



EFEITO DA INGESTÃO DE DERIVADOS DE SOJA
(Glycine max) SOBRE A TIREÓIDE DE RATOS
ESTUDO COM O EMPREGO DE IODO RADIOATIVO

Tullia Maria Clara Caterina Filisetti

DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 083
IEA - DT - 083

OUTUBRO/1978

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach — Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Fábio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

**EFEITO DA INGESTÃO DE DERIVADOS DE SOJA
(*Glycine max*) SOBRE A TIREÓIDE DE RATOS
ESTUDO COM O EMPREGO DE IODO RADIOATIVO**

Tullia Maria Clara Caterina Fillsetti

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em
Ciência dos Alimentos" - Orientador Prof. Dr. Franco
M. Lejolo. Apresentada e defendida em 15 de dezembro
de 1977, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

Note: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	2
3 – REVISÃO DA LITERATURA	2
4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	5
4.1 – Fracionamento da Soja	5
4.2 – Ensaios Agudos	5
4.3 – Ensaios Semicrônicos	5
4.4 – Testes Físico-Químicos	6
5 – MATERIAL	6
5.1 – Soja	6
5.2 – Animais	6
5.3 – Rações Experimentais	6
5.4 – Iodo Radioativo	6
5.5 – Equipamento	6
6 – MÉTODOS	7
6.1 – Fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada e dos Produtos Comerciais	7
6.1.1 – Obtenção do Extrato Total, Extrato Bruto e Resíduo	7
6.1.2 – Fracionamento com Etanol	9
6.1.3 – Purificação por Peneira Molecular	9
6.2 – Tratamento Térmico	9
6.3 – Ensaios das Frações Obtidas	9
6.3.1 – Ensaios Agudos	9
6.3.2 – Ensaios Semicrônicos	11
6.4 – Determinação da Porcentagem de Captação	11
6.5 – Doseamento dos Hormônios da Tireóide	11
6.5.1 – Preparo do Hidrolisado	11
6.5.2 – Separação dos Hormônios	11
6.5.3 – Contagens	12

	Página
6.6 – Doseamento dos Hormônios Séricos	12
6.6.1 – Obtenção do Soro	12
6.6.2 – Medida Indireta da Função Tireoidiana	15
6.6.3 – Radioimunoensaio	15
6.7 – Testes Preliminares para Identificação dos Compostos Presentes no Extrato Total e em Suas Frações	15
6.7.1 – Espectros de Absorção	15
6.7.2 – Glicídes Solúveis em Água	15
6.7.3 – Grupo α -Aminico Livre	15
6.7.4 – Flavonóides	15
6.8 – Métodos Estatísticos	15
7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
7.1 – Ensaios Agudos Realizados com os Extratos de Farinha de Soja Desengordurada	16
7.1.1 – Efeito do Extrato Total Não Autoclavado, Ação em 24 Horas	16
7.1.2 – Efeito do Extrato Total Não Autoclavado, Ação em 3 e 24 Horas	16
7.1.3 – Efeito da Autoclavagem Sobre a Ação do Extrato Total, Ação em 24 Horas .	19
7.1.4 – Efeito da Autoclavagem Sobre a Ação do Extrato Total, Ação em 6 Horas . .	23
7.2 – Ensaios Agudos dos Produtos Obtidos por Fracionamento do Extrato Total	23
7.3 – Testes Físico-Químicos de Identificação	26
7.4 – Presença do Fator em Diferentes Produtos Comerciais de Soja	33
7.5 – Ensaios Semicrônicos	37
8 – CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

	Página
I Grupos Experimentais e Frações de Soja Testadas	6
II Teor de Proteína das Rações	7
III Extrato Total, Ação Após 24 Horas	17
IV Extrato Total, Ação Após 24 Horas (Repetição)	18
V Extrato Total, Ação Após 3, 6 e 24 Horas	20
VI Extrato Total Autoclavado, Ação Após 24 Horas	21
VII Extrato Total de Farinha de Soja Desengordurada e Autoclavada, Ação Após 6 Horas ...	22
VIII Extrato Total Autoclavado, Ação Após 6 e 24 Horas	24
XI Fracionamento do Extrato Total com Etanol 90%	28
X Fracionamento do Extrato Total em Sephadex G-25	30
XI Fracionamento do Extrato Total em Sephadex G-25 (Repetição)	31
XII Testes Físico-Químicos (Frações Sephadex G-25)	34
XIII Extratos Total, Ação Após 24 Horas (Repetição)	35
XIV Produtos Comerciais ou Soja	38
XV 1º Ensaio Semicrônico, Efeito na Tireóide e no Crescimento	39
XVI 2º Ensaio Semicrônico, Efeito na Tireóide e no Crescimento	41
XVII 2º Ensaio Semicrônico, Efeito na Síntese dos Hormônios Tireóidiano	43

LISTA DE FIGURAS

1 Fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada	8
2 Temperatura x Autoclavagem	10
3 Cromatografia (Iodotirosinas)	13
4 Cromatografia (Iodotirosinas)	14
5 Extrato Total e Extrato Total Autoclavado x Tempo de Ação	25
6 Espectro de Absorção (Extrato Total, Sobrenadante Et-OH 90% e Ppt. Et-OH 90%)	27
7 Diagrama de Eluição Extrato Total (Coluna de Sephadex G-25)	29
8 Espectro de Absorção (Fração II Sephadex G-25)	32

EFEITO DA INGESTÃO DE DERIVADOS DE SOJA (Glycine max) SOBRE A TIREÓIDE DE RATOS

ESTUDO COM O EMPREGO DE IODO RADIOATIVO

Tullia Maria Clara Caterina Filisetti

RESUMO

Produtos derivados de soja foram testados em ratos através de ensaios agudos de 3 e 24 horas e em dois ensaios-semicrônicos de 16 e 29 dias.

Os ensaios agudos foram realizados com Extratos Totais (ETs), obtidos a partir de Farinha de Soja Desengordurada (FSD) por precipitação em meio aquoso (pH 4,2) e posteriormente em acetona na proporção de 2:1 (acetona:solvente). Observou-se, que o Extrato Total Autoclavado (ETA) administrado por sonda gástrica, após 6 e 24 horas diminuía a porcentagem de captação de ^{131}I pela tireóide por 100 gramas de rato. O ET, sem autoclavagem prévia, manifestou efeito na glândula após 6 horas e perdia essa ação após 24 horas de sua administração.

ETs obtidos a partir de Produtos Comerciais de Soja como: Concentrado Proteico, Farinha Tostada e Leite provocaram, também, após 24 horas uma diminuição na porcentagem de captação de ^{131}I pela tireóide por 100 gramas de rato.

Os ensaios semicrônicos foram realizados com produtos de fracionamento de soja, os quais eram incorporados às rações experimentais. No primeiro ensaio semicrônico, de 16 dias, houve uma diminuição na porcentagem de captação de ^{131}I por 10 mg de tireóide e um aumento de capacidade de ligação de triiodotirosina no soro de rato. No segundo ensaio semicrônico, de 29 dias, o fator em estudo provocou um aumento na porcentagem de captação de ^{131}I por 10 mg de tireóide e uma não alteração dos hormônios séricos. Nesse ensaio foram dosados, também, os hormônios tireoidianos e seus precursores; observando-se um aumento da moniodotirosina (MIT), triiodotironina (T_3) e de tiroxina (T_4) e uma diminuição de diiodotirosina (DIT) e do iodo não organificado. Observamos também, um aumento na relação MIT/DIT e diminuição na relação T_3/T_4 .

Os testes físico-químicos preliminares realizados com a fração II Sephadex G-25, manifestaram reação positiva para ninhidria, Molish e flavonóides.

1 - INTRODUÇÃO

A possibilidade de alimentação adequada das populações atuais e futuras, reside no contínuo diagnóstico e busca de soluções para problemas complexos e multi-setoriais, relativos ao suprimento, demanda e utilização biológica dos alimentos. Ambos permitirão trazer alternativas, apontar prioridades, para um planejamento nutricional associado ao planejamento geral da saúde e ao desenvolvimento sócio-econômico do país.

É sabido que a ingestão dos alimentos está intimamente associada ao seu custo, o que torna muito importante a otimização da utilização biológica dos nutrientes veiculados especialmente se pensarmos em termos de populações confrontadas com potenciais alimentares existentes. Por exemplo, na América Latina, 7% dos alimentos consumidos seriam suficientes para aliviar a desnutrição dos grupos populacionais vulneráveis existentes, mostrando a importância de, mesmo pequenas perdas serem reduzidas, o que em última análise, corresponderia a um aumento na eficiência da produção agrícola.

Ao nível da utilização biológica dos alimentos, sabemos que os nutrientes devem estar "disponíveis", não deve haver fatores tóxicos presentes e, o preparo e o processamento devem ser adequados.

Um importante grupo de alimentos vegetais, o das Leguminosas, apresenta uma série de problemas de natureza bioquímica, que reduzem a possibilidade da sua utilização biológica como a presença de fatores tóxicos naturais e a baixa digestibilidade de sua proteína. Por essa razão, especialmente, quando se trata de novos alimentos, ou mesmo do aumento e diversificação na utilização de produtos antes pouco consumidos, faz-se necessária uma análise detalhada de suas qualidades. A soja e seus produtos enquadram-se nessa situação.

Originalmente consumida "in natura", nos últimos anos passou a constituir uma das fontes semi-convencionais de alimentos, e a ser adicionada a outros produtos com finalidade tecnológica ou de complementação nutricional, na forma de concentrados e isolados protéicos, e de "leites artificiais", tanto em programas oficiais de alimentação de grupos vulneráveis, como pela empresa privada.

Resultados obtidos em nossos laboratórios e informações de outros, envolvidos como nós, no estudo de produtos processados de soja, acusaram para esses alimentos um valor biológico inferior ao previsível; o fato é agravado ainda pela possibilidade da existência de lesões bioquímicas, não evidenciáveis nos testes de crescimentos como normalmente efetuados.

Essas considerações e as suas implicações mostram a importância do conhecimento detalhado sobre a existência de possíveis compostos com alguma ação biológica.

Resolvemos com esse espírito buscar mais informações sobre esses fatores, estudando um que parece agir na tireóide, cuja existência foi relatada há tempo, mas sobre o qual pouco se sabe em termos de natureza, mecanismo de ação e significado da ação biológica.

Esperamos, assim, contribuir ao nível científico, para a otimização da utilização dos nossos potenciais alimentares, participando ao lado de elementos da nossa e de outras áreas na tentativa de trazer dados que abram alternativas para a solução dos problemas alimentares e nutricionais.

2 – OBJETIVOS

Os objetivos específicos do presente trabalho foram estudar, numa variedade brasileira de soja e em alguns de seus produtos comerciais, a possível presença de fatores com ação sobre a tireóide, bem como obter informações sobre a sua natureza e mecanismo de ação.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

Substâncias que agem direta e indiretamente na tireóide podem ser encontradas em inúmeros vegetais^(10,11,48,54,58) e são de natureza química diversa.

Nas plantas do gênero *Brassica*, como couve, repolho, nabo, encontra-se a 1,5-vinil-2-tiooxazolidona⁽²⁾, substância capaz de desencadear hiperplasia da tireóide, especialmente em

condições de baixa ingestão de iodo na dieta⁽⁵⁸⁾. Essa substância existe na forma de um tioglicosídeo inativo, precursor, que por ação de uma glicosidase, a mirosinase, é transformada na substância ativa⁽¹¹⁾. A enzima também é produzida por bactérias intestinais que passam a ser as responsáveis pela transformação do tioglicosídeo quando o produto foi cozido e a enzima vegetal inativada⁽³¹⁾.

Outras tiooxazolidonas como a 5,5-dimetil-2-tiooxazolidona^(1,13), além de uitrilas como a 3-indol-acetonitrila podem ser encontradas^(6,54) em plantas desse gênero, ao lado de tiocianatos, isotiocianatos e polissulfetos^(32,48,58).

Na mandioca existem dois glicosídeos: a linamarina e a foto-australina, capazes de liberar cianeto pela ação de outra β -glicosidase, a linamarase; o cianeto por sua vez é detoxificado pela ação da rodanase hepática a tiocianato, substância também bociogênica⁽¹⁷⁾.

Nas cebolas, também, encontram-se compostos sulfurados capazes de bloquear a captação de iodo pela tireóide, como o n-propildissulfeto que já foi responsabilizado pela alta incidência de bócio em regiões do Líbano⁽³⁶⁾.

Estudos feitos em ratos que ingeriam um pigmento glicosídico extraído da casca do amendoim e de sementes de caju, demonstraram a existência de atividade bociogênica⁽²⁹⁾. A ação na tireóide, no caso, seria devida a uma iodação preferencial dos metabólitos formados após a ingestão, diminuindo assim a quantidade de iodo disponível para ligar-se à tirosina. Através desse mesmo mecanismo e, ainda, pela inibição da condensação oxidativa da monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) alguns autores explicam a ação na tireóide de certos flavonóides e de seus produtos de degradação⁽¹⁸⁾.

É importante citar, também, os nitritos e nitratos presentes em certos vegetais^(54,57) que em quantidades elevadas podem interferir diretamente na captação de iodo pela tireóide, bem como os salicilatos⁽⁵⁵⁾, capazes de bloquear a ligação dos hormônios tireoideanos com as proteínas plasmáticas e de inibir a sua formação "in vitro".

São conhecidas, ainda, substâncias como as encontradas em nozes capazes de produzir bócio de forma indireta, ou seja provocando um aumento na perda fecal de tiroxina⁽²⁵⁾.

Ao lado dessas substâncias bociogênicas conhecidas existem outras cuja natureza e ação não está caracterizada como é o caso do "fator" existente na soja (Glycine max).

A revisão da literatura mostrou que os vários pesquisadores atribuem a causas diversas, os diferentes efeitos causados pela ingestão de soja sobre a tireóide, sendo que alguns negam mesmo a existência de qualquer ação direta. Assim, como veremos, certos autores, observando a instalação de bócio em ratos alimentados com soja atribuíram-no a uma possível deficiência de iodo na dieta e ao passo que outros, simplesmente, ao baixo valor biológico da proteína.

McCARRISON⁽²⁷⁾ foi o primeiro a relatar que ratos alimentados com soja crua apresentavam um hiperplasia da tireóide, observável mesmo quando a ração continha teor de iodo bem superior ao necessário.

Estudos posteriores de SHARPLESS e col.⁽⁴⁴⁾, WILGUS e col.⁽⁵³⁾ e HALVERSON e col.⁽¹²⁾ demonstraram que em ratos e também galinhas, e inclusão de soja não processada na ração, era capaz de provocar um aumento da glândula e que essa propriedade era inibida, totalmente, pela administração de quantidades elevadas de iodo, ou parcialmente, pelo tratamento térmico da soja.

É interessante enfatizar aqui, que segundo WILGUS e col.⁽⁵³⁾ a adição de iodo corrigia o bócio, mas não era capaz de melhorar a diminuição de crescimento pelos animais em questão.

Com relação à solubilidade do fator ativo, os autores citados observaram, que a propriedade bociogênica da soja crua não podia ser removida pelo tratamento com solventes orgânicos como éter,

acetona, clorofórmio ou etanol, com exceção de SHARPLESS e col. ⁽⁴⁴⁾ segundo os quais essa propriedade podia ser parcialmente eliminada por tratamento com éter ou acetona.

