

**UREASE DE SEMENTES DE SOJA E SUA TOXICIDADE PARA RATOS**

**ANDREA AGACIANA BESSA MAIA**

**FORTALEZA-CEARÁ**  
**2008**

ANDREA AGACIANA BESSA MAIA

UREASE DE SEMENTES DE SOJA E SUA TOXICIDADE PARA RATOS

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR  
EM BIOQUÍMICA.

Orientadora: Prof. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA-CE

UREASE DE SEMENTES DE SOJA E SUA TOXICIDADE PARA RATOS

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA.

Orientadora: Prof. Dr. Ilka Maria Vasconcelos

  
Andréa Agaciana Bessa Maia

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 02/04/08

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do  
Nascimento  
Examinador  
Universidade Estadual do Ceará

  
Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello  
Examinador  
Universidade Estadual do Ceará

  
Prof. Dra. Ilka Maria Vasconcelos  
Orientadora  
Universidade Federal do Ceará

  
Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito  
Examinador  
Universidade Federal do Ceará

  
Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
Examinador  
Universidade Federal do Ceará

**A conclusão do assunto, tudo tendo sido ouvido, é: Teme o  
[verdadeiro] Deus e guarda os seus mandamentos.  
Pois esta é toda [a obrigação] do homem.**

**Eclesiastes 12:13**

**O amor “Suporta todas as coisas, acredita todas as coisas, persevera em todas as coisas. O amor nunca falha....”**

**1 Coríntios 13:7-8.**

Ao meu marido, Alex Oliveira de Moura, e  
ao meu filho, André Bessa de Moura.

Meus amores.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

À Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, pela orientação e compreensão que foram fundamentais para a realização desta tese.

Ao Dr. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, por sua constante contribuição para a execução deste trabalho.

À Dra. **Ana de Fátima Fontenele Urano de Carvalho**, pelas sugestões e contribuições práticas dadas a esse trabalho, principalmente nos ensaios biológicos.

Ao Dr. **Cláudio Cabral Campello** pelas sugestões e disposição em ajudar na realização deste trabalho, principalmente nas análises estatísticas.

À Dra. **Gerly Anne de Castro Brito** pela disposição e contribuição dispensadas as análises histológicas.

À Dra. **Tereza Neuma Albuquerque Gomes Nogueira** pelas valiosas sugestões dadas às análises histológicas

Ao Dr. **Nilberto Robson Falcão do Nascimento** por ter aceito o convite de participar como examinador da banca de defesa desta tese.

Aos amigos **Janne, Geórgia, Juliana, Silvinha, Hermógenes, Adelina, Isabel, Rosana, Jandenilson, Emanuele, Hellen, Eveline, Mirela, Henrique e Daniele**, que fazem parte do laboratório de Toxinas Vegetais, pela disposição em ajudar de forma física e emocional durante toda a realização deste trabalho.

Aos amigos **Betânia, Hévila, Ygor, Edvar, Simone, Hélio, Mayra, Fred** pelas suas amizades e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Aos amigos **Davi e Mariana**, e todos os que fazem parte do laboratório de Fisiologia Animal, por estarem sempre à disposição para ajudar.

A todos os **colegas integrantes de outros laboratórios** deste departamento que sempre estiveram dispostos a ajudar durante esta caminhada.

Aos funcionários **Nega, Ivan e Vanda** sempre prontos a ajudar.

Aos **Professores** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos.

À **Minha Mãe e aos meus Irmãos**, por terem me ajudado a chegar até aqui, principalmente através de seus conselhos e paciência.

**Acima de tudo, agradeço ao Deus Todo-Poderoso Jeová, que rege minha vida, por me conceder forças e permitir a realização deste trabalho.**

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.**

## SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xi
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xiii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xv
<u>RESUMO</u>	xvi
<u>ABSTRACT</u>	xviii
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	4
2.1. <u>Soja [<i>Glycine max</i> (L.) Merrill]</u>	5
2.2. <u>Aspectos Nutricionais</u>	6
2.3. <u>Proteínas Antinutricionais e/ou Tóxicas em Soja</u>	7
2.4. <u>Parâmetros Utilizados na Avaliação do Valor Nutricional das Proteínas</u>	14
<u>3. OBJETIVOS</u>	17
3.1. <u>Geral</u>	18
3.2. <u>Específicos</u>	18
<u>4. MATERIAIS</u>	19
4.1. <u>Sementes</u>	20
4.2. <u>Eritrócitos</u>	20
4.3. <u>Animais de Experimentação</u>	20
4.4. <u>Reagentes Químicos</u>	20
<u>5. MÉTODOS</u>	22
5.1. <u>Preparação da Farinha dos Genótipos de Soja</u>	23
5.1.1. <u>Obtenção da Farinha</u>	23

	Página
5.1.2. Delipidação da Farinha	23
5.2. <u>Composição Química Elementar</u>	23
5.2.1. Determinação de Umidade	23
5.2.2. Determinação de Cinzas	24
5.2.3. Determinação de Fibra Bruta	24
5.2.4. Determinação do Teor de Proteína Total	25
5.2.5. Determinação do Teor de Lipídios Totais	25
5.3. <u>Extração e Determinação de Proteína</u>	26
5.4. <u>Deteção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais</u>	27
5.4.1. Urease	27
5.4.2. Inibidor de tripsina	27
5.4.3. Lectina	28
5.4.4. Toxina	28
5.5. <u>Purificação da Urease de Semente de Soja</u>	29
5.6. <u>Avaliação do Grau de Pureza da Urease Purificada</u>	29
5.6.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	29
5.6.2. Determinação da Sequência de Aminoácidos NH <sub>2</sub> – Terminal	32
5.7. <u>Avaliação <i>in vitro</i> dos Efeitos da Pepsina sobre a Urease</u>	32
5.8. <u>Ensaio Imunológico</u>	33
5.8.1. Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-Urease de Soja	33
5.8.2. “Dot Blotting”	34
5.8.3. “Western Blotting”	35
5.9. <u>Ensaio Biológico</u>	35

	Página
5.9.1. Ensaio Biológico 1 – Avaliação da Qualidade Nutricional de Sementes de Genótipos de Soja Contendo Teores Diferenciados de Urease	35
5.9.1.1. Análises Histológicas e Morfométricas	40
5.9.1.2. Bioquímica Sanguínea	40
5.9.2. Ensaio Biológico 2 – Avaliação da Toxicidade Aguda da Urease Purificada por Via Oral (Dose Única)	42
5.9.3. Ensaio Biológico 3 – Determinação do pH e Equivalentes Ácidos no Conteúdo Estomacal de Ratos Submetidos à Administração de Urease Purificada por Via Oral	42
5.10. <u>Análise Estatística</u>	43
<b>6. RESULTADOS</b>	45
6.1. <u>Composição Química Elementar</u>	46
6.2. <u>Comparação dos Perfis Protéicos das Farinhas de Sementes dos Genótipos de Soja por PAGE-SDS</u>	46
6.3. <u>Deteccção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais</u>	46
6.4. <u>Purificação da Urease de Sementes de soja</u>	50
6.5. <u>Avaliação <i>in vitro</i> dos Efeitos da Pepsina sobre a Urease</u>	52
6.6. <u>Ensaio Biológico 1 - Avaliação da Qualidade Nutricional de Sementes de Genótipos de Soja Contendo Teores Diferenciados de Urease</u>	57
6.7. <u>Ensaio Biológico 2 - Avaliação da Toxicidade Aguda da Urease Purificada por Via Oral (Dose Única)</u>	68
6.8. <u>Ensaio Biológico 3 - Determinação do pH e Equivalentes Ácidos no Conteúdo Estomacal de Ratos Submetidos à Administração de Urease Purificada por Via Oral</u>	68
<b>7. DISCUSSÃO</b>	74
<b>8. CONCLUSÕES</b>	85
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	87

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Esquema geral de purificação das ureases de sementes de soja	31
2	Gaiolas metabólicas utilizadas pelos animais no experimento de avaliação da qualidade nutricional de genótipos de soja	37
3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS e 2-mercaptoetanol das farinhas dos genótipos de soja, corada com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raias 2, 3, 4, 5, 6 e 7 representam os genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209, respectivamente.	48
4	Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose. Amostra (800 mgP) do material precipitado com acetona 20% e dialisado ( <i>cut-off</i> 50 kDa) foi aplicada numa coluna de Q-Sepharose (30 x 2,5 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, contendo 2-mercaptoetano 0,005 M e EDTA 0,001 M. As proteínas retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio contendo concentrações crescentes de NaCl: 0,15 M, 0,3 M e 1,0 M. Fluxo: 45 mL/h; Frações: 4,5 mL.	51
5	Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-300. Amostra (24 mgP) da fração rica em urease, obtida na cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, foi aplicada numa coluna de Sephacryl S-300 (60 x 1,5 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,001 M. A coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio. Fluxo: 6 mL/h; Frações: 2 mL. O símbolo (-♦-) indica frações exibindo atividade ureásica. Figura circunscrita: PAGE-SDS. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raia 2: Urease purificada.	53

FIGURA		Página
6	Atividade ureásica residual após diferentes tempos de incubação da urease purificada com pepsina.	55
7	(A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS e 2 mercaptoetanol de uma fração rica em urease, proveniente da cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, após incubação com pepsina em diferentes intervalos de tempo. A visualização das bandas protéicas foi feita com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. Raias 1: Marcadores de massa molecular; Raias 2: Urease purificada; Raias 3, 4, 5, 6 e 7 representam a fração rica em urease (troca iônica) após incubação com pepsina por 60, 120, 180 e 240 minutos, respectivamente. (B) <i>Western blotting</i> das amostras incubadas com pepsina, utilizando IgG anti-urease de soja e revelação com BCIP/NBT, substratos para fosfatase alcalina.	56
8	Curvas de crescimento dos ratos (n = 6) alimentados com dieta contendo farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203, comparadas com o crescimento de ratos alimentados com dieta contendo clara do ovo e dieta isenta de proteína (NPC).	58
9	Cortes (HE) do estômago de ratos alimentados com dietas à base de clara do ovo e contendo farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203 (aumento de 100x). A - Erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas.	63
10	Cortes (HE) do estômago de ratos submetidos ao ensaio de toxicidade aguda (dose simples), após 24 horas de ingestão de NaCl 0,15 M (controle) e de urease pura. A - Erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas. B - células parietais volumosas e hipocloradas.	69
11	Variação do pH estomacal de animais, em resposta a entubação com NaCl 0,15 M (controle) e urease pura (1000 U), medidos após diferentes tempos de entubação.	71

## LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Composição (g/Kg) das dietas controle (Clara do ovo e aprotéica) e experimentais (farinhas de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)	39
2	Composição centesimal (g/100g de farinha) de sementes de soja, genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209, expressa em percentual de peso seco	47
3	Fatores tóxicos e/ou antinutricionais presentes no extrato bruto de sementes de soja	49
4	Purificação da urease de sementes de soja, genótipo CD203	54
5	Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos (n = 6) com dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)	59
6	Balanco de nitrogênio dos ratos (n = 6) alimentados com dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203), calculados para os últimos cinco dias do experimento	60
7	Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos internos dos ratos (n = 6) submetidos a dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)	62
8	Medidas da mucosa do estômago (superfície luminal até a muscular) de ratos submetidos a dietas controle (proteína da clara do ovo) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)	66
9	Dosagens séricas e creatinina urinária em ratos (n = 6) submetidos a dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)	67

TABELA		Página
10	Valores do pH estomacal de animais (n = 6), medidos após diferentes tempos de entubação com NaCl 0,15 M (controle) e urease (1000 U)	70
11	Equivalentes ácidos do conteúdo estomacal de animais (n = 6), medidos após diferentes tempos de entubação com NaCl 0,15 M (controle) e urease pura (1000 U)	73

## **ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES**

BSA	Albumina Sérica Bovina
CCK	Colecistocinina
CM	Carboximetil
CNTX	Canatoxina
DL <sub>50</sub>	Dose capaz de matar 50% dos animais testados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium
PVDF	Difluoreto polivinilideno
R <sub>f</sub> s	Mobilidade relativa
SBA	Aglutinina de soja
SBTI	Inibidores de Tripsina de Soja
SBTX	Toxina da soja
SYTX	Soyatoxina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetrametiletenodiamina
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Tween	Polioxietileno sorbital mono-oleato
D	Digestibilidade
EGG WHITE	Proteína da clara do ovo
NPU	Utilização Protéica Final
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
UH	Unidade de hemaglutinação. Definida como sendo o inverso da maior diluição que é ainda capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2 %
UI	Unidade de Inibição. Definida como a quantidade em mg tripsina inibida
VB	Valor Biológico

## RESUMO

As sementes de soja são muito usadas na alimentação humana e animal devido ao seu alto conteúdo de lipídios e proteínas. Porém, sabe-se que as proteínas das sementes de soja não são totalmente aproveitadas pelos organismos que as ingerem devido à presença de fatores antinutricionais. O objetivo deste trabalho foi verificar se as ureases presentes nas sementes de soja possuem ação antinutricional e/ou tóxica para ratos. Dois cultivares (CD201 e CD203) com teores semelhantes dos fatores antinutricionais mais conhecidos (lectina 1,38 e 1,36 UH/mgF respectivamente, e inibidor de tripsina 73,88 e 73,50 mgTI/gF respectivamente) e diferentes quantidades de ureases (52,37 e 135,75 U/gF respectivamente), foram utilizados para avaliação nutricional na tentativa de verificar se havia diferenças na performance dos animais alimentados com dietas contendo farinha dos dois cultivares. Os parâmetros nutricionais avaliados, como NPU (utilização líquida da proteína) e digestibilidade *in vivo* não mostraram diferenças estatísticas entre as duas cultivares. A análise dos órgãos dos animais revelou hipertrofia dos intestinos delgado e grosso além de atrofia do timo, alterações já conhecidas e atribuídas aos fatores antinutricionais presentes nas sementes de soja. Além disso, os animais alimentados com a dieta contendo a farinha da cultivar CD203 também apresentaram atrofia do fígado e do baço. A análise da bioquímica sanguínea mostrou alterações nas dosagens de TGO e uréia nos animais alimentados pelas duas cultivares, contudo, os alimentados com CD203 também apresentaram alterações na creatinina sérica e urinária. A análise histológica revelou algumas alterações como hipertrofia e hiperplasia das células parietais, além de hipotrofia das células principais. Comparando histologicamente os tecidos gástricos é digno de nota que o grupo da CD201 possui áreas mais preservadas do que CD203, que possui maior teor de urease. A urease das sementes de soja foi, então, purificada empregando-se os seguintes passos: extração, precipitação com acetona 20%, diálise com membrana de 50 kDa, cromatografia em Q-sepharose fast flow e em sephacryl S-300 HR. Digestibilidade da urease, *in vitro*, com pepsina, revelou que mesmo após 4 horas a enzima não foi digerida e nem perdeu a atividade. Determinação do pH do estômago, após contato com a urease

purificada, mostrou elevação após 15 minutos, permanecendo até os 120 minutos e diminuindo aos 240 minutos. O número de equivalentes ácidos permaneceu abaixo do controle, mesmo após 240 minutos. Análise histológica da mucosa do estômago, 24 horas após contato com a urease de sementes de soja, revelou hipertrofia das células mucosecretoras, metaplasia intestinal no colo da glândula com células parietais volumosas, hipocoradas, e hiper cromasia da camada basal. Estes resultados mostraram a toxicidade para ratos, da urease presente nas sementes de soja, contribuindo assim, para um maior conhecimento de sua participação na defesa química, uma função recentemente proposta para essa proteína.

## ABSTRACT

Due to the high protein and oil contents soybeans have long been considered a valuable edible food for both animals and man. However, soybeans are known to contain a number of antinutritional or toxic factors that decreases its nutritional value. The objective of this work was to evaluate whether soybean urease has antinutritional and/or toxic action in rats. Two soybean cultivars (CD201 and CD203) with similar amounts of antinutritional factors such as lectin (1,38 e 1,36 UH/mgF respectively) and trypsin inhibitor (73,88 e 73,50 mgTI/gF, respectively) but different amounts of urease (52,37 e 135,75 U/gF, respectively), were used in a feeding trial in value to assess differences on the performance of rats feed on diets containing the seed meals from the two cultivars. NPU (net protein utilization) and *in vivo* protein digestibility did not show differences between the two cultivar. Some organs as gut, thymus, liver and spleen were affected by the presence of raw soybean in the diets. Blood's biochemistry analysis showed changes in TGO, urea and creatinin. Histological examinations showed hypertrophy/hyperplasia of parietal cells and hypotrofia of principal cells, however the CD201 cultivars has more preserved area compared to CD203. Soybean urease was purified by extraction, acetone fractionation, dialysis (50 kDa, cut off), Chromatography on Q-sepharose fast flow and sephacryl S-300 HR. The *in vitro* digestibility with pepsin showed that after 4 hours this protein was not digest neitter lose activity. Upon urease administration was observed an increase in the sthomacal pH after 15 min contact. Such higher pH, compared to controls, remained until 120 min and decrease there after until 240 minutes. As expected the acid equivalent remain lower than control group. Histological examinations of the sthomac 24 hours after contact with the purified urease showed hypertrophy in mucussecretor cells and intestinal metaplasia. This study contributes to clarify the role of plant and bacteria ureases.

# **1. INTRODUÇÃO**

*“A soja pode ser uma alternativa viável na luta contra a fome, principalmente em países com deficiência nutricional, se aliada a estratégias governamentais que levem em conta a contribuição de produtos alimentícios locais”.*

Estas palavras foram pronunciadas pelo secretário intergovernamental da FAO, Dr. Peter Thoenes, na VI Conferência Mundial de Pesquisa de Soja, IV Conferência Internacional de Processamento e Utilização de Soja e III Congresso Brasileiro de Soja, realizados em Foz do Iguaçu (PR), em 2004 (BESSA, 2004).

Dentre as leguminosas, a soja recebe atenção especial, por possuir alto conteúdo protéico e óleo de boa qualidade. Embora a semente de soja possua elevado teor de proteínas, estas não são totalmente aproveitadas pelo organismo, devido ao fato de que algumas delas possuem fatores antinutricionais e/ou tóxicos que interferem na digestão e absorção dos nutrientes. Dentre estes, destacam-se os inibidores de tripsina (SBTI) e a aglutinina de soja (SBA), as duas proteínas antinutricionais mais conhecidas e estudadas em soja até a presente data. Todavia, há relatos na literatura de que outras proteínas, além das aqui citadas, devem contribuir para os efeitos deletérios oriundos da utilização da soja *in natura* ou indevidamente processada. Na tentativa de contribuir com maiores informações a este respeito, estudos foram conduzidos por nossa equipe, sendo avaliados os teores de SBTI, SBA e, também, de outros constituintes, tais como neurotoxinas (soyatoxina e toxina da soja) e urease, em diferentes genótipos de soja adaptados às condições de plantio da região Nordeste do Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 1997). Nestes trabalhos, foi verificado que os genótipos estudados possuíam conteúdos variados de tais proteínas. Então, nossa equipe visando dar uma maior contribuição aos estudos com a soja, selecionou genótipos contendo teores diferenciados das proteínas analisadas, cujas farinhas foram utilizados como fonte de proteínas em dietas para ratos em crescimento (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Nesta investigação, um modelo estatístico foi utilizado que correlacionava a ingestão de tais constituintes protéicos presentes na farinha de soja com os efeitos observados. As análises mostraram que todos os compostos protéicos estudados (SBTI, SBA, urease e neurotoxinas) interferiram não somente no desenvolvimento dos animais, mas, também, nas dimensões de seus órgãos. Ainda que o experimento tenha sido realizado com a farinha e não com proteínas purificadas, os dados obtidos sugeriram efeitos

antinutricionais e/ou tóxicos para a urease presente em sementes de soja. Resultados semelhantes foram obtidos, posteriormente, por nosso grupo, quando ao invés de ratos em crescimento foram utilizados frangos de corte como modelo experimental (CAMPELLO, 2003).

Os dados apresentados e o fato de que, em geral, as ureases apresentam alta similaridade ( $\geq 50\%$ ) em suas seqüências de aminoácidos nos motivaram a avaliar os efeitos antinutricionais e/ou tóxicos da urease de soja, utilizando como modelo experimental ratos. Um dos questionamentos feitos foi se a urease de soja teria ação similar às ureases bacterianas. Ureases bacterianas causam efeitos deletérios no organismo (BICHLER *et al.*, 2002). Como exemplo, a urease de *Helicobacter pylori*, principal causadora de gastrite e úlcera gástrica em humanos, sendo essa proteína um importante fator responsável pela colonização da bactéria no estômago (HARRIS *et al.*, 1996; KEARNEY *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2007). Se efeitos similares ou relacionados aos descritos fossem verificados com a urease purificada da soja, esse trabalho contribuiria com novos conhecimentos acerca de suas funções, abrindo outras perspectivas, já que o principal papel atribuído a essa proteína tem sido o de permitir à planta o uso de uréia como fonte de nitrogênio (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; MOBLEY *et al.*, 1995).

Em consonância com o exposto, a seguinte hipótese foi formulada:

*“Além da função de prover nitrogênio para a planta, a urease de soja constitui-se em um fator antinutricional e/ou tóxico para animais superiores, quando administrada por via oral. É possível que o seu mecanismo de ação esteja relacionado ao proposto para ureases bacterianas, particularmente Helicobacter pylori.”*

Para testar a hipótese apresentada, vários estudos foram conduzidos, usando farinha de genótipos de soja contendo teores diferenciados de urease, assim como urease purificada de suas sementes.

## **2. REVISÃO DE** **LITERATURA**

## 2.1. Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]

A soja é oriunda do leste da Ásia, mais precisamente das regiões central e oeste da China, cujos primeiros relatos de sua existência datam de 2838 a.C., sendo considerada o mais importante legume cultivado e um dos “Wu Ku” ou cinco grãos sagrados (soja, arroz, trigo, cevada e milho). Essa leguminosa permaneceu no Oriente por dois milênios, atingindo o Ocidente entre os séculos XV e XVI, conservando-se por quatro séculos como uma simples curiosidade. Somente a partir do século XX começou a sua expansão, sendo, atualmente, considerada a mais importante oleaginosa em produção no mundo sob cultivo extensivo (COSTA, 1996; ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2000).

A primeira notícia sobre o plantio de soja no Brasil ocorreu em 1882 e foi dada por Gustavo D’Utra, professor da Escola Agrícola da Bahia. Em 1908, imigrantes japoneses iniciaram o cultivo em pequenas hortas em São Paulo, a partir de sementes trazidas em suas bagagens. Em 1936, teve início sua comercialização em Giruá-RS. Por esta época, também se iniciava o melhoramento da soja na antiga seção de cereais e leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas (COSTA, 1996; ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2000). Em 1950, a soja foi introduzida na alimentação de suínos e, a partir de 1957, devido às frustrações com a lavoura de trigo, passou a ser cultivada como sustentação da economia regional e de milhares de famílias rurais. Daí em diante, esta cultura começou a ocupar grandes áreas, primeiramente no Rio Grande do Sul, espalhando-se por Santa Catarina, Paraná, São Paulo e outros Estados do País (ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2000).

Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial de soja, vindo atrás somente dos Estados Unidos, com produção crescente a cada ano, mesmo com as adversidades climáticas e governamentais. Os principais estados produtores de soja são o Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Bahia. A soja, atualmente, é uma das culturas que está sendo geneticamente modificada em larga escala no mundo todo (ZHOU *et al.*, 2007), atingindo cerca de 80% de toda a produção. O principal produto da soja é o óleo, sendo bastante utilizado na alimentação humana e animal, com produção mundial estimada para 2006/07 de 58,4 milhões de toneladas (EMBRAPA-SOJA, 2008). Outros produtos derivados da soja são farinha, sabão,

cosméticos, resinas, tintas, solventes e biodiesel (ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2005).

## 2.2. Aspectos Nutricionais

A soja é uma leguminosa considerada de elevada qualidade nutricional, sendo esta uma das razões pelas quais ela, por muitos anos, vem sendo objeto de estudo em pesquisas que buscam uma alimentação mais saudável. Sua composição química varia com o país de origem, devido às condições de desenvolvimento, variedades genéticas e processamento (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2006). Sua elevada qualidade nutricional esta relacionada ao seu elevado conteúdo de proteína e óleo, sendo, assim, bastante utilizada pelas indústrias, já que estes representam os ingredientes mais importantes na produção de rações. O óleo de soja possui características que o tornam mais saudável do que os óleos de amendoim e do caroço de algodão. Após a retirada do óleo, a farinha da semente de soja chega a conter 40 a 45% de proteínas, constituindo-se num ingrediente alimentar bem versátil, de baixo custo e alta qualidade nutricional, já que na sua composição encontra-se conteúdo de aminoácidos próximo aos de proteínas de origem animal (SGARBIERI, 1996; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Apesar de todas as considerações feitas acima, o valor nutricional das sementes de soja é menor do que o esperado! Isso é atribuído, em parte, à presença de compostos que impedem o total aproveitamento de seus nutrientes. Tais substâncias são conhecidas como fatores antinutricionais, os quais incluem as lectinas, inibidores de proteases, taninos e outros. Recentemente, outros fatores protéicos foram destacados como possuidores de propriedades antinutricionais e/ou tóxicas, tais como as neurotoxinas soyatoxina (SYTX) e toxina da soja (SBTX) e as ureases (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Alguns dos fatores citados, particularmente os de origem protéica, podem ser inativados termicamente ou removidos da farinha de soja dependendo das condições utilizadas (OLGUIN *et al.*, 2003; BAJPAI *et al.*, 2005; GUILLAMON *et al.*, 2008).

A seguir, será feito um breve relato das propriedades que caracterizam uma proteína ser antinutricional ou tóxica. Além disso, informações serão dadas sobre as principais proteínas de soja com propriedades antinutricionais e/ou tóxicas.

### 2.3. Proteínas Antinutricionais e/ou Tóxicas em Soja

Proteínas antinutricionais são aquelas que agem diminuindo a eficiência do metabolismo, interferindo na utilização dos nutrientes. Já as proteínas tóxicas agem de forma aguda, produzindo lesões nos órgãos e tecidos e alterações fisiológicas diversas que podem, inclusive, causar a morte (SGARBIERI, 1996).

As principais proteínas antinutricionais e/ou tóxicas encontradas em sementes de soja incluem a aglutinina, inibidores de tripsina, neurotoxinas e ureases.

#### *Agglutinina da soja (SBA)*

Lectinas são proteínas que possuem, pelo menos, um domínio não-catalítico, capazes de se ligar, reversivelmente, a mono- ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). De acordo com esses autores, as lectinas podem ser classificadas em: 1) Merolectinas, aquelas proteínas que apresentam, exclusivamente, um único sítio de ligação a carboidratos; 2) Hololectinas, aquelas proteínas que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, sendo consideradas verdadeiras aglutininas, compreendendo a maioria das lectinas de plantas; 3) Quimerolectinas, aquelas que contêm um ou mais domínios de ligação a carboidratos e, ainda, um outro domínio com atividade catalítica que atua independentemente, incluindo quitinases e RIPs tipo 2 e 4) Superlectinas, podendo ser consideradas um grupo especial de quimerolectinas. Estas últimas são proteínas que contêm, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidrato, os quais são estruturalmente distintos, reconhecendo carboidratos diferentes. Um exemplo da ocorrência da superlectina

foi detectado no bulbo da tulipa TxLCI, consistindo de uma molécula com domínios distintos ligantes a manose e a *N*-acetil-D-galactose (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Algumas lectinas são proteínas consideradas altamente tóxicas e/ou antinutricionais, e muito dos aspectos de seu mecanismo de ação já estão bem elucidados. Esta propriedade deletéria está vinculada à sua resistência a proteólise durante sua passagem pelo trato digestório, interferindo no aproveitamento dos nutrientes (PEUMANS e VAN DAMME, 1996; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Ademais, lectinas podem se ligar nas microvilosidades das células do epitélio intestinal, chegando, muitas vezes, a causar ruptura de membranas e degradação de microvilos, acarretando lesão no epitélio e diminuição da camada de muco que protege o tecido epitelial do intestino delgado, principalmente duodeno e jejuno. Algumas lectinas podem, ainda, ser internalizadas nos enterócitos, atingir o sistema circulatório e, então, atuar de modo sistêmico, causando diversas alterações metabólicas (REDDY e PIERSON, 1994; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

A aglutinina de soja (SBA) é uma glicoproteína que se liga fortemente a *N*-acetil-D-galactosamina, podendo se ligar mais fracamente a D-galactose. Sua massa molecular é de 120 kDa, sendo um tetrâmero composto de subunidades idênticas, com dois sítios de ligação a *N*-acetil-D-galactosamina. Quando administrada por via oral, grande parte da SBA resiste à passagem pelo estômago e intestino. No intestino delgado proximal, liga-se às células epiteliais, podendo ser absorvida pelos enterócitos, liberada na lâmina própria e, subsequentemente, alcançar a circulação. A presença de SBA na dieta causa retardo no crescimento, devido à diminuição na ingestão da dieta, às elevadas perdas de nitrogênio e matéria seca fecal, assim como, redução do nitrogênio corporal (GRANT, 1989). A SBA presente na dieta também causa ruptura do epitélio do intestino delgado, induzindo hipertrofia desse órgão, como resultado da hiperplasia das células da cripta. Estes eventos parecem ser mediados por poliaminas e hormônios gastrointestinais, como também por fatores de crescimento celular (PUSZTAI e BARDOCZ, 1995). Também são observadas alterações celulares (hipertrofia e hiperplasia) no pâncreas provocadas pela SBA, como consequência de uma provável liberação de colecistocinina (CCK) (HERZIG *et al.*, 1997; SHIYAN *et al.*, 2003).

*Inibidores de tripsina (SBTI)*

Os inibidores de tripsina de soja estão entre os mais estudados fatores antinutricionais encontrados nos vegetais, sendo conhecidos como inibidores de Kunitz e de Bowman-Birk (LIENER, 1994; REDDY e PIERSON, 1994).

Os inibidores de Bowman-Birk apresentam massa molecular em torno de 7 a 10 kDa, sítios de ligação separados e independentes para tripsina (Lys 16 e Ser 17) e quimiotripsina (Leu 43 e Ser 44) funcionando simultaneamente, ausência ou baixas concentrações de glicina e triptofano, altos teores de cisteína formando 7 a 9 pontes dissulfeto, e resistência à desnaturação térmica e química (BAU *et al.*, 1997; KENNEDY, 1998). Os inibidores de Kunitz apresentam massa molecular em torno de 21 kDa, um sítio de ligação com alta especificidade para tripsina (Arg 63 e Ile 64), quatro resíduos de cisteína (cerca de 2% do total), formando duas pontes dissulfeto, e menor resistência térmica, quando comparados aos inibidores de Bowman-Birk, podendo ser inativados pelo calor, por condições ácidas e pepsina (LE GUEN e BIRK, 1993; SONG e SUH, 1998; VALUEVA e MOSOLOV, 1999).

Do ponto de vista nutricional, os SBTI são capazes de reduzir ou impedir a digestão de nutrientes e afetar o metabolismo corpóreo, o crescimento e a saúde (LIENER, 1994; VALUEVA e MOSOLOV, 1999; GLADYSHEVA *et al.*, 2000). A sua ação prevalece nas regiões proximais do intestino delgado, mas pode envolver indiretamente as células epiteliais intestinais, incluindo células endócrinas. Esta ação leva à secreção de peptídeos regulatórios e hormônios, que induzem a secreção e o crescimento de órgãos e podem, também, afetar outros aspectos do metabolismo corporal, como a eliminação do nitrogênio endógeno através do intestino (GRANT, 1999). O pâncreas é geralmente o órgão mais afetado pela presença de SBTI na dieta (FRIEDMAN e BRANDON, 2001). Os danos causados a este órgão envolvem a ação da CCK. A secreção deste hormônio gastrointestinal, produzido pelas células endócrinas do jejuno, é regulada por peptídeos específicos, produzidos no duodeno, susceptíveis à degradação catalisada pela tripsina. Com a inibição da tripsina e quimiotripsina, a digestão das proteínas fica comprometida, como também a degradação do peptídeo liberador da CCK (“feedback” negativo). Altas quantidades deste peptídeo se ligam a células endócrinas no jejuno e induzem uma rápida e

prolongada liberação de CCK na circulação. Como consequência, ocorre uma hipersecreção de enzimas e hipertrofia pancreática (REDDY e PIERSON, 1994; LIDDLE, 1997).

Estudos recentes tentam não somente remover, mas também recuperar o inibidor de tripsina e a lectina da farinha de soja, sem perder a qualidade protéica, seja por utilizar novas metodologias, seja por eliminação genética, produzindo, assim, sementes de soja sem a presença destes fatores comprovadamente antinutricionais (MORAES *et al.*, 2006; KANSAL *et al.*, 2006).

#### *Neurotoxinas (soyatoxina, SYTX; toxina da soja, SBTX)*

Toxinas vegetais com ação sobre o sistema nervoso são também encontradas na soja, as quais podem ser representadas pela SYTX e SBTX.

A SYTX (DL<sub>50</sub> 7-8 mg/Kg de peso corpóreo) é uma proteína ácida de cadeia única, possuindo Mr em torno de 21 kDa (VASCONCELOS *et al.*, 1994). Já a SBTX (DL<sub>50</sub> 6 mg/Kg de peso corpóreo) trata-se de uma proteína dimérica de massa molecular de 44 kDa, composta por duas subunidades distintas, uma de 27 kDa e outra de 17,0 kDa (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Ambas toxinas, quando administradas por via i.p. a camundongos e ratos, são capazes de induzir uma série de sintomas caracterizados por dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas, precedendo a morte do animal. Em decorrência dessa sintomatologia, tais toxinas foram classificadas como neurotoxinas. Além dos efeitos verificados em mamíferos, a SBTX apresentou atividades sobre outros modelos experimentais, tendo sido capaz de inibir o crescimento do fungo *Cercospora sojina* e de exercer efeitos tóxicos aos insetos *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus*, sugerindo ser a SBTX uma proteína envolvida na defesa da planta contra seus agressores (SIEBRA, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2008). Em adição, quando feita uma avaliação nutricional de genótipos de soja contendo teores diferenciados destas toxinas, onde estes foram utilizados como fonte de proteínas em dietas experimentais para ratos em crescimento, foi verificado, com auxílio de um modelo estatístico, que alguns dos efeitos observados apresentavam correlação com as quantidades de SYTX e SBTX ingeridas. Dentre as alterações detectadas, ressaltam-se os efeitos tóxicos bastante severos sobre o

pâncreas dos ratos (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

### *Ureases*

Urease (uréia amidohidrolase, EC 3.5.1.5) é uma metaloenzima, dependente de níquel, que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. A hidrólise de uma molécula de uréia resulta na liberação de duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (SIRKO e BRODZIK, 2000; KARMALI *et al.*, 2004).

Urease já foi detectada em muitos organismos, por exemplo, em plantas, bactérias, fungos e invertebrados (SIRKO e BRODZIK, 2000; BICHLER *et al.*, 2002). Nas plantas, esta enzima predomina nas sementes. Porém, ela já foi detectada em folhas, sendo até mesmo possível que esteja difundida em toda a planta, embora em baixos níveis de atividade (POLACCO e HAVIR, 1979; HORGAN, 1983; HIRAYAMA *et al.*, 2000).

Várias ureases de sementes de leguminosas foram purificadas e caracterizadas. As melhores informações genéticas de ureases de plantas são oriundas daquelas encontradas nas sementes de soja (POLACCO e HOLLAND, 1993; 1994). Nesta leguminosa, foram identificados genes que codificam duas isoenzimas de urease, uma ubíqua e a outra dita ser embrião-específica, ambas altamente homólogas entre si (MEYER-BOTHLING e POLACCO, 1987; TORISKY *et al.*, 1994). A urease específica do embrião, com maior atividade específica (1 mol/min.mg) é uma proteína abundante, sintetizada exclusivamente em embriões em desenvolvimento. Entretanto, raízes de planta de soja jovem retêm considerável teor de urease embrião-específica derivada do eixo embrionário, bem como os cotilédones da semente madura (POLACCO e HOLLAND, 1994). A urease ubíqua, também chamada tecido-específica, possui baixa atividade específica ( $10^{-3}$  mol/min.mg) e é sintetizada em todos os órgãos, mas parece ser mais ativa em tecidos jovens (HORGAN, 1983). Cada isoenzima de urease parece ser codificada por um único gene estrutural; *Eu1* e *Eu4* para a urease embrião-específica e ubíqua, respectivamente. Mutações em cada um dos genes afetam somente uma das isoenzimas (MEYER-BOTHLING e POLACCO, 1987; POLACCO *et al.*, 1989).

Em relação à estrutura, as ureases de plantas e fungos são proteínas homooligoméricas, enquanto as de bactérias são multiméricas, formadas de duas ou três subunidades distintas (MOBLEY *et al.*, 1995; TANGE e NIWA, 1997). Seqüências de aminoácidos revelam que todas as ureases conhecidas são altamente similares ( $\geq 50\%$ ), embora nas diferentes espécies possam ser encontradas enzimas constituídas por uma, duas ou três cadeias polipeptídicas distintas. Com base na seqüência similar e reação cinética, acredita-se que as ureases tenham estrutura e mecanismo catalítico comuns (KARPLUS *et al.*, 1997; SIRKO e BRODZIK, 2000). Ureases de sementes de feijão-de-porco, soja e muitas bactérias têm pH ótimo entre 7-8, enquanto que o pH ótimo de ureases de fungos está entre 8-8,5. Urease de folhas de soja possui dois valores ótimos de pH, 5,3 e 8,8 (MOBLEY e HAUSINGER, 1989). Já a urease de folhas de amora tem atividade ótima em pH entre 6-10 (HIRAYAMA *et al.*, 2000).

O principal papel das ureases está em permitir ao organismo o uso de uréia como fonte de nitrogênio (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; MOBLEY *et al.*, 1995). Em plantas, quantidades significativas de nitrogênio são translocados na forma da uréia. Este composto deriva de arginina e, possivelmente, da degradação de purinas e ureídeos. A urease ubíqua é responsável por reciclar metabolicamente derivados de uréia. As ureases possuem, também, papel importante na germinação e metabolismo de nitrogênio em plântulas. Elas podem funcionar coordenadamente com a arginase, na utilização de reservas de proteínas das sementes durante a germinação (POLACCO e HOLLAND, 1993).

Recentes estudos têm mostrado que as ureases exercem ação deletéria frente a pragas e patógenos, sugerindo sua participação no mecanismo de defesa da planta (POLACCO e HOLLAND, 1994; CARLINI e GROSSI DE SÁ, 2002; BECKER-RITT *et al.*, 2007; FOLLMER, 2008). Follmer e Colaboradores (2004), avaliando o potencial inseticida em *D. peruvianus*, das ureases de origem vegetal (*Canavalia ensiformis* e *G. max*) e de origem bacteriana (*Bacillus pasteurii*) demonstraram que somente as ureases vegetais apresentaram toxicidade sobre o modelo avaliado, reduzindo o ganho de massa corpórea e retardamento no desenvolvimento do estágio de ninfas para insetos adultos. Este efeito inseticida não foi afetado mesmo após tratamento com *p*-hidroximercuribenzoato, um quelante de metais, bloqueador do sítio ativo, indicando que esta propriedade é independente da atividade ureolítica da proteína. Corroborando com a função de defesa, a

urease embrião-específica de soja, além de sua atividade inseticida, foi capaz de inibir o crescimento de hifas do fungo *Fusarium solani* e a esporulação dos fungos *Penicillium herguei*, *Curvularia lunata*, *Trichoderma sp*, *T. pseudokomingii* e *T. viride* (MARTINELLI, 2004). Extratos protéicos obtidos a partir de folhas de tabaco transgênico, expressando a urease ubíqua de soja, também foram capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos *Penicillium sp*, *T. citrinoviride* e *C. lunata* (BECKER-RITT *et al.*, 2005).

Com respeito à possível ação antinutricional das ureases presentes em sementes de soja, há poucos relatos na literatura, sendo estes provenientes do nosso grupo de trabalho. Vasconcelos e colaboradores (2001) demonstraram que as ureases presentes em farinha de sementes de soja foram capazes de influenciar, negativamente, o consumo de alimentos e o ganho de peso de ratos, afetando de forma significativa os valores relativos à Utilização Líquida da Proteína (NPU), digestibilidade e peso relativo de órgãos internos. Quando o modelo experimental foi mudado de ratos para frangos de corte, num experimento semelhante, novamente as ureases de soja se sobressaíram como uma proteína antinutricional e/ou tóxica. Todavia, as alterações aqui enfatizadas foram verificadas quando as dietas foram formuladas com farinha das sementes contendo diferentes teores de ureases. Até o presente momento, não havia sido realizado qualquer experimento utilizando urease purificada de sementes quiescentes de soja, de modo a se ter certeza de que os efeitos observados resultam de suas ações sobre os organismos consumidores.

A ação tóxica das ureases bacterianas é bem fundamentada. Por exemplo, urease de *Helicobacter pylori* é um dos principais fatores responsáveis pela colonização da bactéria, já que com a hidrólise da uréia, a liberação da amônia eleva o pH estomacal, permitindo o estabelecimento deste microorganismo. Ulcerações na mucosa gástrica têm sido provocadas por ureases bacterianas, cujos mecanismos de ação envolvem efeito direto da amônia, tida como um composto tóxico, e um outro indireto, originário da prevenção do fluxo de prótons a partir das glândulas gástricas para a luz estomacal, resultando em uma retrodifusão destes prótons (HAZELL e LEE, 1986; MOBLEY, 2000; STINGL e REUSE, 2005). Recentemente, Suto *et al.* (2001) mostraram que a urease de *H. pylori* e de outras bactérias intestinais causam elevações nos níveis de amônia sanguínea em esquilos com cirrose hepática.

Dada a alta similaridade nas seqüências de aminoácidos das ureases, independentemente da espécie da qual ela foi purificada, é possível que as ureases de sementes de soja possam ter ação antinutricional e/ou tóxica.

#### 2.4. Parâmetros Utilizados na Avaliação do Valor Nutricional Das Proteínas

A determinação química das quantidades de nutrientes indispensáveis na dieta é muito valiosa. Porém, ela não é suficiente para caracterizar o valor nutritivo de um alimento. Isto porque, na maioria dos casos, outros nutrientes, embora presentes nos alimentos, não se tornam totalmente disponíveis ao organismo após sua passagem pelo trato digestório (SGARBIERI, 1996). A qualidade da proteína, também conhecida como valor nutricional, depende de seu conteúdo em aminoácidos, da utilização dos aminoácidos após a digestão, absorção e taxa mínima obrigatória de oxidação e, ainda, da proporção dos aminoácidos para síntese protéica (FRIEDMAN, 1996).

Alguns índices, baseados em determinações químicas, são usados na avaliação das proteínas, porque estabelecem certas correlações entre a composição da proteína e seu valor nutritivo. Estes índices são obtidos através de ensaios biológicos e químicos.

##### *Digestibilidade*

É a medida da percentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado (TAGLE, 1981; SGARBIERI, 1996). Sua avaliação “in vivo” é feita calculando-se a razão percentual entre o nitrogênio absorvido e o nitrogênio ingerido na dieta. Pode ser calculada de uma forma simplificada, denominada digestibilidade aparente (Da), expressa como:

$$Da = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fecal}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

Entretanto, esta forma de estimativa incorre em erros pelo fato de que nem todo nitrogênio presente nas fezes corresponde a resíduos alimentares ingeridos. Uma fração deste nitrogênio fecal provém de células epiteliais descamadas, muco, enzimas, corpos celulares microbianos etc. que constituem o chamado Nitrogênio Fecal Metabólico. Se este valor não for deduzido do teor encontrado nas fezes, a percentagem de nitrogênio absorvida será subestimada. A correção é feita pelo cálculo da digestibilidade real ou verdadeira (Dv):

$$Dv = \frac{N_{\text{ingerido}} - (N_{\text{fecal}} + N_{\text{fecal metabólico}})}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

#### *Utilização Líquida da Proteína (NPU)*

Consiste em medir a percentagem do nitrogênio ingerido ( $N_{\text{ingerido}}$ ) que foi retido no organismo ( $N_{\text{retido}}$ ). Este índice é calculado pela relação entre o nitrogênio corporal de ratos alimentados com a dieta teste ( $N_{\text{teste}}$ ) e aquele de ratos alimentados com a dieta isenta de proteína ( $N_{\text{isento}}$ ) (TAGLE, 1981; MAHAN E ESCOTT-STUMP, 1998).

$$NPU = \frac{N_{\text{teste}} - N_{\text{isento}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

*Valor Biológico (VB)*

O valor biológico expressa a fração do nitrogênio absorvido ( $N_{\text{absorvido}}$ ) que ficou retido no animal ( $N_{\text{retido}}$ ).

$$VB = \frac{N_{\text{retido}}}{N_{\text{absorvido}}} \times 100$$

A determinação do valor biológico de uma proteína é um dos métodos mais antigos e perfeitos. Quanto menor o valor biológico, maior a quantidade de proteína necessária para alcançar o equilíbrio nitrogenado (MAIA, 1998; MAHAN E ESCOTT-STUMP, 1998).

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. Geral

Avaliar se a urease de soja se constitui num fator antinutricional e/ou tóxico para ratos e contribuir para um maior conhecimento de sua participação na defesa química, uma função recentemente proposta para essa proteína.

### 3.2. Específicos

1. Selecionar genótipos de soja para serem utilizados em ensaios biológicos e na purificação da urease;
2. Purificar e avaliar o grau de pureza da urease obtida de sementes de soja, através da determinação da massa molecular e da seqüência NH<sub>2</sub>-terminal;
3. Fazer avaliação “in vitro” dos efeitos da pepsina sobre a urease, através de eletroforese em gel de poliacrilamida e determinação da atividade ureásica residual;
4. Avaliar a qualidade nutricional de sementes de genótipos de soja contendo teores diferenciados de urease, através da análise do desempenho dos animais (ratos), de alterações nos órgãos internos e da bioquímica do sangue;
5. Avaliar os efeitos agudos da urease purificada até 24 horas após sua administração, em dose única (1000 U), por via oral a ratos, observando a taxa de mortalidade e o surgimento de alterações na mucosa gástrica dos animais;
6. Determinar o pH e o número de equivalentes ácidos no conteúdo estomacal de ratos até 4 horas após administração de urease purificada, em dose única (1000 U), por via oral.

