

NIS-mf- 1218

NILDA P. SOSA DE PEREIRA

**PROTEÍNA ISOLADA DA SOJA (*Glycine max*). INFLU-
ÊNCIA NO METABOLISMO DO ÁCIDO OLEICO VERIFI-
CADA COM O EMPREGO DE ¹²⁵I**

*Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de
Fisiologia Geral, para obtenção do título de
"Mestre em Ciências" sob a orientação do
Prof. Dr. Paulo Sawaya.*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Fisiologia Geral

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA

Divisão de Radiofarmácia

São Paulo

1973

NILDA P. SOSA DE PEREIRA

PROTEÍNA ISOLADA DA SOJA (*glycine max*). INFLUÊNCIA NO METABOLISMO
DO ÁCIDO OLÉICO VERIFICADA COM O EMPREGO DO ^{125}I

*Tese apresentada ao Instituto de
Bióciências da Universidade de São
Paulo, Departamento de Fisiologia
Geral, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências sob a orientação
do Professor Doutor PAULO SAWAYA*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Biociências
Departamento de Fisiologia Geral

Instituto de Energia Atômica
Divisão de Radiofarmácia

São Paulo - 1973

*A meus pais
que com tanta sabedoria me educaram*

*À memória inesquecível de minha
querida avô, quem incentivou-me em
todas as etapas de minha vida*

*A minhas tias
A meus irmãos
pelo apoio e amizade*

A TONY

pela compreensão e estímulo

Ao Professor Doutor PAULO SAWAYA, o meu profundo reconhecimento pelo elevado espirito universitário que demonstrou ao acolher a idéia da realização deste estudo.

Ao Professor Doutor JOSÉ CARLOS BARBÉRIO, os meus sinceros agradecimentos pelos valiosos conhecimentos transmitidos, e pelo irrestrito apoio fornecido.

Ao Professor Doutor SERGIO M. ZUCAS, que não apenas sugeriu sua realização, mas que também coordenou, participou de todas as suas fases: pelo precioso tempo dispendido com ensinamentos e incentivos diários, a mais profunda gratidão.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni, D.D. Superintendente do Instituto de Energia Atômica, pelos meios postos a minha disposição, que possibilitaram a realização deste Trabalho.
- Ao Centro Nacional de Energia Nuclear, pela bolsa concedida.
- Ao Prof. Dr. José Danilo Pecci, Presidente de la Comisión Nacional de Energia Atômica de Asunción, Paraguay, cujo auxílio permitiu minha apresentação e ingresso no I.E.A.
- Ao Dr. Oscar Perez, que foi o primeiro a despertar-me interesse no campo da Energia Atômica.
- Ao Engenheiro Cibár Cáceres Aguilera, Diretor do Centro de Processamento de Dados do I.E.A. por possibilitar a elaboração de programas de Computador.
- À Srta. Odette Guedes, pela execução dos programas de Computador.
- Ao Sr. Carlos Henrique Mesquita, pela ajuda e sugestões no tratamento estatístico dos dados.
- Às Sras. Terezine Arantes Ferraz, Diretora do Departamento de Documentação do I.E.A. e Idelma Pagliusi, Diretora de Informação da Biblioteca do I.E.A. pela revisão das referências bibliográficas.
- À Sra. Constância Pagano da Silva, Diretora da Divisão de Processamento do Material Radioativo, pela ajuda prestada.

Às Colegas Marycel F. de Barboza, Maria Aparecida de Almeida, Sa
gramor de Chaves e Melo Persano e Regina C. Brandileone, pela
inestimável colaboração recebida.

Aos Colegas Roberto Barsotti, Orlando Rebelo dos Santos e Pablo San
chez, pela ajuda recebida durante a redação deste Trabalho.

Aos Srs. João da Penha, Lazaro Albino e Paulo Ferrari, que deram
sua valiosa colaboração na parte técnica.

À Srta. Marilene Fernandes, que datilografou.

Às Pessoas que direta e indiretamente contribuíram na elaboração
deste Trabalho.

