

Atividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação

Maria Inés Genovese and Franco M. Lajolo

Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental - Fac. Ciências Farmacêuticas. USP.

RESUMO. Altos valores de atividade inibitória de tripsina residual encontrados para feijões submetidos a tratamento térmico indicaram que estes poderiam ser decorrentes de artifícios da metodologia utilizada e não de inibição específica. Dessa forma, realizou-se uma avaliação crítica dos métodos em uso e de possíveis interferentes, visando determinar se justificariam a variabilidade de resultados e tentando estabelecer o modo mais adequado de determinar a atividade inibitória residual de feijões. Os resultados mostraram que o meio de extração dos inibidores, o pH da reação e as condições de preparo da amostra são responsáveis por alterações significativas dos valores de atividade inibitória encontrados, necessitando cuidadosa padronização. Este é o primeiro relato sobre a influência da liofilização da amostra sobre a atividade inibitória de tripsina residual de feijões cozidos.

Palavras-chave: Atividade inibitória de tripsina, feijões, métodos de determinação, interferentes.

SUMMARY. Trypsin inhibitory activity of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.): critical evaluation of methods for determination.

High values of residual trypsin inhibitory activity found for heat-treated beans indicated the occurrence of artifices due to the methodology. A critical evaluation of the methods in use and of possible interferents was performed trying to determine the most adequate way of measuring residual trypsin inhibitory activity. Results showed that extraction conditions, pH of reaction and sample preparation are responsible for significant alterations of the values found, requiring careful standardization. This is the first report about the influence of lyophilization upon residual trypsin inhibitory activity of cooked beans.

Key words: Trypsin inhibitory activity, dry beans, determination, interferences.

INTRODUÇÃO

O feijão é amplamente consumido na América Latina e representa uma importante fonte de nutrientes, principalmente proteínas. No entanto, apesar de conter entre 20 e 30% de proteínas, estas apresentam um valor nutricional baixo, resultado da sua baixa digestibilidade e do seu baixo teor e biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados. Além dos fatores relacionados à própria estrutura das proteínas, a presença de fatores anti-nutricionais como inibidores de proteases tem sido implicada na baixa digestibilidade das proteínas do feijão, tornando necessária a sua inativação (1, 2).

Os inibidores de proteases do feijão são do tipo Bowman-Birk e apresentam estrutura compacta e elevada resistência à inativação térmica, maior na forma purificada do que na matriz da semente, e são os responsáveis pela reduzida digestibilidade *in vitro* da fração albumínica e de misturas contendo albuminas e faseolina (2-4).

As diversas práticas culinárias e de processamento industrial e a possibilidade de elaboração de produtos como farinhas e sopas destinados à alimentação infantil tornam necessários conhecimentos sobre eventuais quantidades residuais e segurança metodológica para essa avaliação.

Nesse aspecto, porém, a literatura não é conclusiva e não

há, como no caso da soja, uma metodologia especialmente desenvolvida e amplamente aceita para a avaliação da inativação térmica desses inibidores no feijão. Os métodos mais comumente utilizados baseiam-se na determinação espectrofotométrica da inibição *in vitro* da ação de tripsina purificada sobre um substrato, natural ou sintético, causada por um extrato do alimento em questão. Para altos valores de inibição, como os encontrados para amostras cruas, os resultados mostram-se confiáveis, precisos e reprodutíveis. No entanto, para valores baixos, diminuição na precisão e ocorrência de inibição não-específica causada por outros componentes da amostra tem sido relatadas (5).

Este trabalho teve como objetivos determinar a atividade inibitória de tripsina residual de feijões na forma como são comumente consumidos, bem como avaliar a adequação das técnicas em uso para sua avaliação.

MATERIAIS E METODOS

Materiais

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) utilizado foi o da variedade Carioca, fornecido pelo Instituto Agrônomo de Campinas, cuja umidade era de $9,9 \pm 0,1\%$. A amostra foi moída em moinho Janke & Kunkel A-10 (Ika® Works, Inc., Wilmington,

E.U.A.) e passada em peneira 60 mesh (0,25 mm). A farinha assim obtida apresentou um conteúdo protéico de $23,24 \pm 0,64\%$ (N x 6,25; base úmida (b.u.)), determinado através do método de Kjeldahl (6). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A tripsina, EC 3.4.21.4 (T-8253, 12700 unidades/mg proteína), foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A.), assim como o BAPNA (N α -benzoi-DL-arginina p-nitroanilida, B-4875). As amostras das outras variedades de feijão estudadas foram fornecidas pela EMBRAPA. Os tipos, variedades, origem e teor protéico (N x 6,25, b.u.) são apresentados a seguir. **Feijão Preto:** Rio Tibagi (CNPAF, $22,36 \pm 0,23\%$), Xamego (CNPAF, $21,96 \pm 0,34\%$); **feijão Carioca:** Aporé (CNPAF, $21,19 \pm 0,39\%$), Carioca Mg (ESAL, $22,02 \pm 0,25\%$); **feijão Jalo:** Emgopa 201-ouro (CIAT, $21,03 \pm 0,14\%$); Jalo Precoce (CNPAF, $25,72 \pm 0,29\%$); **feijão Roxo:** Roxo 90 (ESAL, $22,77 \pm 0,61\%$); **feijão vermelho-escuro:** Safira (CNPAF, $23,50 \pm 0,55\%$).