## **4. MATERIAIS**

#### 4.1. Sementes

Sementes quiescentes de soja [*Glycine max* (L) Merrill], genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209, foram fornecidas pela Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda (COODETEC), Cascavel, Paraná.

#### 4.2. Eritrócitos

Eritrócitos utilizados nos ensaios de hemaglutinação foram obtidos a partir de amostras de sangue de coelho albino adulto (linhagem Nova Zelândia), mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 4.3. Animais de Experimentação

Ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, e camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram provenientes de colônias do Biotério Central da UFC.

#### 4.4. Reagentes Químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA), anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, *N*- $\alpha$ -benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), concentrado protéico “egg white” (clara de ovo), “Coomassie Brilliant Blue” G e R, ditioneitol (DTT), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (tipo I-S),

*N,N,N',N'*-tetrametiletanolamina (TEMED), membranas de difluoreto polivinilideno (PVDF), nitroazul tetrazolio (NBT), tripsina, triptofano, urease e marcadores de massa molecular para eletroforese foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

2-mercaptoetanol (2-ME) e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

As matrizes cromatográficas foram adquiridas da GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## **5. MÉTODOS**

## 5.1. Preparação da Farinha dos Genótipos de Soja

### 5.1.1. Obtenção da Farinha

Sementes quiescentes íntegras dos diferentes genótipos de soja (CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209) foram, primeiramente, trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho para café, até obtenção de uma farinha fina. As farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

### 5.1.2. Delipidação da Farinha

Amostras das farinhas dos diferentes genótipos foram delipidadas com éter de petróleo, na proporção de 1:10 (p/v), sob exaustão de capela à temperatura ambiente, até a completa remoção dos lipídios. As farinhas delipidadas foram deixadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, até a evaporação total do solvente. Uma vez delipidadas, as farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

## 5.2. Composição Química Elementar

### 5.2.1. Determinação de Umidade

Frascos secos, a 100 °C, e tarados, contendo aproximadamente 0,5 g de farinha dos diferentes genótipos de soja, foram colocados em estufa com circulação de ar forçada a 100 °C, por 24 horas. Decorrido esse tempo, os frascos contendo as amostras foram transferidos

para um dessecador e mantidos até que atingissem a temperatura ambiente (24 °C) sendo, então, pesados. Após pesagem, os frascos contendo as amostras retornaram à estufa e o processo foi repetido para verificação da constância do peso. O teor de umidade foi determinado através da diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo esse valor expresso em percentagem do peso original.

### 5.2.2. Determinação de Cinzas

Cadinhos de porcelana previamente aquecidos a 105 °C por 1 hora, resfriados e tarados, contendo cerca de 2 g de farinha de soja dos diferentes genótipos, foram colocados em mufla a 600 °C, por 4 horas, para incineração da matéria orgânica. Em seguida, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até que atingissem a temperatura ambiente e pesados. O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo o conteúdo expresso em percentagem.

### 5.2.3. Determinação da Fibra Bruta

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com a AOAC, 1980. Amostras da farinha dos genótipos estudados (2 g) foram colocadas em recipientes de refluxação do aparelho digestor (Sistema de Fibra Bruta/Modelo TR 146/8-50 e TE 146/5-50) juntamente com 100 mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,25% e submetidas à fervura por 30 minutos, contados a partir do ponto de ebulição. Concluída a digestão ácida, procedeu-se a filtração com a haste de tela (200 – 400 mesh), lavando a tela com água destilada fervente sobre os resíduos. O material retido na tela foi removido com uma solução de NaOH a 1,25% previamente aquecida (100 mL). O material foi novamente colocado no aparelho digestor e submetido à fervura por mais 30 minutos. Concluída a digestão alcalina, o resíduo da hidrólise (água, fibra e minerais) foi filtrado em cadinho poroso adaptado a um recipiente

acoplado a uma bomba de vácuo. O resíduo sólido final foi lavado com álcool absoluto (20 mL) e, posteriormente, com éter etílico (10 mL) a fim de facilitar a secagem. Os cadinhos foram, então, colocados em estufa com circulação forçada de ar por 12 horas a 105 °C. Em seguida, os recipientes foram transferidos para dessecador e pesados. Essa pesagem forneceu o peso do material que constava de fibras e minerais. O passo seguinte foi uma calcinação em mufla a 500 °C, durante 4 horas. Nesta etapa, toda fibra foi oxidada, restando apenas minerais. O valor referente à fibra bruta foi obtido pela diferença entre o peso do resíduo das digestões antes da calcinação e o resíduo mineral final, sendo o resultado expresso como percentagem do peso seco da farinha das sementes.

#### 5.2.4. Determinação do Teor de Proteína Total

O teor de proteína total das farinhas dos genótipos de soja estudados foi determinado pelo método de Kjeldahl, adaptado para medida do nitrogênio através do ensaio colorimétrico descrito por Baethgen e Alley (1989). Balões de mineralização, contendo em torno de 0,5 g das farinhas, 5,0 g de catalisador ( $K_2SO_4$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  e selênio, na proporção de 100:10:1) e 25 mL de  $H_2SO_4$  concentrado foram colocados no digestor, para a completa digestão das amostras. As amostras digeridas foram diluídas para 200 mL em água grau milli-Q. Alíquotas desse material foram utilizadas para determinação do teor de nitrogênio total, através de ensaio colorimétrico, sendo as leituras das absorbâncias feitas a 650 nm. O teor de nitrogênio foi determinado utilizando-se uma curva obtida com sulfato de amônio. A proteína total foi determinada através da multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

#### 5.2.5. Determinação do Teor de Lipídios Totais

Os lipídios totais foram determinados conforme a técnica descrita pela AOAC (1980), usando-se n-hexano como solvente. Cartuchos de papel de filtro, contendo cerca de 2 g de farinha dos genótipos de soja avaliados, foram colocados em contato com n-hexano por 8 horas, em extratores de Soxhlet acoplados a balões previamente desengordurados, secos e tarados. Em seguida, o solvente foi evaporado em banho-maria a 70 °C e os balões foram levados para estufa a 105 °C durante 1 hora e, então, resfriados até a temperatura ambiente e pesados. Esse procedimento foi repetido até obtenção de pesos constantes. Os lipídios totais foram calculados pela diferença dos pesos inicial e final dos balões, sendo os valores expressos em percentagem do peso seco das amostras.

### 5.3. Extração e Determinação de Proteína

Para extração das proteínas, farinha delipidada dos genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209 foi posta em contato com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, na proporção de 1:4 (p/v), contendo EDTA 0,001 M, 2-mercaptoetanol 0,005 M, deixada sob agitação contínua por 1 h, 4 °C, sendo, em seguida, filtrada em pano de trama fina. O filtrado foi centrifugado a 30.000 x g, 20 minutos, 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido denominado de Extrato Total.

Para determinação do teor de proteínas, foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras das absorbâncias a 595 nm (espectrofotômetro tipo Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments). A concentração protéica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de BSA.

#### 5.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) das Farinhas dos Genótipos de Soja

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 16,5 x 18,5 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 15% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. As amostras (4 mg de farinha/mL) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, na presença de 1% de 2-mercaptoetanol e 20% de glicerol, colocadas 30 minutos sob agitação e então centrifugadas 13.000 x g, por 10 minutos. As amostras foram aquecidas a 100 °C, durante 10 minutos, e centrifugadas a 10.000 x g (centrífuga “Eppendorf” 541 7R), por 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foi acrescentado azul de bromofenol, a fim de permitir visualização da corrida eletroforética. Aliquotas encerrando 40 µL foram aplicadas por poço e a corrida conduzida a corrente constante de 20 mA, durante aproximadamente 4 horas. As bandas protéicas foram visualizadas por coloração com “Coomassie Brilliant Blue R”. Como marcadores de massa molecular foram usados: albumina sérica bovina (67,0 kDa); albumina do ovo (45,0 kDa); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa); anidrase carbônica bovina (29,0 kDa); tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa); inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa). A massa molecular aparente da proteína de interesse foi estimada a partir de uma curva padrão construída com os Rfs dos diferentes marcadores de massa molecular utilizados.

#### 5.5. Deteção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais

##### 5.5.1. Urease

Farinha delipidada dos diferentes genótipos de soja foi colocada em contato com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,001 M, 2-mercaptoetanol 0,002 M, na proporção de 1:4 (p/v) (FOLLMER *et al.*, 2004a). A suspensão foi deixada sob agitação contínua por 1 hora, 4 °C, sendo, em seguida, centrifugada a 13.000 x g, 20 minutos, 4 °C. A determinação da atividade ureásica foi feita como descrito por Kaplan (1969), com algumas modificações. Alíquota de 0,1 mL de uma solução de uréia 0,5 M foi misturada com 0,7 mL de EDTA 2%, tamponado com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5. Após adição da amostra (0,2 mL), a mistura foi incubada a 37 °C, por 15 minutos. A seguir, foi adicionado a essa mistura 1 mL da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitroprussiato de sódio/L) e 1 mL da solução B (43 mL de hipoclorito de sódio 5,25% + 20 g de hidróxido de sódio/L), sendo, então, deixada a 37 °C, por 5 minutos. Passado esse tempo, foram adicionados 7 mL de água grau milli-Q aos tubos, sendo estes cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação a uma curva obtida com urease comercial (Sigma 41H7008 - 870.000 U/g).

### 5.5.2. Inibidor de Tripsina

A dosagem dos inibidores de tripsina foi realizada seguindo-se a técnica originalmente descrita por Kakade com algumas modificações (HAMERSTRAND *et al.*, 1981). Amostras de 0,02 g foram suspensas em 1 mL de NaOH 0,01 N, mantidas sob agitação constante por 3 horas à temperatura ambiente e, em seguida, colocadas em repouso por 30 minutos. Após este período, os extratos foram centrifugados a 15.000 x g, por 5 minutos. Após centrifugação, alíquotas de 0,1 mL das amostras foram incubadas, por 45 minutos, a 37 °C, num meio de reação que consistia de 1,6 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, 0,1 mL de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 mL de HCl 0,001 N) e 0,1 mL do substrato BAPNA. A reação foi interrompida com ácido acético a 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. Os resultados foram calculados levando-se

em conta a curva obtida com inibidor de tripsina de soja (padrão) e expressos como quantidade (mg) de tripsina inibida por grama de farinha.

Para dissolução de 10 mg do BAPNA foi usado, primeiramente, 0,5 mL de dimetilsulfóxido que, por sua vez, foi agitado vigorosamente em “vortex” até a completa dissolução do substrato. Em seguida, o volume foi completado para 1 mL com água grau milli-Q, sendo esta solução novamente agitada e usada imediatamente.

### 5.5.3. Lectina

Para detecção e dosagem de lectina foi empregada a técnica de hemaglutinação segundo metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), com algumas modificações (VASCONCELOS *et al.*, 1991). As amostras foram submetidas a diluições seriadas em tubos de ensaio, na presença de NaCl 0,15 M (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 etc). A 0,25 mL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos (2%). Os tubos foram incubados a 37 °C, 30 minutos, deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g por 30 segundos à temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidades de hemaglutinação (UH), definida como inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de aglutinar hemácias.

### 5.5.4. Toxina

Para avaliação de toxicidade aguda foi utilizada a via intraperitoneal (i.p.) em camundongos Swiss, pesando entre 20-25 g, alimentados *ad libitum* com dieta peletizada comercial. Diferentes teores de proteína foram testados de modo a encontrar a dose máxima não letal, a dose mínima capaz de causar 100% de letalidade e doses intermediárias envolvendo percentuais de morte no intervalo de 0-100%. A toxicidade foi expressa como

DL<sub>50</sub>, sendo uma unidade considerada como a quantidade de proteína (mg de proteína/g de peso corpóreo) necessária para produzir convulsões e morte em 50% dos animais testados no período de 24 horas (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

## 5.6. Purificação da Urease de Sementes de Soja

Tendo sido determinada uma elevada atividade ureásica no genótipo CD203, este foi selecionado para seguir nas etapas de purificação da urease, mostradas no esquema apresentado na FIGURA 1, seguindo-se o protocolo descrito por Follmer *et al.* (2004a), com algumas modificações. A purificação da enzima foi monitorada através da determinação de sua atividade ureolítica, conforme descrito no item 5.4.1., após cada etapa de purificação.

### 5.6.1. Avaliação do Grau de Pureza da Urease Purificada

#### 5.6.1.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Este procedimento foi empregado com o objetivo de acompanhar o processo de purificação, monitorar o grau de pureza da proteína obtida e estimar a massa molecular. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 10 x 8 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 15% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. As amostras (2 mg/mL) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, na presença de 1% de 2-mercaptoetanol e 20% de glicerol. As amostras

foram aquecidas a 100 °C, durante 10 minutos, e centrifugadas a 10.000 x g (centrífuga “Eppendorf” 541 7R), por 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foi acrescentado azul de bromofenol, a fim de permitir visualização da corrida eletroforética. Aliquotas encerrando 20 µL foram aplicadas por poço e a corrida conduzida a corrente constante de 20 mA, durante aproximadamente 2 horas. As bandas protéicas foram visualizadas por coloração com “Coomassie Brilliant Blue R”. Como marcadores de massa molecular foram usados: albumina sérica bovina (67,0 kDa); albumina do ovo (45,0 kDa); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa); anidrase carbônica bovina (29,0 kDa); tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa); inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa). A massa molecular aparente da proteína de interesse foi estimada a partir de uma curva padrão construída com os Rfs dos diferentes marcadores de massa molecular utilizados.

#### 5.6.1.2. Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH<sub>2</sub>-Terminal

A seqüência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-Terminal da urease foi determinada através da degradação de Edman, utilizando-se sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-21/23). Para tanto, amostras da urease purificada foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (conforme descrita anteriormente) e, em seguida, eletrotransferida (sistema “trans blot”, Multiphor II Pharmacia-LKB) para membrana de PVDF. A eletrotransferência foi conduzida a 50 V, 150 mA, por 45 minutos. Ao término, a membrana foi saturada com metanol 100% e, em seguida, lavada com água grau milli-Q e corada com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 0,1% em metanol 50% e ácido acético 1%, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, a membrana foi descorada com solução de metanol 50% e ácido acético 1%, tendo sido trocada várias vezes, até visualização das bandas protéicas. A banda correspondente à subunidade da urease foi recortada da membrana e submetida à determinação de sua seqüência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal. A seqüência obtida foi submetida ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

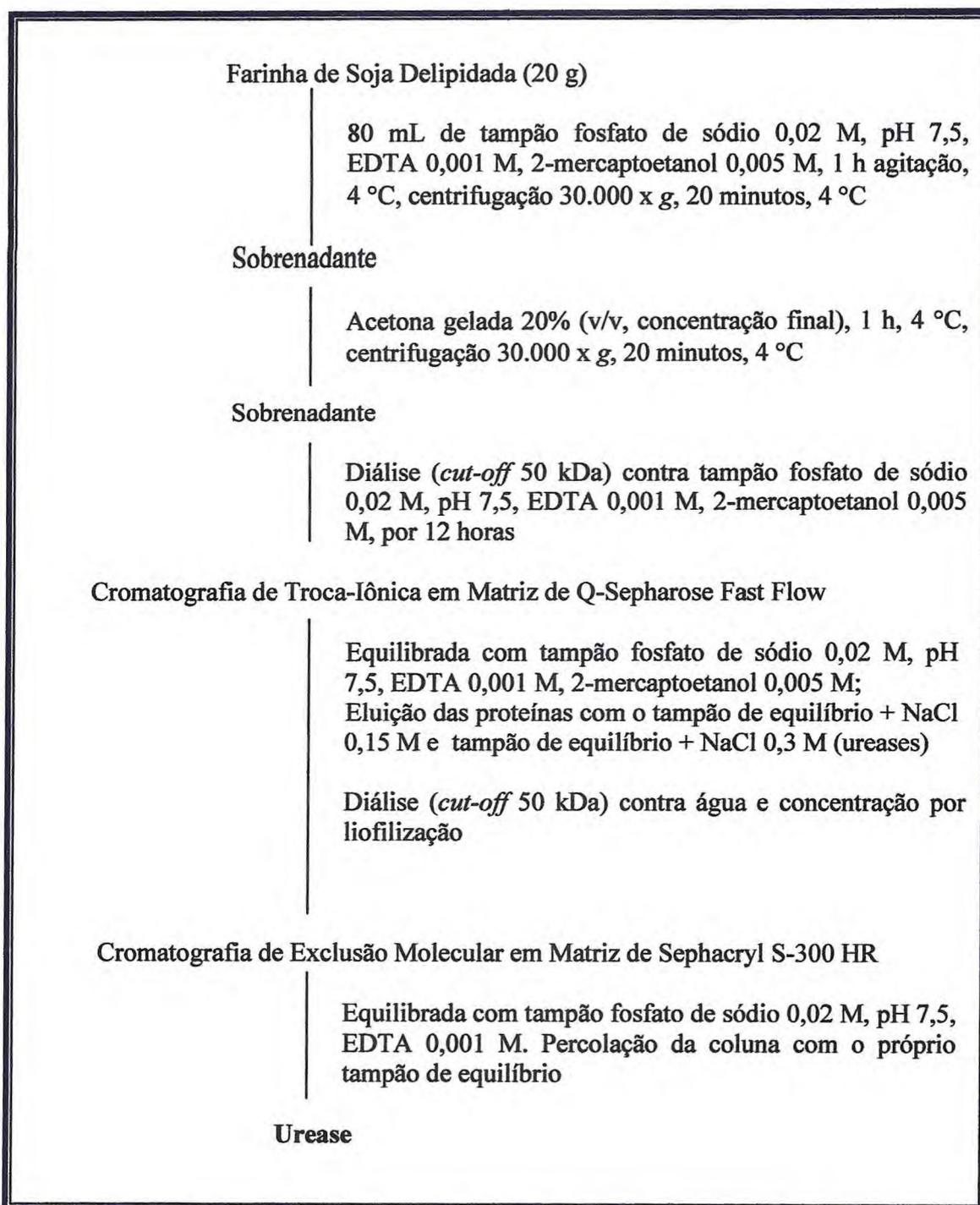


FIGURA 1. Esquema geral de purificação das ureases de sementes de soja.

### 5.7. Avaliação *in vitro* dos Efeitos da Pepsina sobre a Urease

Inicialmente, 10 mg de urease purificada foram dissolvidos em 5 mL de HCl 0,1 N. Dessa solução, foram retiradas alíquotas de 250  $\mu$ L e adicionados 50  $\mu$ L de solução de pepsina (1 mg/mL em HCl 0,1 N, pH 1,75). Esta proporção equivale a uma relação *enzima/proteína* de 1:10. As alíquotas foram colocadas em banho-maria a 37 °C durante 0, 60, 120 e 240 minutos. Parte das alíquotas retiradas foi acrescida, imediatamente, de 250  $\mu$ L de tampão de amostra 2 vezes concentrado (Tris-HCl 0,125 M, SDS 2%, pH 6,8) para eletroforese e aquecida a 100 °C, durante 5 minutos. A cada uma das amostras foi adicionada 1 gota de azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose, preparando-se, assim, para a corrida eletroforética. O tempo zero foi composto da amostra, enzima e tampão de corrida. O restante das alíquotas foi utilizado para dosagem de atividade ureásica, conforme metodologia descrita anteriormente.

### 5.8. Ensaio Imunológicos

#### 5.8.1. Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-Urease de Soja

Para produção e obtenção da fração imune IgG anti-urease foi seguida a metodologia originalmente descrita por Harboe e Inglid (1973). O soro imune contra a urease foi obtido a partir de coelhos da raça Nova Zelândia branca. Os animais foram, inicialmente, inoculados por via intramuscular (i.m.) com uma emulsão contendo 2 mg de urease, 0,5 mL de NaCl 0,15 M e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund's. Esse processo foi repetido após 21 e 36 dias, mas através de injeções subcutâneas (s.c.) em várias regiões do corpo (1° e 2° reforços) e sem a adição do adjuvante de Freund's. Após 7 dias do 2° reforço, foi feita a primeira sangria, através de pequena incisão longitudinal na veia marginal da orelha e aplicada uma outra dose de reforço preparada de forma idêntica à

anterior. Este procedimento foi repetido semanalmente, até obtenção de quantidade suficiente de soro imune. A colheita do sangue foi efetuada em tubos de ensaio, sem anticoagulante, e mantidos à temperatura ambiente para que houvesse a completa retração do coágulo. Em seguida, o soro obtido foi centrifugado a 4.000 x g, por 5 minutos, para completa remoção do coágulo.

Para purificação das IgG, o soro obtido foi submetido a precipitação com sulfato de amônio sólido, a 33% de saturação. Em seguida, foram feitas três diálises alternadas com água destilada e tampão acetato 0,05 M, pH 5,0, durante 6 dias. Após a última diálise com água, o material foi centrifugado a 15.000 x g, 20 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna de Proteína A-agarose P-2545, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Após a coluna ter sido equilibrada com o referido tampão, 20 vezes o seu volume, a amostra previamente centrifugada foi aplicada na coluna. O material retido, rico em IgG anti-urease, foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 3,0, contendo ácido cítrico 0,1 M. Esse material foi dialisado contra água grau milli-Q, concentrado por liofilização e armazenado a 2 °C.

### 5.8.2 “Dot Blotting”

Esta técnica foi utilizada para estimar o título dos anticorpos. Para isso 10 µL de urease de soja (1 mg/mL em fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5) foram aplicados sobre membrana de nitrocelulose e deixados secar. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão Tris 0,05 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5% (p/v), cujo tempo de contato foi 1 hora. Decorrido esse tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana incubada com o anticorpo anti-urease de soja (1:50, 1:100 e 1:500), por uma noite, a 37 °C. Após incubação, a membrana foi colocada no tampão de lavagem por cinco vezes consecutivas, cada uma com duração de 10 minutos e, então, incubada com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:1.000), por 1 hora, a 37 °C. Após lavagem da membrana sob as mesmas condições, foi

seguido o procedimento de revelação que consistiu em colocar a membrana em contato com o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). A membrana de nitrocelulose foi deixada em contato com a solução do substrato e monitorada até que fosse visualizada mudança de coloração que caracterizasse a reação antígeno-anticorpo quando, então, foi lavada com sucessivas trocas de água e o título estimado. Prova em branco foi feita substituindo-se o anticorpo primário pelo soro pré-imune.