Também BLOCK e col. ⁽⁴⁾, constataram possibilidade semelhante, ou seja a de redução na capacidade biociogênica, em ratos, por desengorduramento da soja crua, apesar da soja nesse caso mostrar-se mais rica em iodo.

Efeitos semelhantes, medidos porém pela redução na captação de iodo radioativo, foram observadas tanto em ratos ⁽¹⁹⁾ como em crianças alérgicas ⁽⁵⁰⁾, alimentadas com "leite de soja". O mesmo autor observou, agora em adultos, que entre catorze testados, apenas dois manifestavam efeitos biociogênicos quando alimentados com "leite de soja" por cinco dias, sugerindo que o agente em questão, interfere com a síntese dos hormônios tireoidianos de acordo com a suscetibilidade individual.

Por outro lado, opostamente, outros autores observaram um aumento na captação de iodo marcado tanto em ratos ^(3,49) como em crianças alimentadas com produtos derivados de soja ^(15,33,45); esses efeitos foram atribuídos pelos pesquisadores a uma ação indireta: haveria um aumento na excreção fecal de tiroxina endógena, diminuindo o rendimento recuperador pela circulação entero-hepática, o que causaria queda da tiroxina plasmática, estimulando a produção de tireotrofina e logo causando um hipertireoidismo.

A perda fecal de tiroxina, por outro lado, seria devida a mudanças do ambiente gastro-intestinal ^(3,15) como: trânsito gastro-intestinal acelerado por causa do volume do bolo fecal, provocando redução na reabsorção de tiroxina ou à presença de uma substância capaz de agir nessa reabsorção ou mesmo a ação de inibidores trópticos. É possível, também, que a soja facilite o desenvolvimento da *Escherichia coli* no trato intestinal, microorganismo que consegue se ligar à tiroxina reduzindo sua reabsorção ⁽³⁷⁾.

Outra linha de observação é a trazida pelas pesquisas de NORDSIEK ⁽³⁰⁾, que verificou haver um aumento de peso da tireóide, em ratos alimentados com rações contendo de 35 a 60% de soja crua, observando, porém, que a adição de caseína à ração eliminava o efeito. O autor sugere que, sendo a caseína uma proteína de elevado valor biológico, pode favorecer a síntese de proteínas e consequentemente auxiliar no transporte humoral e na absorção intestinal dos hormônios na tireóide. Sugere, também, que esse efeito biociogênico poderia estar relacionado com a presença de antitripsinas, hipótese levantada, também, por outros pesquisadores ⁽⁹⁾.

Recentemente, KONIJN e col. ⁽¹⁹⁾ conseguiram resultados interessantes; constataram a presença de um agente depressor da função tireoidiana na farinha de soja não aquecida, que resiste à digestão pancreática e ao aquecimento em banho-maria fervente, durante duas horas, mas, é aparentemente destruído pelo tostamento da farinha.

A substância responsável foi parcialmente purificada parecendo ser um oligopeptídeo de baixo peso molecular ⁽²⁰⁾.

Ela consegue inibir a captação de iodo pela tireóide tanto "in vivo" (ensaios de 24h) como "in vitro" diminuindo a sua organificação e, quando incorporada na dieta, aumenta a capacidade de ligação das proteínas séricas à triiodotironina (T_3) radioativa exógena.

A glândula quando exposta "in vitro" ao agente depressor, apresenta uma incorporação menor de radioiodo na forma de diiodotirosina (DIT) e a relação triiodo tironina/tiroxina (T_3/T_4) torna-se maior, faltam porém estudos "in vivo", para confirmar esses resultados.

Resumindo, constata-se que segundo alguns, a soja causa hipertireoidismo e segundo outros hipotireoidismo, havendo inclusive idéias diferentes com relação às propriedades químicas da substância responsável. Ao lado desses existem ainda outros autores ⁽⁴⁶⁾ que negam a existência de qualquer ação.

Essas observações reforçam, a nosso ver, a necessidade de se fazerem mais estudos sobre o assunto, justificando os objetivos propostos.

4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 – Fracionamento da Soja

A soja foi fracionada de várias maneiras para o isolamento do fator ativo.

4.2 – Ensaios Agudos

As experiências dos ensaios agudos foram realizadas num período experimental de 3 a 24 horas. Os produtos testados (Figura 1) nos animais provinham do fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada (FSD), Farinha de Soja Desengordurada e Autoclavada (FSDA) e Produtos Comerciais de Soja.

4.3 – Ensaios Semicrônicos

Foram realizados dois ensaios semicrônicos; no primeiro ensaio semicrônico os animais foram submetidos a um período experimental de 16 dias e no segundo ensaio semicrônico de 29 dias. Os produtos testados provinham do fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada não autoclavada (FSD) e Autoclavada (FSDA) (Figura 1). Os grupos recebiam rações que continham produtos de fracionamento conforme indicados na Tabela I.

Tabela I

Grupos Experimentais dos Ensaios Semicrônicos:
Frações de Soja Testadas

Ensaios	Grupos	Fração Testada
1º	FSD	Farinha de Soja Desengordurada e não Autoclavada
	R	Resíduo não autoclavado
	RA + EB	Resíduo Autoclavado + Extrato Bruto não Autoclavado
	FSDA	Farinha de Soja Desengordurada e Autoclavada
	RA	Resíduo Autoclavado
2º	RA + EBA	Resíduo Autoclavado + Extrato Bruto Autoclavado
	FSDA	Farinha de Soja Desengordurada e Autoclavada
	RA	Resíduo Autoclavado
	RA + EBA	Resíduo Autoclavado + Extrato Bruto Autoclavado.

4.4 – Testes Físico-Químicos

Estes testes foram realizados em frações parcialmente purificadas que continham o fator em estudo, no sentido de verificarmos a presença em sua estrutura química de peptídios, glicídeos e flavonóides.

5 – MATERIAL

5.1 – Soja

Utilizamos a variedade Santa Rosa, (*Glycine max*) obtida na Estação Experimental da Escola Superior de Agronomia de Lavras. Os derivados de soja (leite, concentrado protéico e farinha tostada) foram obtidos no comércio local.

5.2 – Animais

Foram ratos (*Rattus norvegicus* variedade *Albinus*) obtidos de colônias mantidas no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e alimentados com um ração comercial padrão do biotério. Durante a experiência foram alojados em gaiolas individuais, recebendo água "ad libitum" e os diferentes tipos de rações experimentais conforme o caso.

5.3 – Rações Experimentais

Foram preparadas para realização dos ensaios semicrônicos.

As preparações a serem testadas foram adicionadas a uma dieta básica que continha 1% de mistura vitamínica, 4% de mistura salina, 8% de óleo de soja e 87% de amido. A adição das diversas frações era feita às expensas de amido de forma a resultar numa porcentagem final de 18% de proteína. As rações do segundo ensaio receberam ainda 0,2% de metionina.

A mistura salina usada no primeiro ensaio foi a de FOX & BRIGGS⁽⁸⁾; já, no segundo, alterou-se a quantidade de iodeto de potássio de 17,0 mg para 3,1 mg %.

A mistura vitamínica foi descrita anteriormente⁽²¹⁾.

A porcentagem de proteína das rações experimentais obtida por análise⁽¹⁴⁾ encontra-se na Tabela II.

5.4 – Iodo Radicativo

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

O iodeto de sódio (Na^{125}I) para a dosagem dos hormônios séricos provinha de conjuntos especificamente preparados para a sua dosagem (Lepetit S.A. e Bio-Rad Laboratories).

5.5 – Equipamento

Além do equipamento convencional de laboratório, usou-se para as contagens um detector de cintilação, com cristal de poço de iodeto de sódio ativado com tálio NaI(Tl) , e contador modelo Ultra Scaler II (Nuclear Chicago); um espectrofotômetro Acta III (Beckman) foi usado para a obtenção dos espectros de absorção no ultravioleta (UV).

Tabela II

Teor de Proteína das Rações Utilizadas nos Ensaio Semicrônico.

Ensaio	Grupos *	% proteína (N x 6,25)
1º	FSD	18,71
	R	19,12
	RA + EB	18,42
	FSDA	18,29
	RA	18,56
	RA + EBA	19,72
2º	FSDA	19,39
	RA	18,34
	RA + EBA	17,83

* Ver Tabela I

6 – MÉTODOS

6.1 – Fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada (FSD) e dos Produtos Comerciais

6.1.1 – Obtenção do Extrato Total (ET), Extrato Bruto (EB) e Resíduo (R)

A soja, previamente moída e desengordurada com hexana, na proporção de 1:3 (soja:solvente) foi tratada ainda com éter etílico, em extrator de Soxhlet, até desengorduramento total. A Farinha de Soja Desengordurada (FSD) assim obtida, após secagem ao ar, foi novamente triturada em moinho de facas e submetida a extração com água. A seguir, foi tratada como sugerido por KONIJN e col.⁽¹⁹⁾, com as modificações descritas abaixo e esquematizadas na Figura 1.

200 g de FSD foram tratadas com 1,5 l de água destilada, acidificadas com HCl 1N até pH 4,2 (ponto isoeletrico das proteínas de soja), submetidas à agitação por 1 hora, sendo a seguir, a suspensão filtrada ou centrifugada a 7.000 r.p.m. O precipitado foi reextraído com 500 ml de água destilada da mesma forma e o sobrenadante resultante acrescentado ao anterior.

Os sobrenadantes conforme o caso ou eram concentrados em evaporador rotatório a vácuo a 50°C até volume final de 100 ml – originando o Extrato Bruto (EB) ou eram tratados com acetona na proporção de dois volumes de acetona para um volume de sobrenadante.

Após repouso, a 4°C durante doze horas, o extrato cetônico era filtrado e o filtrado concentrado em evaporador rotatório a vácuo (50°C), até volume de 100 ml, obtendo-se assim – o Extrato Total (ET).

Para o 1º teste semicrônico partimos de 1,7 Kg de FSD e 1,7 Kg de FSDA; para o 2º teste semicrônico usamos 4,0 Kg de FSDA, seguindo-se o mesmo esquema tendo sido porém obtido nesse caso no Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas.

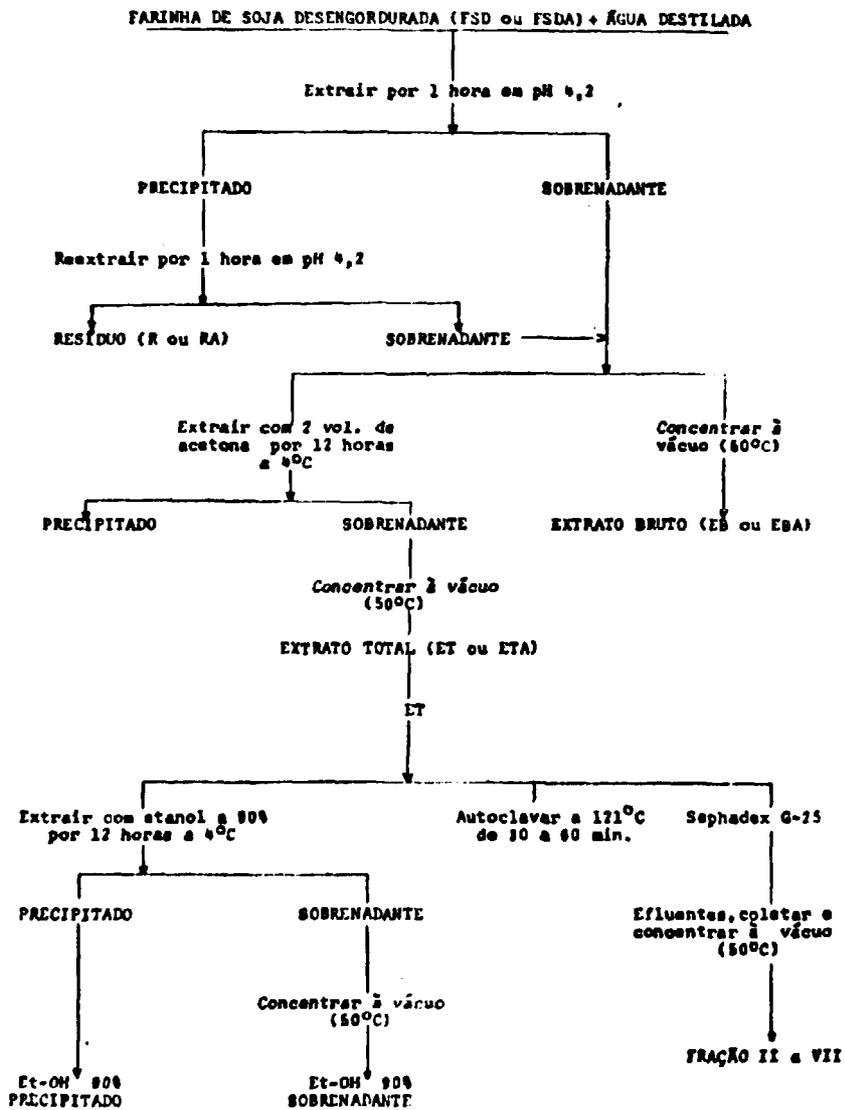


Figura 1 - Esquema Geral de Fracionamento de Farinha de Soja Desengordurada

A obtenção dos extratos dos Produtos Comerciais seguem o mesmo esquema da Figura 1 até a obtenção do Extrato Total (ET). O leite de soja sofreu prévio desengorduramento igual ao da soja moída.

6.1.2 – Fracionamento com Etanol

O Extrato Total foi adicionado de etanol até concentração de 90%, deixado em repouso a 4°C por doze horas e filtrado. O sobrenadante foi concentrado a 50°C em evaporador rotatório a vácuo até o volume inicialmente utilizado de Extrato Total. Para os testes o precipitado era redissolvido em água até volume igual ao do Extrato Total (Figura 1).

6.1.3 – Purificação por Peneira Molecular

De 6 a 10 ml do Extrato Total eram fracionados em coluna de Sephadex G-25 médio ou fino (2,0 x 96,0 cm), previamente equilibrada com acetato de amônio 0,02M (com velocidade de escoamento de $\cong 1,7$ ml/min.). A coluna foi eluída com acetato de amônio 0,02M, coletando-se volumes de 5 ml.

Para os testes com animais, os efluentes compreendendo cada uma das várias frações obtidas, foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório à 50°C até volume igual ao introduzido na coluna.

Para obtenção de quantidade suficiente de extrato fracionado, foram utilizados os efluentes correspondentes a cinco corridas.

6.2 – Tratamento Térmico

Normalmente, o tratamento térmico do Extrato Total era realizado em autoclave vertical em frascos de 125 ml contendo de 40 a 60 ml de líquido, por tempos variados entre 30 e 60 minutos conforme a experiência.

As autoclavagens da Farinha de Soja Desengordurada (FSD) ou do Resíduo (R) foram feitas após adição de água na proporção de 35:10 (H₂O:FSD/R).

No caso do ensaio agudo da experiência citada no item 7.1.3 e primeiro ensaio semicrônico, a autoclavagem foi feita em erlenmeyers de 1,5 l durante um período de 40 minutos a 1 atmosfera de pressão e no segundo ensaio semicrônico em latas de 1,5 Kg seguindo ciclo de temperatura, apresentado na Figura 2.

Essas modificações foram introduzidas devido à necessidade de manipulação de grandes quantidades de material.

O esquema para o fracionamento da Farinha de Soja Desengordurada após autoclavagem prévia (FSDA), seguiu e esquematizado para a farinha não autoclavada (item 6.1.1) (Figura 1).

