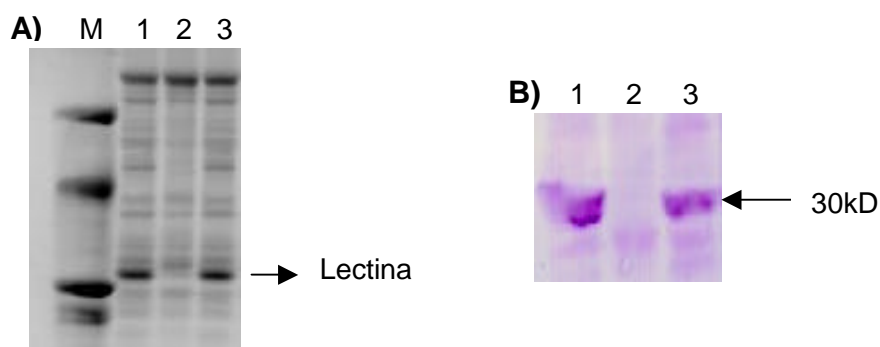


Figura 4. Confirmação da ausência de lectina nas sementes da linhagem livre de KTI e lectina. A) Análise de lectina por SDS-PAGE em sementes de soja. B) Western blot de proteínas de sementes de soja utilizando anticorpos específicos para lectina (anti-SBA). As mesmas amostras (1, 2 e 3) foram analisadas para presença ou ausência de lectina utilizando SDS-PAGE e Western blot. M: marcador de peso molecular (66KDa, 45KDa, 29KDa e 24KDa); 1 e 3: Monarca HyPro (linhagem de soja comercial com presença de lectinas nas sementes), 2: Linhagem livre de KTI e lectina.

3.6. Determinação da qualidade protéica dos farelos de soja

3.6.1. PER, NPR e NPU

A qualidade protéica dos farelos de soja foi determinada em ensaios biológicos com ratos, pela análise dos índices PER, NPR, NPU e digestibilidade.

Observa-se na Tabela 4 os valores encontrados para PER e NPR relativos à caseína. O índice de eficiência protéica (PER) estima o quanto da proteína ingerida pelo animal é usado para promover seu crescimento, enquanto que a razão protéica líquida (NPR) mede o quanto da proteína ingerida é responsável pela manutenção e crescimento do animal.

Tabela 4. Valores de PER e NPR das dietas de caseína e dos farelos de soja determinados em experimentos com ratos.

Dietas	PER ¹	RPER (%) ²	NPR ¹	RNPR ³
Caseína	2,62 a	100	3,01 a	100
T1	0,86 c	33	1,42 c	47
T2	0,33 d	13	1,07 d	36
T3	0,23 d	9	0,92 d	31
T4	1,46 b	56	1,96 b	65

¹ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p,0,05).

² RPER = PER relativo

³ RNPR = NPR relativo

T1 = dieta de soja crua livre de KTI e lectina

T2 = dieta de soja crua contendo KTI e lectina

T3 = dieta de soja processada termicamente livre de KTI e lectina

T4 = dieta de soja processada termicamente contendo KTI e lectina

De acordo com os valores encontrados na Tabela 4, nota-se que os valores de PER relativo foram inferiores aos valores de NPR relativo, o que indica que a proteína dos farelos de soja presta-se melhor para a manutenção do peso dos ratos do que para promover o crescimento dos mesmos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, observa-se que houve diferença significativa entre os valores de PER e NPR da dieta à base de caseína em relação às demais dietas. Esses valores indicam que a qualidade da proteína presente na soja é inferior à caseína para promover o crescimento e a manutenção do animal, e estão de acordo com resultados obtidos por Monteiro (2000). Em seu trabalho, a autora avaliou a digestibilidade e qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases.