### 5.8.3. “Western Blotting”

Para realização do *Western Blotting* foi seguida a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979). Após eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrita no item 5.6.1., as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF em uma unidade de transferência (sistema “trans blot”, Multiphor II Pharmacia-LKB), usando tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, metanol 20%, SDS 0,01%, pH 8,3. A eletrotransferência foi conduzida a 50 V, 150 mA, por 45 minutos. Após transferência das proteínas, a membrana de PVDF foi bloqueada com tampão Tris 0,05 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5% (p/v), cujo tempo de contato foi 1 hora. Decorrido esse tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana incubada com o anticorpo anti-urease de soja (1:50), por 16 horas, a 4 °C. Após incubação, a membrana foi colocada no tampão de lavagem por 5 vezes consecutivas, cada uma com duração de 10 minutos e, então, incubada com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:1000), por 1 hora, a 37 °C. Após lavagem da membrana sob as mesmas condições, foi seguido o procedimento de revelação descrito nos ensaios de *Dot blot*. A membrana foi secada à temperatura ambiente e guardada ao abrigo da luz.

## 5.9. Ensaio Biológico

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991) e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará.

#### 5.9.1. Ensaio Biológico 1 - Avaliação da Qualidade Nutricional de Sementes de Genótipos de Soja Contendo Teores Diferenciados de Urease

Sementes de genótipos de soja, CD201 e CD 203, exibindo atividades ureásicas significativamente diferentes,  $52,37 \pm 5,1$  e  $135,75 \pm 12,9$  U/gF, respectivamente, foram selecionados para serem submetidos ao teste de avaliação da qualidade nutricional de suas proteínas, de acordo com a técnica descrita por Miller e Bender (1955). Ainda, como subsídio para a escolha desses dois genótipos, foi considerado o fato de que eles possuem teores iguais de proteínas e dos outros constituintes protéicos tóxicos e/ou antinutricionais (inibidores de tripsina, lectina e toxinas) analisados no presente trabalho. Esse ensaio teve como objetivo avaliar se em um experimento de curta duração, apenas 10 dias, considerado sub-crônico, seria possível sugerir algum efeito relacionado ao consumo da urease, mesmo ela estando junta com vários outros componentes existentes nas sementes.

Ratos “Wistar”, machos, desmamados com 21 dias de idade, foram alimentados com ração comercial peletizada até atingirem peso médio de 50 g. Os animais foram alimentados com uma dieta contendo proteínas da clara do ovo, *ad libitum*, por três dias, para adaptação à sua forma pulverizada, sendo, então, selecionados de acordo com o peso corpóreo. Em seguida, os ratos foram alimentados com dietas controles (clara do ovo e aprotéica) e experimentais (contendo farinha de sementes dos genótipos de soja CD201 e CD203) durante 10 dias. Para cada dieta, foram usados 6 animais, mantidos em gaiolas metabólicas individuais (FIGURA 2), que possibilitam a coleta de fezes, urina e dieta perdida. Água e dieta foram oferecidas *ad libitum*. As dietas controles e experimentais

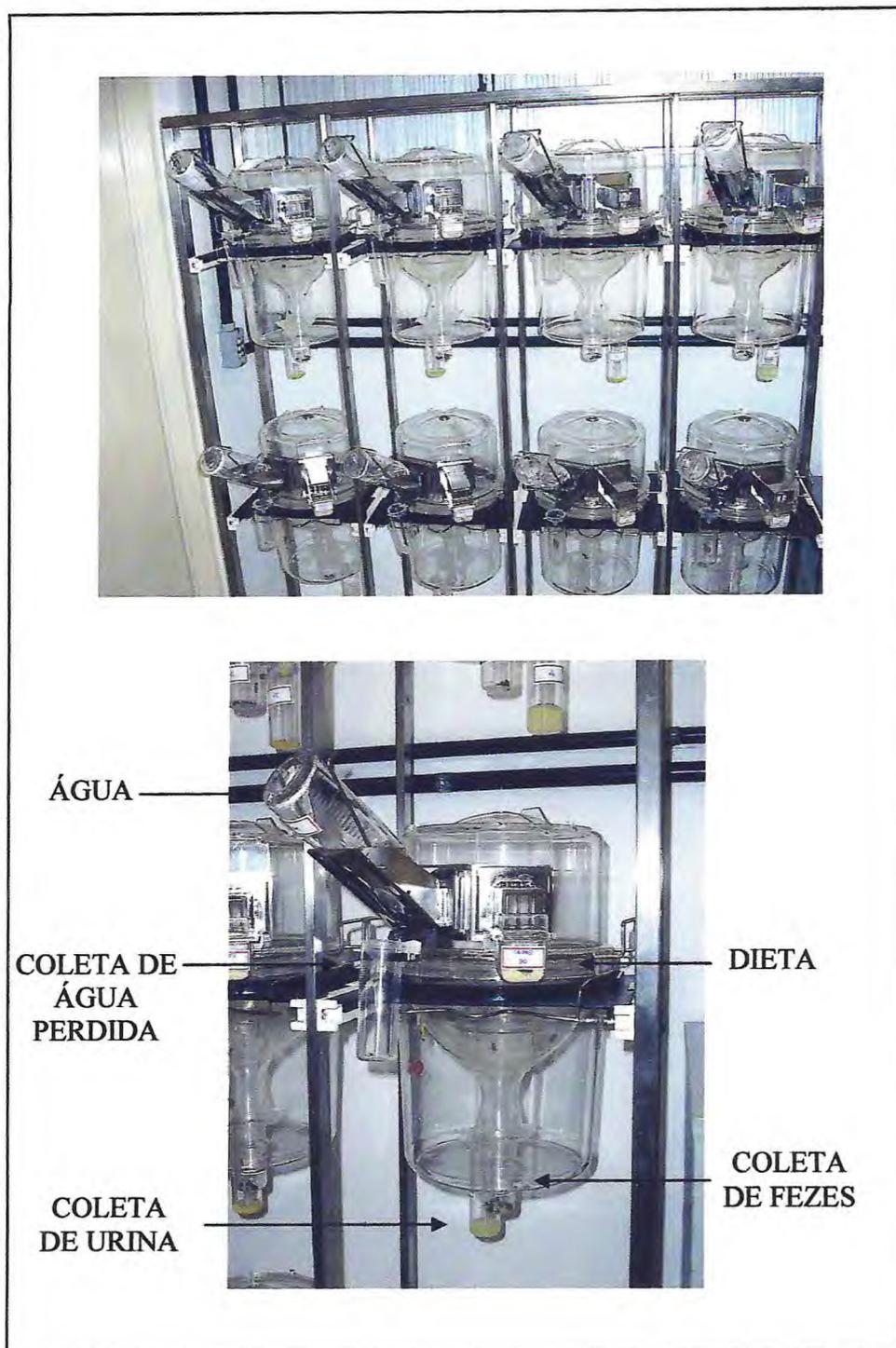


FIGURA 2. Gaiolas metabólicas utilizadas pelos animais no experimento de avaliação da qualidade nutricional de genótipos de soja.

(TABELA 1) foram preparadas encerrando 10% de proteínas (100 g de proteína por Kg de dieta). As dietas experimentais foram suplementadas com metionina e triptofano. Durante todo experimento, os ratos e a dieta refugada foram pesados diariamente. As fezes foram coletadas durante os últimos cinco dias do experimento, secadas em estufa sob ventilação a 40 °C, por 24 horas, pesadas e trituradas em moinho para café, para posterior determinação de nitrogênio total (BAETHGEN e ALLEY, 1989). Ao final dos 10 dias, foram coletadas amostras (2 mL) de sangue dos animais via plexo orbital e, em seguida, estes foram sacrificados por inalação com halotano, sendo seus órgãos internos (baço, coração, fígado, rins, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas, pulmões e timo) dissecados, liofilizados e pesados. As carcaças foram colocadas em estufa a 100 °C, por 24 horas, pesadas e trituradas, juntamente com seus respectivos órgãos, para determinação do teor de nitrogênio corporal (BAETHGEN e ALLEY, 1989).

Os índices para avaliação da qualidade protéica foram a Utilização Líquida de Proteína (NPU), Digestibilidade (D) e Valor Biológico (VB) (MILLER e BENDER, 1955), como já descrito no item 2.4.

TABELA 1. Composição (g/Kg) das dietas controle (clara do ovo e aprotéica) e experimentais (farinhas de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)

Ingredientes	Clara do ovo	NPC <sup>#</sup>	CD201	CD203
Amido de milho	380,38	500	175,77	206,57
Fécula de mandioca	100	100	100	100
Glicose	150	150	150	150
Óleo de milho	150	150	150	150
Vitaminas <sup>δ</sup>	50	50	50	50
Minerais <sup>§</sup>	50	50	50	50
Clara do ovo	119,62	x	x	X
CD201	x	x	321,33	X
CD203	x	x	x	290,53
L-metionina	x	x	2,3	2,3
L-triptofano	x	x	0,6	0,6

<sup>#</sup> NPC – controle não protéico.

<sup>δ</sup> Mistura de vitaminas [vitamina B<sub>12</sub> (100%) 0,02; ácido fólico 0,04; biotina (99%) 0,04; piridoxina HCl 0,04; tiamina HCl 0,04; riboflavina (99%) 0,21; pantotenato de cálcio (97,5%) 1,20; ácido nicotínico 4,00; inositol 4,00; *p*-amino-benzóico 12,00; cloreto de colina (50%) 24,00 e amido de milho 954,39].

<sup>§</sup> Mistura de minerais (sulfato de cobre pentahidratado 0,40; sulfato férrico heptahidratado 5,00; sulfato manganês 3,03; sulfato de zinco heptahidratado 3,60; iodato de potássio 0,04; iodeto de potássio 0,04; fluoreto de sódio 0,12; vanadato de amônia 0,01; cloreto de níquel hexahidratado 0,08; clorato de estanho pentahidratado 0,12; selenito de sódio 0,006).

### 5.9.1.1. Análises Histológicas e Morfométricas

Amostras coletadas dos órgãos (intestino delgado, rins e estômago) foram fixadas em formol 10%, por 24 horas. Em seguida, foram processadas por meio de metodologia convencional para obtenção de fragmentos incluídos em parafina, compreendendo desidratação em soluções alcoólicas de concentração crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), diafanização em xileno, impregnação e inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo, com espessura média de 5  $\mu\text{m}$ , e corados com hematoxilina-eosina. Imagens fotomicrográficas dos cortes histológicos preparados foram obtidas com uso de câmara digital OLYMPUS D-5060 acoplada a microscópio OLYMPUS Modelo CX-40 (aumentos de 100 e 400x).

A mucosa do estômago foi medida a partir da superfície luminal até a muscular da mucosa da mucosa com auxílio do programa Image J para análise de imagens, calibrado com ajuda de lâmina micrométrica OLYMPUS AX 0001 OB-M 1/100.

### 5.9.1.2. Bioquímica Sanguínea

Amostras de sangue dos animais foram usadas para dosagens de marcadores de função renal (uréia e creatinina) e hepáticos [aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT)] e de proteínas totais, glicose, urease e amilase. Nas dosagens foram utilizados kits da Bioclin (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte, MG), seguindo-se as instruções do fabricante.

A determinação da creatinina foi conduzida através do método de Jaffé com modificações (SLOT, 1965). A creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Com a adição do reagente ácido, a cor devida a creatinina é desfeita, permanecendo a coloração relacionada aos cromogênios. Por diferença entre as leituras (510 nm) obtidas no pH alcalino e no pH ácido, tem-se o valor real da creatinina, utilizando-se um padrão de concentração conhecida (creatinina 3 mg).

Para dosagem de uréia foi utilizado o método enzimático colorimétrico descrito por Kaplan (1969). A uréia é hidrolisada a íons amônio e  $\text{CO}_2$  pela urease em pH alcalino, na presença de salicilato de sódio e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar o azul de indofenol. A intensidade de cor (absorbância em 600 nm) é proporcional à concentração de uréia na amostra analisada, e o cálculo é feito utilizando-se a leitura referente a um padrão de concentração conhecida (uréia 70 mg).

As transaminases (TGO – transaminase glutâmica oxalacética ou AST – aspartato aminotransferase e TGP – transaminase glutâmica pirúvica ou ALT – alanina aminotransferase) foram dosadas no soro dos animais de acordo com o princípio descrito por Reitman e Frankel (1957). Substratos (alfa-cetoglutarato, DL-aspartico ou DL-alanina) foram colocados em contato com o soro formando um produto de cor marrom em meio alcalino, cuja leitura de absorbância foi conduzida a 505 nm. Para os cálculos é utilizado uma curva de calibração utilizando um padrão de concentração conhecida (Piruvato de Sódio 2,53 mmol/L, Tampão fosfato 0,1 mol/L ph 7,4 e Azida sódica 7,7 mmol/L).

As proteínas séricas totais foram determinadas através da metodologia de Reinhold (1968), modificada por Dumas *et al* (1981), utilizando-se o reagente de Biureto, o qual se liga de forma específica com peptídeos contendo mais de duas ligações peptídicas. Tais compostos reagem com íons cúpricos em meio alcalino, produzindo um complexo de composição desconhecida de cor violeta, o qual é medido colorimetricamente a 540 nm, cuja leitura é proporcional ao número de ligações peptídicas presentes. Para os cálculos é utilizado um padrão de concentração conhecida (Albumina 4g/dL, estabilizador e Azida sódica 15,38 mmol/L).

A taxa de glicose foi determinada seguindo a metodologia enzimática colorimétrica – GOD – PAP. A glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. Para os cálculos é utilizado um padrão de concentração conhecida (Glicose 100,0 mg/dL (5,56 mmol/L) Ácido benzóico 20,47 mmol/L).

A determinação da atividade amilásica foi feita através do método de Caraway (1959). O princípio do método inclui a incubação do soro com o amido. Pela adição do iodo, o amido não hidrolisado adquire coloração azul ocasionando uma diminuição da atividade enzimática.

#### 5.9.2. Ensaio Biológico 2 - Avaliação da Toxicidade Aguda da Urease Purificada por Via Oral (Dose Única)

No segundo ensaio biológico, foi utilizado urease purificada de sementes do genótipo CD203. Este ensaio teve como finalidade a análise da toxicidade aguda da urease para animais submetidos a uma exposição de curta duração. A avaliação da toxicidade aguda da urease utilizando dose única foi realizada segundo metodologia descrita por Brito (1994), com modificações.

Para cálculo da dose de urease a ser administrada, foi tomada como base a atividade ureásica detectada em sementes de soja, genótipo CD203, sendo considerada a quantidade total de unidades ureásicas recebida por um animal durante 10 dias, conforme ocorrido no ensaio biológico 1, item 5.9.1. Assim sendo, cada animal recebeu 1000 unidades ureásicas.

Na condução do ensaio, ratos com peso médio de 70 g foram adaptados em gaiolas metabólicas durante três dias, com ração comercial e água *ad libitum*. Em seguida, os animais foram submetidos ao jejum de dieta por 12 horas, e ao jejum total (comida e água) por mais 1 hora. Os animais foram, então, entubados com sonda orogástrica, contendo 0,7 mL de uma solução de urease purificada, preparada em NaCl 0,15 M, encerrando 1000 unidades. Animais controles receberam apenas NaCl 0,15 M. Água e ração foram novamente oferecidas *ad libitum* aos animais, 1 e 4 horas após entubação, respectivamente. Após os períodos de 4, 8 e 24 horas, os animais (n = 4) foram sacrificados por inalação com halotano e o estômago dissecado. Como parâmetros de toxicidade aguda foi observada a taxa de mortalidade dos animais e feitas análises histológicas de cortes do estômago, como descrito nos item 5.9.1.1.

### 5.9.3. Ensaio Biológico 3 - Determinação do pH e Equivalentes Ácidos no Conteúdo Estomacal de Ratos Submetidos à Administração de Urease Purificada por Via Oral

Tendo em vista a presença de alterações histológicas e morfométricas no estômago de animais, ligadas à presença de urease, um terceiro ensaio biológico foi programado de modo a avaliar parâmetros relacionados à acidez do conteúdo estomacal. Para isso, um ensaio, utilizando urease pura, foi conduzido de forma bastante parecida ao descrito no item 5.9.2, exceto que os animais ( $n = 6$ ) foram sacrificados com 15, 30, 45, 60, 120 e 240 minutos após a gavagem. O estômago dissecado foi imerso em 4 mL de NaCl 0,15 M, aberto e lavado para retirar o conteúdo estomacal. Em seguida, o estômago esvaziado foi secado em papel de filtro e pesado. O conteúdo estomacal foi centrifugado a 3.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para medida do pH e da produção de ácido, seguindo a metodologia descrita por Gut *et al.* (2002). Para cálculo dos equivalentes ácido do estômago, foi feita uma curva de titulação utilizando-se uma solução padronizada de NaOH 0,0098 N, de modo a possibilitar a determinação do ponto de equivalência (JULIÃO, 1997), sendo os valores expressos em microequivalentes de ácido por grama de estômago ( $\mu\text{Eq./gE}$ ).

### 5.10. - Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, para confirmação da normalidade da distribuição e homogeneidade de variância entre os tratamentos, respectivamente. Confirmado o atendimento das exigências para realização da análise de variância (ANOVA), esta foi executada por meio do procedimento GLM do programa SAS (1999) e os testes de comparação de médias foram selecionados segundo os critérios estabelecidos por (SAMPAIO, 2002). Resultados referentes à composição centesimal foram comparados através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Peso fresco

e seco relativo de órgãos ( $CV < 15\%$ ) foram comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), enquanto os parâmetros séricos, balanço nitrogenado e produção gástrica de ácido, nas comparações entre tratamentos dentro de cada tempo após aplicação ( $CV > 15\%$ ), foram executadas pelo teste t de Student. O teste de Dunnett foi aplicado para comparações entre os tratamentos experimentais e o controle quanto à produção de mEq de ácido no ambiente estomacal em diferentes tempos após a aplicação da amostra por gavagem. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando  $p < 0,05$  e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

## **6. RESULTADOS**

### 6.1. Composição Química Elementar

Os teores de umidade, cinzas, fibra bruta, proteína e lipídios das farinhas das sementes de soja, genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209 estão mostrados na TABELA 2. Os genótipos apresentaram valores de umidade e cinza variando de 8,53 a 10,20 g/100 g de farinha e de 4,45 a 4,86 g/100 g de farinha, respectivamente, havendo diferenças significativas entre alguns deles ( $p < 0,05$ ). Quanto aos teores de fibra bruta os valores encontrados variaram de 3,80 a 5,70 g/100 g de farinha, não diferindo significativamente ( $p > 0,05$ ). Como esperado, todos os genótipos apresentaram elevados conteúdos protéicos e lipídicos, variando de 30,23 a 46,35 g/100 g de farinha e de 19,25 a 23,10 g/100 g de farinha, respectivamente, tendo sido detectada variação significativa entre alguns dos genótipos avaliados.

### 6.2. Comparação dos Perfis Protéicos das Farinhas de Sementes dos Diferentes Genótipos de Soja por PAGE-SDS

Os perfis eletroforéticos encontrados para as farinhas dos genótipos CD201, CD203, CD204, CD204, CD207 e CD209 estão mostrados na FIGURA 3. PAGE-SDS sob condições redutoras não mostrou diferenças marcantes entre os genótipos, no que concerne à distribuição de bandas protéicas.

### 6.3. Deteção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais

As atividades inerentes aos fatores tóxicos e/ou antinutricionais avaliados no presente trabalho estão apresentadas na TABELA 3. Os extratos brutos dos genótipos estudados exibiram atividade ureásica, cujos valores variaram de 49,75 a 135,75 U/g de

TABELA 2. Composição centesimal (g/100 g de farinha) de sementes de soja, genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209, expressa em percentual de peso seco

Genótipos	Constituinte				
	Umidade	Cinzas	Fibra Bruta	Proteína*	Lipídio
CD201	10,20 ± 0,10c	4,86 ± 0,12a	4,33 ± 0,50a	36,86 ± 1,21b	19,25 ± 0,49d
CD203	9,37 ± 0,15b	4,45 ± 0,09b	4,93 ± 0,50a	36,60 ± 1,38b	19,90 ± 0,14cd
CD204	9,18 ± 0,08b	4,51 ± 0,08ab	5,07 ± 0,42a	43,39 ± 3,65a	22,70 ± 0,07a
CD206	8,59 ± 0,12a	4,62 ± 0,27ab	5,70 ± 0,14a	46,35 ± 3,38a	20,25 ± 0,21c
CD207	8,53 ± 0,08a	4,57 ± 0,18ab	3,80 ± 0,28a	30,23 ± 2,62c	23,10 ± 0,28a
CD209	8,74 ± 0,31a	4,75 ± 0,13ab	4,87 ± 0,42a	36,65 ± 2,35b	21,15 ± 0,28b

Médias de determinações em triplicata. Letras iguais na vertical representam valores que não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

\* N x 6,25.

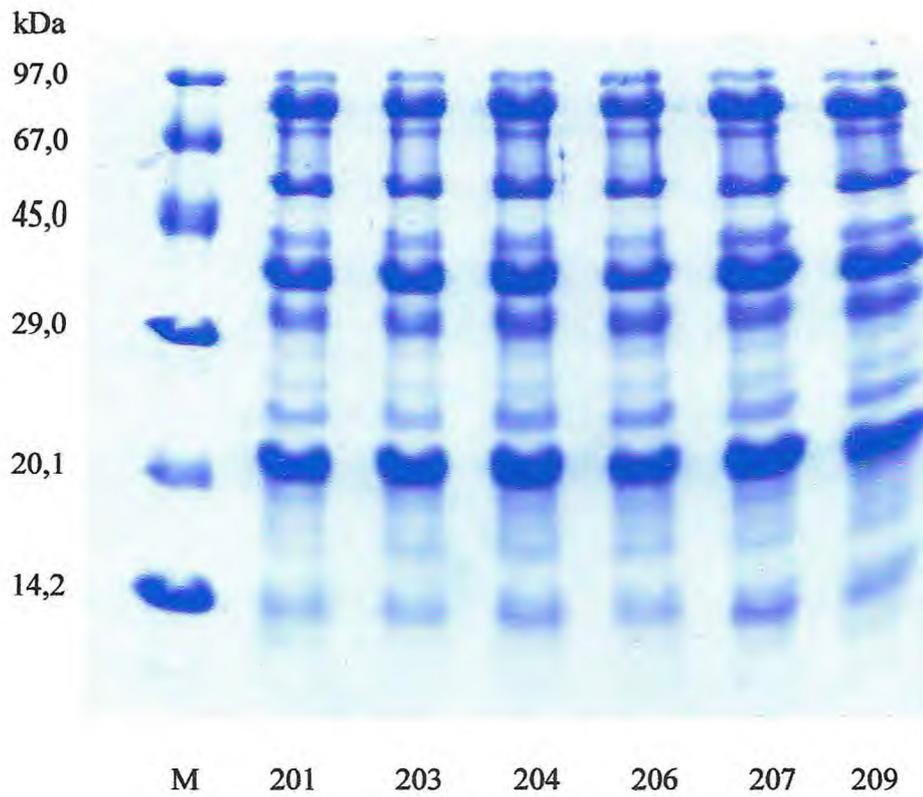


FIGURA 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS e 2-mercaptoetanol das farinhas dos genótipos de soja, corada com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raias 2, 3, 4, 5, 6 e 7 representam os genótipos CD201, CD203, CD204, CD206, CD207 e CD209, respectivamente.