6.3 – Ensaio das Frações Obtidas

6.3.1 – Ensaio Agudos

Nos valem da técnica utilizada por KONIJN⁽¹⁹⁾ modificada segundo o esquema: 2 ml da fração em estudo (Figura 1) correspondentes a ingestão de 4 g de Farinha de Soja Desengordurada foram

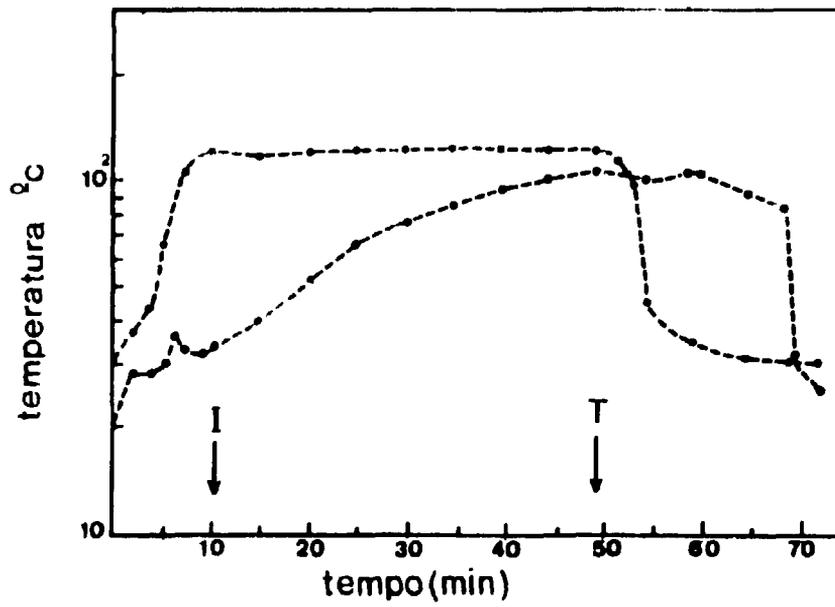


Figura 2 - Variação da Temperatura Durante a Autoclavagem de Farinha de Soja Desengordurada (FSD) em Latas de 1/2 Kg. FSD (o- - -o), autoclave (·- ·- ·-), I = início e T = término da autoclavagem

administradas através de sonda gástrica a grupos de ratos mantidos em jejum por doze horas e alojados em gaiolas individuais. Os ratos controle recebiam, da mesma forma 2 ml de solução fisiológica. Decorrida uma hora, injetava-se por via intraperitoneal cerca de $5 \mu\text{Ci } ^{131}\text{I}$ /100 g de peso de rato, num volume de 1 ml. Após a administração do radioiodo os animais eram alimentados com ração normal do biotério.

Decorridas 24 horas (ou após tempos variáveis em certas experiências), os animais foram sacrificados por inalação de éter, as tireóides com a traquéia removidas, lavadas com solução fisiológica e sua radioatividade medida.

O efeito do "fator" em estudo foi avaliado calculando-se a porcentagem de captação/100 g de peso do animal.

6.3.2 – Ensaio Semicrônicos

Nesse caso, as frações em estudo (Tabela I) foram adicionadas às rações experimentais.

Findo o período experimental de 16 dias no primeiro ensaio e 29 dias no segundo, os animais recebiam, por via intraperitoneal, 1 ml de solução de $\text{Na } ^{131}\text{I}$ com $10 \mu\text{Ci/ml}$ por 100 g de rato. Após 24 horas os animais eram sacrificados com éter etílico e as suas tireóides removidas com cuidado para evitar que se rompessem. As glândulas eram lavadas com solução fisiológica, pesadas imediatamente e a radioatividade medida em cintilador.

O efeito da fração em estudo foi avaliado por diferentes parâmetros como: peso da glândula, % da captação, nível de hormônios tireoidianos e séricos e índices de crescimento.

6.4 – Determinação da Porcentagem de Captação

A porcentagem de captação foi calculada dividindo-se o número de contagens obtidas com a tireóide por aquelas obtidas contando-se, nas mesmas condições, 1 ml de uma diluição conveniente da solução padrão injetada nos animais e multiplicando-se a razão por 100.

Em todos os casos as contagens foram superiores a 10.000 para manter-se o erro estatístico de contagem inferior a 1%.

6.5 – Doseamento dos Hormônios da Tireóide

6.5.1 – Preparo do Hidrolisado

Logo após a medida da radioatividade cada tireóide foi macerada em homogenizador mecânico com 1 ml de tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 8,6 contendo: 0,1% de tiouracilo, 0,9% de NaCl e 0,1% de pronase; após a homogeneização acrescentavam-se mais 2 ml de pronase a 0,1% dissolvida no mesmo tampão sendo os macerados deixados em estufa a 37°C por vinte e quatro horas, para a digestão enzimática⁽²⁰⁾. Os hidrolisados de cada glândula eram centrifugados a 8.000 r.p.m. durante vinte minutos e os sobrenadantes utilizados na cromatografia.

6.5.2 – Separação dos Hormônios

A separação dos hormônios foi efetuada por cromatografia descendente em papel Whatman 3MM⁽¹⁶⁾, tendo os cromatogramas de cada hidrolisado sido desenvolvidos em dois sistemas de solventes distintos.

Sistema 1: para Iodotirosinas

n-butanol:ácido acético:água (4:1:5)

Os solventes foram colocados em funil de separação na proporção citada acima, e após agitação deixou-se a mistura em repouso por quatro horas a 4°C. A fase superior foi utilizada no desenvolvimento dos cromatogramas e a inferior para saturação prévia do sistema.

Sistema 2: para Iodotironinas

NH₄OH 2N:n-butanol (1:1)

Os solventes foram colocados em funil de separação, e após agitação deixou-se a mistura em repouso por quatro horas a 4°C. A fase superior foi utilizada no desenvolvimento dos cromatogramas e a inferior para saturação prévia do sistema.

Para as corridas, 500 µl do hidrolisado de cada glândula foram misturadas com 100 µl de mistura de padrões (2 mg de NaI + 2 mg de MIT + 2 mg de DIT + 8 mg T₃ + 8 mg T₄ dissolvidos em 4 ml de NH₄OH 2N)*

200 µl dessa mistura foram então aplicados ao papel em estrias de 1,5 cm. Após as manchas estarem secas, os cromatogramas foram levados para saturar nas cubas que continham a fase aquosa dos respectivos solventes e após um período de cinco horas a fase butanólica foi colocada em contacto com os cromatogramas. O tempo de desenvolvimento foi de quinze horas.

Finda a corrida, os cromatogramas foram secados e revelados quimicamente. Para os compostos com grupamento fenólico utilizou-se o reativo de PAULY⁽⁵⁾ e para localização do iodeto sódio, o cloreto de paládio a 1% em solução aquosa acidificada com HCl (pH = 3).

6.5.3 – Contagens

Após revelação química os cromatogramas foram secados ao ar novamente, recortados em tiras de 1 cm. de largura (na direção origem → front) e a radioatividade de cada tira determinada em detector de cintilações. As contagens correspondentes a um determinado hormônio, identificado quimicamente, foram agrupadas para se calcular sua porcentagem em relação à soma total das contagens do cromatograma.

Nas Figuras 3 e 4 encontram-se representados duas das corridas realizadas, a título de ilustração e avaliação da técnica empregada.

6.6 – Doseamento dos Hormônios Séricos

6.6.1 – Obtenção do Soro

Antes da remoção das tireóides os animais eram levemente anestesiados com éter etílico e através punção cardíaca retiravam-se 5 ml de sangue. Para evitar hemólise e obter-se uma boa retração do coágulo utilizaram-se, para cada animal, seringa e tubo de ensaio previamente siliconizados. Após coagulação, o soro era separado por centrifugação a 2.000 r.p.m. e congelado a -20°C para posterior análise dos hormônios.

(*) (MIT) moniodotirosina, (DIT) de Iodotirosina, (T₃) triiodotironina, (T₄) Tiroxina.

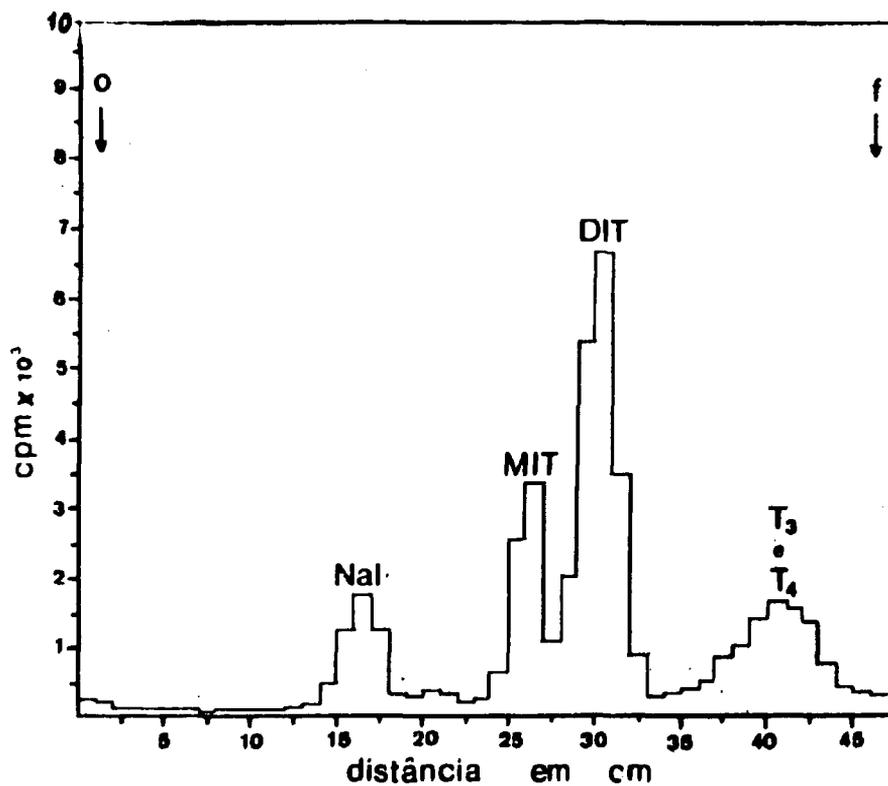


Figura 3 - Perfil Cromatográfico das Contagens de Hidrolisado de Tireóide no Sistema Solvente 1.
O = origem; F = frente; c.p.m. = contagens por minuto

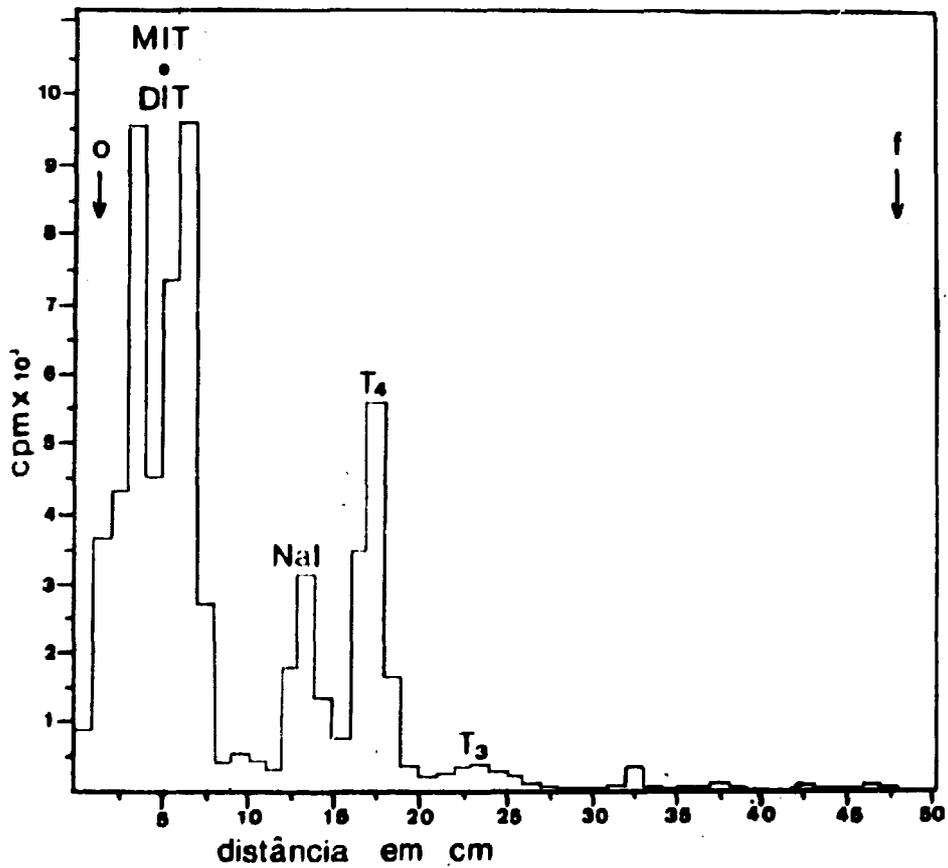


Figura 4 - Perfil Cromatográfico das Contagens de Hidrolisado de Tireóide no Sistema Solvente 2.
O = origem; F = frente; c.p.m. = contagens por minuto

6.6.2 – Medida Indireta da Função Tireoidiana

Baseada no método de LEONARDS⁽²²⁾; utilizamos para esse fim o sistema Trilute (Ames Yissum, Ltda, Israel). A quantidade de soro usada na medida, para cada animal, foi de 0,15 ml.

6.6.3 – Radioimunoensaio

Para a dosagem do T_3 empregamos o sistema T_3 Dow-Lepetit (Lepetit S.A) e para a dosagem do T_4 o sistema Quantimune T_4 RIA (Bio-Rad Laboratories).

6.7 – Testes Preliminares para Identificação dos Compostos Presentes no Extrato Total e em Suas Frações

6.7.1 – Espectros de Absorção

Os espectros foram obtidos em solução aquosa ou etanólica (90%) na diluição de 1/600.

6.7.2 – Glicídes Solúveis em Água

Foram detectados através de reações em tubo de ensaio com resorcinol (reação de Seliwanoff)⁽⁵²⁾ benzidina + ácido tricloro acético⁽⁵⁾ e reação de Molish-Udransky⁽⁵²⁾.

6.7.3 – Grupo α -Amírico Livre

Avaliados através das reações em tubo de ensaio com reagente de ninhidrina segundo método de SPIES⁽⁴⁷⁾.

6.7.4 – Flavonóides

Detectados através das reações com $FeCl_3$ a 5% e Na_2CO_3 a 10%, segundo SEIKEL⁽⁴³⁾.

Foram efetuados também reações em forma de "spottest" sendo os reveladores empregados UV, vapores de NH_3 e vapores de NH_3 + UV⁽⁴³⁾. Nos valem também da cromatografia em papel Whatman 3 MM⁽⁴³⁾ com n-butanol: ácido acético: H_2O (4:1:5), preparado conforme item 6.5.2.

Os reveladores empregados foram UV, vapores de NH_3 , vapores de NH_3 + UV, Na_2CO_3 10% e $FeCl_3$ 5%.