Os valores de PER para animais alimentados com dietas à base de soja crua, com presença ou ausência de KTI e lectina, mostraram-se significativamente diferentes entre si (Tabela 4), indicando uma melhora nutricional da soja livre de KTI e lectina em relação à variedade convencional. Ao avaliar a qualidade nutricional de variedades de soja utilizando o índice de eficiência protéica (PER), Friedman *et al.* (1991) notaram uma melhora nutricional em variedades de soja livre de KTI, quando comparadas às variedades comerciais.

Apesar da ausência dos principais fatores antinutricionais, a soja crua livre de KTI e lectina apresentou menores valores de PER e NPR quando comparada à soja convencional tratada termicamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Palácios *et al.* (2002) em um experimento com leitões. Ao avaliar

a qualidade nutricional de variedades de soja, os autores observaram que leitões alimentados com variedade de soja livre de KTI e lectina crua ainda apresentavam uma depressão de 45% no seu crescimento. Segundo os autores, este fato deve-se à presença de outros fatores termolábeis, distintos de KTI e lectina, presentes na soja. Além dos inibidores de proteases e lectinas, considerados os principais fatores antinutricionais em soja, não se deve descartar a presença de outros compostos, como fitatos e taninos (Olguin *et al.*, 2003).

Os valores de PER e NPR entre os tratamentos com a variedade Monarca crua e a linhagem livre de KTI e lectina processada termicamente não diferiram entre si. Este resultado não era esperado, uma vez que tais genótipos contrastam para presença de KTI e lectina, considerados os principais fatores antinutricionais na soja.

No entanto, a Tabela 5 mostra que os animais pertencentes a estes tratamentos respondem pelo menor consumo alimentar e menor taxa de ganho de peso entre todos os tratamentos do ensaio biológico, não diferindo entre si. Assim, o baixo consumo alimentar destes animais pode ser o responsável pelos resultados obtidos, já que, tanto para o cálculo do PER quanto do NPR, são considerados o ganho de peso e o consumo alimentar dos animais do grupo teste.

Na Tabela 6 encontram-se os valores de NPU para as dietas a base de caseína e de farelos de soja, determinados em experimentos com ratos.

Tabela 5. Consumo alimentar e ganho de peso dos animais alimentados com as dietas controle e a base de soja.

Dietas	Ganho peso (g)¹	Consumo alimentar (g)²
Caseína	62,3 a ³	256,3 a
T1	14,4 c	174,5 b
T2	4,6 d	128,7 c
T3	3,6 d	144,3 c
T4	27,8 b	191,1 b

¹ Ganho de peso médio (g) dos animais durante os 14 dias do experimento

² Consumo médio (g) das dietas fornecidas aos animais durante os 14 dias do experimento.

³ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6. Valores de NPU das dietas de caseína e dos farelos de soja determinados em experimentos com ratos.

Dietas	NPU¹	RNPU (%)²
Caseína	46,40 a	100
T1	22,81 c	49
T2	17,90 c	39
T3	18,07 c	39
T4	38,14 b	82

¹ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p,0,05$).

² RNPU = NPU relativo

T1 = dieta de soja crua livre de KTI e lectina

T2 = dieta de soja crua contendo KTI e lectina

T3 = dieta de soja processada termicamente livre de KTI e lectina

T4 = dieta de soja processada termicamente contendo KTI e lectina

Como pode ser observado na Tabela 6, houve uma diferença significativa entre os valores de NPU da dieta de caseína com as demais dietas. Esse resultado indica que a qualidade da proteína dos farelos de soja é inferior à caseína para promover síntese protéica, pois o NPU mede o quanto da proteína ingerida fica retido no organismo do animal.

Os valores de NPU para as dietas contendo os farelos de soja variaram de 17,9 a 38,14 (Tabela 6). Esses valores são inferiores àqueles encontrados por Vasconcelos *et al.* (2001) para dietas a base de grãos de soja com baixos teores de KTI e lectina, suplementadas com L-triptofano e L-metionina, cujos valores variaram de 31,4 a 69,5.