TABELA 3. Fatores tóxicos e/ou antinutricionais presentes no extrato bruto de sementes de soja

Genótipos	Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais			
	Urease*	Inibidor de Tripsina <sup>#</sup>	Lectina <sup>§</sup>	Toxina <sup>&amp;</sup>
CD201	52,37 ± 5,1d	73,88 ± 0,90a	1,38 ± 0,10b	7,59 ± 0,70b
CD203	135,75 ± 12,9a	73,50 ± 0,88a	1,36 ± 0,08b	5,42 ± 0,88b
CD204	54,12 ± 3,9d	74,70 ± 0,71a	2,76 ± 0,00a	7,62 ± 0,76b
CD206	80,12 ± 7,6b	74,08 ± 0,41a	2,73 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,66 ± 0,77b
CD207	49,75 ± 3,8d	73,35 ± 0,61a	2,69 ± 0,11 <sup>a</sup>	11,94 ± 1,09a
CD209	64,75 ± 4,1c	69,96 ± 2,71b	2,69 ± 0,11 <sup>a</sup>	9,86 ± 0,90a

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) pelo teste de SNK. Cada valor representa a média de três determinações.

\* A atividade ureásica foi expressa como unidades de urease por g de farinha. 1 g de urease pura contém 870.000 unidades (Sigma).

<sup>#</sup> A atividade inibidora de tripsina foi expressa em mg de tripsina inibida por g de farinha.

<sup>§</sup> A atividade hemaglutinante foi expressa como unidades de hemaglutinação (UH) por mg de farinha. Uma UH corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

<sup>&</sup> A atividade tóxica foi expressa como DL<sub>50</sub>. Uma DL<sub>50</sub> representa a quantidade de proteína em mgP/g de peso corpóreo de camundongo capaz de produzir convulsão e morte em 50% dos animais injetados por via intraperitoneal.

farinha. O genótipo CD203 mostrou uma atividade significativamente superior aos demais. Os genótipos CD201, CD204 e CD207 não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) e apresentaram a menor atividade ureásica. Os valores encontrados para inibidores de tripsina, 69,96 a 74,70 mg de tripsina inibida/g de farinha, revelaram que dos seis genótipos estudados, somente CD209 mostrou-se diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais, apresentando o mais baixo teor. A presença de lectinas, detectada através da atividade hemaglutinante do extrato bruto frente a eritrócitos de coelho, foi detectada em todos os genótipos, com valores variando de 1,36 a 2,76 UH/mg de farinha. Os valores mais baixos foram apresentados pelos genótipos CD201 e CD203, que não diferiram entre si, contrastando com aqueles apresentados pelos outros genótipos. Os extratos brutos obtidos a partir dos genótipos estudados apresentaram toxicidade aguda quando injetados por via i.p. em camundongos, no intervalo de 12 a 24 horas. Os animais apresentaram sintomas típicos de comprometimento do sistema nervoso, tais como piloereção, taquicardia, convulsão, estiramento da cauda e patas, culminando com a morte. Todavia, os valores de  $DL_{50}$  foram diferentes para alguns genótipos, variando de 5,42 a 11,94 mgP/g de peso corpóreo do animal. Quatro dos genótipos (CD201, CD203, CD204 e CD206) apresentaram maior toxicidade, exibindo valores de  $DL_{50}$  estatisticamente equivalentes.

#### 6.4. Purificação da Urease de Sementes de Soja

Dentre os seis genótipos analisados, CD203 foi o que apresentou maior atividade ureásica. Assim sendo, este genótipo foi selecionado para purificação da urease presente nas sementes.

Para purificação da urease foi seguido o protocolo descrito por Follmer *et al.* (2004) com algumas modificações (FIGURA 1). Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C. Após precipitação do extrato bruto com acetona (20%), seguida de diálise em membrana de *cut-off* de 50 kDa, o material foi submetido à cromatografia de troca iônica em matriz de Q-Sepharose, cujo perfil está mostrado na FIGURA 4. Essa cromatografia

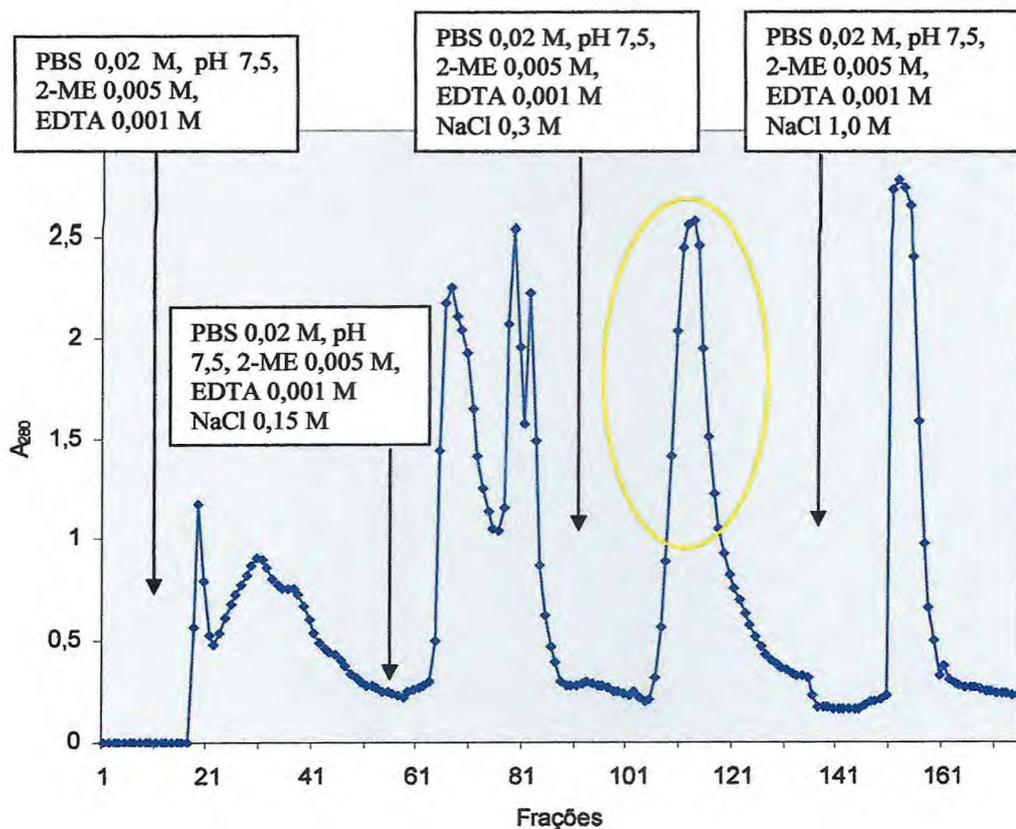


FIGURA 4. Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose. Amostra (800 mgP) do material precipitado com acetona 20% e dialisado (*cut-off* 50 kDa) foi aplicada numa coluna de Q-Sepharose (30 x 2,5 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, contendo 2-mercaptoetano 0,005 M e EDTA 0,001 M. As proteínas retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio contendo concentrações crescentes de NaCl: 0,15 M, 0,3 M e 1,0 M. Fluxo: 45 mL/h; Frações: 4,5 mL.

resultou na obtenção de 7 picos protéicos. Dois deles foram obtidos com o próprio tampão de equilíbrio, fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, contendo 2-mercaptoetanol 0,005 M e EDTA 0,001 M. Os outros foram oriundos da adição de NaCl em diferentes concentrações ao tampão. Quando realizado ensaio para avaliação da atividade ureásica, o pico eluído após adição de NaCl 0,30 M ao tampão de equilíbrio concentrou toda atividade ureásica. Esse material foi dialisado exaustivamente contra água e liofilizado, sendo, em seguida, submetido à cromatografia de exclusão molecular. O processo cromatográfico rendeu dois picos bem definidos, obtidos por percolação da coluna com o tampão de equilíbrio (FIGURA 4). A atividade ureásica ficou restrita apenas ao primeiro pico. Esse material não mostrou atividade tóxica por via intraperitoneal, inibitória de tripsina ou hemaglutinante. A TABELA 4 mostra os dados referentes à purificação da urease.

PAGE-SDS do material obtido na cromatografia de exclusão molecular mostrou a presença de uma banda com massa molecular aparente de 90 kDa. A confirmação de que essa banda protéica era da urease foi obtida através da determinação de sua seqüência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal, MKLSPREIEKLDL. Constatada a purificação da urease, este material foi utilizado nos ensaios biológicos.

#### 6.5. Avaliação *in vitro* dos Efeitos da Pepsina sobre a Urease

A atividade enzimática da urease permaneceu não variou significativamente ( $p > 0,05$ ) mesmo após a incubação da urease purificada com pepsina por 4 horas (FIGURA 6). Quando uma fração rica em urease, como aquela obtida na cromatografia de troca iônica foi incubada com pepsina, a visualização da banda protéica referente à urease ainda foi possível mesmo após 4 horas de incubação, muito embora nesse tempo já possa ser observada uma diminuição na sua intensidade, refletindo possivelmente a degradação da proteína (FIGURA 7A). A banda correspondente à urease, nos diferentes tempos de incubação com pepsina, foi também reconhecida pelo anticorpo primário anti-urease de soja em experimento de "Western Blot" (FIGURA 7B).

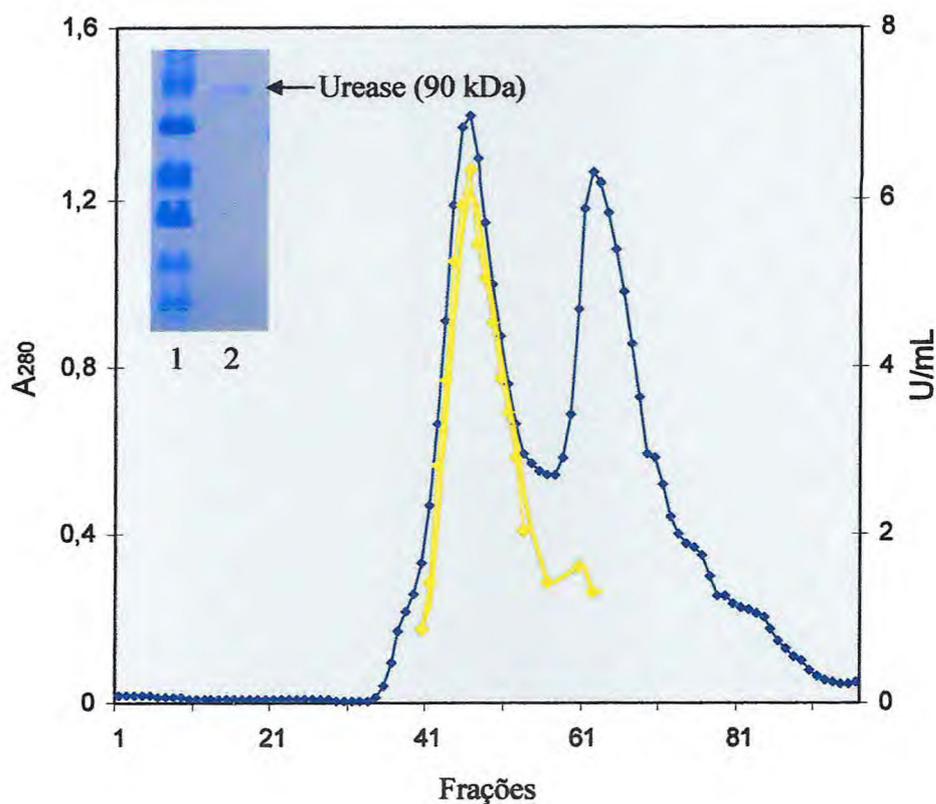


FIGURA 5. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-300. Amostra (24 mgP) da fração rica em urease, obtida na cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, foi aplicada numa coluna de Sephacryl S-300 (60 x 1,5 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,001 M. A coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio. Fluxo: 6 mL/h; Frações: 2 mL. O símbolo (-♦-) indica frações exibindo atividade ureásica. Figura inscrita: PAGE-SDS. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raia 2: Urease purificada.

TABELA 4. Purificação da urease de sementes de soja, genótipo CD203

Etapas*	Proteína <sup>#</sup> (mgP/100 gF)	Urease Atividade Específica <sup>§</sup> (U/mgP)	Índice de Purificação <sup>¶</sup>	Rendimento (%)
Extrato Bruto	21.332,25 ± 789,45	39,00 ± 1,01	1,0	100
Acetona	12.625,20 ± 282,80	93,98 ± 2,56	2,4	59,2
Diálise ( <i>cut-off</i> 50 kDa)	6.291,60 ± 313,60	645,14 ± 58,83	16,5	29,5
Q-Sepharose	1.316,70 ± 229,95	1.610,72 ± 96,09	41,3	6,2
Sephacryl S-300	113,40 ± 8,00	4.263,00 ± 463,81	109,3	0,5

\* Etapas de purificação da urease como descritas em Métodos. Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis experimentos similares.

# Quantidade total de proteína recuperada (mg), em cada etapa de purificação, a partir de 100 g de farinha de soja.

§ A atividade ureásica foi expressa como atividade específica (U/mgP), considerando os valores de atividade ureásica e proteína em 100 g de farinha de soja. 1 g de urease pura contém 870.000 unidades (Sigma).

¶ Calculado através da relação da atividade específica de cada etapa de purificação e àquela do extrato bruto considerada como 1.0.

<sup>†</sup> Recuperação de proteína exibindo atividade ureásica em cada etapa de purificação (extrato bruto, 100%).

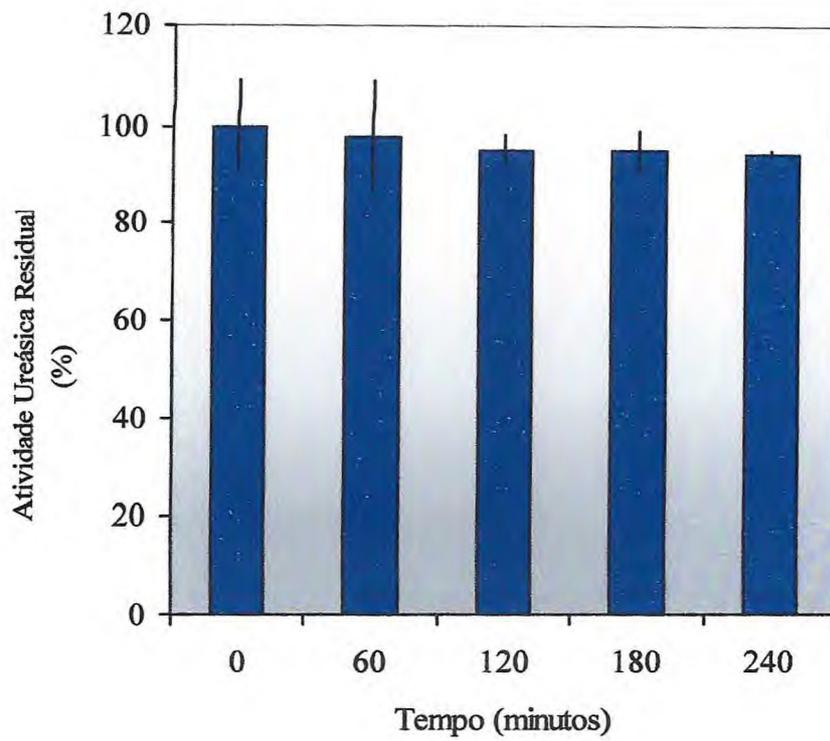


FIGURA 6. Atividade ureásica residual após diferentes tempos de incubação da urease purificada com pepsina.

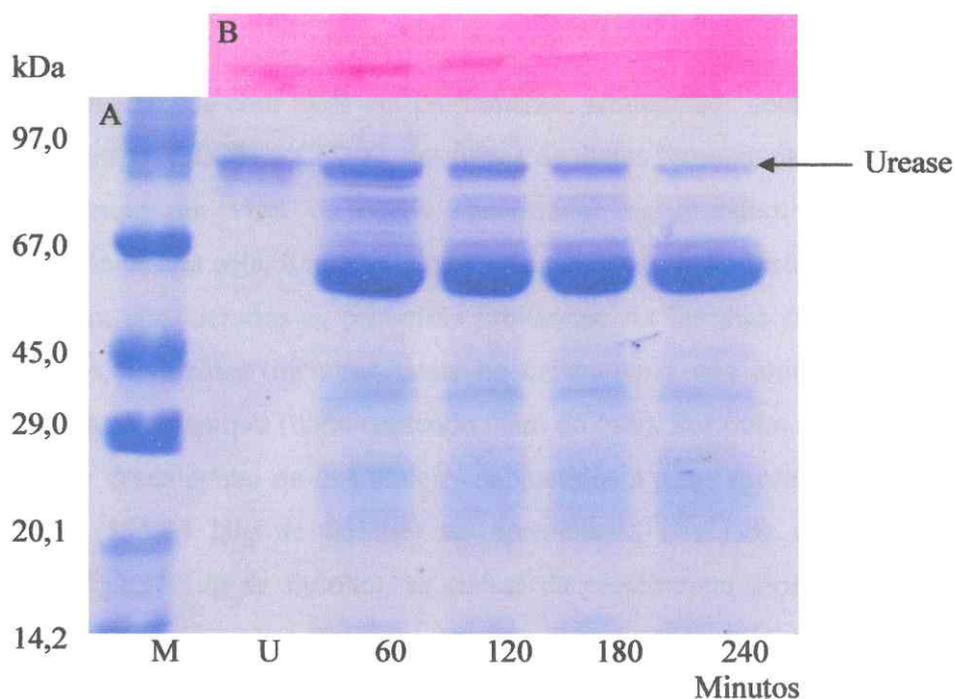


FIGURA 7. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS e 2 mercaptoetanol de uma fração rica em urease, proveniente da cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, após incubação com pepsina em diferentes intervalos de tempo. A visualização das bandas protéicas foi feita com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raias 2: Urease purificada; Raias 3, 4, 5, 6 e 7 representam a fração rica em urease (troca iônica) após incubação com pepsina por 60, 120, 180 e 240 minutos, respectivamente. (B) *Western blotting* das amostras incubadas com pepsina, utilizando IgG anti-urease de soja e revelação com BCIP/NBT, substratos para fosfatase alcalina.

#### 6.6. Ensaio Biológico 1 - Avaliação da Qualidade Nutricional de Sementes de Genótipos de Soja Contendo Teores Diferenciados de Urease

A FIGURA 8 e as TABELA 5 e 6 mostram alguns parâmetros nutricionais obtidos nos testes biológicos realizados com ratos em crescimento, alimentados com farinhas das sementes de soja, genótipos CD201 e CD203, em forma de dietas semi-sintéticas contendo 10% de proteína. Tendo em vista os dados encontrados na literatura referentes à composição de aminoácidos da soja, foram adicionados às dietas os aminoácidos triptofano e metionina, por serem considerados os primeiros limitantes. As farinhas dos genótipos, mesmo suplementadas, induziram menores taxas de crescimento dos animais, quando comparadas com o controle positivo (dieta contendo clara do ovo). Por outro lado, os ratos mostraram um melhor desempenho do que aqueles submetidos à dieta aprotéica. Apesar, do genótipo CD203 (135,75 U/g de farinha) ter apresentado atividade ureásica bem superior ao CD201 (52,37 U/g de farinha), as curvas de crescimento mostraram perfis semelhantes, exibindo a mesma inclinação.

Os dados apresentados na TABELA 5 reforçam os resultados visualizados na curva de crescimento. O consumo diário de dieta e o ganho de peso dos animais não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) para os grupos submetidos às dietas experimentais (CD201 e CD 203), sendo esses valores inferiores aos do grupo controle positivo (clara do ovo) e, maiores, do que aqueles verificados para o grupo que alimentado com a dieta aprotéica (NPC). Similarmente, os valores de NPU (Utilização Líquida da Proteína), digestibilidade e valor biológico foram estatisticamente semelhantes para os dois genótipos avaliados, todos eles significativamente inferiores aos verificados com a dieta à base de clara do ovo.

Na TABELA 6 estão alguns parâmetros analisados apenas nos últimos cinco dias do experimento, tais como os dados de ingestão alimentar e de nitrogênio e as suas relações com a excreção de matéria fecal e nitrogênio. Numericamente, os animais alimentados com a dieta à base de clara de ovo foram os que apresentaram maior ingestão de dieta e, conseqüentemente, de nitrogênio (48,07 e 0,91 g/rato, respectivamente), mas não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) dos tratamentos contendo CD201 (40,51 e 0,83 g/rato, respectivamente) e CD203 (41,47 e 0,89 g/rato, respectivamente). Com relação à excreção

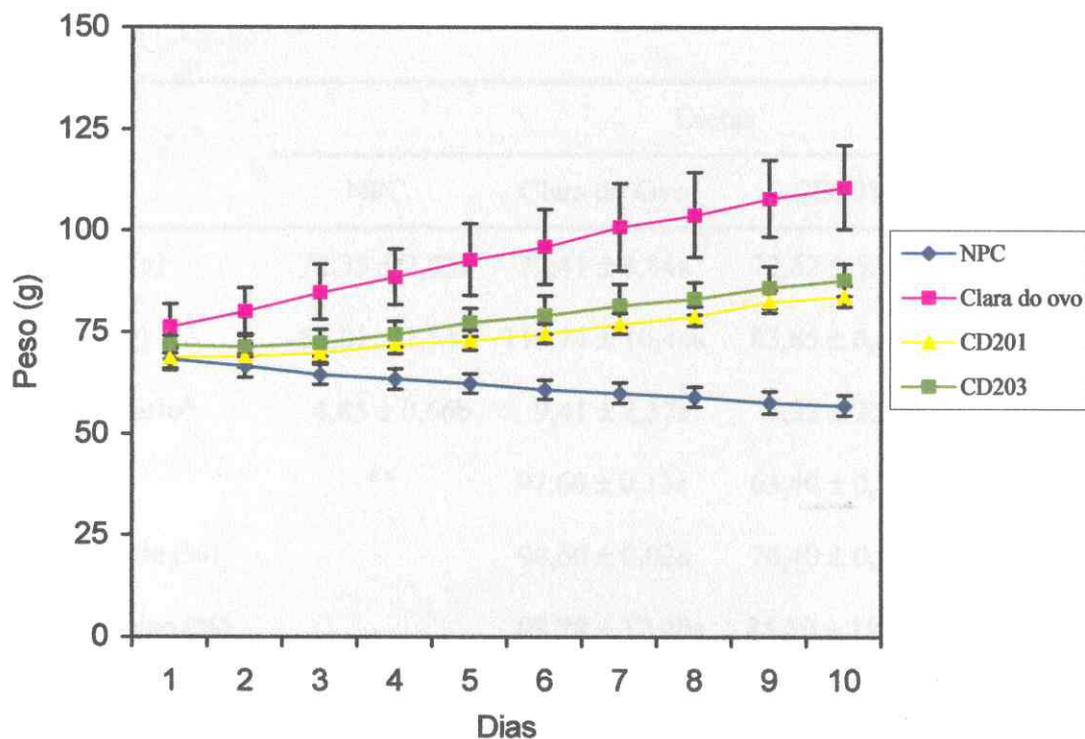


FIGURA 8. Curvas de crescimento dos ratos ( $n = 6$ ) alimentados com dieta contendo farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203, comparadas com o crescimento de ratos alimentados com dieta contendo clara do ovo e dieta isenta de proteína (NPC).