RESUMO

Alguns aspectos do metabolismo do ácido oléico foram de terminados pelo uso de ^{125}I , em ratos alimentados com dieta à base de proteína isolada da soja (*Glycine max*).

O ^{125}I incorporado ao ácido oléico e este misturado com outros nutrientes, foi administrado a dois lotes de ratos sendo que um lote recebeu a proteína isolada da soja como fonte proteica e o outro a caseína.

Foi verificada a influência desses dois grupos de proteína no metabolismo do ácido oléico marcado com ^{125}I .

Pelos resultados obtidos verificou-se que o uso de traçadores radioativos é eficaz em pesquisas de nutrição.

ABSTRACT

Some aspects of the metabolism of the oleic acid have been determined using ^{125}I , in laboratory rat fed with a soybean (*Glycīnae max*) - isolated protein - basis diet.

The ^{125}I incorporated in the oleic acid and added to other nutrients, was administered to two groups of rats, one of them with soybean isolated protein as proteic source and, the other with casein.

The influence of these two groups of protein in the metabolism of ^{125}I labelled oleic acid was studied.

According to the experiments it was verified that the use of radioactive tracer is effective in nutritional researches.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	6
3. PLANO DE TRABALHO	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4.1. <u>MATERIAIS</u>	9
4.1.1. <u>Animais</u>	9
4.1.2. <u>Gaiolas</u>	9
4.1.3. <u>Rações</u>	9
a) Composição	9
b) Preparo da ração	11
4.1.4. <u>Escolha do isótopo radioativo</u>	11
4.2. <u>MÉTODOS</u>	12
4.2.1. <u>Químicos</u>	12
a) Preparação de ácido oléico marcado com ^{125}I	12
b) Determinação da fração lipídica	13
c) Determinação da fração protéica	13
4.2.2. <u>Físicos</u>	13
a) Determinação da radioatividade na ração	13

	Página
b) Determinação da radioatividade nos <u>or</u> gãos e líquidos biológicos	14
4.2.3. <u>Biológicos</u>	14
a) Balanço do ^{125}I	14
b) Determinação da captação do ^{125}I pelo fígado	14
c) Determinação da captação de ^{125}I pela tireóide	14
d) Determinação da radioatividade retida pela carcaça	14
4.2.4. <u>Estatísticos</u>	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÕES	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas foram um dos primeiros alimentos cultivados pelo homem, e exercem papel de grande importância na alimentação em toda a América Latina; seu consumo no Brasil é o mais elevado do mundo, com uma ingestão diária da ordem de 68 g por pessoa⁽³⁾. Possuem alto teor de glicídios, proteínas, ferro, fósforo e niacina, sendo consideradas como fonte de proteína de importância. Em numerosos países é a principal fonte de proteína da alimentação, devido ao teor elevado desse nutriente. No entanto, como a qualidade das proteínas vegetais é geralmente inferior àquela dos animais não se pode substituí-las integralmente.

Tendo em vista o papel desempenhado pelos amino-ácidos essenciais no organismo, a qualidade da proteína é um fator mais importante que a quantidade^(3,20,21).

O valor biológico dos alimentos depende da composição em amino-ácidos essenciais, assim como da maneira como são liberados no processo da digestão. Ainda que as proteínas das leguminosas, isoladamente consideradas, tenham valor biológico inferior ao da maioria das demais classes de proteínas, podem as leguminosas ser consideradas como fontes delas, desde que a dieta assegure a presença de outros vegetais, contribuindo desta maneira para a ingestão de todos os amino-ácidos considerados essenciais^(7,40).

Por outro lado, substâncias nocivas de diversas classes, têm sido encontradas em algumas leguminosas sendo de destacar, inibidoras de tripsina, glucocídios cianogenados, saponinas, fitohemaglutinina, substâncias bociogênicas, etc.⁽³⁾.

Segundo Aykroyd⁽³⁾ a soja crua contém uma substância inibidora da tripsina, intervindo no processo da decomposição e digestão das proteínas parece que na soja esse inibidor ocorre em maior quantidade que em outras leguminosas. A substância inibidora atua retardando a liberação de metionina, de maneira que esta não pode ser utilizada eficazmente para a síntese de proteínas.