O valor de NPU relativo para a dieta a base de soja convencional tratada termicamente foi de 82%, diferindo estatisticamente das demais dietas. Resultados semelhantes foram encontrados por Grant *et al.* (1986) ao avaliarem a qualidade nutricional de variedades de soja. Os autores encontraram um NPU de 83% para dietas contendo soja processada a 100°C durante 20 minutos, em calor úmido.

3.6.2. Digestibilidade “in vivo”

Os valores da digestibilidade “in vivo” para as dietas a base de caseína e farelos de soja estão expressos na Tabela 7.

A medida da digestibilidade indica o quanto das proteínas ingeridas é hidrolisado por enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo, constituindo o

primeiro fator que afeta a eficiência da utilização protéica da dieta (Friedman, 1996).

Os valores da digestibilidade verdadeira para as dietas a base de soja variaram de 45,10 a 95,60 (Tabela 7). Estes valores estão próximos àqueles encontrados por Vasconcelos *et al.* (2001) para farinhas de soja convencional e com baixos teores de KTI e lectina, variando entre 50,90 e 78,30. A digestibilidade relativa da dieta contendo soja convencional crua foi de 45%, mostrando-se inferior ao valor encontrado por Monteiro *et al.* (2003), que foi de 88,16%.

Tabela 7. Valores de digestibilidade das dietas de caseína e dos farelos de soja determinados em experimentos com ratos.

Dietas	Digestibilidade¹	R Digestibilidade (%)²
Caseína	99,80 a	100
T1	68,10 b	68
T2	45,10 c	45
T3	95,60 a	96
T4	73,50 b	74

¹ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p,0,05).

² R Digestibilidade = Digestibilidade relativa

T1 = dieta de soja crua livre de KTI e lectina

T2 = dieta de soja crua contendo KTI e lectina

T3 = dieta de soja processada termicamente livre de KTI e lectina

T4 = dieta de soja processada termicamente contendo KTI e lectina

A Tabela 7 mostra que a digestibilidade da dieta de caseína (99,80) não foi estatisticamente diferente da dieta livre de KTI e lectina processada termicamente

(95,60). Observa-se também que os valores de digestibilidade das dietas contendo soja livre de KTI e lectina crua (68,10) ou soja convencional tratada termicamente (73,50) não diferiram estatisticamente entre si. Esses resultados mostram que a eliminação genética de KTI e lectina dos grãos de soja promoveu uma melhora significativa na digestibilidade protéica. O inibidor de tripsina Kunitz, o qual representa cerca de 80% dos inibidores de tripsina presente nos grãos de soja (Tan-Wilson, 1988), é considerado o mais severo fator antinutricional desta leguminosa, seguido pelas lectinas (Vasconcelos *et al.*, 2001; Rizzi *et al.*, 2003).

A diferença significativa entre a digestibilidade das dietas livres de KTI e lectina, crua e processada termicamente, pode ser justificada pela presença de fatores antinutricionais termolábeis, distintos de KTI e lectina, os quais possivelmente interferiram no processo de digestão das proteínas da dieta (Vasconcelos *et al.*, 2001; Olguin *et al.*, 2003). Palácios *et al.* (2004) compararam o desenvolvimento de aves e suínos alimentados com dietas à base de soja convencional e livre de KTI e lectina. A eliminação genética de KTI e lectina proporcionou uma melhora significativa no desenvolvimento desses animais. No entanto, segundo os autores, apesar da ausência dos principais fatores antinutricionais, a soja livre de KTI e lectina somente deve ser fornecida aos animais após submeter-se a um tratamento térmico.

3.7. Análise Histológica

Estudos laboratoriais têm relatado a ocorrência de danos na mucosa intestinal de animais alimentados com soja “in natura”, os quais são atribuídos a

compostos tóxicos, como as lectinas (Sharma *et al.*, 1995; Olguin *et al.*, 1999). Ao contrário das lectinas, os inibidores de tripsina não interagem com as células das microvilosidades em “bordadura em escova” (Pusztai *et al.*, 1997). O efeito antinutricional exercido pelos inibidores de tripsina deve-se à sua interferência com a função da tripsina, diminuindo a digestão de proteínas e, em casos mais severos, resultando em hipertrofia pancreática (Vasconcelos *et al.*, 2001).