TABELA 5. Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos (n = 6) com dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)

Parâmetro	Dietas			
	NPC	Clara do Ovo	CD201	CD203
Peso Inicial (g)	72,35 ± 2,83a	72,41 ± 3,84a	72,67 ± 3,11a	72,67 ± 2,93a
Peso Final (g)	57,01 ± 2,54c	110,74 ± 10,44a	83,85 ± 6,08b	87,83 ± 3,99b
Consumo Diário*	4,85 ± 0,66b	9,41 ± 2,37a	7,32 ± 2,14a	8,13 ± 1,59a
NPU (%)	-**	97,60 ± 0,13a	63,40 ± 0,16b	65,40 ± 0,07b
Digestibilidade (%)	-	98,60 ± 0,02a	76,40 ± 0,01b	74,00 ± 0,05b
Valor Biológico (%)	-	98,78 ± 12,20a	85,50 ± 18,45b	88,39 ± 7,41b
N corpóreo	8,43 ± 0,59a	9,17 ± 0,19a	8,82 ± 0,57a	8,53 ± 0,61a

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), teste de SNK.

\* Consumo diário (g/dia/rato).

\*\* Não determinado.

TABELA 6. Balanço de nitrogênio dos ratos ( $n = 6$ ) alimentados com dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203), calculados para os últimos cinco dias do experimento

Parâmetros*	Dietas		
	Clara do Ovo	CD201	CD203
Dieta ingerida (D)	48,07 ± 6,69a	40,51 ± 4,33a	41,47 ± 4,23a
N ingerido (N)	0,91 ± 0,13a	0,83 ± 0,09a	0,89 ± 0,09a
Excreção fecal (F)	1,84 ± 0,29c	5,41 ± 0,68a	4,07 ± 0,54b
N fecal (FN)	0,27 ± 0,01c	0,34 ± 0,03b	0,45 ± 0,04a
F/D x 100	3,84 ± 0,39c	13,34 ± 1,79a	9,82 ± 0,83b
FN/N x 100	29,37 ± 6,43c	41,49 ± 6,27b	50,96 ± 8,20a

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), teste de SNK.

\* Os valores estão expressos em g/rato/5 dias.

de matéria fecal e de nitrogênio foi observado que os animais que receberam às dietas testes excretaram conteúdos maiores do que aqueles que consumiram a dieta controle positivo (1,84 e 0,27 g/rato). Entretanto, também foram verificadas diferenças nos valores dos tratamentos contendo as dietas experimentais. O grupo submetido à dieta CD201 (5,41 g/rato) apresentou maior excreção de matéria fecal do que o verificado com a dieta CD203 (4,07 g/rato). Inversamente, a excreção de nitrogênio foi maior quando utilizado a dieta contendo CD203 (0,45 g/rato) do que CD201 (0,34 g/rato). As relações de excreção fecal e dieta ingerida ( $F/D \times 100$ ) e nitrogênio excretado e nitrogênio ingerido mostraram que os animais alimentados com as dietas contendo os genótipos CD201 e CD203 apresentaram valores superiores aos animais do grupo controle positivo. Maior excreção de nitrogênio em relação ao ingerido foi verificada no grupo que consumiu o genótipo com maior teor de urease, quase duas vezes maior ao do controle positivo.

Após a análise de alguns parâmetros nutricionais dos animais submetidos às dietas experimentais, ao final do décimo dia de experimentação os mesmos foram sacrificados, tendo alguns órgãos internos como baço, coração, estômago, fígado, intestinos delgado e grosso, pâncreas, pulmões, rins e timo retirados, a fim de averiguar as possíveis alterações conseqüentes do consumo das dietas contendo teores diferenciados de urease. Procederam-se, então, às análises dos pesos relativos de alguns órgãos internos dos ratos. Os resultados estão mostrados na TABELA 7.

Em comparação com os órgãos internos dos animais pertencentes ao grupo mantido com a dieta à base de clara de ovo, foi verificado que nos animais submetidos às dietas experimentais houve hipertrofia dos intestinos delgado e grosso e atrofia do timo. Os animais que receberam a dieta contendo o genótipo rico em urease apresentaram, ainda, redução do peso seco relativo do baço e fígado. Os animais que receberam a dieta aprotéica apresentaram maior peso relativo de alguns órgãos, como rins, intestino grosso, pulmão e coração.

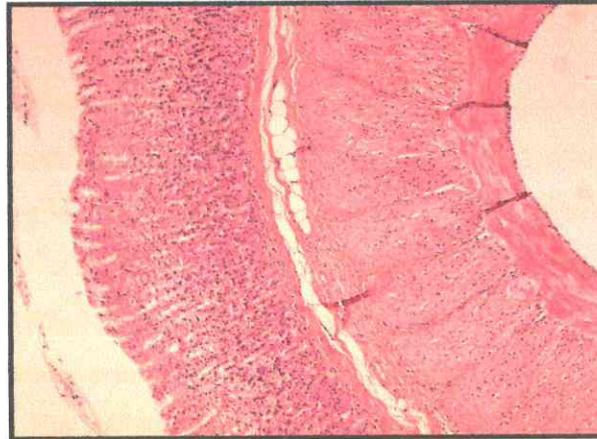
A FIGURA 8 mostra a análise histológica de cortes do estômago de animais alimentados com dietas controle positivo (clara do ovo) e experimentais (CD201 e CD203). Ao final do ensaio nutricional, amostras dos tecidos do estômago, intestino delgado e rins foram coletadas para análise histológica. Entretanto, não foram detectadas alterações nos

TABELA 7. Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos internos dos ratos (n = 6) submetidos a dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)

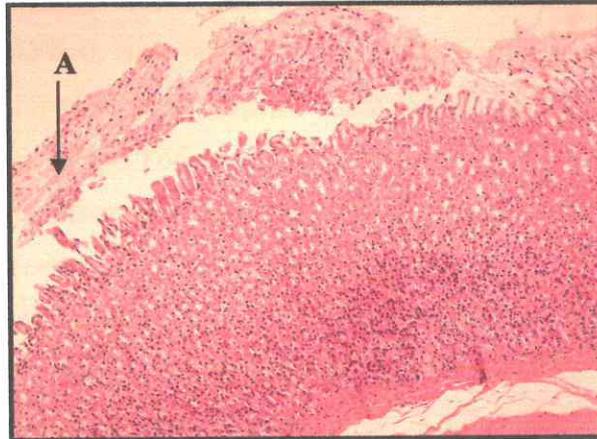
Órgãos	Dietas			
	NPC	Clara do Ovo	CD201	CD203
Estômago	0,52 ± 0,07a	0,45 ± 0,06a	0,52 ± 0,06a	0,52 ± 0,02a
Rins	0,86 ± 0,05a	0,51 ± 0,11b	0,51 ± 0,05b	0,46 ± 0,06b
Pâncreas	0,14 ± 0,11a	0,16 ± 0,06a	0,18 ± 0,04a	0,21 ± 0,05a
Intestino Delgado	1,80 ± 0,27b	1,68 ± 0,25 b	2,34 ± 0,23a	2,34 ± 0,43a
Timo	0,18 ± 0,04ab	0,23 ± 0,05a	0,17 ± 0,03b	0,17 ± 0,03b
Intestino Grosso	0,61 ± 0,08a	0,44 ± 0,06b	0,64 ± 0,14a	0,62 ± 0,16a
Pulmão	0,50 ± 0,05a	0,38 ± 0,05b	0,43 ± 0,02b	0,40 ± 0,04b
Baço	0,16 ± 0,02ab	0,18 ± 0,02a	0,15 ± 0,02ab	0,14 ± 0,02b
Fígado	4,40 ± 0,34a	4,01 ± 0,56a	3,85 ± 0,47a	3,32 ± 0,27b
Coração	0,32 ± 0,05a	0,24 ± 0,03b	0,28 ± 0,02b	0,25 ± 0,02b

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), teste de SNK.

Clara do ovo



CD201



CD203

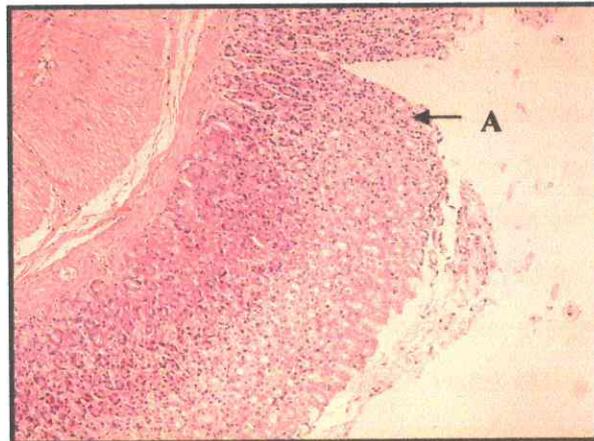


FIGURA 9. Cortes (HE) do estômago de ratos alimentados com dietas à base de clara do ovo e contendo farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203 (aumento de 100x). A - Erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas.

rins e intestino. Já o tecido estomacal mostrou a presença de erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas, hipertrofia e hiperplasia das células parietais e hipotrofia das células principais. Em alguns trechos foram, também, observadas hipertrofia de células mucosecretoras com descamação e, em outras áreas, rarefação delas. Estas alterações foram mais evidentes no tecido do estômago dos animais submetidos à dieta preparada com o genótipo CD203, que apresenta maior conteúdo de urease do que o CD201. Em adição, o tecido estomacal dos animais alimentados com a dieta contendo CD201 apresentou áreas mais preservadas.

No exame morfométrico, encerrando medidas da mucosa do estômago da superfície luminal até a muscular, foi observado aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos animais que consumiram dietas contendo soja. Todavia, esse aumento foi ainda maior com o consumo de CD203, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) de CD201 (TABELA 8).

A TABELA 9 mostra as dosagens séricas e a creatinina urinária dos animais alimentados com as dietas controles (NPC e clara do ovo) e experimentais (CD201 e CD203). Os animais alimentados com as dietas contendo os dois genótipos de soja apresentaram concentrações de glicose, proteínas totais, amilase, alanina aminotransferase e urease semelhantes as do grupo controle positivo. Os animais submetidos à dieta contendo CD201 mostraram, ainda, concentrações de creatinina urinária e plasmática equivalentes as dos animais alimentados com as proteínas da clara do ovo, diferentemente do observado com os ratos que receberam o genótipo contendo maior teor de urease. Os valores de creatinina urinária e plasmática para os animais submetidos à dieta contendo CD203 foram 2,93 e 0,58 mg/dL, respectivamente, contrastando com 1,60 e 0,71 mg/dL, respectivamente, apresentado pelo grupo controle positivo. Por outro lado, ambos genótipos mostraram altas taxas de uréia sérica (26 a 27 mg/dL), cerca de cinco vezes maior do que a do grupo alimentado com proteínas da clara do ovo. Concentrações menores de aspartato aminotransferase também foram apresentadas pelos animais que continham soja em suas dietas. Quando comparados os genótipos CD201 e CD203 entre si, não foram encontradas diferenças significantes. Apesar da creatinina urinária nos animais alimentados com CD203 ter sido significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que no controle positivo, ela não diferiu significativamente do grupo alimentado com CD201. Quanto à creatinina plasmática, mesmo tendo sido significativamente menor ( $p < 0,05$ ) no grupo CD203, em

relação aos grupos controle positivo e CD201, o valor detectado se encontra dentro da faixa considerada normal para ratos (HARKNESS e WAGNER, 1993).

TABELA 8. Medidas (n = 100) da mucosa do estômago (superfície luminal até a muscular da mucosa) de ratos submetidos a dietas controle (proteína da clara do ovo) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)

Mucosa do Estômago	Dietas		
	Clara do Ovo	CD201	CD203
Espessura (µm)	424,60 ± 43,34c	479 ± 53,33b	492,61 ± 42,15a

Média ± desvio padrão. Letras diferentes na horizontal indicam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

TABELA 9. Dosagens séricas e creatinina urinária em ratos (n = 6) submetidos a dietas controle (proteína da clara do ovo e NPC) e experimentais (farinha de sementes de soja, genótipos CD201 e CD203)

Dosagens	Dietas				Ratos*
	NPC	Clara do Ovo	CD201	CD203	
Creatinina Urinária (mg/dL)	2,48 ± 0,70ab	1,60 ± 0,85b	2,65 ± 0,93ab	2,93 ± 0,75a	-
Glicose (mg/dL)	65,36 ± 15,46b	126,88 ± 12,44a	114,33 ± 19,21a	134,00 ± 10,23a	50 – 135
Proteínas Totais (g/dL)	3,84 ± 0,41b	5,37 ± 0,49a	5,53 ± 0,40a	5,33 ± 0,48a	5,6 – 7,6
Creatinina Plasmática (mg/dL)	0,34 ± 0,08c	0,71 ± 0,08a	0,70 ± 0,03a	0,58 ± 0,08b	0,2 – 0,8
Amilase (U/dL)	51,36 ± 25,59a	59,80 ± 28,33a	65,12 ± 5,67a	52,00 ± 25,75a	-
Uréia (mg/dL)	25,57 ± 5,57a	5,75 ± 3,04b	27,19 ± 4,77a	26,10 ± 7,18a	15 – 21
Aspartato Aminotransferase (U/mL)	90,05 ± 7,23a	85,45 ± 7,76a	71,00 ± 9,79b	65,58 ± 4,91b	-
Alanina Aminotransferase (U/mL)	19,86 ± 4,77a	20,07 ± 1,55a	21,52 ± 6,27a	20,15 ± 5,80a	-
Urease (U/mgP)	10,28 ± 0,23a	4,60 ± 0,34b	4,50 ± 0,69b	4,58 ± 0,21b	-

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), teste de SNK.

\*Valores normais para ratos (HARKNESS e WAGNER, 1993).

### 6.7. Ensaio Biológico 2 - Avaliação da Toxicidade Aguda da Urease Purificada por Via Oral (Dose Única)

A administração de uma única dose de urease (1000 U) não causou mortalidade dos animais, no período de 24 horas.

A FIGURA 9 mostra análises de cortes do estômago de animais entubados com NaCl 0,15 M (controle) e urease , após 24 horas. Apesar de terem sido coletadas amostras de tecido com 4, 8 e 24 horas após entubação, alterações mais proeminentes foram verificadas no maior tempo. No estômago dos animais que receberam urease foram visualizadas erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas. Uma discreta hipertrofia das células mucosecretoras foi observada no controle. Todavia, nos animais tratados com urease, esta alteração foi muito mais intensa, tendo sido detectadas, também, metaplasia intestinal no colo da glândula, com células parietais volumosas e hipocoradas, e hiper Cromasia da camada basal.

### 6.8. Ensaio Biológico 3 - Determinação do pH e Equivalentes Ácidos no Conteúdo Estomacal de Ratos Submetidos à Administração de Urease Purificada por Via Oral

A TABELA 10 e a FIGURA 10 mostram os valores de pH do estômago dos animais nos diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos) após a entubação com urease de soja e NaCl 0,15 M (controle). Os valores pH estomacal dos animais que receberam urease estiveram sempre acima do controle. Essa diferença marcante já é visível com apenas 15 minutos de tratamento. Com 30 minutos, um maior valor de pH é atingido,

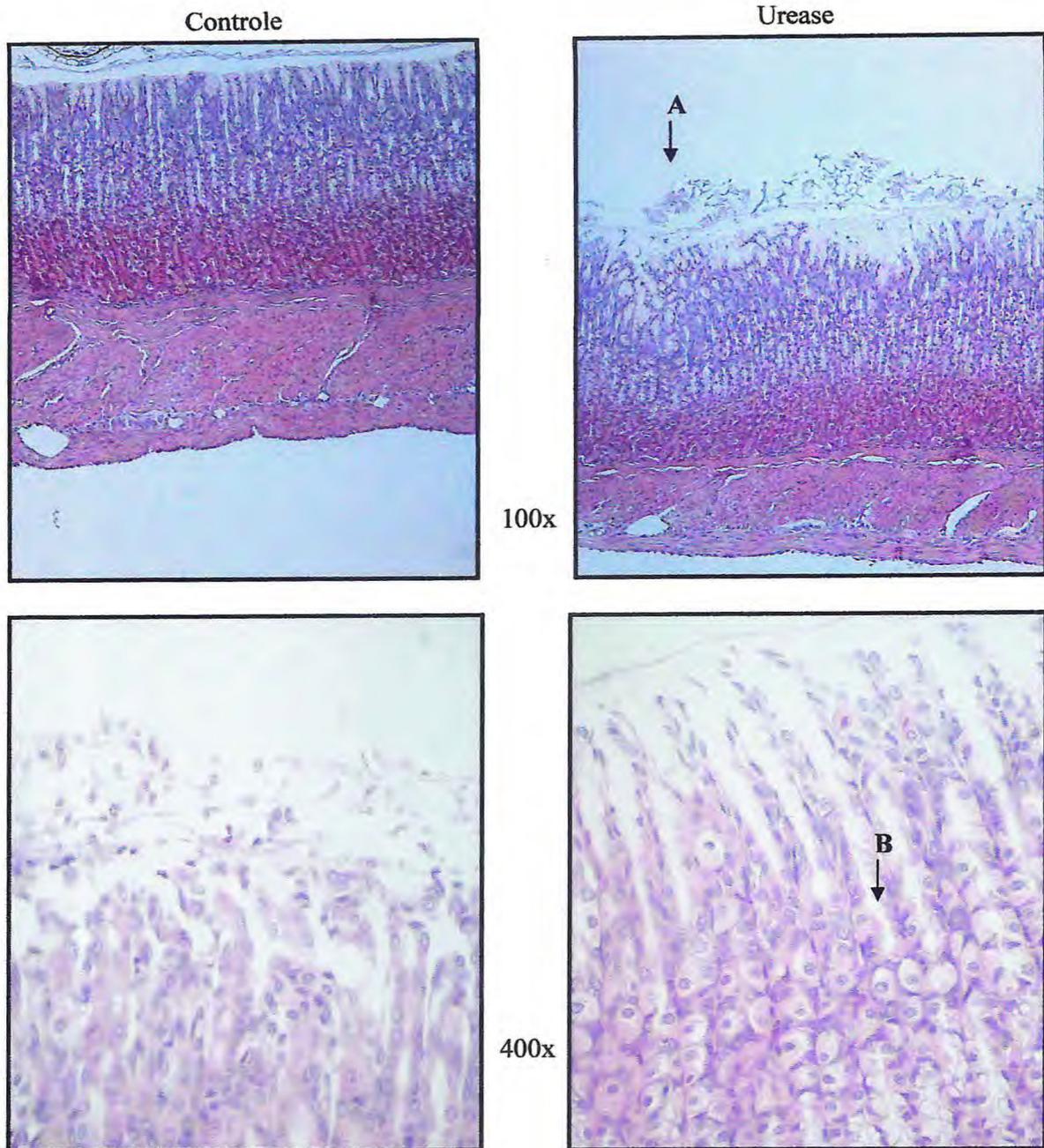


FIGURA 10. Cortes (HE) do estômago de ratos submetidos ao ensaio de toxicidade aguda (dose simples), após 24 horas de ingestão de NaCl 0,15 M (controle) e de urease pura. A - Erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas. B - células parietais volumosas e hipocoradas.

TABELA 10. Valores do pH estomacal de animais (n = 6), medidos após diferentes tempos de entubação com NaCl 0,15 M (controle) e urease (1000 U)

Tempos (minutos) <sup>¶</sup>	pH <sup>§</sup>	
	NaCl 0,15 M	Urease
0	3,18 ± 0,19Aa	3,18 ± 0,19Ca
15	3,31 ± 0,44Ab	3,96 ± 0,48Ba
30	3,68 ± 0,54Ab	4,74 ± 0,53Aa
60	3,47 ± 0,36Ab	4,73 ± 0,42Aa
120	3,54 ± 0,43Ab	4,77 ± 0,31Aa
240	3,83 ± 0,46Aa	4,06 ± 0,30Ba

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (entre tempos dentro de cada tratamento). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (entre tratamentos dentro de cada tempo).

<sup>¶</sup> Minutos após a entubação das amostras (controle e urease).

<sup>§</sup> Medida de pH do conteúdo estomacal em diferentes tempos após entubação.

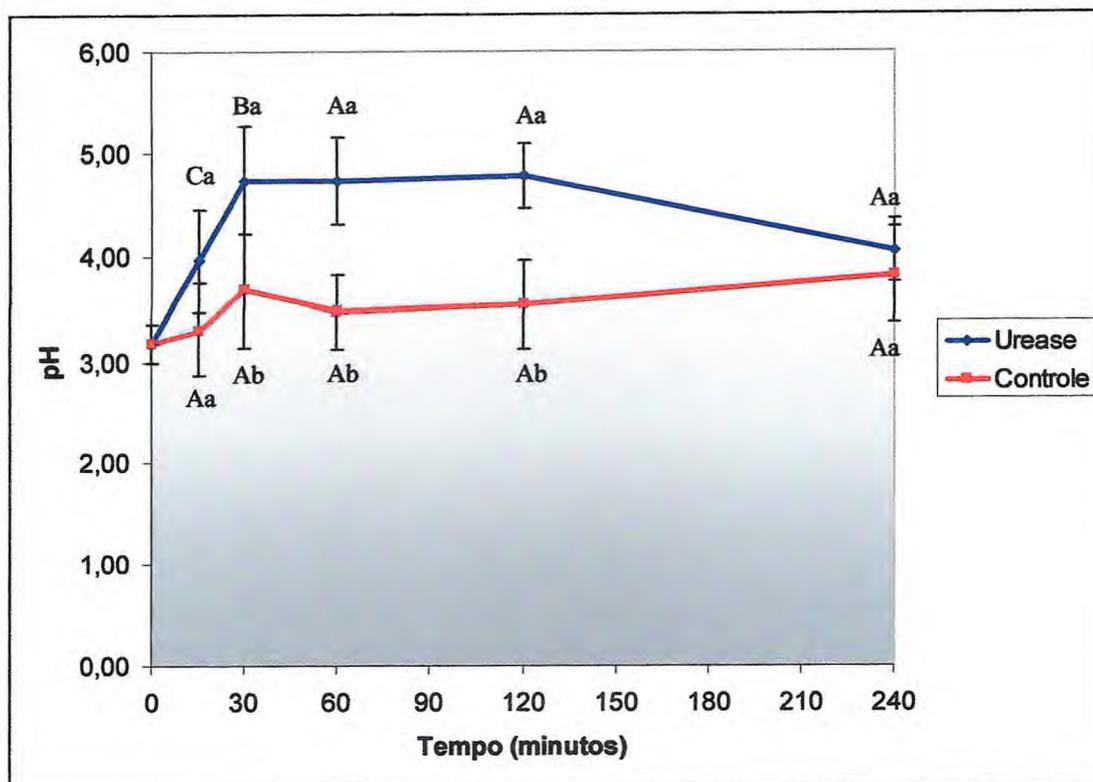


FIGURA 11. Variação do pH estomacal de animais, em resposta a entubação com NaCl 0,15 M (controle) e urease pura (1000 U), medidos após diferentes tempos de entubação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos dentro de cada tratamento. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos dentro de cada tempo.

permanecendo estável até 120 minutos. Com 240 minutos, é observado um decréscimo no pH, cujo valor torna-se comparável ao verificado no controle no mesmo período após incubação, mas, ainda, superior ao medido no tempo zero. Opostamente, não foram verificadas variações nos valores de pH no conteúdo estomacal dos animais tratados com NaCl 0,15 M.