Cozimento do feijão

Amostras de feijão (~100 g) foram submetidas ao cozimento em água destilada em condições variadas, previamente deixadas de molho ou não. Os feijões foram deixados de molho em água destilada (1:9 m/v) por 14 horas, após o qual a água foi descartada. Após nova adição de água destilada (1:9 m/v), os feijões foram cozidos a 100°C ou autoclavados a 121°C (15 psi), por tempos variados. As amostras foram então congeladas e liofilizadas com a água de cocção, e homogeneizadas em moinho Janke & Kunkel A-10 até passar em peneira 60 mesh (0,25 mm). Alternativamente, logo após o cozimento os feijões foram resfriados até atingirem a temperatura ambiente, após o qual procedeu-se à extração de proteínas, como descrito abaixo.

Extração das proteínas do feijão

Amostras cruas e amostras cozidas liofilizadas. A extração das proteínas do feijão cru e tratado termicamente, para a determinação da atividade inibitória de tripsina, foi feita agitando-se, durante 3 horas à temperatura ambiente, um grama da farinha de feijão cru ou do feijão cozido liofilizado (60 mesh) em 50 ml de hidróxido de sódio 0,01 N, como recomendado por Kakade *et al.* (7) para derivados de soja. A suspensão foi então centrifugada (30.000 g/30 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado para a determinação do teor protéico pelo método de Lowry *et al.* (8), usando-se albumina de soro bovino como padrão. Alternativamente, utilizou-se ácido sulfúrico 0,25 N ou água destilada para efeito de comparação da capacidade extratora. Para a determinação da atividade inibitória de tripsina, os extratos foram diluídos com água destilada (em geral 1/5, para feijões cozidos, e 1/10, para feijões crus), sendo que o extrato ácido teve seu pH previamente ajustado para 8,2.

Amostras cozidas não liofilizadas. Os feijões foram

homogeneizados juntamente com a água de cocção, durante 2 a 4 min, com homogeneizador tipo Ultra-Turrax (Polytron® - Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), logo após o seu cozimento. A seguir adicionou-se NaOH de forma a obter-se concentração final de 0,01N, e a suspensão foi mantida sob agitação por três horas à temperatura ambiente. Os extratos assim obtidos foram utilizados para a determinação da atividade inibitória de tripsina, após diluição 1/5 com água destilada.

Atividade inibitória de tripsina

A atividade inibitória de tripsina foi determinada de acordo com Kakade, Simons & Liener (9) usando benzoi-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato: 0,2 a 1,0 ml das soluções protéicas foram pipetados, em triplicata, e o volume final ajustado para 1,0 ml com água destilada. A cada tubo, previamente acondicionado em banho-maria a 37°C, adicionaram-se 1,0 ml da solução de tripsina (0,05 mg/ml de HCl 0,001 N) e, após 5 min., 7,0 ml de BAPNA (0,3 mg/ml de tampão Tris 50 mM, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20 mM), previamente aquecido a 37°C. A reação foi interrompida após 10 min pela adição de 1 ml de ácido acético 30% e a absorbância lida a 410 nm, contra os brancos de reação aos quais adicionou-se o ácido acético antes do BAPNA. Uma unidade de tripsina foi definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 410 nm por 10 ml do meio de reação. Alternativamente, utilizou-se caseína 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,6 como substrato para a tripsina, de acordo com Kakade, Simons & Liener (9), sendo uma unidade de tripsina definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 280 nm em 20 min por 10 ml do meio de reação. Os resultados foram expressos como unidades inibitórias de tripsina (UIT) por mg de proteína, sendo uma unidade inibitória responsável pela inibição de uma unidade de tripsina.

Eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE)

A eletroforese em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi feita de acordo com Laemmli (10), utilizando-se concentração de 12% de poliácridamida para o gel de separação e sistema de eletroforese Mini-Protean II da Bio-Rad. Os géis foram corados com Coomassie Blue R. O padrão de peso molecular utilizado foi o Dalton Mark VII-L, da Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.), que consiste de α -lactalbumina (14,3 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), tripsinogênio (24 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), albumina de ovo (45 kDa), e albumina bovina (66 kDa).

Eletroforese em condições nativas com revelação para inibidores de tripsina

A eletroforese em condições nativas foi realizada de

acordo com o método de Davis (11), em gel de poliacrilamida. A revelação dos inibidores de tripsina nos géis foi feita de acordo com Uriel & Berges (12). Após a corrida, a placa foi incubada com solução de tripsina (5 mg/100 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4), durante 20 minutos. A seguir, esta foi lavada três vezes com água destilada. Adicionou-se à placa solução contendo 4,7 mg de N-acetil-DL-fenilalanina- β -naftilester dissolvidos em 2 ml de dimetilformamida, misturados, na hora do uso, a 18 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 contendo 20 mg de *o*-dianisidina-tetrazotizada. Após 30 min a placa foi lavada com água destilada e escaneada com densitômetro GS 700 da Bio-Rad (Molecular Analyst Software).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade inibitória de tripsina de feijões cozidos

Amostras do feijão Carioca foram submetidas ao cozimento em água destilada em condições variadas, previamente deixadas de molho por 14 horas ou não. Os resultados (Tabela 1) mostraram que, mesmo para tempos de aquecimento superiores aos necessários para tornar o feijão palatável (molho e autoclave 15' ou apenas autoclave 30'), ainda se observava uma alta atividade inibitória de tripsina. Em geral, observou-se uma maior inativação para os feijões deixados previamente de molho, embora o molho por si só não pareça ter efeito na redução do teor de inibidores. O tratamento térmico em temperaturas de autoclavagem mostrou-se mais eficiente que a 100°C, sendo que 15 e 30 min em autoclave corresponderam a 1 hora a 100°C, embora tempos bem superiores aos necessários para tornar o feijão palatável ainda tenham deixado uma atividade residual significativa (23 a 30%, para 121°C por 1 hora).