A integridade do epitélio intestinal de ratos alimentados com dietas contendo soja convencional ou soja livre de KTI e lectina pode ser observada na Figura 5. Os animais alimentados com soja convencional crua apresentaram um maior nível de alterações na morfologia das microvilosidades intestinais, quando comparados àqueles alimentados com a soja livre de KTI e lectina crua.

Não foram observadas diferenças histomorfológicas qualitativas entre os grupos que receberam as dietas contendo soja processada termicamente, contendo ou não KTI e lectina. Olguin *et al.* (2003) realizaram uma análise histomorfológica quantitativa do intestino de ratos alimentados com caseína e com farinha de soja processada termicamente (calor úmido a 98°C durante 30 minutos). Segundo os autores, os resultados da análise, incluindo medidas do comprimento das vilosidades e profundidade da cripta, não foram diferentes entre os grupos estudados. No entanto, não é possível a comparação entre os resultados, uma vez que a análise realizada neste trabalho foi qualitativa.

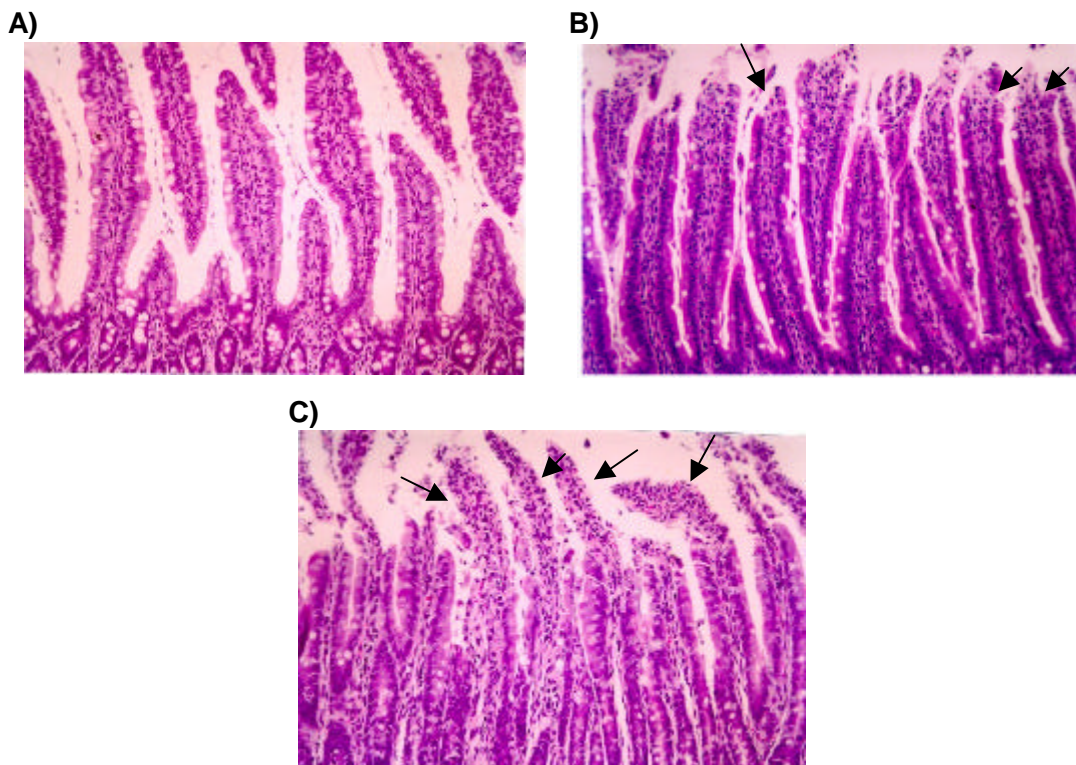


Figura 5. Análise histológica qualitativa de cortes do intestino de ratos alimentados durante 14 dias com dietas à base de soja. A) Intestino delgado de ratos alimentados com a linhagem livre de KTI e lectina. B e C) Intestino delgado de ratos alimentados com a linhagem Monarca HyPro (presença de KTI e lectina), apresentando lesões apicais (B) e também lesões que comprometem todo o epitélio da mucosa intestinal (C). As setas indicam alterações na integridade do epitélio nas microvilosidades intestinais. (aumento de 400x).

Após a análise histológica pela microscopia óptica, observou-se que os animais do grupo controle (alimentados com caseína) apresentaram vilosidades bem constituídas, sem lise celular aparente. As lesões na mucosa intestinal dos animais alimentados com soja convencional crua variaram entre lesões mais leves, na região apical das microvilosidades em “bordadura em escova” (Figura

5B), até níveis mais severos, comprometendo toda a camada de células epiteliais nessa região (Figura 5C).

As alterações da função fisiológica do intestino, causadas por lectinas, são produtos da sua estabilidade aos processos digestivos e também da sua especificidade pelas células da mucosa intestinal (Silva e Silva, 2000). Puztai *et al.* (1990) demonstraram que aproximadamente 60% das lectinas da dieta resistem à proteólise, ligando-se às células do epitélio intestinal. Para Nevel *et al.* (1998), o reconhecimento e a ligação das lectinas a glicoproteínas presentes nas células epiteliais confere a estas proteínas efeitos negativos quanto à interferência nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes.