6.8 – Métodos Estatísticos

Foram realizados 3 tipos de análise estatística:

a) Teste "t" de Student para comparação entre duas médias⁽⁷⁾

*b) Análise de Variância. Nos casos em que pela análise se rejeitou a hipótese de igualdade das médias dos grupos, três soluções foram tomadas; em certos casos fez-se a comparação

(*) Realizada pelos Profs. Clovis Araujo Peres, Wilton Oliveira Bussab e Dalton Francisco de Andrade, do Instituto de Matemática e Estatística de USP.

de cada grupo com o controle (Técnica de DUNNET)⁽⁷⁾, em outros usou-se a técnica de análise de conglomerados para agrupar os tratamentos semelhantes (Técnica de SCOTT e KNOTT)⁽⁴¹⁾ e no caso de doseamento dos hormônios tireoidianos no segundo ensaio semicrônico, nos valem os da técnica de FISHER⁽⁷⁾.

- c) **Análise de Covariância.** Foi utilizada nas variáveis que dependiam de algum modo do peso inicial, para eliminar-se o efeito do peso inicial do rato. Quando a hipótese de igualdade entre as médias ajustadas foi rejeitada, passou-se a técnica de agrupamento das médias (Técnica de SCOTT e KNOTT)⁽⁴¹⁾.

O nível mínimo de significância considerado foi de 5% ou 1% conforme o caso.

7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 – Ensaios Agudos Realizados com os Extratos de Farinha de Soja Desengordurada (FSD)

Os efeitos agudos foram obtidos, como descrito em 6.3.1, administrando-se extratos de soja a ratos, e avaliando-se a sua ação por medida da captação de ¹³¹I pela tireóide após prazos variáveis de 3 a 24 horas. Os extratos, tratados ou não termicamente, consistiam dos Extratos Totais (ET), frações razoavelmente purificadas (6.1) (Figura 1) já que boa parte das proteínas (contendo inclusive fitohemaglutinina e antitripsina) eram eliminadas por precipitação isoelétrica em pH 4.2 e, numa segunda fase, pelo tratamento com acetona^(19,24,40).

7.1.1 – Efeito do Extrato Total Não Autoclavado. Ação em 24 Horas

Extratos Totais, não autoclavados, preparados a partir de Farinha de Soja Desengordurada Crua, administrados a ratos por sonda gástrica não causaram, após 24 horas de ação, qualquer variação significativa na porcentagem de captação de ¹³¹I pela tireóide (Tabela III).

Ensaios preliminares realizados anteriormente com propiltiouracilo nos haviam indicado a eficiência da técnica escolhida; testes prévios realizados com um produto comercial de soja haviam também indicado uma ação mensurável, fatos esses que em vista dos resultados negativos da Tabela III, nos levaram à repetição da experiência.

Na Tabela IV encontram-se os resultados dessa primeira repetição, bem como de outras, realizadas posteriormente, num espaço de 20 meses a partir de 1º ensaio. Como se vê pela tabela, apenas em um caso, entre as 3 repetições, houve redução significativa da captação ($P \leq 0,05$), o que representava uma confirmação muito fraca dos resultados obtidos na nossa experiência piloto.

Os resultados pareciam apenas refletir a confusão existente na literatura sobre a existência – não existência de substâncias ativas^(12,20,45,46). Faltava ainda explicar a ação (exceção) obtida na terceira repetição (concluímos mais tarde que a exceção obtida poderia ser explicada por um excesso de aquecimento durante a preparação dos extratos usados nessa experiência).

7.1.2 – Efeito do Extrato Total Não Autoclavado. Ação de 3 a 24 Horas

Pensando que uma possível metabolização pudesse eliminar a ação do composto ativo, no prazo empregado inicialmente, de 24 horas, realizamos experiências procurando avaliar a ação após tempos menores decorridos entre a ingestão dos extratos e a medida da captação.

Tabela III

Efeito do Extrato Total na Captação de ^{131}I pela Tireóide

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cpm)	% de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μCi	cpm			
Controle	9 ♂	101,0 ± 3,1 **	24	4,9	1.757.648	142.407 ± 12.098	8,03 ± 0,68	a
Extrato Total	11 ♂	107,0 ± 3,4	24	4,9	1.757.648	153.728 ± 9.310	8,24 ± 0,60	a

* Usou-se Análise de Variância. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

** Erro padrão (26)

Tabela IV

Efeito do Extrato Total na Captação de ^{131}I pela Tireóide

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cpm)	% de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μCi	cpm			
Controle	10 ♂	166,0 ± 3,0 **	24	8,2	3.420.800	192.750 ±12.701	3,40 ± 0,26	a
Extrato Total	10 ♂	165,0 ± 2,7	24	8,2	3.420.800	160.549 ±13.668	2,84 ± 0,22	a
Controle	7 ♂	163,0 ± 8,1	24	7,0	3.349.050	632.107 ±58.504	11,93 ± 1,25	a
Extrato Total	8 ♂	161,0 ± 6,6	24	7,0	3.349.050	530.335 ±56.650	9,97 ± 1,45	a
Controle	8 ♂	158,0 ± 9,0	24	6,0	2.361.625	269.302 ±25.704	7,23 ± 0,63	a
Extrato Total	8 ♂	155,0 ± 7,4	24	6,0	2.361.625	195.762 ±11.109	5,47 ± 0,47	b (P < 0,05)

* Usou-se Análise de Variância. Letras iguais no mesmo experimento indica que não houve diferença significativa (P > 0,05)

** Erro Padrão

Os resultados, de várias repetições encontram-se na Tabela V e mostram que existe de fato um fator ativo (F) que consegue diminuir a captação de ^{131}I pela tireóide e cuja ação se inicia após 3 horas de administração mas que desaparece decorridas 24 horas.

A observação feita explica, em parte, a discrepância de certos dados da literatura, que poderiam ser devidos ao tipo de técnica usada para a detecção da ação tóxica.

Para os resultados obtidos, várias explicações nos ocorreram como:

- a) O fator ativo (F) seria, como pensado, rapidamente eliminado ou inativado no organismo (detoxificado, hidrolizado, com perda de ação) o que ocorreria entre 6 e 24 horas após a administração.
- b) (F) seria composto de duas substâncias, daquela ativa (A) e uma inibidora ou antagonista (I), cujas velocidades de: absorção ou metabolização ou de excreção, fossem diferentes. Assim, por exemplo, se a absorção de (I) fosse mais lenta, ou se (I) existisse na forma de um precursor que levasse algumas horas para tornar-se ativo, a ação seria aquela obtida nos nossos resultados.
- c) O fator (F) poderia, também, existir na forma de um precursor (ou precursores) inativo, sendo que apenas uma pequena fração estaria na forma livre; e cuja quantidade só seria suficiente para agir num período de tempo curto (6 horas). Essa quantidade poderia ser formada na preparação do extrato.

7.1.3 – Efeito da Autoclavagem Sobre a Ação do Extrato Total. Ação em 24 Horas

A possibilidade inferida, da existência de mais de uma substância ou de um precursor inativo, nos levou a tentar discriminar a ação das mesmas e, como poderiam ter labilidades térmicas diferentes, realizamos experiências exploratórias, comparando a ação de Extratos Totais Autoclavados com a do Extrato Total Cru.

Esses resultados encontram-se na Tabela VI e mostram (em duas repetições) que a autoclavagem do extrato total entre 30-60 min., faz com que o mesmo se torne operante na depressão da captação confirmando de um lado, a existência, nesse extrato, de uma substância ativa e, por outro negando a hipótese "a", levantada anteriormente.

Outro aspecto importante é que essa substância é resistente ao tratamento térmico de 121°C por 60 min., mesmo em solução; possivelmente ela deveria resistir ao processamento industrial, o que foi confirmado (ver adiante).

Havia, ainda, porém, a possibilidade da substância ativa ter sido "produzida" como resultado de uma reação ocorrida durante a autoclavagem do Extrato Total e desse modo seria apenas um "artefato", mas não uma substância existente na soja.

Diante disso realizamos testes onde autoclavamos a Farinha de Soja Desengordurada, em suspensão aquosa para depois separar o Extrato Total e testá-lo.

Os resultados da Tabela VII mostram que ação foi a mesma que ocorreu no caso do aquecimento do extrato, indicando tratar-se de substância preexistente na soja e não formada artificialmente na autoclavagem do Extrato Total. Pelo mesmo raciocínio conclui-se que, devido às diferenças observadas antes e depois da autoclavagem, a mesma substância também não poderia ser formada durante a preparação do extrato, fase em que as condições utilizadas são menos severas.

Tabela V

Efeito do Extrato Total na Tireóide: 3, 6 e 24 horas após a Administração de ^{131}I

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cpm)	% de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μCi	cpm			
Controle	7 ♂	136,0 ± 8,0 **	3	4	3.033.300	152.506 ±15.235	3,73 ± 0,32	a
Extrato Total	6 ♂	138,0 ± 8,5	3	6,4	3.033.300	154.295 ± 6.081	3,74 ± 0,25	a
Controle	10 ♀	114,0 ± 2,8	6	6,2	2.289.750	326.956 ±22.620	12,63 ± 0,94	a
Extrato Total	10 ♀	112,0 ± 2,7	6	6,2	2.289.750	216.978 ±22.292	8,49 ± 0,86	b (P < 0,001)
Controle	9 ♀	155,0 ± 2,7	6	6,1	2.368.100	289.204 ±35.338	7,29 ± 1,02	a
Extrato Total	9 ♀	155,0 ± 3,4	6	6,1	2.368.100	195.539 ±14.827	5,30 ± 0,30	b (P < 0,05)
Controle	9 ♂	101,0 ± 3,1	24	4,9	1.757.648	142.407 ±12.098	8,03 ± 0,68	a
Extrato Total	11 ♂	107,0 ± 3,4	24	4,9	1.757.648	153.728 ± 9.310	8,24 ± 0,60	a

* Usou-se Análise de Variância. Letras iguais no mesmo experimento indica que não houve diferença significativa (P > 0,05)

** Erro Padrão

Tabela VI

Efeito da Autoclavagem do Extrato Total Sobre a sua Atividade na Tireóide

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cpm)	%de captação /100 g de rato	Análise Estatística
				μ Ci	cpm			
Controle	9 σ	140,0 $\pm 3,2^*$	24	6,6	2.375.200	257.026 ± 13.672	7,76 $\pm 0,43$	a**
Extrato Total Autoclavado 30 min.	15 σ	146,0 $\pm 2,0$	24	6,6	2.375.200	204.873 ± 10.352	5,89 $\pm 0,27$	b (P < 0,001)
Controle	10 φ	117,0 $\pm 4,6$	24	5,5	2.059.550	251.994 ± 15.840	10,57 $\pm 0,67$	a***
Extrato Total	10 φ	120,0 $\pm 3,5$	24	5,5	2.059.550	243.448 ± 12.620	9,97 $\pm 0,76$	a
Extrato Total Autoclavado 30 min.	10 φ	120,0 $\pm 3,0$	24	5,5	2.059.550	186.471 ± 11.885	7,55 $\pm 0,47$	b (P < 0,05)
Extrato Total Autoclavado 60 min.	9 φ	117,0 $\pm 3,3$	24	5,5	2.059.550	205.108 ± 13.476	8,83 $\pm 0,51$	b (P < 0,05)

*Erro Padrão

**Usou-se Análise de Variância. Letras iguais no mesmo experimento indica que não houve diferença significativa.

***Usou-se Análise de Variância; e rejeitando-se a hipótese de igualdade (P < 0,01) empregamos a técnica de Análise de Conglomerados (técnica de SCOTT e KNOTT). Letras iguais no mesmo experimento indicam que não houve diferença significativa (P > 0,05).

Tabela VII

Efeito da Autoclavagem da Farinha de Soja Desengordurada Sobre a Ação na Tireóide

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	%de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μ Ci	cpm			
Controle	8 ♀	133,0 \pm 3,5 **	6	6,80	2.794.600	234.097 \pm 22.517	6,30 \pm 0,56	a
Extrato Total de FSD e Auto-clavada 40 min.	8 ♀	137,0 \pm 4,1	6	6,80	2.794.600	160.929 \pm 5.085	4,19 \pm 0,11	b (P \leq 0,05)

* Usou-se Análise de Variância, rejeitando-se a hipótese de igualdade (P \leq 0,001), empregamos a técnica de Análise de Conglomeradas (Técnica de SCOTT e KNOTT). Letras diferentes indicam diferença significativa.

** Erro Padrão

7.1.4 – Efeito da Autoclavagem Sobre a Ação do Extrato Total. Ação em 6 Horas

Na tentativa de discriminar mais entre as explicações alternativas apresentadas, realizamos essas experiências cujos resultados encontram-se na Tabela VIII. Elas confirmam a ação após 24 horas, mesmo após autoclavagem e a ação, também nas 6 horas, da mesma forma como acontece quando não há aquecimento.

A Figura 5 ilustra melhor do que as Tabelas a evolução da ação observada em função do tempo de ação e da autoclavagem.

Como o tratamento térmico faz com que a ação depressora permaneça após 6 horas é possível que ele tenha destruído uma segunda substância (I) que como suposto, agiria de forma oposta à da substância ativa (A) ou seja, aumentando a captação de ^{131}I pela tireóide (hipótese b).

No caso do fator existir na forma de um precursor (hipótese c) o aquecimento poderia levar à formação da substância ativa que alcançaria uma concentração suficiente para agir nas 6 horas como nos 24 horas. Não há elementos finais nesta altura para decidir, mas a alternativa c parece próxima da realidade.

7.2 – Ensaios Agudos dos Produtos Obtidos por Fracionamento do Extrato Total

Na tentativa de isolar as substâncias envolvidas para posterior identificação e de testar as hipóteses levantadas, procuramos obter frações ativas (que aumentassem ou diminuíssem a captação do ^{131}I) o que foi feito por tratamento com etanol ou por separação em coluna de peneira molecular.

Dentre as substâncias candidatas a serem, segundo as hipóteses levantadas, fatores ativos ou fatores inibidores ou ainda, precursores de ambos, os flavonóides pareciam adequados.

A substância ativa (A) poderia, por exemplo, ser um flavonóide, existente como precursor na forma de glicosídeo inativo, que se hidrolisaria por aquecimento, passando a agir.

A ação nas 6 horas seria explicada como dissemos pela pequena quantidade existente na forma livre que metabolizada não conseguiria agir após 24 horas.

Essa idéia encontra apoio no fato já verificado de que os flavonóides conseguem tanto aumentar^(28,34) como diminuir⁽¹⁸⁾ o metabolismo basal em animais, bem como aumentar^(35,42) ou diminuir⁽⁴²⁾ a captação de ^{131}I pela tireóide.

O mecanismo envolvido parece estar relacionado com uma ação ao nível das peroxidases tireoidianas^(18,29) ou ainda ao nível de competição entre os grupos fenólicos de flavonóides e os da tirosina, na fase da organização do iodo^(18,39).

A análise dos vários resultados apresentados na literatura sobre a soja, não nos auxiliaram muito; alguns autores⁽⁴⁴⁾ observaram, por exemplo, que um fator bociogênico da soja era solúvel em éter etílico e acetona, pois com o tratamento por esse solvente a soja perdia essa ação. Já, segundo outros, o tratamento com éter etílico, acetona, clorofórmio ou etanol não eram capazes de remover a ação bociogênica^(12,53).

Um único trabalho recente evidencia que, em extratos de soja, se consegue precipitar o fator ativo com acetona a 90%, éter etílico a 90% ou etanol a 90%⁽¹⁹⁾.

Realizamos assim uma série de experiências preliminares para verificar a presença de flavonóides no nosso extrato.