Esses resultados vão em desacordo com os obtidos por outros autores (13,14), que em geral observaram 100% de inativação após 30 minutos de autoclavagem do feijão. Desta forma, os altos valores de atividade inibitória residual encontrados, para todos os tratamentos térmicos testados, indicaram que estes poderiam ser decorrentes de artifícios da metodologia utilizada e não de inibição específica. Sendo assim, a atividade inibitória de tripsina das mesmas amostras foi determinada de acordo com variações do método de Kakade, Simons & Liener (9), incluindo tipo de substrato utilizado para a tripsina e meio extrator para os inibidores, e estudou-se a possível interferência de compostos polifenólicos e condições de preparo da amostra. Os resultados são apresentados a seguir.

TABELA 1

Atividade inibitória de tripsina de feijões Carioca cozidos

	UIT/mg proteína	Atividade residual (%)
Feijão cru	62,1 \pm 1,2 ^a	100
Feijão deixado de molho	67,1 \pm 2,8 ^b	100
Feijão autoclavado 30 min	37,7 \pm 2,7 ^c	60,7
Feijão autoclavado 1h	18,4 \pm 2,5 ^d	29,6
Feijão 100°C/1h	38,7 \pm 1,4 ^c	62,3
Feijão deixado de molho e autoclavado 15 min	28,4 \pm 0,6 ^e	42,3
Feijão deixado de molho e autoclavado 30 min	28,2 \pm 0,6 ^e	42,0
Feijão deixado de molho e autoclavado 1 h	15,3 \pm 0,7 ^d	22,8
Feijão deixado de molho e cozido 100°C/1h	29,9 \pm 0,3 ^f	44,6

Obs. Os feijões foram deixados de molho em água destilada (1:9) por 14 horas, após o qual a água foi descartada. Após nova adição de água destilada (1:9), os feijões foram cozidos, liofilizados com a água de cocção, e homogeneizados. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$). UIT. Unidades inibitórias de tripsina.

Substrato sintético x substrato natural (caseína)

Uma das críticas feitas ao método que utiliza BAPNA como substrato para a tripsina é que, por se tratar de um substrato sintético, não representaria a situação real, sendo que substratos naturais seriam mais adequados para avaliar a influência da presença desses inibidores em alimentos sobre a utilização de nutrientes *in vivo*. Para efeito de comparação, a determinação foi repetida para duas amostras de feijão sem e duas amostras com tratamento térmico, utilizando-se a caseína como substrato para a tripsina, de acordo com Kakade, Simons & Liener (9). Os resultados podem ser vistos na Tabela 2 e confirmam os obtidos através do método com BAPNA, ou seja, continuou sendo detectada uma alta atividade inibitória de tripsina residual nos feijões tratados termicamente, sendo que com a caseína como substrato esses valores foram inclusive maiores. Não houve diferenças significativas na atividade inibitória do feijão cru ou apenas deixado de molho determinada através dos dois métodos.

TABELA 2
Atividade inibitória de tripsina do feijão Carioca determinada pelo método da caseína

	UIT/mg proteína	Atividade residual (%)
Feijão cru	58,8 ± 4,9 ^a	
Feijão deixado de molho	68,8 ± 4,0 ^b	100
Feijão deixado de molho e autoclavado 15 min	33,8 ± 3,1 ^c	49,1
Feijão deixado de molho e autoclavado 30 min	35,3 ± 3,1 ^c	51,3

Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$). UIT. Unidades inibitórias de tripsina.

Interferência de compostos polifenólicos

Os compostos polifenólicos encontrados na casca do feijão são termo-estáveis e, segundo Fernández *et al.* (15), parcialmente responsáveis pela atividade inibitória de tripsina de feijões crus e, principalmente, de feijões cozidos, onde os inibidores protéicos se encontrariam desnaturados e portanto inativos. Para avaliar a interferência desses compostos nos valores encontrados determinou-se a atividade inibitória de tripsina de farinha de feijões descascados manualmente, antes e após tratamento térmico. Como se observa na Tabela 3, os feijões descascados apresentaram uma atividade inibitória de tripsina levemente maior que a de feijões inteiros (compare com Tabela 1), e esta não se alterou após aquecimento da farinha a 100°C/15 min, indicando que a inibição de tripsina devida aos compostos polifenólicos da casca não está envolvida. Os valores mais elevados de atividade resultariam da concentração dos inibidores no cotilédone com a retirada da casca. Confirmando estes resultados, a atividade inibitória de tripsina do extrato obtido a partir da farinha de feijões descascados, ao qual adicionou-se taninos condensados purificados a partir da casca, não diferiu significativamente da encontrada para o extrato sem taninos (Tabela 3). Esses resultados demonstram que, pelo menos no caso do feijão Carioca, os compostos polifenólicos da casca não estão implicados no efeito inibitório de proteases observado, contrariando os resultados de Fernández *et al.* (15). No entanto, Weder & Telek (16) também observaram uma atividade inibitória de proteases em geral maior para cotilédones em comparação com o feijão inteiro e, após uma série de estudos da atividade inibitória de misturas contendo cotilédones e casca em diferentes proporções, também concluíram que os taninos ou outros componentes da casca não contribuem para a inibição de tripsina e quimotripsina humanas ou bovinas.