4. Resumo e Conclusões

Os fatores antinutricionais presentes em soja, como o KTI e a lectina, podem provocar efeitos fisiológicos adversos em seus consumidores, além de diminuir a biodisponibilidade de nutrientes no organismo. O desenvolvimento de sementes que não expressem KTI e lectina tem sido sugerido como uma estratégia para proporcionar uma melhora na qualidade nutricional da soja. Este trabalho avaliou o efeito nutricional da eliminação genética de KTI e lectina das sementes de uma linhagem de soja, desenvolvida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Bioagro/UFV, visando o seu uso na indústria de alimentos. Para isso, foi realizado um ensaio biológico com ratos Wistar para análise do coeficiente de eficiência protéica, da razão protéica líquida, da utilização protéica líquida e da digestibilidade verdadeira. A caracterização bioquímica das sementes de soja livres de KTI e lectina também foi realizada. Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

❖ A linhagem de soja livre de KTI e lectina apresentou uma composição centesimal típica de soja comercial, com um conteúdo médio, na base seca, de 41,96% de proteína, 13,18% de lipídeos, 5,77% de cinzas e 39,09% de carboidratos.

❖ A eliminação genética de KTI promoveu uma diminuição significativa nos valores de inibição de tripsina dos extratos protéicos derivados da linhagem livre de KTI e lectina, comparado aos valores obtidos com a soja convencional.

❖ A temperatura de 105°C em calor seco (estufa) durante 40 minutos foi suficiente para promover a inativação do inibidor de tripsina Kunitz e da lectina nas sementes de soja convencional.

❖ Com relação à avaliação da qualidade protéica dos farelos de soja, os índices PER, NPR e NPU apresentaram valores inferiores àqueles obtidos com a proteína-padrão caseína. Estes resultados eram esperados, considerando que a proteína de soja é deficiente em alguns aminoácidos essenciais, o que limita a sua utilização na síntese protéica.

❖ A eliminação genética do KTI e lectina promoveu uma melhora acentuada na digestibilidade da proteína de soja, confirmando que estes são os principais fatores antinutricionais presentes nesta leguminosa. Os valores de digestibilidade dos farelos de soja tratada termicamente livre de KTI e lectina não diferiram estatisticamente aos da caseína, considerada uma proteína padrão.