Estudos realizados na Universidade de Nebraska sobre a soja crua, demonstraram que o fator inibidor da tripsina era igual ao fator inibidor do crescimento⁽⁵⁾; no entretanto, outras investigações demonstraram que existem também outros fatores responsáveis por essa inibição⁽³²⁾.

O fator inibidor da tripsina, parece também ser responsável pela hipertrofia do pâncreas, que é observada em animais alimentados com soja, mas este mecanismo não foi ainda esclarecido^(23,39).

Trabalhos de Kratzer⁽²⁴⁾ indicam que a proteína isolada da soja interfere na utilização dos minerais. Wada e col.⁽⁴⁴⁾ julgam que a soja crua é realmente um alimento de baixo valor nutritivo.

A soja, uma das primeiras leguminosas estudadas apresenta cerca de 40% de proteínas, cujos amino-ácidos essenciais se distribuem da seguinte maneira⁽¹⁾.

<u>AMINO-ÁCIDOS ESSENCIAIS</u>	<u>PORCENTAGEM %</u>
Fenilalanina	2,57
Isoleucina	2,11
Leucina	2,97
Lisina	2,61

Metionina	0,81
Treonina	1,80
Triptofano	0,54
Valina	1,89
Arginina	3,19
Histidina	1,03
	total	19,52

Pela composição em amino-ácidos, verifica-se ser a soja relativamente deficiente em metionina. Essa carência afeta a integridade do organismo, principalmente a do fígado, constituindo-se, pois, esse amino-ácido um agente lipotrópico importante^(4,8).

Sabe-se, por outro lado, que dietas deficientes em metionina, induzem a uma esteatose hepática: a deficiência pode ser superada, acrescentando-se o amino-ácido à dieta. Em casos de marca da deficiência de metionina, pode se verificar que excessiva quantidade de gorduras são acumuladas no fígado, ocorrendo modificações degenerativas e fibrosas. O contrário também é verdadeiro, ou seja, alimentos ricos em proteínas e com bom teor de metionina, não levam a depósitos de gorduras no fígado mesmo que na dieta estas estejam presentes em taxas elevadas^(8,37,45).

Segundo vários autores^(19,42) a ação lipotrópica da metionina reside no fato de que a síntese de colina se faz com o auxílio dos radicais metila cedidos pela metionina.

Olson e col.⁽³⁶⁾ mostraram que animais alimentados com proteína da soja desprovida de colina e com baixo teor em metionina, desenvolvem fígados gordurosos, hipolipemia e hipocolesterolemia. Esses efeitos são mínimos quando se substitui a proteína de soja pela caseína o que se pode explicar pelo maior conteúdo de metionina nesta proteína.

Evidencia-se a importância da caseína, pelo fato de que o depósito de gordura no fígado está regulado pelo seu nível na dieta.

ta; assim é que, quando esse nível se eleva de 5% para 30%, o conteúdo lipídico cai de 12,49% para 6,12% (9).

Merece destaque o papel da metionina na prevenção de depósitos de gorduras no fígado, o que foi confirmado por Tucker e Eckstein (43) e Channon e col. (10) ao estudarem, individualmente, aminoácidos adicionados à dieta, concluindo ser a metionina a única capaz de tal prevenção, o que explicaria a acentuada ação da caseína.

Por sua vez, para o estudo de glicerídeos e ácidos graxos no organismo, muito contribuiu o uso de radioisótopos permitindo a preparação de trioleína e ácido oléico marcados com ^{131}I ou ^{82}Br (12).

Numerosas informações foram obtidas com o uso de gorduras marcadas, principalmente com relação a absorção das mesmas no intestino delgado.

Digestão, absorção e excreção de gorduras, puderam ser estudadas convenientemente através da utilização de gorduras marcadas, ficando evidenciado o importante papel do fígado no metabolismo e transporte desses compostos (18,28,34).