TABELA 3
Atividade inibitória de tripsina da farinha de feijão Carioca descascado determinada pelo método do BAPNA

	UIT/mg proteína
Farinha crua	71,1 ± 0,9 ^a
Farinha 100 °C/15 min ¹	72,0 ± 3,1 ^a
Farinha crua + tanino ²	68,2 ± 2,9 ^a

Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$). UIT. Unidades inibitórias de tripsina. 1. Suspensão de farinha em água destilada (1:9 m/v) liofilizada após o aquecimento. 2. Mistura farinha: taninos condensados (purificados a partir da casca) na proporção de 100 mg de farinha para 1,3 mg de taninos.

Extração dos inibidores de tripsina

Tanto o método oficial da “American Association of Cereal Chemists” (17) como o da “American Oil Chemists’ Society” (18) para determinação da atividade inibitória de tripsina em soja e derivados se baseiam no método proposto por Kakade *et al.* (7), onde a extração das amostras é feita com NaOH 0,01 N (1:50 p/v) durante três horas à temperatura ambiente. Por outro lado, o método proposto por Mueller & Weder (19) utiliza H₂SO₄ 0,25 N (1:20 p/v) durante uma hora à temperatura ambiente. Dessa forma, a variação encontrada na atividade inibitória de tripsina residual pode ser decorrente de diferenças na capacidade extratora dessas soluções.

A Tabela 4 mostra a capacidade extratora do NaOH 0,01 N, do H₂SO₄ 0,25 N e da H₂O e a Figura 1 o perfil eletroforético das proteínas extraídas (poços 1 a 7). Para os feijões que não foram submetidos a tratamento térmico observa-se que a maior capacidade extratora foi a do NaOH, não havendo diferença entre a quantidade total de proteínas extraída pela água e pelo ácido sulfúrico. Após tratamento térmico houve uma queda drástica na solubilidade das proteínas, sendo que o NaOH continuou apresentando a maior capacidade de extração (26,5 e 50% maior que a do H₂SO₄ e da H₂O, respectivamente), porém 84% menor que para o feijão cru.

Quando a atividade inibitória de tripsina foi determinada nesses extratos obtidos a partir do feijão cru, usando-se o método do BAPNA tradicional, não foram encontradas diferenças entre os valores obtidos para o extrato em NaOH e H₂SO₄, porém uma atividade inibitória de tripsina cerca de 25% menor foi encontrada para o extrato em H₂O. Esses resultados mostram que, apesar da maior capacidade extratora do NaOH e da mesma capacidade de extração observada para o H₂SO₄ e a H₂O, o perfil de proteínas extraídas é diferente, o que foi confirmado através de eletroforese (Figura 1). No caso do feijão cozido, também observamos uma maior

atividade inibitória de tripsina para os extratos em NaOH, cerca de duas a três vezes a encontrada para os extratos em água. O extrato em H_2SO_4 , no entanto, não apresentou atividade, mesmo quando a determinação foi feita sem diluição prévia.

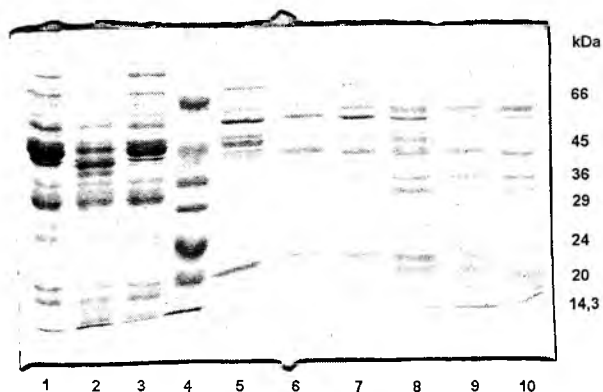
TABELA 4
Capacidade de extração das proteínas do feijão de diferentes soluções

	% proteínas totais extraídas		
	NaOH 0,01 N	H_2SO_4 0,25 N	H_2O
Feijão cru	93,2 ^a	65,5 ^b	66,3 ^b
Feijão molho 14 h 100°C/1 h	15,1 ^c	11,1 ^d	7,5 ^e

Obs. Todas as extrações foram realizadas na razão 1:50 (p/v) por três horas à temperatura ambiente, para efeito de comparação. Os resultados representam a média de duplicatas. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

FIGURA 1

Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) das proteínas extraídas por diferentes soluções a partir do feijão cru e cozido. Poços 1 a 3: feijão cru. 1. Extrato em NaOH 0,01 N; 2. Extrato em H_2SO_4 0,25 N; 3. Extrato em H_2O ; 4. Padrão de peso molecular; Poços 5 a 7: feijão deixado de molho 14 h e cozido 100 °C/1 h (liofilizado). 5. Extrato em NaOH 0,01 N; 6. Extrato em H_2SO_4 0,25 N; 7. Extrato em H_2O ; Poços 8 a 10: feijão deixado de molho 14 h, cozido a 100 °C/1 h, e extraído logo após o cozimento. 8. Extrato em NaOH; 9. Extrato em H_2SO_4 0,25 N; 10. Extrato em H_2O



Esses resultados demonstram a grande variação nos valores de atividade inibitória de tripsina residual de feijões cozidos que são obtidos utilizando-se diferentes soluções extratoras: quando se utiliza álcali, atividades residuais

elevadas são detectadas (28 a 35%), já com água, apenas cerca de 16%, e com ácido sulfúrico, não são detectadas atividades residuais. A menor atividade encontrada para o extrato em água obtido a partir do feijão cru demonstra que a água não extrai os inibidores de forma eficiente e que esses extratos são portanto inadequados para a determinação. Em relação ao feijão cozido, as diferenças entre os extratos obtidos em NaOH e H_2SO_4 sugerem a ocorrência de artifícios da técnica, os quais tentou-se determinar.