Tabela VIII

Efeito do Extrato Total Autoclavado na Tiouréia: 6 e 24 horas após a Administração de ^{131}I

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	% de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μCi	cpm			
Controle	8 ♀	133,0 ± 3,5 **	6	6,8	2.794.600	234.097 ±22.517	6,30 ± 0,56	a
Extrato Total Autoclavado 30 min.	8 ♀	136,0 ± 3,6	6	6,8	2.794.600	151.488 ±11.668	3,96 ± 0,26	b (P < 0,05)
Controle	10 ♀	117,0 ± 4,6	24	5,5	2.059.550	251.994 ±15.840	10,57 ± 0,67	a
Extrato Total Autoclavado 30 min.	10 ♀	120,0 ± 3,0	24	5,5	2.059.550	186.471 ±11.885	7,55 ± 0,47	b (P < 0,05)

* Usou-se Análise de Variância, rejeitando-se a hipótese de igualdade (P < 0,001 e 0,01 respectivamente), empregamos a técnica de Análise de Conglomerados (Técnica de COTT e KNOTT). Letras diferentes indicam diferença significativa.

** Erro Padrão

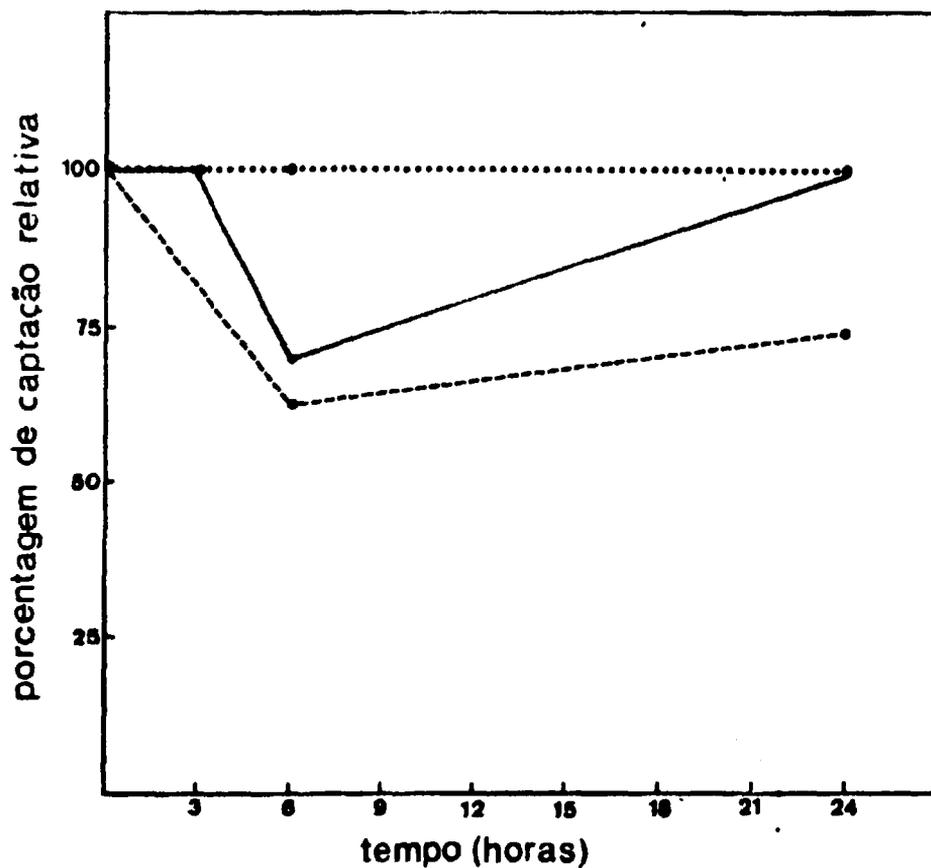


Figura 5 - Efeito da Autoclavagem do Extrato Total na % de Captação/100 g de Rato em Função do Tempo de Aplo. (.....) Controle; (—) Extrato Total; (- - -) Extrato Total Autoclavado. A % de Captação/100 g de Rato foi Considerada em Relação ao Grupo Controle, cujo valor era igual a 100

Inicialmente verificamos que o espectro de absorção do Extrato Total, entre 360 a 170 nm mostrava dois pontos de máxima: um por volta de 200 nm que poderia ser devido a peptídeos e outro em torno de 260 nm que, pelo histórico do extrato seria devido principalmente a flavonóides.

A cromatografia ascendente do Extrato Total, autoclavado ou cru, em papel Whatman 3 MM, evidenciou um grande número de manchas sobrepostas que davam reação positiva em UV, vapores de amônia, vapores de amônia + UV, Na_2CO_3 a 10% e FeCl_3 5%, indicando a presença de vários flavonóides diferentes e também, de outros compostos fenólicos.

Por precipitação do Extrato Total com etanol a 90% obtivemos um precipitado, com absorção máxima em 194 nm e um sobrenadante que mantinha os dois picos em 197 nm e 259 nm (Figura 6).

O desaparecimento do pico em 259 nm foi tomado como indicativo de eliminação de boa parte dos flavonóides, fato que foi confirmado pela realização de reações específicas como descrito acima.

As frações separadas foram testadas em animais na esperança de termos conseguido separação entre (A) e (I), mas não tivemos sucesso (Tabela IX).

É importante comentar, porém, que para a precipitação com etanol partimos do extrato cru.

Os resultados obtidos por KONIJN et al.⁽¹⁹⁾ que conseguiram precipitar um fator com etanol a 90%, talvez se devesse ao fato dos mesmos trabalhar com soja que já apresentava o composto ativo livre.

Na tentativa de purificarmos mais o Extrato Total, a caminho de um possível isolamento e identificação, o mesmo foi, com sucesso, fracionado em coluna de Sephadex G-25 médio ou fino por eluição com acetato de amônio 0,02M (item 6.1.3).

Obtivemos 8 frações, segundo o perfil cromatográfico mostrado na Figura 7, que após concentração foram testados (item 6.3.1) verificando-se que apenas uma delas, a Fração II era ativa; os resultados de duas repetições encontram-se nas Tabelas X e XI.

Pensamos, também, que fosse possível encontrar alguma fração que agisse de forma oposta ao fator, aumentando portanto a captação de ^{131}I o que nos daria mais indicação na direção das hipóteses levantadas anteriormente (da existência de substância antagonista).

Na primeira experiência, as Frações III e VII mostraram essa tendência que não se mostra, porém, estatisticamente significativa. Na segunda repetição, novamente os resultados foram negativos. Devemos comentar aqui a dificuldade de interpretação dos resultados que encontramos pois o Extrato Total, apesar de não ter sido autoclavado, mostrou-se ativo; retomaremos adiante a discussão desse aspecto.

De qualquer forma, o fracionamento em Sephadex resultou numa purificação, mesmo que parcial, do extrato original, liberando o fator de uma série de componentes que foram retardados na coluna. Esse retardamento, foi maior do que era de se esperar, indicando algum tipo de interação com a dextrana, possivelmente, devido a presença de grupamentos aromáticos nas últimas frações.

7.3 – Testes Físico-Químicos de Identificação

A Fração II obtida por separação em coluna de Sephadex G-25, e que se mostrou ativa agindo na tireóide, foi submetida a alguns testes para se obterem indicações iniciais sobre a natureza química do composto em questão.

O espectro de absorção evidenciou 2 pontos de máxima em 196 nm e 262 nm (Figura 8) semelhantes aos apresentados pelo Extrato Total. Os picos são indicadores da presença de peptídeos e flavonóides.

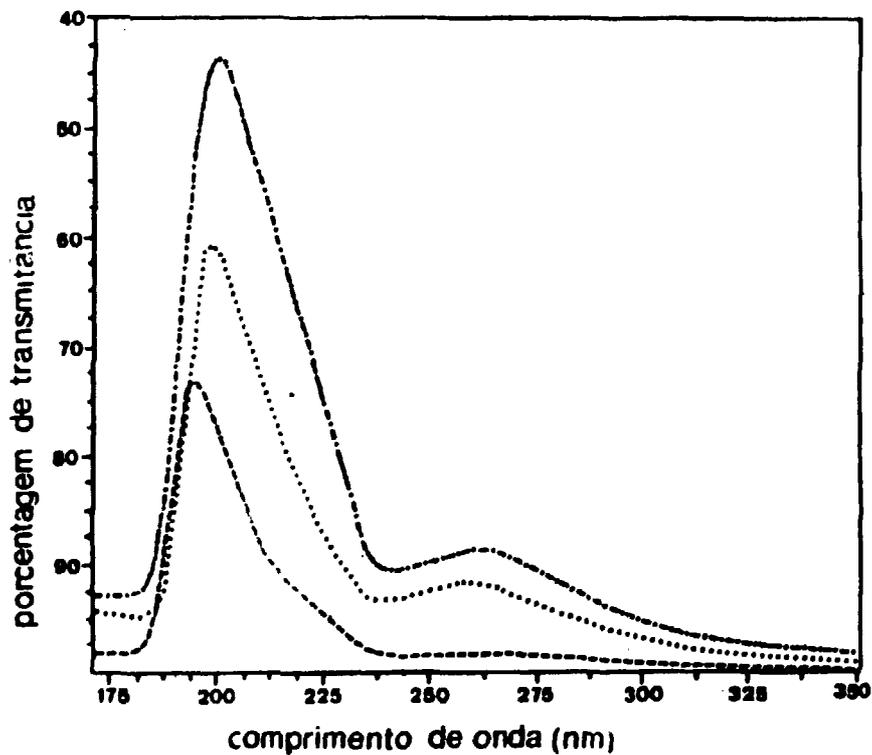


Figura 8 -- Espectro de Absorção na Faixa de Ultravioleta (- - - - -) Extrato Total; (.....) Sobrenadante Et-OH 90%; (- . - . -) Precipitado Et-OH 90%, em Solução Aquosa. Diluição final 1/600

Tabela IX

Efeito das Frações Resultantes do Tratamento do Extrato Total com Etanol

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cpm)	%de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				µCi	cpm			
Controle	8 ♂	161,0 ± 9,6 **	24	7,3	1.900.400	172.480 ±11.616	5,66 ± 0,31	a
Precipitado Etanol 90 %	8 ♂	162,0 ± 8,1	24	7,3	1.900.400	176.365 ± 9.557	5,73 ± 0,28	a
Sobrenadante Etanol 90 %	8 ♂	160,0 ± 6,9	24	7,3	1.900.400	149.605 ±12.109	4,96 ± 0,37	a
Controle	8 ♀	121,0 ± 2,4	24	5,0	1.332.300	146.583 ±13.860	9,03 ± 0,75	a
Precipitado Etanol 90 %	7 ♀	122,0 ± 2,1	24	5,0	1.332.300	124.333 ±12.707	7,60 ± 0,72	a
Sobrenadante Etanol 90 %	8 ♀	122,0 ± 2,1	24	5,0	1.332.300	112.045 ±11.317	6,86 ± 0,57	a
Controle	8 ♂	111,0 ± 5,7	24	7,0	3.349.050	606.147 ±54.974	16,72 ± 2,05	a
Precipitado Etanol 90 %	7 ♂	114,0 ± 8,7	24	7,0	3.349.050	473.577 ±39.216	12,63 ± 1,26	a
Sobrenadante Etanol 90 %	8 ♂	111,0 ± 6,2	24	7,0	3.349.050	466.837 ±29.511	12,64 ± 0,74	a

*Usou-se Análise de Variância. Letras iguais no mesmo experimento indicam que não houve diferença significativa. (P > 0,05)

**Erro Padrão

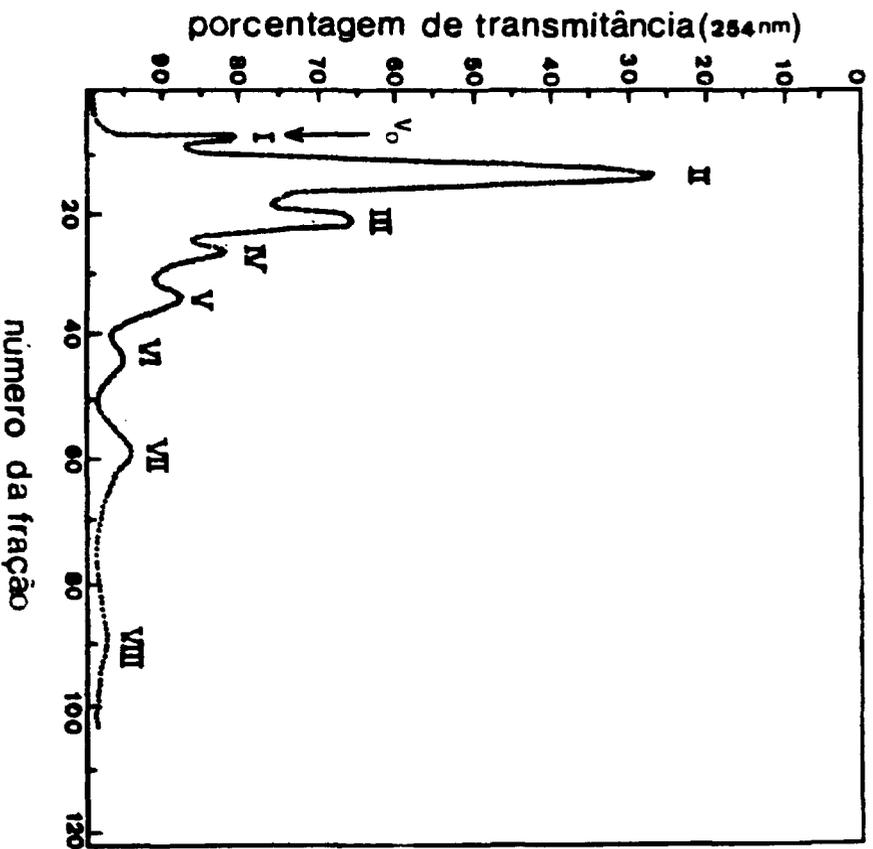


Figura 7 - Diagrama de Eluição de 0,5 ml de Extrato Total em Coluna de Sephadex G-25. A Coluna foi Equilibrada e Eluída com Acetato de amônio 0,02M; Frações de 5 ml foram Coletadas a um Fluxo de 1,8 ml/min.