A TABELA 11 mostra os valores de equivalentes ácidos encontrados após titulação do conteúdo estomacal de animais entubados com NaCl 0,15 M e urease. Nos animais entubados com urease, foram verificados valores inferiores de equivalentes ácidos em relação ao tempo zero em todos os tempos avaliados, corroborando com os dados de pH. Todavia, apenas o valor documentado no tempo de 30 minutos é que foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ). Isso significa que a urease ocasionou redução da acidez após 30 minutos, retornando depois ao normal. Já nos animais entubados com NaCl 0,15 M, embora não exista diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os valores determinados, para alguns dos intervalos avaliados, foi detectada tendência de aumento dos equivalentes ácidos. Quando comparados os dois tratamentos em cada tempo, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os valores apresentados, exceto no tempo zero, evidenciando que a urease diminuiu a acidez no estômago.

TABELA 11. Equivalentes ácidos do conteúdo estomacal de animais ( $n = 6$ ), medidos após diferentes tempos de entubação com NaCl 0,15 M (controle) e urease pura (1000 U)

Tempos (minutos) <sup>¶</sup>	Equivalentes Ácidos <sup>§</sup>	
	NaCl 0,15 M	Urease
0	11,37 ± 2,97	11,37 ± 2,97
15	14,50 ± 2,23A	9,01 ± 1,33B
30	11,43 ± 2,54A	7,47 ± 1,70*B
60	14,38 ± 1,78A	9,65 ± 2,67B
120	13,06 ± 3,56A	9,68 ± 2,24B
240	10,83 ± 2,46A	8,79 ± 1,30B

Valores seguidos por \* diferem significativamente do grupo controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada tempo após entubação (Teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

<sup>¶</sup> Minutos após a entubação das amostras (controle e teste).

<sup>§</sup> Medida de equivalentes ácidos no conteúdo estomacal em diferentes tempos após entubação.

## **7. DISCUSSÃO**

O presente trabalho descreve estudos voltados para avaliação dos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos da urease de soja. Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório sugeriram que a urease presente em sementes de soja, juntamente com os inibidores de tripsina e a lectina, poderia promover efeitos deletérios em animais, quando soja crua fosse incluída em suas dietas como fonte de proteínas. A literatura consultada, além da apresentada pelo nosso grupo de pesquisa, não dispõe de informações a este respeito, razão pela qual foi desenvolvido este trabalho de pesquisa. Dessa forma, todos os experimentos foram realizados de modo a responder se a urease é um constituinte protéico antinutricional e/ou tóxico.

Seis genótipos de soja foram disponibilizados pela Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda (COODETEC), Cascavel, Paraná. As primeiras análises foram direcionadas para a seleção de dois desses genótipos, a serem utilizados nas etapas posteriores do presente trabalho. Numa primeira abordagem, foram analisados seus conteúdos protéicos, perfis eletroforéticos e teores de constituintes protéicos antinutricionais e/ou tóxicos.

Os dados da composição química centesimal (TABELA 2) mostram que todos os genótipos avaliados são ricos em proteínas, ainda que tenham sido detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre eles. Os valores observados são semelhantes ou próximos aos apresentados por vários outros genótipos de soja, cujos dados encontram-se disponíveis na literatura (VASCONCELOS *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2006; REDONDO-CUENCA *et al.*, 2007; MANJAYA *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008).

Os genótipos aqui estudados apresentam perfis protéicos semelhantes, mostrados por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (FIGURA 2), com distribuição de bandas similar ao de outros genótipos de soja (VASCONCELOS *et al.*, 1997).

Fatores antinutricionais e/ou tóxicos de natureza protéica estão presentes em diferentes leguminosas, dentre elas nos genótipos de soja avaliados no presente trabalho (TABELA 3), sendo conhecidos por causarem efeito negativo na nutrição e/ou nos processos fisiológicos dos animais que os consomem. Com relação aos inibidores de tripsina, os genótipos analisados formam um grupo bastante homogêneo, onde somente CD209 mostrou-se diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais. Os teores desses

componentes são da mesma ordem dos achados em outros genótipos (MIURA *et al.*, 2001; OLGUIN *et al.*, 2003; CAMPELLO, 2003; MACHADO *et al.*, 2008). Os efeitos da ingestão de inibidores de tripsina já são bastante conhecidos e a inibição de enzimas proteolíticas causadas por eles tem como consequência a redução da digestão dos alimentos, da absorção de nitrogênio e enxofre e da taxa de crescimento, aumento da síntese e secreção de tripsinogênio e quimiotripsinogênio pelo pâncreas, hipertrofia e hiperplasia pancreática, síntese e liberação de fatores hormonais (colecistocinina, CCK), dentre outros (GRANT, 1989, 1995; NORTON, 1991; LIENER, 1994; MONTEIRO *et al.*, 2004; CLARKE e WISEMAN, 2005).

A presença de lectinas foi um outro parâmetro avaliado. Baseado em seu teor nas sementes, verificado através da capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho, os genótipos estudados foram divididos em dois grupos, um encerrando aproximadamente 2,7 UH/mg de farinha (CD204, CD206, CD207 e CD209) e o outro em torno de 1,4 UH/mg de farinha (CD201 e CD203). Ambos os valores estão dentro da faixa encontrada na literatura (FRIEDMAN *et al.*, 1991; BRÍGIDO, 2006; MACHADO *et al.*, 2008). As lectinas são consideradas fatores antinutricionais, ou tóxicos (dependendo da dose), porque quando incorporadas na dieta provocam alterações no metabolismo intestinal e sistêmico, causando danos aos animais que a consomem, tais como retardo no crescimento e várias alterações que podem levar à morte. Por interagirem com glicoconjugados presentes na membrana celular do intestino, as lectinas causam ruptura da borda em escova, atrofia das microvilosidades, hiperplasia das células das criptas, perda da viabilidade das células intestinais e alterações de alguns órgãos (OLIVEIRA *et al.*, 1994; BARDOCZ *et al.*, 1995; PUSZTAI e BARDOCZ, 1995; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

Com relação à toxicidade aguda, os genótipos analisados mostraram-se menos tóxicos em relação a outros já estudados pelo nosso grupo (VASCONCELOS *et al.*, 1997; BRÍGIDO, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A toxicidade aguda das sementes de soja é atribuída a duas proteínas distintas, a soyatoxina (SYTX) (VASCONCELOS *et al.*, 1994) e a toxina da soja (SBTX) (VASCONCELOS *et al.*, 2008). As duas toxinas possuem características físico-químicas distintas, mas provocam sinais clínicos semelhantes quando injetadas por via intraperitoneal em camundongos, tais como dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas, precedendo à morte do animal. Quanto aos efeitos

antinutricionais, um estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2001) mostrou que as toxinas, juntamente com outros fatores antinutricionais, foram capazes de conferir um aumento no tamanho do pâncreas e intestino delgado. Todavia, as toxinas estavam presentes com outros constituintes das sementes de soja, sendo necessários testes adicionais usando as proteínas tóxicas purificadas.

O teor de urease, tendo como base a atividade ureásica, mostrou-se bem heterogêneo entre os diferentes genótipos. O genótipo CD203 (135,75 U/g de farinha), por exemplo, possui mais que o dobro de atividade ureásica determinada em CD201 (52,37 U/g de farinha). Ambos os valores têm sido encontrados em outros genótipos de soja e estão disponíveis na literatura (VASCONCELOS *et al.*, 1997; BRÍGIDO, 2006). Embora haja deficiência de estudos com o objetivo de averiguar a ação antinutricional e/ou tóxica das ureases de origem vegetal para animais superiores, a alta homologia entre elas e as ureases bacterianas conduz a especulações de que, como as ureases bacterianas, as ureases de origem vegetal poderiam ser responsáveis por danos causados à mucosa gástrica, exercendo algum efeito deletério. As ureases bacterianas causam toxicidade direta na mucosa gástrica, em virtude da amônia liberada pela hidrólise da uréia, e podem provocar impedimento do fluxo de prótons das glândulas gástricas para o lúmen, resultando numa difusão reversa de prótons. A amônia tem atividade citotóxica, aumentando a permeabilidade da célula epitelial para prótons e é, também, um potente ativador de monócitos *in vitro*, provavelmente participando da resposta imune local (CUSSAC *et al.*, 1992; POLLACO e HOLLAND, 1993; GOBERT *et al.*, 2002). Quanto à ação antinutricional, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (VASCONCELOS *et al.*, 2001) sugeriu ser a urease um fator tóxico. Entretanto, nesse trabalho, assim como relatado para as toxinas da soja, foram utilizadas dietas contendo farinha das sementes e não a urease purificada.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a seleção de dois genótipos entre os seis análises, para avaliação de parâmetros nutricionais e purificação da urease. Um deles foi o CD203, que por apresentar maior atividade ureásica, foi selecionado para purificação dessa proteína, já que um dos objetivos desse trabalho foi purificar a urease de soja e avaliar seus efeitos antinutricionais e/ou tóxicos. O outro genótipo foi o CD201 (52,37 U/g de farinha), por apresentar menos da metade da atividade ureásica de CD203 (135,75 U/g de farinha), mas não diferir nos conteúdos de proteína total, lectina, toxinas e inibidores de

tripsina (TABELA 3). Esses dois genótipos foram utilizados em um dos ensaios biológicos realizados nesse trabalho e será discutido mais adiante.

Para purificação da urease, foi inicialmente utilizado o protocolo descrito por Follmer *et al.* (2004). Este protocolo foi modificado de forma a otimizar o processo de obtenção de um material purificado (FIGURA 1). As mudanças se deram logo no início, na etapa de precipitação com acetona, onde foi verificado que o contato do extrato bruto com acetona por apenas uma hora já era suficiente para precipitar as proteínas, não havendo a necessidade de duas horas de repouso. Uma outra alteração foi logo em seguida, quando nas diálises, membranas com limite de exclusão de 50 kDa passaram a ser utilizadas (SPECTRA 6 - BioAgency Biotecnologia e Com. Ltda), possibilitando a retirada de moléculas de massa molecular abaixo de 50 kDa e a obtenção do material de interesse mais puro (TABELA 4). Por fim, foi introduzida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-300 HR, favorecendo a obtenção da urease purificada, apresentando massa molecular aparente de 90 kDa e alta atividade ureolítica (FIGURA 4; TABELA 4). Koivunen *et al.* (2003), purificando enzimas que hidrolisam uréia-metileno de bactérias, utilizaram matrizes de Q-Sepharose e Sephacryl S-300 HR, como utilizado na purificação da urease de soja, e verificaram que a matriz de troca iônica Q-sepharose se mostrou mais eficiente do que outras matrizes, como a DEAE-Sepharose.

Ureases de origens diversas podem ser inativadas pela presença de metais pesados e por oxidação. Para evitar a perda da atividade enzimática, foram utilizados EDTA e 2-mercaptoetanol em todos os passos de purificação, da mesma forma como usados para outras ureases (MOHAMED *et al.*, 1999; HIRAYAMA *et al.*, 2000; KOIVUNEN *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2004). Em adição, neste trabalho foi observado que é de fundamental importância utilizar reagentes de boa qualidade e dentro dos prazos de validade. Os resultados revelaram que o uso de 2-mercaptoetanol com prazo de validade ultrapassado, mas ainda capaz de clivar pontes dissulfeto, foi capaz de reduzir a atividade da enzima para menos de um terço da atividade original.

Uma vez purificada a urease, as etapas seguintes compreendem os ensaios biológicos a fim de avaliar os efeitos dessa enzima, quando administrada por via oral. Todavia, tem sido mostrado que para uma proteína apresentar alguma atividade no organismo, por via oral, ela precisa ser, pelo menos, parcialmente resistente à hidrólise por

proteases presentes no trato digestório dos animais (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Wilfart *et al.* (2007) mostraram que cerca de 67% das proteínas presentes em farinha de sementes de soja são digeridas já no estômago. Portanto, a expectativa era que a urease de soja fosse, também, digerida quando da passagem pelo estômago. Todavia, na avaliação *in vitro* dos efeitos da pepsina sobre a urease de soja foi verificado, por eletroforese, que a banda referente a essa proteína não foi completamente digerida ao longo de 4 horas, sendo, inclusive, reconhecida por IgG anti-urease de soja (FIGURA 6) e por IgG monoclonal anti-urease de *Canavalia ensiformis*, obtido comercialmente (Sigma) (dados não mostrados). É interessante a observação de que embora parcialmente digerida, a enzima conservou sua atividade ureolítica até 4 horas após sua incubação com pepsina (FIGURA 5).

Devido ao baixo rendimento da urease purificada, aliado à necessidade de elevada quantidade dessa proteína para ser incorporada em uma dieta para ratos em crescimento, nos levou a realizar um primeiro ensaio biológico apenas com a farinha das sementes de soja, como única fonte de proteínas (10%) foi realizado. A finalidade foi avaliar a qualidade nutricional de sementes de genótipos de soja expressando atividade ureásica bem diferenciada, de modo a possibilitar correlações entre os efeitos observados e a urease consumida. Para esse fim, portanto, os genótipos CD201 (52,37 U/g de farinha) e CD203 (135,75 U/g de farinha) foram utilizados. Os animais alimentados com dietas contendo farinha das sementes de ambos os genótipos mostraram redução no crescimento, quando comparados ao controle positivo (clara do ovo), não havendo diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 7, TABELA 5). Essa redução do crescimento pode ser explicada, pelo menos em parte, pelos baixos valores, em relação ao controle positivo, de alguns parâmetros nutricionais avaliados, tais como NPU (utilização líquida de proteínas), digestibilidade e valor biológico, que foram semelhantes para os dois genótipos, independentemente da diferença na atividade ureásica apresentada. Os valores de NPU para os animais dos grupos submetidos às dietas-teste (CD201 e CD203) foram, aproximadamente, 35% mais baixo ao do grupo controle, mostrando que do total de proteínas ingeridas, somente 65% foram incorporadas pelo organismo. Similarmente, os valores de digestibilidade foram significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores ao do grupo alimentado com dieta contendo proteínas da clara do ovo, aproximadamente de 25% menor. O mesmo foi verificado com o valor biológico, que relaciona a quantidade de nitrogênio

absorvida que foi retida no organismo, cujos índices foram em torno de 10% mais baixos do que o do controle positivo. Baixos valores desses parâmetros foram, também, relatados para outros genótipos de soja, quando utilizados como única fonte de proteínas na dieta para ratos em crescimento (VASCONCELOS *et al.*, 2001; BRÍGIDO, 2006; PIRES *et al.*, 2006).

Diferentemente do apresentado até o momento, as relações entre eliminação fecal e consumo de dieta ( $F/D \times 100$ ) e entre nitrogênio fecal e nitrogênio ingerido ( $FN/N \times 100$ ) mostraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparados os dois genótipos utilizados (TABELA 6). A razão  $F/D$  foi maior no grupo submetido à dieta contendo CD201 do que com CD203. Todavia, a razão  $FN/N$  foi superior nos animais que consumiram CD203 ao invés de CD201. Ainda que os dados não sejam suficientes para fazer uma afirmativa, é possível que a resistência à digestão apresentada pela urease tenha alguma relação com a elevada excreção de nitrogênio nas fezes, particularmente se considerado que a atividade ureásica é maior no genótipo CD203 do que no CD201.

O consumo das dietas contendo os genótipos de soja resultou em alterações de alguns órgãos (TABELA 7). Em comparação com o controle “clara do ovo”, os ratos que se alimentaram com as dietas contendo farinhas dos genótipos de soja apresentaram hipertrofia dos intestinos delgado e grosso e atrofia do timo. Esses resultados já eram esperados e são atribuídos aos fatores antinutricionais presentes nas sementes de soja, e, também da inanição protéica, desde que os ratos pertencentes ao grupo aprotéico apresentaram algumas destas alterações observadas (GRANT *et al.*, 1987; GRANT, 1989; MAIA, 1998). Os ratos alimentados com o genótipo CD203, rico em urease, também apresentaram atrofia do baço e fígado. Apenas com os dados obtidos nesse estudo é difícil atribuir uma razão para tal fato. Todavia, não pode ser descartada a possibilidade desta alteração estar associada com a urease. Há relatos mostrando que a bactéria *Helicobacter hepaticus* causa doenças e alterações hepáticas, havendo evidências de que a urease bacteriana está envolvida nesse processo (BECKWITH *et al.*, 2001). Alterações no pâncreas, pulmões e rins não foram detectadas, conforme relatado por outros autores (GRANT *et al.*, 1987; GRANT, 1989; PUSZTAI, 1991; LIENER, 1994; CLARKE e WISEMAN, 2005).

Embora não tenham sido observadas diferenças no peso seco relativo do estômago entre os diferentes tratamentos, experimentais e controles, análises histológicas e morfométricas mostraram alterações no estômago dos animais que consumiram dietas contendo soja (FIGURA 8). Presença de erosão de células epiteliais, perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas, hipertrofia e hiperplasia das células parietais e hipotrofia das células principais foram algumas das alterações observadas. Em algumas áreas, hipertrofia das células mucosecretoras com descamação foi, também, verificada. As alterações foram bem mais evidentes no estômago dos animais cuja dieta continha o genótipo CD203. O estômago desses animais apresentou, também, a mucosa mais espessa (TABELA 8). A urease da bactéria *Helicobacter pylori* tem sido considerada a principal causa de gastrite e úlcera no estômago em humanos (HARRIS *et al.*, 1996; KEARNEY *et al.*, 2000; RICCI, 2007). Assim, é possível que as alterações descritas para os animais alimentados com os genótipos de soja tenham associação com a urease de soja, hipótese esta respaldada pelo fato da mucosa do estômago dos animais alimentados com a cultivar CD201 ter apresentado áreas mais preservadas.

Análise da bioquímica sanguínea e creatinina urinária foram realizadas para verificar alterações metabólicas mais discretas entre os animais alimentados com os dois genótipos. Foram então feitas análise da função renal, com dosagens de uréia e creatinina séricas e creatinina urinária, análise da função hepática, com dosagens de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) séricas, análise do metabolismo pancreático, com a determinação da amilase sérica e também a análise de glicose e proteínas totais, para observar alterações de carboidratos e proteínas no sangue. A determinação da urease sérica foi realizada para verificar existência de atividade ureásica no soro dos animais alimentados com os genótipos de soja. Algumas alterações foram detectadas como mostra a TABELA 9. Os animais alimentados com as duas dietas-teste, CD201 e CD203, apresentaram alterações nas dosagens de AST e uréia. Com relação às determinações de AST, não existe correlação clínica de níveis baixos de AST e patologias conhecidas. Níveis elevados ocorrem em hepatites virais, doenças necróticas hepáticas e distrofias musculares (BORGES *et al.*, 2005). Ureia é o principal produto do metabolismo das proteínas e ácidos nucleicos e constitui, aproximadamente, 80% do nitrogênio excretado. A uréia é formada no fígado a partir dos ácidos aminados e do íon amônio

( $\text{NH}_4^+$ ), proveniente da ação bacteriana no intestino grosso. A produção de uréia é fortemente afetada pela ingestão, catabolismo e perda de proteínas no trato gastrointestinal. O aumento do teor de uréia possui três causas principais: redução da eliminação renal, aumento do catabolismo protéico e a combinação destes dois mecanismos. Assim, os níveis aumentados de uréia observados nos animais alimentados com CD201 e CD203 podem ser oriundos do alto catabolismo protéico provocado pelo não aproveitamento total das proteínas de soja ingeridas pelos animais. Os animais alimentados com o genótipo CD203 apresentaram, também, alteração na dosagem de creatinina sérica, quando comparado ao grupo controle, porém esses valores ainda estão dentro da faixa considerada normal para ratos, não caracterizando alteração no metabolismo. Com relação à creatinina urinária, foi observada elevação considerável de seu nível em relação ao grupo alimentado com as proteínas da clara do ovo, podendo ser devido à atrofia de alguns órgãos, como já mencionado anteriormente. A creatinina é a forma cíclica da creatina, sendo formada em uma taxa constante pelo músculo, o principal estoque de creatina-fosfato. É o elemento nitrogenado no sangue menos variável. Elevações de creatinina sérica são vistas na insuficiência renal e glomerulonefrite crônica. Sua excreção urinária não é influenciada pela dieta e quando diminuída pode estar relacionada com atrofia muscular (HENRY, 1996; LIMA *et al.*, 2001). As dosagens de glicose, proteínas totais, amilase e ALT (alanina aminotransferase) não revelaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparadas as do grupo controle positivo e se assemelham àquelas presentes na literatura (KUROIWA *et al.*, 2005; JESCHKE *et al.*, 2005). Urease sérica elevada nos animais alimentados com a dieta isenta de proteínas pode ser devido à interferência da amônia gerada pelo alto catabolismo protéico neste grupo. Esta amônia é detectada pelo método utilizado na determinação da atividade ureásica, sendo, portanto, um resultado falsamente elevado.

Em virtude das alterações observadas nos estômagos dos animais, particularmente nos submetidos à dieta contendo o genótipo com maior atividade ureásica, um segundo ensaio biológico foi programado, mas, desta vez, usando a urease purificada de sementes do genótipo CD203. Este ensaio teve como finalidade a análise da toxicidade aguda da urease de soja para animais submetidos à exposição de curta duração. A taxa de mortalidade dos ratos foi zero, no período de 24 horas, quando uma dose única de urease (1000 U) foi administrada por entubação com sonda orogástrica em ratos. Embora não tenha sido

detectada letalidade dos animais, sintomas de intoxicação aguda foram detectados, desde que alterações severas já foram notificadas com apenas 24 horas após entubação dos animais. A análise histológica do estômago dos animais que receberam a urease de soja revelou presença de erosão de células epiteliais e perda da arquitetura da região superior das glândulas gástricas, hipertrofia das células mucosecretoras, metaplasia intestinal no colo da glândula, com células parietais volumosas e hipocoradas, e hiperplasia da camada basal (FIGURA 9). Estes resultados confirmam que as alterações visualizadas no estômago dos animais alimentados com farinha dos genótipos de soja foram provenientes da ação da urease. A resistência demonstrada pela urease de soja no pH e digestão enzimática estomacal poderia explicar, pelo menos em parte, seus efeitos, alguns deles já relatados para as ureases de origem bacteriana (MOBLEY *et al.*, 1995; SIRKO e BRODZIK, 2000). A urease de *H. pylori* proporciona a liberação de amônia, podendo resultar na formação de hidróxido de amônio, que é tóxico para as células parietais, e facilitar a retrodifusão de íons hidrogênio, promovendo a erosão e ulceração do tecido (TAKEUCHI *et al.*, 1995; LOGAN, 1996; KEARNEY *et al.*, 2000; GOLBERT *et al.*, 2002). Comparando as alterações oriundas das duas ureases, de soja e da bactéria, similaridades são detectadas, compreendendo metaplasia intestinal e células parietais volumosas e hipocoradas, indicativas da presença de eventos já relatados, como a retrodifusão de íons hidrogênio (SIQUEIRA *et al.*, 2007; RICCI *et al.*, 2007).