Um ponto investigado foi a utilização de extratos previamente centrifugados ou não. De acordo com Kakade *et al.* (7) não há diferenças significativas entre a atividade inibitória de tripsina de extratos de soja crua em NaOH, previamente centrifugados ou não. No entanto, os autores observaram que, para amostras submetidas a tratamento térmico, a atividade detectada em extratos não-centrifugados era maior, e sugeriram que o método detectaria a atividade de inibidores de tripsina insolubilizados pelo aquecimento. Similarmente ao relatado pelos autores, no caso do feijão cru não houve diferenças entre os valores de atividade encontrados para os extratos centrifugados ou não (Tabela 5), tanto em NaOH como em H_2SO_4 e H_2O . Já para os feijões cozidos, encontrou-se uma atividade residual maior para o extrato não-centrifugado, em comparação com o centrifugado, apenas para o extrato em NaOH. Isso indica que, ao contrário do sugerido por Kakade *et al.* (7), não é a atividade de inibidores insolúveis que está sendo detectada, já que não houve diferenças para os extratos em H_2SO_4 e H_2O .

TABELA 5
Atividade inibitória de tripsina determinada em diversos extratos obtidos a partir do feijão cru e cozido

	UIT/mg prot. total		
	NaOH 0,01 N	H_2SO_4 0,25 N	H_2O
<i>Feijão cru</i>			
-extrato centrifugado	81,1 ± 5,8 ^a	76,5 ± 0,7 ^a	60,4 ± 4,2 ^b
-extrato sem centrifugar	80,9 ± 1,9 ^a	77,7 ± 8,4 ^a	60,5 ± 1,2 ^b
<i>Molho 14h e 100°C/1h</i>			
-extrato centrifugado	22,7 ± 0,7 ^c	n.d.	9,7 ± 4,7 ^d
-extrato sem centrifugar	28,5 ± 0,8 ^c	n.d.	10,0 ± 0,6 ^d

Obs. Todas as extrações foram realizadas na razão 1:50 (p/v) por três horas à temperatura ambiente. O extrato em H_2SO_4 teve seu pH previamente ajustado para 8,2 antes da determinação. Os extratos foram utilizados antes e após centrifugação (10.000 g/30 min). Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$). n.d.: atividade não detectada. UIT. Unidades inibitórias de tripsina.

Efeito da liofilização das amostras

Neste estudo as amostras de feijão foram deixadas de molho e submetidas a tratamento térmico, após o qual elas

foram liofilizadas e homogeneizadas (vide Mat. e Mét.). As amostras assim obtidas foram mantidas em freezer até o momento da extração e determinação da atividade inibitória de tripsina. Para verificar se esse processo poderia interferir nos resultados obtidos, as determinações foram repetidas para amostras de feijão logo após o seu cozimento, conforme descrito em Mat. e Mét. A atividade inibitória de tripsina foi determinada antes e após centrifugação do extrato (10000 g/30 min). Os resultados obtidos, assim como a quantidade de proteína extraída, se encontram na Tabela 6, e o perfil eletroforético dos extratos na Figura 1 (poços 8 a 10). A atividade inibitória de tripsina residual encontrada no extrato em NaOH (19%) foi cerca da metade da encontrada para a amostra liofilizada, apesar de terem sido extraídas quantidades similares de proteína, com o mesmo perfil eletroforético. Ainda, não se obteve uma maior inibição de tripsina quando se utilizou o extrato em NaOH sem centrifugar em comparação com o centrifugado, como no caso das amostras liofilizadas. O ácido sulfúrico (0,25 N) apresentou capacidade extratora similar à do hidróxido de sódio, e novamente não foi detectada atividade inibitória residual nesse extrato.

TABELA 6
Atividade inibitória de tripsina determinada em feijão Carioca logo após o seu cozimento (100°C /1 h)

	UIT/mg prot. Total
extrato centrifugado	12,8 ± 0,7 ^a
extrato sem centrifugar	12,3 ± 0,1 ^a
% proteína total extraída	10,5

Obs. As extrações foram realizadas na razão 1:20 (p/v) com NaOH 0,01N por três horas à temperatura ambiente. Os extratos foram utilizados antes e após centrifugação (10.000 g/30 min). Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$). UIT. Unidades inibitórias de tripsina.

Para confirmar esse efeito da liofilização das amostras determinou-se a atividade inibitória de tripsina de oito variedades diferentes de feijão, antes e após cozimento, liofilizadas ou não, através dos dois métodos, utilizando caseína ou BAPNA como substrato para a tripsina. Os resultados se encontram na Tabela 7. A maior atividade inibitória de tripsina dos feijões crus, encontrada através dos dois métodos, foi a da variedade Carioca Mg. Excetuando-se o feijão Emgopa 201 cru, os valores de atividade encontrados com BAPNA foram significativamente maiores que os encontrados com caseína.