Tabela X

Efeito das Frações Resultantes do Fracionamento do Extrato Total em Sephadex G-25 (1ª experiência)

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	%de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				µCi	cpm			
Controle	9 ♂	131,0 ± 1,5 **	24	7,8	3.220.614	409.916 ±26.864	9,66 ± 0,58	a
Extrato Total	9 ♂	133,0 ± 2,1	24	7,8	3.220.614	307.000 ±11.118	6,87 ± 0,30	b (P < 0,05)
Fração II	9 ♂	133,0 ± 1,5	24	7,8	3.220.614	267.112 ±18.377	6,45 ± 0,37	b (P < 0,05)
Fração III	9 ♂	134,0 ± 1,7	24	7,8	3.220.614	475.092 ±18.051	10,80 ± 0,38	a
Fração IV	9 ♂	134,0 ± 1,3	24	7,8	3.220.614	387.840 ±24.444	9,41 ± 0,59	a
Fração V	9 ♂	134,0 ± 1,1	24	7,8	3.220.614	412.486 ±13.876	9,48 ± 0,46	a
Fração VII	9 ♂	133,0 ± 2,5	24	7,8	3.220.614	445.208 ±34.242	10,17 ± 0,81	a

* Usou-se Análise de Variância, e como foi rejeitada a hipótese de igualdade ($P < 0,001$), empregamos a técnica de Análise de Conglomeradas (técnicas de SCOTT e KNOTT). Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$)

** Erro Padrão

Tabela XI

Efeito das Frações Resultantes do Fracionamento do Extrato Total em Sephadex G-25 (2ª experiência)

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	%de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μ Cl	cpm			
Controle	10 σ	120,0 \pm 3,4 **	24	5,0	2.245.395	172.207 \pm 10.270	6,38 \pm 0,35	a
Extrato Total	9 σ	117,0 \pm 3,5	24	5,0	2.245.395	128.677 \pm 8.522	4,89 \pm 0,44	b (P < 0,05)
Fração II	12 σ	120,0 \pm 2,8	24	5,0	2.245.395	125.130 \pm 7.463	4,65 \pm 0,30	b (P < 0,05)
Controle	8 σ	156,0 \pm 2,9	24	7,0	3.481.625	301.657 \pm 20.001	5,57 \pm 0,33	a
Fração IV	7 σ	156,0 \pm 3,6	24	7,0	3.481.625	283.902 \pm 26.406	5,26 \pm 0,53	a
Fração VI	8 σ	156,0 \pm 3,6	24	7,0	3.481.625	309.697 \pm 19.825	5,71 \pm 0,34	a
Controle	11 σ	99,0 \pm 5,2	24	5,0	1.841.000	156.235 \pm 7.342	8,80 \pm 0,51	a
Fração III	9 σ	103,0 \pm 4,7	24	5,0	1.841.000	166.782 \pm 15.843	8,79 \pm 0,78	a
Fração V	10 σ	104,0 \pm 4,4	24	5,0	1.841.000	155.067 \pm 10.909	8,07 \pm 0,55	a

* Usou-se Análise de Variância, para o experimento em que foi rejeitada a hipótese de igualdade ($P < 0,001$), empregamos a técnica de Análise de Conglomeradas (Técnica de SCOTT e KNOTT). Letras iguais no mesmo experimento indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$)

** Erro Padrão

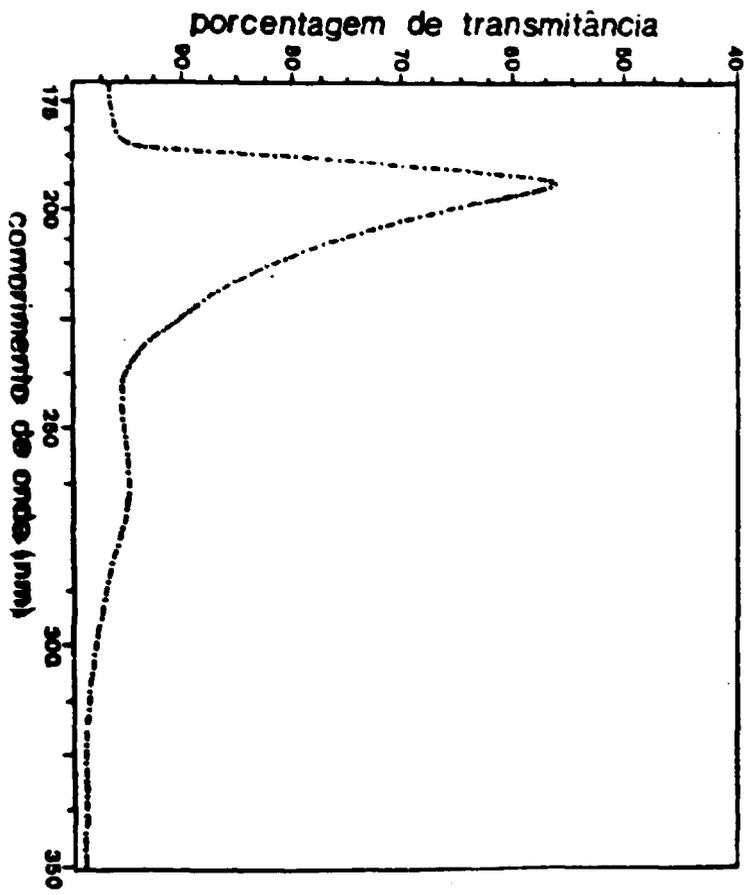


Figura 8 - Espectro de Absorção na Faixa do Ultravioleta de Fração II Sephadex G-25

A fração, mesmo após fracionamento é formado por diversas substâncias dando reação positiva para glicídes, grupo α -amínico livre e substâncias fenólicas. Por cromatografia evidenciaram-se pelo menos 4 tipos de flavonóides, correspondentes a 4 manchas nos cromatogramas (Tabela XII).

A Tabela mostra ainda testes efetuados com outras frações não ativas onde se verifica a presença de glicídes e substâncias fenólicas em quase todas, mas em nenhuma a presença de grupo α -amínico livre.

Isso nos faz pensar na possibilidade da substância ter natureza peptídica. Outros autores⁽²⁰⁾ identificaram um composto obtido da soja como sendo de natureza peptídica e de baixo peso molecular o qual diminui a captação de ^{131}I na tireóide. Esse composto porém era precipitável em etanol a 90% o que não parece ser o nosso caso (Tabela IX) (a não ser que devessemos ter aquecido o Extrato Total antes do tratamento com etanol). Por outro lado, o mesmo autor encontrou ação para soja não autoclavada nas 24 horas, o que não corresponde aos nossos resultados, estando uma possível comparação, a merecer melhores estudos.

Devemos comentar finalmente, com relação à ação de extratos aquecidos e não aquecidos que reunindo todas as experiências realizadas com Extrato Total, em alguns casos evidenciava-se a ação mesmo sem o aquecimento do Extrato Total (Tabela XIII).

A explicação parece ser devida a um aquecimento maior por ocasião do preparo do Extrato Total pois nesses casos (onde havia ação sem autoclavagem prévia) o extrato tinha sido produzido em grandes quantidades (para ser adicionado à ração dos animais) o que pode ter causado um maior tempo de aquecimento.

Qualquer outra explicação que tentamos como: tempo de armazenamento da soja, idade do extrato, e proveniência da soja, não mostraram qualquer relação com o observado, tornando mais forte a explicação dada inicialmente. De qualquer forma o que nos parece relevante é que o aquecimento da soja provoca o aparecimento de uma substância com ação na tireóide e não a destrói facilmente.

Podemos resumir afirmando que existe na soja um "fator" que por aquecimento passa a ser ativo, agindo de forma a diminuir a captação de ^{131}I pela tireóide. Esse agente resiste a autoclavagem por até 1 hora e está presente em diversos produtos comerciais de soja (item 7.4).

Na soja não tratada termicamente esse fator está inibido, a sua ação é antagonizada por algum outro composto ou ele se encontra na forma de um precursor.

Nesse último caso o fator só se formava com o aquecimento da soja, mas de qualquer forma a ingestão de soja processada levaria a ingestão desse agente.

Testes para maior purificação estão em elaboração; já verificamos por exemplo que um tratamento prévio por carvão é efetivo na eliminação de vários flavonóides (eliminação do pico em 260 nm) bem como glicídes. Colunas de poliestireno sulfonada e Dowex 50 W x 8 (20-50 Mesh U.S.) eluídas por gradiente de acetato de piridina parecem dar bons resultados na separação da Fração II.

7.4 - Presença do Fator em Diferentes Produtos Comerciais de Soja

Os nossos resultados mostram a existência de fato, de um fator ativo sobre a tireóide, mesmo na soja autoclavada, de elevada resistência térmica, passível mesmo de se formar durante o aquecimento.

Como vários produtos obtidos da soja e de seus derivados são atualmente comercializados e consumidos por diversos grupos etários, resolvemos testar a ação de alguns deles sobre a tireóide.

Todos os produtos testados: Concentrados Protéicos, Farinha Tostada de Soja e Leite de Soja,

Tabela XII

Testes Físico-Químicos Preliminares para Identificação de Compostos Resultantes do Fracionamento do Extrato Total em Coluna de Sephadex G-25

Frações	Espectro	Tubo de Ensaio					Cromatografia			
	170 a 360 nm	Molisch	Resorcinol	Nihidrina	FeCl ₃ 5%	Na ₂ CO ₃ 10%	UV		NH ₃ + UV	
							λ longo	λ curto	λ longo	λ curto
Fração II	196 262	+++	+++	+++	+	+	4*	4	4	4
Fração III	—	—	+	—	—	+	2	2	2	2
Fração IV	—	—	+	—	—	+	—	—	2	1
Fração V	—	—	++	—	+	+	—	—	—	—
Fração VI	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Fração VII	—	—	++	—	—	—	—	—	1	1

* Número de manchas

Tabela XIII

Efeito do Extrato Total na Captação de ^{131}I pela Tireóide

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	%de captação /100 g de rato	Tratamento Estatística *
				μCi	cpm			
Controle	9 ♂	101,0 ± 3,1 **	24	4,9	1.757.648	142.407 ±12.098	8,03 ± 0,68	a
Extrato Total	11 ♂	107,0 ± 3,7	24	4,9	1.757.648	153.728 ± 9.310	8,24 ± 0,60	a
Controle	10 ♀	117,0 ± 4,6	24	5,5	2.059.550	251.994 ±15.840	10,57 ± 0,67	a
Extrato Total	10 ♀	120,0 ± 3,5	24	5,5	2.059.550	243.448 ±12.620	9,97 ± 0,76	a
Controle	9 o	131,0 ± 1,5	24	7,8	3.220.614	409.916 ±26.864	9,66 ± 0,58	a
Extrato Total	9 ♂	133,0 ± 2,1	24	7,8	3.220.614	307.000 ±11.118	6,87 ± 0,30	b (P < 0,05)

* Já descrito nas tabelas anteriormente apresentadas.

** Erro Padrão

Continua...

Continuação Tabela XIII

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	%de captação /100 g de rato	Tratamento Estatística *
				µCi	cpm			
Controle	10 ♂	166,0 ± 3,0	24	8,2	3.420.800	192.750 ±12.701	3,40 ± 0,26	a
Extrato Total	10 ♂	165,0 ± 2,7	24	8,2	3.420.800	160.549 ±13.668	2,84 ± 0,22	a
Controle	10 ♂	120,0 ± 3,4	24	5,0	2.245.395	172.207 ±10.270	6,38 ± 0,35	a
Extrato Total	10 ♂	117,0 ± 3,5	24	5,0	2.245.395	126.677 ± 8.522	4,89 ± 0,44	b (P < 0,05)
Controle	8 ♂	158,0 ± 9,0	24	6,0	2.361.625	269.302 ±25.704	7,23 ± 0,63	a
Extrato Total	8 ♂	155,0 ± 7,4	24	6,0	2.361.625	195.762 ±11.109	5,47 ± 0,47	b (P < 0,05)
Controle	7 ♂	163,0 ± 8,1	24	7,0	3.340.050	632.107 ±58.504	11,93 ± 1,25	a
Extrato Total	8 ♂	161,0 ± 8,6	24	7,0	3.340.050	530.335 ±56.650	9,97 ± 1,45	a

* Já descrito nas Tabelas anteriormente apresentadas.

** Erro Padrão

mostraram-se ativos na depressão da captação de ^{131}I pela tireóide de ratos (Tabela XIV). Esses resultados confirmam a adequação da técnica que empregamos para avaliar a presença dessas substâncias e as indicariam em um controle de qualidade ou fiscalização futura.

Por outro lado ficou patente que, mesmo o processamento industrial, não é capaz de destruir a substância ativa sendo que, com base nos resultados já descritos, a mesma pode ser inclusive "liberada" ou "formada" pelas operações de tostagem, pasteurização, etc.

Acreditamos, também, que o processamento posterior a nível doméstico não conseguirá destruir totalmente essa substância, pois como vimos é capaz de resistir a autoclavagem a 1 atm. 121°C por 1 hora; tratamento a que a maioria dos produtos de soja dificilmente seriam submetidos.

Resta saber qual a conseqüência da ingestão crônica desses alimentos ou seja qual o significado nutricional.

7.5 – Ensaios Semicrônicas

Através dos ensaios agudos constatamos, na soja autoclavada, a presença de um fator capaz de inibir a captação de ^{131}I pela tireóide, desde 6 horas após a administração, mantendo-se a ação pelo menos 24 horas depois.

Com o intuito de obter dados sobre a ação, a longo prazo, estabelecer o mecanismo de ação do fator e inferir sobre o significado nutricional da sua ingestão realizamos dois ensaios semicrônicos, tanto com frações de soja crua como autoclavada.

O tratamento pelo calor foi necessário, não só para liberar a ação do fator, como para eliminar a interferência de outras substâncias antinutricionais.

Sabe-se pela literatura que a soja crua e seus produtos de fracionamento contém uma série de fatores antinutricionais como hemaglutininas⁽⁵⁶⁾, inibidores de crescimento^(39,40,56) antitripsinas^(23,24,39,40,56) bem como outros não ainda bem identificados^(40,56).

O primeiro ensaio semicrônico teve duração de 16 dias, partindo-se de ratos com peso inicial ao redor de 86 g; no segundo conseguimos preparar material para 29 dias de experimento e iniciamos com ratos mais jovens que tinham peso inicial de 59 g.

O primeiro ensaio foi realizado com 6 grupos experimentais, sendo que em três deles testamos produtos não autoclavados de soja (Tabela I) que foram: Farinha de Soja Desengordurada (FSD), Resíduo (R) ou Resíduo Autoclavado + Extrato Bruto (RA + EB). Os outros grupos foram os correspondentes autoclavados ou seja: Farinha de Soja Desengordurada Autoclavada (FSDA), Resíduo Autoclavado (RA) ou Resíduo Autoclavado + Extrato Bruto Autoclavado (RA + EBA).

Verifica-se facilmente pela Tabela XV, que nos grupos que recebiam rações contendo as frações não autoclavadas de soja, obteve-se crescimento menor e menor coeficiente de eficácia alimentar indicando a presença, em todos eles, de fatores inibidores de crescimento.

O coeficiente de eficácia alimentar, para as frações autoclavadas, foi o mesmo para todas, o que não aconteceu no caso das não autoclavadas.

Vê-se, ainda, pela Tabela que o grupo com FSD teve coeficiente de eficácia alimentar negativo ao passo que os grupos R e RA + EB foram positivos, apesar de serem inferiores aos dos grupos correspondentes que receberam tratamento térmico; esses resultados mostram a existência, mesmo nessas frações, de fatores antinutricionais que como fica demonstrado foram destruídos pelo tratamento térmico.

Tabela XIV

Efeito dos Extratos de Diferentes Produtos Comerciais de Soja

Grupos	Nº de ratos	Peso médio dos ratos (g)	Tempo de ação (hs)	Dose injetada		Dose captada (cmp)	%de captação /100 g de rato	Análise Estatística *
				μ Ci	cpm			
Controle	8?	145,0 \pm 3,6 **	24	6,0	1.415.950	223.409 \pm 26.880	10,90 \pm 1,34	a
Concentrado Protéico de Soja	7?	144,0 \pm 3,8	24	6,0	1.415.950	149.125 \pm 15.820	7,36 \pm 0,92	b
Farinha de Soja Tostada	8?	144,0 \pm 2,7	24	6,0	1.415.950	131.499 \pm 13.095	6,43 \pm 0,58	b
Leite de Soja	7?	145,0 \pm 3,8	24	6,0	1.415.950	155.291 \pm 13.133	7,47 \pm 0,55	b

* Usou-se Análise de Variância e como a hipótese de igualdade foi rejeitada ($P < 0,001$) empregamos a técnica de comparação com controle (técnica de DUNNET). Todos os grupos são significativamente diferentes ao controle ($P < 0,05$).