Tendo em vista a presença de alterações histológicas no estômago de animais ligadas à presença de urease, um terceiro ensaio biológico foi programado de modo a avaliar parâmetros relacionados à acidez do conteúdo estomacal e, assim, correlacionar com a produção de amônia. Nesse ensaio, foram determinados o pH e equivalentes ácidos no conteúdo estomacal de ratos submetidos a uma única dose de urease (1000 U) por via oral, até 4 horas após exposição. Com apenas 15 minutos após entubação dos animais com urease, elevação do pH foi verificada, permanecendo estável até 120 minutos (TABELA 10, FIGURA 10). Como confirmação desses resultados, os equivalentes ácidos se mostraram abaixo do controle, animais entubados com NaCl 0,15 M (TABELA 11). É muito provável que a elevação do pH seja decorrente da amônia produzida pela hidrólise da uréia, semelhantemente ao verificado com a urease de *H. pylori*. A urease produzida pela bactéria *H. pylori* é tida como o principal fator de colonização desta bactéria devido à

amônia liberada pela hidrólise da uréia presente no estômago (GRAHAM, 1989; LICHTENBERGER *et al.*, 1995). Mutantes de *H. pylori* que não produzem urease não conseguem colonizar o estômago (TSUDA *et al.*, 1994; BIJLSMA *et al.*, 1998; STAHLER *et al.*, 2005).

Por fim, como uma maneira de ressaltar a relevância do presente estudo, é importante destacar que pouco se sabe sobre os efeitos biológicos de ureases vegetais. Estudos recentes mostraram que ureases de soja e de *Canavalia ensiformis* possuem atividade pró-inflamatória, induzem exocitose de alguns tipos de células, como plaquetas, macrófagos e neutrófilos, e são capazes de induzir agregação plaquetária (FOLLMER *et al.*, 2004; OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006). Ureases de plantas também apresentaram atividade inseticida sobre alguns modelos testados (FOLLMER *et al.*, 2004a; 2004b; STANISÇUASKI *et al.*, 2005). Nesse trabalho, uma outra atividade foi mostrada, os seus efeitos tóxicos por via oral para animais superiores, induzindo alterações particularmente no estômago, sendo muitos de seus efeitos similares aos da urease de *H. pylori*. Os resultados obtidos corroboram com a proposta de que ureases vegetais participam de processos de defesa química da planta, além de atuar na biodisponibilização de nitrogênio.

## **8. CONCLUSÕES**

A urease presente em sementes de soja mostrou-se resistente, “in vitro”, à ação da pepsina, mantendo sua atividade ureásica mesmo após 4 horas de contato com a enzima. Foi capaz, ainda, de induzir alterações na mucosa gástrica de ratos e de elevar o pH do conteúdo estomacal, de forma semelhante ao verificado em estômagos de animais colonizados com a bactéria *Helicobacter pylori*, produtora de urease, evidenciando suas propriedades tóxicas. Diante disso, é sugerido que a urease vegetal esteja relacionada, também, com o papel fisiológico de defesa da planta contra a herbivoria praticada por alguns animais, além de sua atuação na biodisponibilização de nitrogênio.

## **9. REFERÊNCIAS** **BIBLIOGRÁFICAS**

ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2000. **Origem/História**. Gazeta grupo de comunicações, o nacional grupo editorial. Disponível em: <<http://www.anuarios.com.br/port/2000/soja/default.php>>.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2005. **Energia Renovada**. Gazeta grupo de comunicações, o nacional grupo editorial. Disponível em: <<http://www.anuarios.com.br/port/2005/soja/default.php>>.

AOAC, **Association of Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis. Washington D. C., 1213 p., 1980.

BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldahl digests. **Soil Science**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BAJPAI, S., SHARMA, A., GUPTA, M. N. Removal e recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry**, v. 89, p. 497-501, 2005.

BAU, H., VILLAUME, C., NICOLAS, J., MÉJEAN, L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, p. 1-9, 1997.

BECKER-RITT, A. B., MULINARI, F., VASCONCELOS, I. M., CARLINI, C. R. Antinutritional and/ or toxic factors in soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merril]. Comparison among different cultivars adapted to South Region of Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 263-270, 2004.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G. E., SANTI, L., VAINSTEIN, M. H., OLIVEIRA, J. T. A., FIUZA, L. M., PASQUALI, G., CARLINI, C. R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v. 50, p. 971-983, 2007.

BECKWITH, C. S., MCGEE, D. J., MOBLEY, H. L. T., RILEY, L. K. Cloning , expression, and catalytical activity of *Helicobacter hepaticus* urease. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5914-5920, 2001.

BESSA, F. Soja é uma das alternativas contra a fome no mundo. In: **Produtos Agropecuários\grãos\soja** 29/11/2004. Disponível em: <www21.sede.embrapa.br>

BICHLER, K. H., EIPPER, E., NABER, K., BRAUN, R., ZIMMERMANN, R., LAHME, S. Urinary infection stone. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, p. 488-498, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BIJLSMA, J. J. E., GERRITS, M. M., IMAMDI, R., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E., KUSTERS, J. G. Urease-positive, acid-sensitive mutants of *Helicobacter pylori*: urease-independent acid resistance involved in growth at low pH. **FEMS Microbiology Letters**, v.167, p. 309-355, 1998.

BRÍGIDO, J. A. **Avaliação de níveis biologicamente seguros para inclusão de soja crua na dieta de animais – uma abordagem bioquímica e nutricional**. 2006, 86p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRITO, A. S. Toxicidade Aguda (Dose Simples). **Manual de Ensaios Toxicológicos in vivo**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, cap 1, pp. 15-22, 1994

CAMPELLO, C. C. **Proteínas antinutricionais e/ou tóxicas de genótipos de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] e sua correlação com a performance nutricional de frangos de corte**. 2003, 152p. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with inseticidal properties. A review on their potentialities as bioinseticidas. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARAWAI, W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 32, p. 97-99, 1959.

CLARKE, E. J., WISEMAN, J. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Antinutritional factors. **Journal of Agricultural Science**, v. 134, p. 125-136, 2000.

COSTA, J. A., **Cultura da soja**, Porto Alegre: IVO MANICO e JOSÉ ANTÔNIO COSTA, 1996. 233 p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. **Os princípios éticos da experimentação animal**. São Paulo, 1991. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso em 22 jan. 2008.

CUSSAC, V., FERRERO, R. L., LABIGNE, A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 2466-2473, 1992.

DOUMAS, B. T., BAYSE, D. D., BORNER, K., CARTER, R. J., PETERS Jr, T., SCHAFFER, R. A. Candidate reference method for determination of total protein in serum I. Development and validation. **Clinical Chemistry**, v.27, p.642-650, 1981.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DA SOJA - EMBRAPA. A soja**. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/soja>> Acesso em 21 jan.2008.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, p. 18-28, 2008.

FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMAN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D., CARLINI, C. R. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. Biological effects unrelated to ureolytic activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 1357-1363, 2004a.

FOLLMER, C., WASSERMANN, G. E., CARLINI, C. R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. **Plant Science**, p. 1-6. 2004b.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6-29, 1996.

FRIEDMAN, M., BRANDON, D. L., BATES, A. H., HYMOWITZ, T. Comparison of a commercial soybean cultivar and a isolate lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effects of heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 327-335, 1991.

FRIEDMAN, M., BRANDON, D. L., Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

GLADYSHEVA, I. P., BALABUSHEVICH, N. G., MOROZ, N. A., LARIONOVA, N. I. Isolation and characterization of soybean Bowman-Birk inhibitor from different sources. **Biochemistry**, v. 65, p. 198-203, 2000.

GOBERT AP, MERSEY BD, CHENG Y, BLUMBERG DR, NEWTON JC, WILSON, K.T. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macro-phage inducible nitric oxide synthase. **The Journal Immunology**, v.168, p. 6002-6006, 2002.

GRANT, G. Anti-nutritional effects of dietary lectins. **Aspects of Applied Biology**, v. 13, p. 51-74, 1989.

GRANT, G. Protein protease inhibitors from plants. In: **Secondary Plant Products: Anti-nutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding**. CAYGILL. J. C., MUELLER-HARVEY, I. (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 71-86, 1999.

GRANT, G., WATT, W. B., STEWART, J. C., PUSZTAI, A. Changes in the small intestine and hind-leg muscles of rats induced by dietary soybean (*Glycine max*) proteins. **Medical Science Research**, v. 15, p. 1355-1356, 1987.

GRANT, G., DORWARD, P. M., BUCHAN, W. C. ARMOUR, J. C. PUSZTAI, A. Consumption of diets containing raw soybeans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days – Effects on body composition and organ weights. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 17-29, 1995.

GRAHAM, D. Y., *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. **Gastroenterology**, v. 96, p. 615-625, 1989.

GUILLAMÓN, E., PEDROSA, M. M., BURBANO C., CUADRADO, C., SÁNCHEZ, M. C., MUZQUIZ, M. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. **Food Chemistry**, v.007, p. 69-74, 2008.

GUT, M. O., PARKKILA, S., VERNEROVÁ, Z., ROHDE, E., ZÁVADA, J., HÖCKER, M., PASTOREK, J., KARTTUNEN, T., GIBADULINOVÁ, A., ZÁVADOVÁ, Z., KNOBELOCH, K., WIEDENMANN, B., SVOBODA, J., HORAK, I., PASTOREKOVÁ, S. Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1889-1903, 2002.

HAMERSTRAND, G. H., BLACK, L. T., GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of standart analytical procedure. **Cereal Chemistry**, v. 58, p.42-45, 1981.

HARBOE, N., INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: AXELSEN, N. H. (ed.). **A Manual Quantitative Immuno-electrophoresis**. London: Blackwell Scientific Publications, p. 161-164, 1973.

HARKNESS, J. E., WAGNER, J. E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. São Paulo: Livraria Roca LTDA, 1993. 238 p.

HARRIS, P. R., MOBLEY, H. L. T., PEREZ-PEREZ, G. I., BLASER, M. J., SMITH, P. D. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. **Gastroenterology**, v. 111, p. 419-425, 1996.

HAZELL, S. L., LEE, A. *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen-ion back diffusion, and gastric-ulcers. **Lancet** 2, n. 8497, p. 15-17, 1986.

HENRI, J. B. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**, 19 (ed), parte II, 1996.

HERZIG, K. H., BARDOCZ, S., GRANT, G., NUSTEDE, R., FOLSCH, U. R., PUZSTAL, A. Red kidney bean lectin is a potent cholecystokinin releasing stimulus in the rat inducing pancreatic growth. *Gut*, v. 41, p. 333-338, 1997.

HIRAYAMA, C.; SUGIMURA, M.; SAITO, H., NAKAMURA, M. Host Plant Urease in the Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, p. 1415-1421, 2000.

HORGAN, M. E. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry*, v. 22, p. 663-667, 1983.

JESCHKE, M. G., RENSING, H., KLEIN, D., SCHUBERT, T., MAUTES, A. E. M., BOLDER, U., CRONER, R. S. Insulin prevents liver damage and preserves liver function in lipopolysaccharide-induced endotoxemic rats. *Journal of Hepatology*, v. 42, p. 870-879, 2005.

JIN, M., ROSARIO, W., WATLER, E., CALHOUN, D. H. Development of a large-scale HPLC-based purification for the urease from *Staphylococcus leei* and determination of subunit structure. *Protein Expression & Purification*, v. 34, p. 111-117, 2004.

JULIÃO, M. S. S. **Otimização das Condições nas Titulações Potenciométricas em Meio Aquoso – Reversão para Meio Aquoso com o Uso do Método de Gran II**. 1997. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

KANSAL, S., SHARMA, A., GUPTA, M. N. An integrated process for obtaining oil, protease inhibitors and lectin from soybean flour. *Food Research International*, v. 39, p. 499-502, 2006.

KAPLAN, A. The determination of urea, ammonia, and uréase. In: GLICK, D. (ed). **Methods of Biochemical Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1969, p. 311-314.

KARMALI, K., KARMALI, A., TEIXEIRA, A., CURTO, M. J. M. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from *Pseudomonas aeruginosa* and *Canavalia ensiformis*. *Analytical Biochemistry*, p.1-7, 2004.

KARPLUS, P. A., PEARSON, M. A., HAUSINGER, R. P. 70 years of crystalline urease: what have we learned? **Accounts of Chemical Research**, v. 30, p. 330-337, 1997.

KARR-LILIENTHAL, L. K., GRIESHOP, C. M., MERCHEN, N. R., MAHAN, D. C., FAHEY, G. C. Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meals from five leading soybean – producing countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6193-6199, 2004.

KEARNEY, D. J., RITCHIE, K., PEACOCK, J. S. Gastric-juice ammonia assay for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the relationship of ammonia concentration to gastritis severity. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 95, p. 3999-3403, 2000.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1406S-1412S, Suppl. S, 1998.

KOIVUNEN, M. E., MORISSEAU, C., NEWMAN, J. W., HOWATH, W. R., HAMMOCK, B. D. Purification and characterization of a methylene urea-hydrolyzing enzyme from *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1433-1442, 2003.

KUMAR, V., RANI, A., SOLANKI, S., HUSSAIN, S. M. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 188-195, 2006.

KUROIWA, Y., NISHIKAWA, A., IMAZAKAWA, T., KANKI, K., KITAMURA, Y., UMEMURA, T., HIROSE, M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murril in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1047-1053, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v.227, p. 685-689, 1970.

LE GUEN, M. P., BIRK, Y. Protease inhibitors from legume seeds: nutritional effects, mode of action and structure-action relationship. In: **Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds**. VAN DER POEL, A. F. B., HUISMAN, J., SAINI, H. S. (Eds). Wageningen Press, Wageningen, The Netherlands, p. 157-171, 1993.

LICHTENBERGER, L. M., DIAL, E. J., ROMERO, J. J., LECHAGO, J., JARBOE, L. A., WOLFE, M. M. Role of luminal ammonia in the development of gastropathy and hypergastrinemia in the rat. **Gastroenterology**, v. 108, p. 320-329, 1995.

LIDDLE, I. E. Cholecystokinin cells. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 221-242, 1997.

LIENER, I. E. Implication of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 31-67, 1994.

LIMA, A. O., SOARES, J. B., GRECO, J. B., GALIZZI, J., CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica - técnica e interpretação**. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2001

LOGAN, R. P. H. The chemotherapeutic effects of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> inhibitors on *Helicobacter pylori* infection. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, p. 79-83, 1996.

MACHADO, F. P. P., QUEIRÓZ, J. H., OLIVEIRA, M. G. A., PIOVESAN, N. D., PELUZIO, M. C. G., COSTA, N. M. B., MOREIRA, M. A. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. **Food Chemistry**, v. 107, p. 649-655, 2008.

MAHAN, L. K., ESCOTT-STUMP, S. Proteins. In: \_\_. **Krause's food, nutrition and diet therapy**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998, cap.5, p. 63-66.

MAIA, A. A. B. **Estudos bioquímicos e nutricionais de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merr) adaptadas as condições de plantio da região nordeste**. 1998, 100p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

MANJAYA, J. G., SUSEELAN, K.N., GOPALAKRISHNA, T., PAWAR, S. E., BAPAT, V. A. Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Food Chemistry**, p. 1324-1327, 2007.

MARTINELLI, A. H. S. Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) ureases: expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*). In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq, Caxambu-MG, 2004.

MEYER-BOTHLING, I. E., POLACCO, J. C. Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 209, n. 3, p. 439-444, 1987.

MILLER, D. S., BENDER, A. E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **The British journal of Nutrition**, Cambridge, v. 9, p. 382-388, 1955.

MIURA, E. M., BINOTTI, M. A. R., DE CAMARGO, D. S., MIZUBUTI, I. Y., IDA, E. I. Biological evaluation of soybean line with low trypsin inhibitor activities. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 51, p. 195-198, 2001.

MOBLEY, H. L. T. UreI-mediated urea transport in *Helicobacter pylori*: an open and shut case?. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 346-348, 2000.

MOBLEY, H. L. & HAUSINGER, R. P. Microbial urease: Significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiology Reviews**, p. 85-108, 1989.

MOBLEY, H. L. T., ISLAND, M. D., HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 451-480, 1995.

MORAES, R. M. A., SOARES, T. C. B., COLOMBO, L. R., SALLA, M. F. S., BARROS, J. G. A., PIOVESAN, N. D., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Assisted selection by specific DNA markers for genetic elimination of the Kunitz trypsin inhibitor and lectin in soybean seeds. **Euphytica**, p. 221-226, 2006.

MOHAMED, T. M., MOHAMED, M. A., MOHAMED, S. A., FAHMY, A. S. Purification of urease from water melon seeds for clinical diagnostic kits. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 215-223, 1999.

MOREIRA, R. A., PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

NORTON, G. Proteinase inhibitors. In: D'MELLO, P. F., DUFFUS, C. M. **Toxic Substances in Crop Plants**. Edinburgh: The Scottish Agricultural College, 1991. cap. 4, p. 69-106.

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

OLIVEIRA, J. T. A., VASCONCELOS, I. M., GONDIM, M. J. L., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., SANTOS, C. F., MOREIRA, L. I. M. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, p. 417-424, 1994.

OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMANN, G. E., CARLINI, C. R. *Bacillus pasteurii* ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 452, p. 149-155, 2006.

PEUMANS , W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS , W. J., VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 132-138, 1996.

POLACCO, J. C., HAVIR, E. A. Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254. n. 5. p. 1707-1715, 1979.

POLACCO, J. C., HOLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **International Review Cytology**, v. 145, p. 65-103, 1993.

POLACCO, J. C., HOLAND, M. A. Genetic control of plant urease. **Genetic Engineering**. v. 16, p. 33-48, 1994.

POLACCO, J. C., JUDD, A. K., DYBING, J. K., CIANZIO, S. R. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. **Molecular & General Genetics**, v. 217, n. 2-3, 1989.

PUSZTAI, A. Plant lectins. Cambridge. **Cambridge University Press**, p. 105-205, 1991.

PUSZTAI, A, BARDOCZ, S. Physiological role (s) of lectins in plants and the effects of their inclusion in the diet on the gut and metabolism of animals. In: **Phytochemicals and Health, 10th Annual Penn State Symposium in Plant Physiology**. Eds. GUSTINE, D. L. & FLORES, H. E.. Pennsylvania, USA, p. 179-191, 1995.

REDDY, N. R., PIERSON, M. D. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. **Food Research International**, v. 27, p. 281-290, 1994.

REDONDO-CUENCA, A., VILLANUEVA-SUAREZ, M. J., RODRIGUEZ-SERVILLA, M. D., MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 1216-1222, 2007.

REINHOLD, J. G., Proteínas Totales, albuminas y globulinas. In: RENIER, M. (ed.) **Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos**. 3ed, Madrid: Aguilar, 1968, v. 1, cap. 15, p. 126-146.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal Clinical and Pathological**, v. 28, p. 57-63, 1957.

RICCI, C., HOLTON, J., VAIRA, D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 21, n. 2, p. 299-313, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SAS/STAT (User's Guide). SAS Institute Inc., Cary, N. C., 1999.

SGARBIERI, V. C. Propriedades nutricionais das proteínas. In: **Proteínas em Alimentos Protéicos – Propriedades – Degradações – Modificações**. São Paulo: Varela. 1996, cap. IV, p. 337-386.

SHIYAN, Q., XIAOPING, Z., CANGHAI, H., ZHENTIAN, L., DEFA, L. Anti-nutritional effects of a moderate dose of soybean agglutinin in the rat. **Archives of Animal Nutrition**, v. 57, p. 267-277, 2003.

SIEBRA, E. A. Toxina da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: aspectos bioquímicos e seu provável papel na defesa da planta. **Tese (Doutorado em bioquímica)** - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 148 p., 2004.

SIQUEIRA, J. S., LIMA, P. S. S., BARRETO, A. S., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 9-13, 2007.

SIRKO, A., BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 1189-1195, 2000.

SLOT, C. Plasma creatinine determination – a new and specific Jaffe reaction method. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 17, p. 381-387, 1965.

SONG, H. K., SUH, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, 347-363, 1998.

SUTO, H., AZUMA, T., ITO, S., OHTANI, M., DOJO, M., ITO, Y., KOHLI, Y., KURIYAMA, M. *Helicobacter pylori* infection induces hyperammonaemia in mongolian gerbils with liver cirrhosis. **Gut**, v. 48, p. 605-608, 2001.

STAHLER, F. N., GANTER, L., LEDERER, K., KIST, M., BERESWILL, S. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* carbonic anhydrases. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 183-189, 2005.

STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C. T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M., CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, p. 753-760, 2005.

STINGL, K., REUSE, H. D. Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity?. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 307-315, 2005.

TAGLE, M. A. Proteína: Qualidade Química e Biológica. In: **Nutrição**. São Paulo. Artes Médicas para a Língua Portuguesa. Cap. IV, p. 331, 1981.

TAKEUCHI, K., OHUCHI, T., HARADA, H., OKABE, S. Irritant and protective action of urea-urease ammonia in rat gastric mucosa. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, p. 274-281, 1995

TANGE, Y. & NIWA, O. Identification of the ure1<sup>+</sup> Gene Encoding Urease in Fission Yeast. **Current Genetics**, p. 244-246, 1997.

TORISK, R. S., GRIFFIN, J. D. YENOFKY, R. L., POLACCO, J. C. A single-gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **Molecular and General Genetics**, v. 242, n. 4, p. 404-414, 1994.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T, GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRIEBOLD, H. O. **Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products**. New York, Van Nostrand Co., p. 331, 1946.

TSUDA, M., KARITA, M., MORSHED, M. G., OKITA, K., NAKAZAWA, T., A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3586-3589, 1994.

VALUEVA, T. A., MOSOLOV, V. V. Proyein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 46, n. 3, p. 307-321, 1999.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrinin b), a GalNac-specific type 2 ribosime-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). **European Journal of Biochemistry**, v. 237, p. 505-513, 1996.

VASCOCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 137-154, 1991.

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.

VASCONCELOS, I.M., MORAIS, J.K.S., SIEBRA, E.A., CARLINI, C.R., SOUSA, D.O.B., BELTRAMINI, L.M., MELO, V. M. M., OLIVEIRA, J.T.A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, 2008.

VASCONCELOS, I. M., SIEBRA, E. A., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, M. A. F., CAMPELO, G. J. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 419-426, 1997.

VASCOCELOS, I. M., TRENTIN, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, p. 357-366, 1994.

VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385 – 403, 2004.

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**, v. 34, n. 7, p. 1277-1283, 1999.

WILFART, A., JAGUELIN-PEYRAUD, Y., SIMMINS, H., NOBLET, J., VAN MILGEN, J., MONTAGNE, L. A step-wise *in vitro* method to estimate kinetics of hydrolysis of feeds. **Livestock Science**. v. 109, p. 179-181, 2007.

ZHOU, X., LIU, W., LIAN, J., ZHANG, W. Monitoring of Roundup™ Ready soybean in Guangdong province in China. **Food Control**, v.18, p. 1219-1222, 2007.