TABELA 7
Atividade inibitória de tripsina determinada em feijões crus e autoclavados (121°C /15 min), logo após o seu cozimento ou após liofilização

Feijão	UIT/mg de proteína total				
	Cru		Autoclavado 121°C/15 min		
	Caseína	BAPNA	Caseína fresco	BAPNA fresco	BAPNA liofilizado
Aporé	79,4 ± 1,4	89,4 ± 1,1	1,5 ± 0,2	14,1 ± 0,6	33,0 ± 0,4
Carioca Mg	110,4 ± 5,3	131,6 ± 1,0	n.d.	10,1 ± 1,0	48,0 ± 2,8
Emgopa 201	107,5 ± 1,8	93,7 ± 4,0	1,3 ± 0,1	20,7 ± 0,4	58,2 ± 3,5
Jalo Precoce	84,4 ± 3,2	100,5 ± 3,6	n.d.	10,4 ± 0,5	37,5 ± 1,6
Roxo 90	75,6 ± 6,5	88,9 ± 2,7	0,9 ± 0,3	15,7 ± 1,4	33,5 ± 2,7
Rio Tibagi	86,7 ± 3,9	97,6 ± 3,5	n.d.	13,8 ± 1,3	32,7 ± 1,1
Xamego	81,0 ± 3,1	120,2 ± 1,6	n.d.	15,2 ± 1,2	42,5 ± 3,4
Safira	94,4 ± 3,6	108,7 ± 4,8	n.d.	14,2 ± 0,8	37,0 ± 1,4

Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. n.d. não detectada. UIT. Unidades inibitórias de tripsina.

A atividade inibitória residual após autoclavagem (121°C/15 min) foi extremamente variável de acordo com o estado da amostra e com o método utilizado. Para as amostras que foram liofilizadas após o cozimento encontraram-se atividades residuais entre 33 e 38% da atividade original, excetuando-se o feijão Emgopa 201, para o qual foi de 62%, utilizando-se BAPNA como substrato. No entanto, para as amostras analisadas logo após a cocção as atividades residuais foram bem menores, situando-se entre 8% (Carioca Mg) e 22% (Emgopa 201) da atividade original. Surpreendentemente, quando a determinação foi realizada usando-se o método da caseína, atividades de no máximo 2% da atividade original foram detectadas. A Tabela 8 mostra que a quantidade de proteína extraída a partir do feijão cozido, liofilizado ou não, foi similar e portanto não estaria relacionada às diferenças de atividade residual encontradas.

TABELA 8
Capacidade extratora de proteínas do feijão cru e cozido por NaOH 0,01N

Feijão	% de proteína extraída*	
	feijão cru	feijão autoclavado 121°C/15 min. fresco liofilizado
Aporé	98,1	23,4
Carioca Mg	100,0	21,6
Emgopa 201	94,7	28,0
Jalo Precoce	100,0	28,1
Roxo 90	100,0	24,3
Rio Tibagi	100,0	23,5
Xamego	97,8	28,1
Safira	100,0	24,9

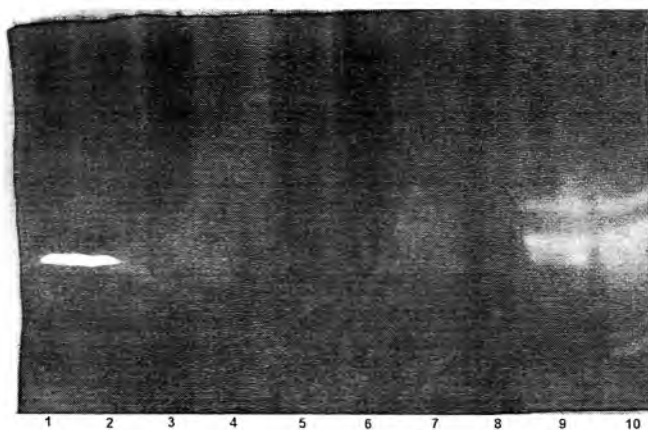
* Os resultados representam a média de duplicatas. O teor total de proteína dos feijões foi determinado através do método de Kjeldahl (Mat. Mét.).

De acordo com os resultados obtidos pelo método da caseína, os inibidores de tripsina seriam completamente inativados com o cozimento dos feijões, contrário ao encontrado pelo método do BAPNA. Desta forma, os extratos das amostras cozidas foram submetidos à eletroforese em condições não-dissociantes e revelação para inibidores de tripsina (Figura 2). Nesta técnica, após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida é imerso em solução de tripsina, o que faz com que esta se adsorva ao gel. A seguir, adiciona-se um substrato sintético para a tripsina. Este substrato, ao ser hidrolisado pela tripsina, forma um composto colorido. Nas regiões correspondentes às bandas do inibidor de tripsina isto não ocorre, e as bandas se mostram translúcidas contra um fundo rosa. De acordo com Genovese & Lajolo (5), o método apresenta grande sensibilidade e permite checar se os valores residuais de atividade inibitória encontrados através do método espectrofotométrico são de fato devidos à presença de inibidores ativos.

FIGURA 2

Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos em NaOH 0,01N obtidos a partir de feijões autoclavados (121°C/15 min), revelada para inibidores de tripsina. 1. Carioca Mg (54 µg), 2. Aporé (56 µg), 3. Jalo Precoce (81 µg), 4. Roxo 90 (63 µg), 5. Rio Tibagi (60 µg), 6. Xamego (69 µg); 7. Emgopa 201 (68 µg), 8. Safira (67 µg), 9 e 10: Feijões crus, 9. Emgopa 201 (6 µg), 10. Roxo 90 (11 µg).