A esteatose hepática pode ser considerada como um sinal proeminente e característico, porém inespecífico de má nutrição (13). As causas de fígado gorduroso podem ser classificadas em dois grupos principais: a) as que conduzem a um aumento na síntese de triglicérides além de sua remoção; b) as que bloqueiam a utilização dos triglicérides do fígado, os quais são normalmente secretados no plasma após combinar-se com colesterol, ou proteínas formando lipoproteínas de baixa densidade (15).

O quadro histológico da esteatose hepática, pode ser considerado como um dos quadros mais dramáticos na morte pelo Kwashiorkor (33), sendo esta um das síndromes nutricionais muito frequente em áreas subdesenvolvidas (6,14,27).

Sabe-se que existe uma relação estreita entre o metabolis

mo dos lípidos e as proteínas, mas o mecanismo pelo qual se dá essa dependência, ainda não foi bem esclarecido⁽²²⁾.

Seria pois interessante, pensar-se numa metodologia de trabalho que incluísse, no estudo do metabolismo do ácido graxo, o próprio ácido oléico marcado com ^{125}I , relacionando seu maior ou menor aproveitamento através da presença de duas proteínas: a caseína, tendo em vista ser reconhecida como padrão protéico, e a proteína isolada da soja que, como se viu anteriormente, é deficiente em metionina, a qual induz a esteatose hepática.

2. PROPOSIÇÃO

Pelo exposto, o propósito deste trabalho será o de demonstrar o efeito da dieta à base de proteína isolada da soja no metabolismo dos lípidos, através do emprego de ácido oléico marcado com ^{125}I .

3. PLANO DE TRABALHO

Tendo em vista o propósito deste trabalho, estabeleceu-se o seguinte plano:

Dois lotes de 6 animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais durante 4 semanas. A alimentação obedeceu ao seguinte critério;

Lote A - Animais que receberam ração preparada com caseína como fonte protéica, adicionada de ácido oléico marcado com ^{125}I .

Lote B - Animais que receberam ração preparada com proteína isolada da soja como fonte protéica, adicionada também de ácido oléico marcado com ^{125}I .

Durante o período experimental foram coletadas fezes e urina, bem como se fez controle de consumo de ração e controle de peso.

Após o período experimental, os animais foram sacrificados e a radioatividade medida no fígado e na tireóide.

A radioatividade foi também determinada nas frações cor

respondentes à carcaça, fezes e urina.

Os resultados obtidos foram cotejados, de maneira que se pudesse avaliar entre as duas rações administradas, possíveis variações no metabolismo do ácido oléico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Animais

Utilizamos durante nosso trabalho, 12 ratos (*Rattus norvegicus var. Albinus*) machos, linhagem Wistar, pesando em média, cerca de 35 g.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: o primeiro (Grupo A) em cuja dieta, como fonte protéica, se utilizou caseína e o segundo (Grupo B), similar ao primeiro, cuja fonte protéica era, porém, a proteína isolada da soja.

4.1.2. Gaiolas

A gaiola metabólica utilizada em nosso experimento foi idealizada por Zucas e col.⁽⁴⁷⁾ a qual facilita um controle rigoroso da quantidade de ração ingerida, assim como das fezes eliminadas, apresentando um índice de confiança da ordem de 97%.

4.1.3. Rações

a) Composição

As rações utilizadas no presente trabalho, tiveram a seguinte composição:

*Proteína	10 %
Sacarose	10 %
Sabugo	4 %
Mistura salina	4 %
Mistura vitamínica	1 %
Ácido oléico+ácido oléico ¹²⁵ I ..	8 %
Amido q.s.p.	100 %

A mistura salina utilizada foi a de Foxe e Briggs⁽¹⁶⁾ que apresenta a seguinte composição:

Carbonato de cálcio	16,600 g
Fosfato tricálcico	47,300 g
Sulfato de cobre	0,017 g
Citrato férrico	0,333 g
Sulfato de magnésio	5,000 g
Cloreto de potássio	11,600 g
Iodeto de potássio	0,017 g
Cloreto de sódio	6,600 g
Fosfato de sódio dibásico	11,600 g
Carbonato de zinco	0,217 g
Sulfato de manganês	0,417 g

A mistura vitamínica empregada no preparo de nossas rações é composta de:

Tiamina	0,500 g
Riboflavina	0,500 g
Pantotenato de cálcio	2,000 g
Vitamina B ₁₂	0,030 g
Vitamina B ₆	0,500 g

* Foi utilizada como fonte protéica a caseína ou a proteína isolada da soja.