5. Referências Bibliográficas

- ARMOUR, J. C.; PERERA, R. L. C.; BUCHAN, W. C.; GRANT, G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 78 p. 225-231. 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 14 ed. Washington, D.C: 1141p. 1984.
- BARBOSA, M. C. A. **Determinação de inibidores de proteases em soja e em seus derivados protéicos**. Viçosa, MG: UFV, 61p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v.11, p.138-143, 1957.
- CAI, T.; CHANG, K. C. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.720-727, 1999.
- CARVALHO, W. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genotypic classes for trypsin inhibitor in soybean seeds. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.12, p.859-863, 1998.
- CARVALHO, W. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Lipoxygenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p.497-501, 1999.

- CLARKE, E. J.; WISEMAN, J. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**, v.134, p.125-136, 2000.
- CRUZ, C. D. **GENES** – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p., 2001.
- DOUGLAS, M. W.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. **Poultry Science**, v.78 p.91-95. 1999.
- DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v.53, p.31-45. 1997.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 95, p. 271-278. 1961.
- FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; HYMOWITZ, T. Comparison of a commercial soybean cultivar and an isolate lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effect of heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.327-335, 1991.
- FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.6-29, 1996.
- GOMES, J. C.; COELHO, D. T. **Leite de soja na alimentação humana**. Viçosa, MG: UFV, 25p., 1989.
- GRANT, G.; MCKENZIE, N. H.; WATT, W. B.; STEWART, J. C.; DORWARD, P. M.; PUTSZTAI, A. Nutritional evaluation of soya beans (*Glycine max*): nitrogen balance and fractionation studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.37, p.1001-1010, 1986.

- HAJÓS, G.; GELENCSÉR, E. Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.165-170, 1995.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed., São Paulo, v.1, 533p. 1985.
- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of a trypsin inhibitor activity of soy products : a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, n. 51, p. 376-382. 1974.
- KUMAR, V.; RANI, A.; TINDWANI, C.; JAIN, M. Lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activities in soybean as influenced by growing location. **Food Chemistry**, v.83, p.79-83, 2003.
- KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v.160 p.979-986. 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p.680-685. 1970.
- LIENER, I. E. Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. **Journal of Nutrition**, v. 125, p.744-750. 1995.
- LUNA, L. G. **Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3 ed., New York: McGraw-Will, 258p., 1968.

- MAENZ, D. D.; IRISH, G. G.; CLASSEN, H. L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, p.335-343, 1999.
- MARTINÉZ, B.; RINCÓN, F. Inhibidores de tripsina. I: Características y significado em la alimentación humana. **Alimentaria**, p.27-31, 1997.
- MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **British Journal of Nutrition**, v.9, p.382-388, 1955.
- MONTEIRO, M. R. P. **Avaliação da digestibilidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases**. Viçosa, MG: UFV, 69p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- MONTEIRO, M. R. P.; MOREIRA, M. A.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V. Avaliação da digestibilidade protéica de genótipos de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.99-107, 2003.
- MUJOO, R.; TRINH, D. T.; PERRY, K. W. N. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v.82, p.265-273, 2003.
- NACHBAR, M. S.; OPPENHEIM, J. D. Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.33, n.11, p.2338-2345, 1980.
- NEVEL, V. C.; RYCKE, H.; BEECKMANS, S.; WILDE, R.; DRIESSCHE, E. V. Inhibitory action of spray dried blood plasma and whole egg powder on lectins

in extracts of several legume seeds: a quantitative approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.77, n.3, p.319-326, 1998.

OLGUIN, M. C.; HISANO, N.; D'OTTAVIO, A. E.; ZINGALE, M. I.; REVELANT, G. C.; CALDERARI, S. A. Nutritional and antinutritional aspects of an Argentinian soy flour assessed on weanling rats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.441-449, 2003.