**Erro Padrão

Tabela XV

Efeitos dos Produtos de Fracionamento da Soja, Sobre o Crescimento e Sobre a Tireóide de Ratos. 1º ensaio Semicontra

Grupos	Nº de ratos	Peso inicial (g) ^a	Peso final (g) ^a	Peso ganho (g) ^a	Ração ingerida (g) ^a	CEA ^b	Dose injetada		Dose captada (cpm)	Peso tireóide (mg) ^{***}	Peso de tireóide /100 g de rato ^{***}	% de captação / 10 mg tireóide ^{***}	Trilute ^{***}
							µCi	cpm					
FSD	6 ♂	92,00 ±1,00	90,80 ± 4,42	(-)	158,80 ± 5,35	(-)	7,20	1.389.780	51.320 ± 5.478	10,88 ±0,54	12,04 ±0,47	3,43 ±0,38	39,90 ±6,30
			c		c	c				b	b	c	c
R	5 ♂	92,00 ±1,40	160,60 ± 5,20	68,40 ± 5,00	279,20 ±11,96	0,2500 ±0,0280	12,00	2.316.300	61.474 ± 5.008	14,27 ±0,56	8,91 ±0,36	1,87 0,17	55,10 ±3,65
			a	a	b	b				c	c	a	c
RA + EB	6 ♂	84,00 ±4,17	140,80 ± 5,67	57,20 ± 3,00	255,40 ±10,37	0,2200 ±0,0120	13,00	6.310.200	109.467 ± 3.733	17,12 ±0,79	17,27 ±0,35	1,02 ±0,05	17,70 ±3,96
			a	a	a	b				a	b	b	c
FSDA	6 ♂	85,00 ±3,83	156,00 ± 6,00	70,50 ± 3,17	248,80 ±12,13	0,2800 ±0,0067	12,80	6.054.200	220.680 ±26.032	17,17 ±0,99	10,99 ±0,41	2,16 ±0,30	85,10 ±3,84
			a	a	a	a				a	a	a	a
RA	6 ♂	83,00 ±5,67	162,70 ± 6,92	80,00 ± 2,58	249,20 ±10,87	0,3200 ±0,0120	12,80	6.054.200	209.120 ±23.748	17,61 ±1,57	10,77 ±0,69	1,94 ±0,08	71,40 ±2,92
			b	b	a	a				a	a	a	b
RA + EBA	6 ♂	82,00 ±3,50	171,80 ± 4,33	89,70 ± 2,00	282,60 ± 5,38	0,3200 ±0,0083	13,00	6.310.200	140.511 ±14.542	18,84 ±1,17	11,02 ±0,74	1,18 ±0,06	82,70 ±4,52
			b	b	b	a				a	a	b	a

^a Usou-se Análise de Covariância; nos casos em que se rejeitou a hipótese de igualdade empregamos a técnica de SCOTT e KNOTT. Letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05)

^b CEA = Coeficiente de Eficácia Alimentar

^{***} Usou-se Análise de Variância nos casos em que se rejeitou a hipótese de igualdade empregamos a técnica de SCOTT e KNOTT. Letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05)

Sobre a possível influência da substância em estudo no crescimento, pode-se dizer que como os grupos FSDA e RA + EBA contém o fator ativo sobre a tireóide e como o crescimento foi o mesmo em ambos, pelo menos em 16 dias, esse fator não consegue influir no crescimento.

Já na segunda experiência os resultados parecem indicar uma diminuição de crescimento nos grupos FSDA e RA + EBA em relação a RA (Tabela XVI).

Nesse caso a explicação pode estar no maior tempo de ação do fator (29 dias) e na maior sensibilidade do ensaio, já que usamos ratos mais jovens.

Parece, portanto, possível que o fator consiga em condições especiais, reduzir o crescimento e mais estudos deverão ser feitos para confirmar os resultados, com rações modelo de caseína, adicionadas do fator purificado e livre mesmo de traços de outros possíveis antinutrientes.

Essa diferença de efeitos, em função do prazo de ação foi observada, também, para os resultados referentes à % de captação/10mg de tireóide. Após 16 dias, o fator autoclavado ou EBA presente na ração é capaz de diminuir a captação — (Tabela XV); já após 29 dias o efeito é inverso havendo um aumento da mesma. Parece haver uma adaptação sobre a qual voltaremos a falar adiante (Tabela XVI).

Os resultados referentes à captação de ^{131}I /10 mg de tireóide permitem explicar, também, as divergências da literatura quanto à ação da soja sobre a tireóide; é evidente que fatores antinutricionais interferiram com os resultados de autores que testaram a soja crua^(4,12,19,20,27,44,50,53), tornando, assim, difícil uma avaliação segura sobre quais as substâncias responsáveis pelos efeitos observados.

O grupo com FSD, por exemplo, que cresceu menos, teve captação aumentada, comparada com o correspondente autoclavado que, pelos ensaios agudos sabemos que contém o fator capaz não de aumentar mas de deprimir essa ação.

Comparando-se o grupo RA + EB com R, observa-se que na presença de EB e portanto do fator, houve uma menor captação; como o crescimento dos animais desses grupos foi semelhante pode-se atribuir essa diferença à ação do fator em estudo que inclusive teria provocado um aumento no peso da tireóide/100g de rato de 8,91 para 12,27 g.

O resultado, porém, não era esperado, já que seria necessário a autoclavagem prévia do EB para a ativação do fator.

É possível que o fator presente no Extrato Bruto, pela ação crônica sofresse uma ativação semelhante à causada pelo aquecimento ou, mesmo, que haja interferência de outras substâncias^(38,39,40) tóxicas presentes nessa fração.

É relevante ainda, comentar o fato do Coeficiente de Eficácia Alimentar para os grupos RA + EB e R ser muito superior ao do FSD.

Como o grupo R teve um Coeficiente de Eficácia Alimentar de 0,25 e o FSD negativo, era de se esperar que o grupo que contém RA (cujo CEA isolado era de 0,32) adicionado de Extrato Bruto tivesse também CEA negativo, causado pelos fatores antinutricionais presentes no EB.

Tal não aconteceu e a explicação pode estar relacionada a problemas de digestibilidade; o grupo R tem menos fatores tóxicos mas baixa digestibilidade, já o grupo RA + EB tem mais fatores tóxicos mas maior digestibilidade, efeitos que se compensariam. O apoio para a explicação se encontra nos estudos de LIENER⁽²⁴⁾ sobre digestibilidade de soja crua e aquecida e nos estudos de SCHINGOETHE e col.⁽³⁹⁾, sobre inibidores tripticos e de crescimento encontrados na soja crua.

A situação dos hormônios séricos tireoidianos, no 1º ensaio semicrônico foi obtida pelo sistema Trilute.

Tabela XVI

Efeitos dos Produtos de Fracionamento da Soja, Sobre o Crescimento e Sobre a Tireóide de Ratos. 2º ensaio Semicrônico

Grupos	Nº de ratos	Peso inicial (g)*	Peso final (g)*	Peso ganho (g)*	Ração ingerida (g)*	CEA*	Dose injetada μ Ci	Dose c.p.24s**	Dose captada (c.p.24s.)	Peso tireóide (mg)***	Peso de tireóide /100 g de rato ***	% de captação / 10 mg tireóide***
FSDA	8 δ	59,00 $\pm 1,12$	167,10 $\pm 4,79$	107,70 $\pm 5,79$	296,50 $\pm 9,97$	0,3600 $\pm 0,0120$	16,72	7.840.334	427.068 ± 41.078	13,46 $\pm 0,93$	8,08 $\pm 0,53$	4,11 $\pm 0,37$
			a	a	a	a				a	a	a
RA	8 δ	59,00 $\pm 1,12$	183,90 $\pm 7,42$	124,60 $\pm 6,30$	318,00 $\pm 12,66$	0,3900 $\pm 0,0100$	17,85	8.599.076	452.402 ± 34.099	14,56 $\pm 1,29$	7,44 $\pm 0,39$	3,72 $\pm 0,44$
			b	b	a	b				a	a	a
RA + EBA	8 δ	59,00 $\pm 1,00$	163,80 $\pm 5,59$	104,70 $\pm 6,05$	287,00 $\pm 12,62$	0,3600 $\pm 0,0100$	15,94	7.682.263	441.624 ± 21.996	10,46 $\pm 0,48$	6,41 $\pm 0,29$	5,53 $\pm 0,21$
			a	a	a	a				b	b	b

* Usou-se Análise de Covariância; nos casos em que se rejeitou a hipótese de igualdade empregamos a técnica de SCOTT e KNOTT. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

** c.p.24s. = contagens por 24 segundos

*** Usou-se Análise de Variância nos casos em que se rejeitou a hipótese de igualdade empregamos a técnica de SCOTT e KNOTT. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Pela Tabela XV observamos que o índice Trilute no grupo de animais que receberam frações de soja não autoclavadas foi aproximadamente 41% inferior ao dos animais que receberam soja autoclavada, indicando que existe uma diminuição na quantidade de hormônios circulantes nesse grupo.

Verifica-se claramente pela Tabela XV, que o agente causador dessa diminuição não foi o fator em estudo, pelo menos nos grupos FSD e RA + EB, pois o grupo que recebeu RA e portanto isento do fator ativo, manifestou um índice inferior as das outras duas rações autoclavadas (FSDA e RA + EBA) que o contém. Concluímos que os fatores antinutricionais presentes na soja crua e em seus produtos de fracionamento causaram essa diminuição dos índices Trilute.

Resultados semelhantes foram, também, observados por KONIJN e col.⁽¹⁹⁾ que, porém, responsabilizaram o fator bociogênico como o agente causador da diminuição desse índice, a nosso ver erroneamente pelo que já expusemos.

No nosso caso o fator aumenta e não diminui os hormônios circulantes como se depreende pela Tabela XV ao comparar os grupos que receberam frações autoclavadas FSDA e RA + EBA com o controle RA.

No segundo ensaio (Tabela I) o experimento foi realizado em três grupos de animais com os quais testamos apenas rações preparadas com as frações autoclavadas (FSDA, RA + EBA, RA) para eliminar a ação dos fatores tóxicos que não aquele em estudo que, como vimos, dificultavam a interpretação dos resultados.

Pela Tabela XVI observamos que a medida da porcentagem de captação/10 mg de tireóide no grupo que recebeu em sua ração RA + EBA comportou-se de modo oposto ao esperado, observando-se um aumento nesse índice: Tanto no ensaio crônico anterior, com soja autoclavada, como nos ensaios agudos com ET autoclavado, a porcentagem de captação diminuiu em relação ao grupo controle.

O extrato bruto autoclavado (EBA) utilizado nesse experimento foi testado em animais (ensaio agudo), antes de ser incorporado à ração, e manifestou uma diminuição de 58% na porcentagem de captação/100g de rato em relação ao grupo controle (após 24 horas).

A diminuição inicialmente provocada pelo fator na porcentagem de captação e posteriormente seu aumento, quando ensaiado a longo prazo (29 dias), nos fazem pensar em um mecanismo de compensação glandular provocado pela baixa quantidade de iodo que inicialmente entra na glândula⁽⁶¹⁾ devido ao bloqueio da entrada do mesmo.

Para uma melhor interpretação desses fatos a nível glandular, realizamos as cromatografias do hidrolisado de tireóide e dosamos os hormônios séricos através de radioimunoensaio.

Os resultados obtidos pelos ensaios acima estão expostos na Tabela XVII e podem ser resumidos da seguinte forma, comparando-se os grupos RA (controle) com RA + EBA e com FSDA:

1) Para os hormônios tireoidianos (radioativos constatam-se as tendências:

- a) Aumento de T_3 como de T_4
- b) Aumento de MIT
- c) Diminuição de DIT
- d) Diminuição de I^-
- e) Aumento da relação MIT/DIT
- f) Diminuição da relação T_3/T_4
- g) O aumento de T_4 é maior do que o de T_3

2) Para os hormônios séricos observou-se a não mudança dos níveis de T_4 e T_3 , apesar de tendência à redução de T_3 que não foi, porém, significativa.

Tabela XVII

Efeitos dos Produtos de Fracionamento da Soja, na Síntese dos
Hormônios Tireoideanos: 2º ensaio Semicrônico

Dosamentos	FSDA	RA	RA + EBA
T ₄ sérico (μg/ml)	5,53 ± 0,25 a	5,90 ± 0,29 a	5,90 ± 0,40 a
T ₃ sérico (ng/100 ml)	0,98 ± 0,15 a	0,94 ± 0,10 a	0,74 ± 0,06 a
Distribuição percentual dos hormônios marcados (¹³¹ I) e seus precursores na tireóide			
Nal	12,94 ± 1,40 a	18,92 ± 1,18 b	12,75 ± 1,43 a
Monoiodotirosina (MIT)	18,53 ± 0,43 a	16,15 ± 0,85 b	18,61 ± 0,84 a
Diiodotirosina (DIT)	45,14 ± 1,11 a	48,48 ± 0,54 bc	46,60 ± 1,00 ac
Tiroxina (T ₄)	11,94 ± 2,12 a	4,81 ± 1,11 b	12,00 ± 1,58 a
Triiodotironina (T ₃)	2,29 ± 0,32 a	1,16 ± 0,14 b	2,01 ± 0,19 a
MIT/DIT	0,41 ± 0,01 a	0,33 ± 0,01 bc	0,40 ± 0,03 ac
T ₃ /T ₄	0,19 ± 0,01 a	0,23 ± 0,03 ab	0,17 ± 0,01 ac

* Usou-se Análise de Variância: Nos casos em que se rejeitou a hipótese de igualdade empregamos a técnica de FISHER. Letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05).

Sabemos que a administração do fator em ensaios agudos de 24 horas, provoca um abaixamento na captação de ^{131}I , no entanto, em ensaios semicrônicos (29 dias), é capaz de promover efeito inverso ou seja aumento na captação (Tabela XVI).

Comparando os nossos resultados, referentes à captação e a mudança dos hormônios tireoidianos verificamos que a ação do fator não corresponde à de nenhuma das outras substâncias descritas na literatura e que age na tireóide.

Assim, os percloratos e tiocianatos⁽⁵⁸⁾ provocam diminuição na captação e também redução na velocidade de síntese de todos os hormônios glandulares sem alterarem as relações MIT/DIT e T_3/T_4 .

Parece, também, que não age nas peroxidases tireoidianas inibindo a organificação do iodo, como é o caso das tionamidas em geral⁽⁵⁶⁾, aromáticos⁽⁵⁸⁾ e alguns flavonóides^(18,29). Os flavonóides, porém, poderiam ser responsabilizados em parte pela ação na glândula, através de outro mecanismo diferente do citado, pois além de estarem presentes, como já foi observado, na fração II (Sephadex G-25), sabe-se que podem diminuir a captação de ^{131}I ⁽⁴²⁾.

O nosso fator age, também, diferentemente daquele isolado por KONIJN e col.⁽²⁰⁾ que observaram uma diminuição na captação e também uma diminuição na organificação de ^{131}I ; devemos levar em consideração, porém, que esses autores testaram a ação do fator apenas "in vitro", além disso não era autoclavado, mas mesmo assim, agia após 24 horas.