Obs: Os números entre parênteses representam a quantidade total de proteína aplicada



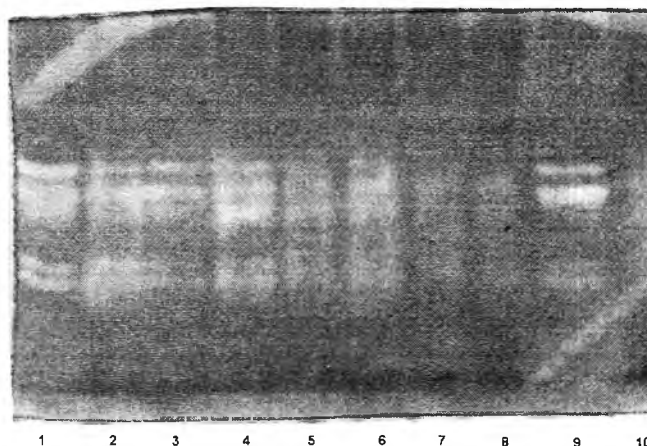
A Figura 2 mostrou que, mesmo quando aplicadas quantidades elevadas de proteína no gel de eletroforese (cerca de dez vezes maiores que as utilizadas para o feijão cru), não se observou inibição de tripsina para as amostras de feijão analisadas logo após o cozimento. Esses resultados demonstram, portanto, que os valores de atividade residual obtidos através do método da caseína estão mais próximos da realidade que os obtidos utilizando-se BAPNA como substrato.

Já para os feijões Carioca cozidos e liofilizados, a técnica mostrou a presença de inibidores ativos, com perfil similar ao dos inibidores presentes no feijão Carioca cru, embora uma quantidade muito superior de proteína tenha sido aplicada e os perfis tenham perdido nitidez à medida que se aumentou a intensidade do tratamento térmico (Figura 3). Esses resultados sugerem que eventuais reações, tais como complexação com outros componentes do feijão, sofridas pelos inibidores de tripsina durante o aquecimento e que levam à sua inativação, seriam parcialmente revertidas durante a liofilização das amostras. Este é o primeiro relato da interferência da liofilização na avaliação da atividade inibitória de tripsina residual de feijões. No entanto, apesar de ainda serem observados inibidores ativos nas amostras liofilizadas, os valores de atividade residual entre 23 e 62% da atividade original (Tabela 1), obtidos através do método com BAPNA, parecem superestimados já que nos géis de poliacrilamida, mesmo aplicando-se quantidades de proteína até sete vezes maiores, não se observam bandas com a mesma intensidade das observadas para as amostras cruas.

FIGURA 3

Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos em NaOH 0,01N obtidos a partir de feijão Carioca cozido e liofilizado, revelada para inibidores de tripsina. 1.

Controle: feijão deixado de molho (12 µg), 2. Feijão deixado de molho e cozido 100°C/1h (62 µg), 3. Feijão cozido 100°C/1h (56 µg), 4. Feijão deixado de molho e autoclavado 15 min (84 µg), 5. Feijão autoclavado 30 min (64 µg), 6. Feijão deixado de molho e autoclavado 30 min (67 µg); 7. Feijão autoclavado 1 h (70 µg), 8. Feijão deixado de molho e autoclavado 2 h (127 µg), 9. Feijão cru (10 µg), 10. Feijão autoclavado 2 h (152 µg). Obs: Os números entre parênteses representam a quantidade total de proteína aplicada



Efeito do pH do meio de reação

A técnica de revelação dos inibidores em gel de poliacrilamida demonstrou que os valores de atividade residual obtidos utilizando-se BAPNA como substrato resultavam de inibição não específica. Como o método descrito por Kakade *et al.* (7) não menciona ajuste de pH dos extratos alcalinos e tanto as diluições como o acerto do volume de reação são feitos com água, as determinações realizadas para o feijão cozido, onde diluições menores que as realizadas para o feijão cru são utilizadas, resultariam em valores diferentes de pH no meio de reação. Desta forma, as determinações de atividade residual de feijões cozidos foram repetidas acertando-se o pH dos extratos para 8,2 e realizando-se as diluições e o acerto do volume de reação com o tampão Tris 50 mM, pH 8,2. Os resultados obtidos tanto para os feijões analisados logo após o cozimento com para os liofilizados são apresentados na Tabela 9 e foram significativamente inferiores aos obtidos originalmente. Embora os valores obtidos para os feijões liofilizados tenham sido em geral maiores que os obtidos para os feijões analisados logo após o cozimento, corresponderam a menos de 5% da atividade dos feijões crus, o que parece estar de acordo com o observado através da técnica de revelação dos inibidores em gel de poliacrilamida (Figura 4). Já para os feijões analisados logo após o cozimento, valores similares de atividade residual não corresponderam ao observado pela análise dos géis (Figura 2), indicando tratar-se de inibição não específica, similar ao relatado por Genovese & Lajolo (5) para produtos derivados de soja.

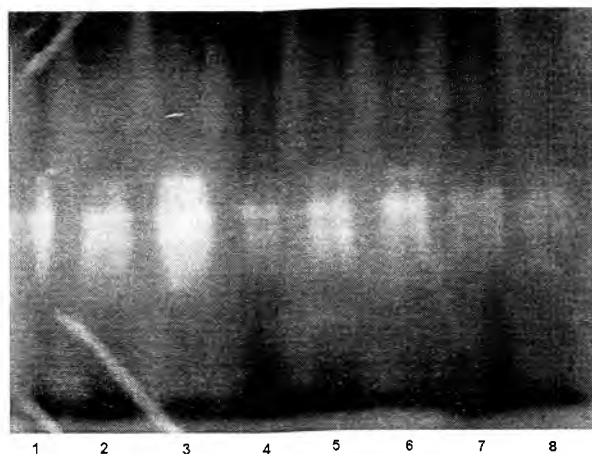
TABELA 9
Atividade inibitória de tripsina de feijões cozidos (121°C/15 min) determinada controlando-se o pH do meio de reação

Feijão	UIT/mg de proteína total	
	Fresco	liofilizado
Aporé	2,9 ± 0,0	4,0 ± 0,3
Carioca Mg	3,2 ± 0,0	4,7 ± 0,4
Emgopa 201	4,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Jalo Precoce	2,2 ± 0,1	4,4 ± 0,4
Roxo 90	3,0 ± 0,1	3,5 ± 0,2
Rio Tibagi	2,1 ± 0,1	2,8 ± 0,3
Xamego	4,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Safira	3,9 ± 0,1	4,3 ± 0,2

Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. UIT. Unidades inibitórias de tripsina.