PALACIOS, M.; EASTER, R. A.; HYMOWITZ, T.; SOLTWEDEL, K. T.; PETTIGREW, J. E. **Effects of soybean variety and processing on growth performance of young pigs**. Illini PorkNet – the online resource for the pork industry. Department of Animal Sciences, Crop Sciences. University of Illinois at Urbana – Champaign. 2002. Disponível em: <http://www.traill.uiuc.edu/porknet/>. Acesso em 05/01/2005.

PALACIOS, M. F.; EASTER, R. A.; SOLTWEDEL, K. T.; PARSONS, C. M.; DOUGLAS, M. W.; HYMOWITZ, T.; PETTIGREW, J. E. Effect of soybean variety and processing on growth performance of young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, v.82, n.4, p.1108-1114, 2004.

PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.7 p.132-138. 1996.

PUSZTAI, A.; EWEN, S. W. B.; GRANT, G.; PNEUMANS, W. J.; van DAMME, E. J. M.; RUBIO, L.; BARDOCZ, S. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. **Digestion**, v.46, p.308-315, 1990.

- PUSZTAI, A.; GRANT, G.; BARDOCZ, S.; GELENCSE, E.; HAJOS, G. Y. Novel dietary strategy for overcoming the antinutritional effects of soya bean whey of high agglutinin content. **British Journal of Nutrition**, v.77, p.933-945, 1997.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951. 1993.
- RIZZI, C.; GALEOTO, L.; ZOCCATELLI, G.; VINCENZI, S.; CHIGNOLA, R.; PERUFFO, A. D. B. Active soybean lectin in foods: quantitative determination by ELISA using immobilised asialofetuin. **Food Research International**, v.36, p.815-821, 2003.
- ROYCHAUDHURI, R.; SARATH, G.; ZEECE, M.; MARKWELL, J. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.412, p.20-26, 2003.
- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M. S. Melhoria da soja. *In*: BORÉM, A. **Métodos de melhoramento de plantas**. ed. UFV – Viçosa, 817p, 1999.
- SCHULZE, H.; SAINI, H. S.; HUISMAN, J.; HESSING, M.; BERG, W.; VERSTEGEN, M. W. A. Increased nitrogen secretion by inclusion of soya lectin in the diets of pigs. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.69 p.501-510.1995.
- SHARMA, S.; SCHUMACHER, U.; RENAASE, V.; COATES, M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. **Gut**, v.36, p.209-214, 1995.

- SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionizing radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry**, v.78, p.187-205, 2002.
- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p.3-9, 2000.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, n. 150, p. 76-85. 1985.
- SOARES, T. C. B. **Mapeamento de locos associados ao conteúdo de proteínas de reserva em soja**. Viçosa, MG: UFV, 113p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- TAN-WILSON, A L.; COSGRIFF, S. E.; DUGGAN, M. C.; OBACH, R. S.; WILSON, K. A. Subclassification of soybean Bowman-Birk isoinhibitors. **Journal America Oil Chemistry Society**, v.65, p.1475-1478, 1988.
- USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.usda.gov/> . Acesso em: 03/12/2004.
- UTUMI, M.M.; BARROS, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Efeito da eliminação genética de lipoxigenases e polipeptídeos de reserva na qualidade da proteína de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n.3, p.203-212, 1998.
- VASCONCELOS, I. M.; TRENTIN, A.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic

- protein isolated from soyabeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.66, p.312-357, 1994.
- VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A. B.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine Max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12 p.55-62. 2001.
- VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.
- WIRIYAUMPAIWONG, S.; SOPONRONNARIT, S.; PRACHAYAWARAKOM, S.; Comparative study of heating processes for full-fat soybeans. **Journal of Food Engineering**, v.65, p.371-382, 2004.
- YAKLICH, R. W. -conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.729-735, 2001.
- YAMADA, L. T. P.; BARCELOS, M. F. P.; SOUZA, R. V.; LIMA, A. L. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.2, p.406-413, 2003.