Para o nosso caso, observamos inicialmente que o fator provoca uma menor incorporação de ^{131}I e após 29 dias dá-se justamente o inverso (aumento na porcentagem de captação). Isso nos leva a crer que, pela diminuição inicial da incorporação de iodo, a glândula, através de um mecanismo de compensação provocado pela deficiência de iodo organificado, aumenta sua capacidade em incorporá-lo⁽⁵¹⁾. A depleção inicial de iodo provocaria uma diminuição na síntese dos hormônios, e a partir do momento em que a disponibilidade de iodo aumentasse dar-se-ia um aumento na velocidade de síntese dos mesmos; esse fato é observado indiretamente pela diminuição na porcentagem de ^{131}I não organificado e no aumento das porcentagens de MIT, T_3 e T_4 radioativos.

A diminuição na porcentagem de DIT radioativo encontra explicação no seguinte fato: como esse precursor contém mais átomos de iodo em sua estrutura e como ele participa em maior quantidade na síntese dos hormônios tireoidianos, seria então o primeiro a ter sua concentração diminuída como consequência da diminuição da incorporação de iodo, e, posteriormente como consequência do aumento da velocidade na síntese de T_3 e T_4 .

Existe, também, a possibilidade desse fator agir na síntese de DIT a nível das peroxidases específicas, provocando uma diminuição do mesmo, mas pelos nossos resultados não observamos, como decorrência, um abaixamento na concentração de T_3 e T_4 na glândula bem como no soro.

A fim de obtermos conclusões mais concretas relacionadas com o mecanismo de ação do fator, será necessário analisar sua influência a nível glandular e sérico através de experiências efetuadas a longo prazo, com dados coletados em diferentes intervalos de tempo.

8 - CONCLUSÕES

- 1) Existe na soja autoclavada um fator capaz de diminuir, entre 8 e 24 horas após sua administração, a captação de iodo pela tireóide de ratos; esse fator não foi porém encontrado em soja crua.
- 2) Esse fator existe também em produtos comerciais como: Concentrado Protéico de Soja, Farinha de Soja Tostada e Leite de Soja e é resistente ao tratamento térmico a 121°C por 60 minutos.

- 3) Em ensaios semicrônicos com animais, ele pode provocar tanto aumento como diminuição da captação dependendo do tempo de ação. Nessas condições é capaz de aumentar a velocidade de síntese da Moniodotirosina, Triiodotironina e Tiroxina, de diminuir a da Diiodotironina e de causar queda no radioiodo não organificado na tireóide. Dependendo do tempo de ação é capaz inclusive de provocar um aumento dos hormônios séricos.

ABSTRACT

Soybean derivatives were tested in rat through acute experiments of 3 to 24 hours and two semichronic experiments of 16 and 29 days.

The acute assay were realized with Total Extract (TEs) obtained from Defated Soybean Flour (DSF) by precipitation in an aqueous medium (pH 4,2) and posteriorly in acetone (2 vol.). It was observed that the Total Autoclaved Extract (TAE) administered by gastric tube after 6 and 24 hours, decreased the percentage of iodine (^{131}I) uptake by 100 gr. of rat. The Total Extract, without previous autoclaving showed effect on the gland after 6 hours and lost its activity 24 hours after its administration.

TEs obtained from Comercial Soybean Products as: Proteic Concentrate, Toasted Flour and Milk also provoked a decrease in percentage of iodine (^{131}I) uptake after 24 hours by 100 gr. of rat.

The semichronic experiments were realized with soybean fraction products, which were incorporated to experimental diet. The first semichronic assay of 16 days, showed a reduction in percentage of iodide (^{131}I) uptake by 10 mg of thyroid and an increase of the triiodothyronine-binding capacity of rat serum. In the second semichronic of 29 days, we had an increase in the percentage of iodine (^{131}I) uptake by 10 mg of thyroid caused by the factor in study and no alteration of seric hormones. We also assayed the thyroid hormones and their precursors, in this assay and observed an increase of moniodotyrosine (MIT), triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) and a decrease of diiodotyrosine (DIT) and inorganic iodine. We also observed an increase in the MIT/DIT ratio and decrease in T_3/T_4 ratio.

In preliminary physicochemical tests, the fraction sephadex G-25 showed a positive reaction for ninhydrin, Molish and flavonoids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASTWOOD, E. B.; BISSELL, A.; HUGHES, A. M. Further studies on the chemical nature of compounds which inhibit the function of the thyroid gland. *Endocrinology*, Springfield, 37:456-481, 1945.
2. ASTWOOD, E. B.; GREER, M. A.; ETLINGER, M. G. L-5-vinyl-2-thio-oxazolidone and antithyroid compound from yellow turnip and from brassica seeds. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 181:121-130, 1949.
3. BECK, R. N. Soy flour and fecal thyroxine loss in rats. *Endocrinology*, Springfield, 62:587-592, 1958.
4. BLOCK, R. J. & MANDL, R. H. The curative action of iodine on soybean goiter and the changes in the distribution of iodoamino acids in the serum and in thyroid gland digests. *Arch. Biochem.*, New York, 93:15-24, 1961.

* De acordo com as normas preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com o World Medical Periodicals, 3ed. New York, 1961.

5. DAWSON, R. M. C.; ELLIOTT, D. C.; ELLIOTT, W. H.; JONES, K. M. *Data for biochemical research*. 2.ed. London, Oxford University Press, 1974. 654 p.
6. DAXENBICHLER, M. E.; VAN ETTEN, C. H.; SPENCER, G. F. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetable. Identification of organic nitriles from cabbage. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 25:121-124, 1977.
7. FEDERE, W. T. *Experimental design*. New York, MacMillan, 1955. 544 p.
8. FOX, M. R. S. & BRIGGS, G. M. Salt mixture for purified-type diet. III. An improved salt mixture for chicks. *J. Nutr.*, Philadelphia, 72:242-250, 1960.
9. GONTZEA, I.; FERRANDO, R.; SUTZESCO, P. *Substances antinutritives naturelles des aliments*. Paris, Vigot Frères, 1968. p.101-123.
10. GREER, M. A. Nutrition and goiter. *Physiol. Rev.*, Washington, 30:513-548, 1950.
11. GREER, M. A. II. *Thyroid hormones*. The natural occurrence of goitrogenic agents. *Recent Progr. Hormone Res.*, New York, 18:187-219, 1962.
12. HALVERSON, A. W.; ZEPPLIN, M.; HART, E. B. Relation of iodine to the goitrogenic properties of soybeans. *J. Nutr.*, Philadelphia, 38:115-129, 1949.
13. HOPKINS, C. Y. A sulfur-containing substance from the seed of *Coringia orientalis*. *Canad J. Res., Sect. B*, Ottawa, 16:341-344, 1938.
14. HORWITZ, W. *Official methods of analysis fo the Association of Official Analytical Chemists*. 11.ed. Washington, Association of Official Analytical Chemists, 1970. p.858.
15. HYDOVITZ, J. D. Occurence of goiter in an infant on soy diet. *New Engl. J. Med.*, Boston, 262:351-353. 1960.
16. IKEDA, E.; NICOLAU, W.; MURAMOTO, E.; MARQUES DE ASSIS, L.; PIERONI, R. R. Separação de compostos iodados biliares e fecais por filtração em Sephadex G-25 M. Estudo do metabolismo entero-hepático da 125-I-tiroxina. *Rev. Ass. méd. brasil.*, São Paulo, 19:131-136, 1973.
17. INTERNATIONAL DEVELOPMENT RESEARCH CENTER. Summary of the general discussion on chronic cassava toxicity, Ottawa, 1973, p.159-162.
18. JENEY, E. New date of pharmacology of flavonoids. *Acta physiol. Acad. Sci. hung.*, Budapest, 34:193-212, 1968.
19. KONIJN, A. M.; EDELSTEIN, S.; GUGGENHEIN, K. Separation of a thyroid-active fraction from unheated soya bean flour. *J. Sci. Food Agric.*, London, 23:549-555, 1972.
20. KONIJN, A. M.; GERSHON, B.; GUGGENHEIN, K. Further purification and mode of action of a goitrogenic material from soybean flour. *J. Nutr.*, Philadelphia, 103:378-383, 1973.
21. LAJOLO, F. M. *Estudo bromatológico de concentrados protéicos de Sardinella eurka e de Tilapia melanopleura obtidos por extração com isopropanol*. São Paulo, 1969. [Tese - Faculdade de Farmácia e Bioquímica].
22. LEONARDS, J. R. Correlation between results of a new T-3 test and the percentage of free thyroxine in serum. *Clin. Chem.*, New York, 16:922-924, 1970.

23. LIENER, I. E. Legume toxins in relation to protein digestibility – A review. *J Food Sci., Chicago*, 41:1076-1081, 1976.
24. LIENER, I. E. & KACADE, M. L. Protease inhibitors. In: LIENER, I. E. *Toxic constituents of plant foodstuffs*. New York, Academic Press, 1969. p.7-68.
25. LINAZASORO, J. M.; SANCHEZ-MARTIN, J. A.; JIMENEZ-DIAZ, C. Goitrogenic effect of walnut and its action on thyroxine excretion. *Endocrinology, Springfield*, 86:696-700, 1970.
26. MANTEL, N. Rapid estimation of standard errors of small samples. *Amer. Statist., Washington*, 5:26-27, 1951.
27. McCARRISON, R. The goitrogenic action of soya-bean and groundnut. *Indian. J. med. Res., Punjab*, 21:179-181, 1933.
28. McLAREN, G. A.; ASPLUNP, R. O.; CROW, D. G.; TSAI, L. I., PORTERFIELD, I. D. Influence of dried-grass silage and silage fractions on basal metabolic rate of rats. *J. Nutr., Philadelphia*, 83:318-224, 1964.
29. MOUDGAL, N. R.; RAGHUPATHY, E.; SARMA, P. S. Studies on goitrogenic agents in food. III. Goitrogenic action of some glycosides isolated from edible nuts. *J. Nutr., Philadelphia*, 66:291-303, 1958.
30. NORDSIEK, F. W. Effects of added casein on goitrogenic action of different dietary levels of soybeans. *Proc. Soc. exp. Biol., New York*, 110:417-420, 1962.
31. OGINSKY, E. L.; STEIN, Av E.; GREER, M. A. Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by conversion of progoitrin to goitrin. *Proc. Soc. exp. Biol., New York*, 119:360-364, 1965.
32. PAXMAN, P. J. & HILL, R. The goitrogenicity of kale and its relation to thiocyanate content. *J. Sci. Food Agric., London*, 25:329-337, 1974.
33. PINCHERA, A.; MacGILLIVRAY, M. H.; GRAWFORD, J. D.; FREEMAN, A. G. Thyroid refractoriness in an athyreotic cretin fed soybean formula. *New Engl. J. Med., Boston*, 273:83-87, 1965.
34. QUASIM, S. A. & STELZIG, D. A. Stimulation of basal metabolic rate of rats fed dried-grass silage and silage flavonoids. *J. Nutr., Philadelphia*, 103:1658-1664, 1973.
35. REILLY, W. A.; SCOTT, K. G.; WHITE, W. E. Increase uptake of iodine-131 by the thyroid gland after administration of hesperidine methyl chalcone. *Proc. Soc. exp. Biol., New York*, 81:682-683, 1952.
36. SAGHIR, A. R.; CDWAN, J. W.; SALJI, J. P. Goitrogenic activity of onion volatiles. *Nature, London*, 211:87, 1966.
37. SALVATORE, G.; GOVELLI, I.; ROCHE, J. La fixation des hormones thyroïdiennes par *Escherichia coli* e son mécanisme. *Gen. comp. Endocr., New York*, 315:25, 1963.
38. SAMBETH, W.; NESHEIM, M. C.; SERAFIN, J. A. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. *J. Nutr., Philadelphia*, 92:479-490, 1967.
39. SCHINGOETHE, D. J.; AUST, S. D.; THOMAS, J. W. Separation of mouse growth inhibitor in soybeans from trypsin inhibitors. *J. Nutr., Philadelphia*, 100:739-748, 1970.

40. SCHINGOETHE, D. J.; TIDEMANN, L. J.; UCKERT, J. R. Studies in mice on the isolation and characterization of growth inhibitors from soybeans. *J. Nutr.*, Philadelphia, 104:1304-1312, 1974.
41. SCOTT, A. J. & KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Tallahassee, 30:507-512, 1974.
42. SCOTT, K. G. & STREI, L. Effect of bioflavones upon metabolism of iodine and iodinated compounds in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 84:493-497, 1952.
43. SEIKEL, M. K. Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. In: GEISSMAN, T. A. *The chemistry of flavonoid compounds*. New York, MacMillan, 1962. p.35-69.
44. SHARPLESS, G. R.; PEARSONS, J.; PRATO, G. S. Production of goiter in rats with raw with treated soy bean flour. *J. Nutr.*, Philadelphia, 17:545-555, 1939.
45. SHEPARD, T. H.; PYNE, G. E.; KIRSCHVINK, J. F.; McLEAN, M. C. Soybean goiter: report of three cases. *New Engl. J. Med.*, Boston, 262:1099-1103, 1960.
46. SOCOLOW, E. L. & SUZUKI, M. Possible goitrogenic effects of selected Japanese foods. *J. Nutr.*, Philadelphia, 83:20-26, 1964.
47. SPIES, J. R. Calorimetric procedures for amino acids. *Meth. Enzimol.* New York, 3:468-471, 1957.
48. VAN ETEN, C. H. Goitrogens. In: LIENER, I. E. *Toxic constituents of plant foodstuffs*. New York, Academic Press, 1969. p.103-142.
49. VAN MIDDLESWORTH, L. Thyroxine excretion, a possible cause of goiter. *Endocrinology*, Springfield, 61:570-573, 1957.
50. VAN WYK, J. J.; ARNOLD, M. B.; WYNN, J.; PEPPER, F. The effects of a soybean product on thyroid function in humans. *Pediatrics*, Springfield, 24:752-760, 1959.
51. VANDERLAAN, W. P. & CAPLAN, R. Observation on a relationship between total thyroid iodine content and the iodide-concentrating mechanism of the thyroid gland of the rat. *Endocrinology*, Springfield, 54:437-477, 1954.
52. VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. *Técnicas e experimentos de bioquímica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973, p.136.
53. WILGUS, JR., H. S.; GASSNER, F. X.; PATTON, A. R.; GUSTAVSON, R. G. The goitrogenicity of soybeans. *J. Nutr.*, Philadelphia, 22:43-52, 1941.
54. WILLS JUNIOR, J. H. Goitrogen: in foods. In: TOXICANTS Occurring naturally in foods. Washington, National Academy of Science, 1966. p.3-17.
55. WOEBER, K. A. & INGBAR, S. H. Antithyroid effect of noncalorigenic congeners of salicylate, with observations on the influence of serum protein on the potency of antithyroid agents. *Endocrinology*, Springfield, 76:584-590, 1965.
56. WOLF, W. J. & COWAN, D. Soybean as a food source. *Crit. Rev. Food Technol.*, Cleveland, 22:81-158, 1971.
57. WOLFF, J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol. Rev.*, Washington, 44:45-90, 1964.

58. YAMADA, T.; KAJIHARA, A.; TAKEMURA, Y.; ONAYA, T. Antithyroid compounds. In: GREIGER, S. R. ed., *Handbook of physiology*. Washington, American Physiological Society, 1974. Sec.7, v.3, p.345-357.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telefônico – IEATOMICA
Telex – 011-23592 IENA BR