FIGURA 4

Eletrforese em gel de poliacrilamida dos extratos em NaOH 0.01N obtidos a partir de feijões autoclavados (121°C/15 min) e liofilizados, revelada para inibidores de tripsina. 1. Aporé (77 µg). 2. Jalo Precoce (101 µg), 3. Emgopa 201 (86 µg). 4. Xamego (74 µg), 5. Roxo 90 (85 µg). 6. Carioca Mg (76 µg): 7. Rio Tibagi (86 µg). 8. Safira (51 µg). Obs: Os números entre parênteses representam a quantidade total de proteína aplicada



Este estudo mostrou que pode haver uma grande variação nos resultados de atividade inibitória de tripsina residual de feijões submetidos a tratamento térmico de acordo com os diferentes métodos utilizados no tratamento da amostra e para a extração dos inibidores. As diferenças encontradas nos valores de atividade inibitória de tripsina residual parecem bastante importantes já que podem significar erros na avaliação da adequabilidade de processos visando eliminação dos inibidores, assim como da ingestão dessas substâncias pelo homem. Embora a liofilização das amostras submetidas a tratamento térmico possa apresentar facilidades técnicas, este estudo mostrou ser mais adequada a determinação da atividade residual logo após o preparo do feijão, por ser o modo mais próximo da situação real de consumo do feijão pelo homem. Neste caso, encontrou-se uma atividade residual de no máximo 5% da atividade inibitória de tripsina original, valor que parece resultar de inibição não específica.

CONCLUSÕES

As etapas críticas para avaliação da atividade inibitória de tripsina residual em feijões cozidos, através do método de Kakade *et al.* (7) utilizando BAPNA como substrato, são relativas ao preparo da amostra e ao pH do meio de reação. A extração dos inibidores em solução de NaOH 0.01 N, por

três horas à temperatura ambiente, mostrou-se adequada, porém os extratos devem ter o seu pH ajustado para 8,2 antes da determinação. Os teores residuais de cerca de 5% encontrados em feijões autoclavados por 15 min, através da utilização de substrato sintético (BAPNA) para a tripsina, são devidos a inibição inespecífica, como demonstrado através de eletroforese em gel de poliacrilamida com revelação para inibidores de tripsina. Esses resultados indicam a necessidade de padronização de cada estágio em cada material a ser analisado para efeito de controle.

REFERÊNCIAS

- Bressani R. Grain quality of common beans. *Food Rev. Int.* 1993;9:237-97.
- Genovese MI, Lajolo FM. Inativação de inibidores de proteases de leguminosas - uma revisão. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.* 2001;34: xxx-xxx. In press.
- Genovese MI, Lajolo FM. In vitro digestibility of albumin proteins. Effect of chemical modification. *J. Agric. Food Chem.* 1996;44: 3022-8.
- Genovese MI, Lajolo FM. Effect of bean (*Phaseolus vulgaris*) albumins on phaseolin in vitro digestibility. Role of trypsin inhibitors. *J. Food Biochem.* 1996;20:275-94.
- Genovese MI, Lajolo FM. Atividade inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (*Glycine max*) consumidos no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 1998;18:309-12.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*, 15 ed. Washington, 1990.
- Kakade ML, Rackis JJ, McGhee JE, Puski G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 1974;51:376-82.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-75.
- Kakade ML, Simons N, Liener IE. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.* 1969;46:518-26.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970;227:680-5.
- Davis BJ. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Sci.* 1964;121:404-27.
- Uriel J, Berges J. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature* 1968;218:578-80.
- Sgarbieri VC, Whitaker JR. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Adv. Food Res.* 1982;28:93-166.
- Weder JKP, Link I. Effect of treatments on legume inhibitor activity against human proteinases. In: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds; Proc. 2nd Int. Workshop "Antinutritional factors (ANFs) in legume seeds"*, Wageningen/The Netherlands, Dec 1-3, 1993 (van der Poel, A.F.B.; Huisman, J.; Saini, H.S., eds.); Wageningen Pers, Wageningen 1993, p.481-5.
- Fernández R, Elias LG, Braham JE, Bressani R. Trypsin inhibitors and hemagglutinins in beans (*Phaseolus vulgaris*) and their relationship with the content of tannins and associated polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 1982;30:734-9.
- Weder JKP, Telek L. Influence of polyphenols on proteinase inhibitor activity determination of dry beans. In: *Bioactive substances in Food of plant origin. Proc. Euro Food Tox. IV, Sep 22-24, 1994* (Kozłowska, H.; Fornal, J.; Zdunczyk, Z., eds.); Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, 1994, p.227-32.
- A.A.C.C. American Association of Cereal Chemists. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. In: *Approved methods of the AACC. Method 71-10*. The Association, St. Paul, 1976.
- A.O.C.S. American Oil Chemists Society. In: *Official methods and recommended practices of the AOCS. Method Ba 12-75*. 34 ed. AOCS, Champaign, 1983.
- Mueller R, Weder JKP. Isolation and characterization of two trypsin-chymotrypsin inhibitors from lentil seeds (*Lens culinaris Medik*). *J. Food Biochem.* 1989;13:39-63.

Recibido: 29-05-2001

Aceptado: 20-09-2001