Bi tartarato de colina	200,000 g
Retinol	0,150 g
Cálcio ergosterol	0,00125 g
Vitamina E	5,000 g
Vitamina K	2,000 g
Ácido p-amino benzóico	10,000 g
Niacina	5,000 g
Biotina	0,030 g
Ácido fólico	0,200 g
Ácido ascórbico	0,100 g
Inositol	100,000 g
Sacarose q.s.p.	1.000,000 g

b) Preparo da ração

Com a mistura dos vários componentes das rações, preparamos um granulado de forma vermicular o qual foi dessecado em estufa regulada a 40°C. Segundo Lajolo e col.⁽²⁵⁾, a ração assim preparada tem a finalidade de apresentar melhor conservação e mais homogeneidade no decorrer da experiência, assegurando, também, menor desperdício do alimento pelos animais, fato este que diminui o erro no controle da quantidade de ração ingerida.

4.1.4. Escolha do isótopo radioativo

O ^{127}I , isótopo estável, aparece na natureza com 100% de abundância isotópica. Como tal, todos os seus isótopos conhecidos são radioativos. Os isótopos cujos números de massa são menores que 127, são todos emissores de pósitron ou decaem por gama, devido ao fenômeno de captura eletrônica; é o caso por exemplo do ^{125}I .

Aqueles cujas massas atômicas são maiores que 127, são todos emissores de beta menos e de radiação gama. Portanto, além da emissão radioativa há que considerar, igualmente, a energia das emissões e principalmente a meia vida.

Dos isótopos conhecidos, o ^{131}I , emissor de beta e ga

ma, apresenta meia vida igual a 8,05 dias; o ^{125}I , emissor de gama, apresenta energia menor que o ^{131}I , mas uma meia vida bem maior, ou seja 60 dias.

Para o nosso trabalho escolhemos o ^{125}I que, ao lado de uma energia menor, apresenta meia vida compatível com o trabalho proposto.

Com efeito, nosso trabalho visa acompanhar durante 4 semanas o metabolismo do ácido graxo no organismo animal, e além disso, pelo menos mais 4 semanas seriam necessárias para o desenvolvimento dos métodos de medida. Por esta razão, optou-se pelo isótopo de meia vida mais longa ou seja, o ^{125}I .

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Químicos

a) Preparação de ácido oléico marcado com ^{125}I

O ácido oléico marcado com ^{125}I preparado segundo a técnica utilizada na Divisão de Radiofarmácia do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, consiste no seguinte:

Coloca-se 1 ml de solução aquosa de cloreto de iodo (ClI)⁽³⁵⁾ em contato com uma solução aquosa de ^{125}I iodeto de sódio (Na^{125}I) livre de carregador (Union Carbide Corporation, U.S.A.) de atividade desejada, durante 5 minutos a fim de processar uma troca isotópica.

O Cl^{125}I é extraído com éter etílico e acrescentado a 3 ml de ácido oléico. Depois de agitar bem, junta-se sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para separar a camada aquosa e deixa-se em repouso durante 1 hora, tempo suficiente para se processar a marcação. Terminado esse tempo, transfere-se a camada etérea para um frasco de vidro com capacidade de mais ou menos 30 cm^3 , aquece-se

em uma chapa elétrica para evaporar o éter contido, ficando apenas o óleo marcado.

A atividade foi determinada por meio de calibrador para raios gama, "Mediac Dose Calibrator - Modelo 6362 - Nuclear Chicago" lendo-se na escala do ^{226}Ra e multiplicando-se a leitura pelo fator de correção 0,53.

Logo foi realizado o controle radioquímico por meio de cromatografia de camada delgada ascendente num suporte de Sílica-Gel G, tendo como solvente a mistura éter de petróleo, éter etílico (2:1) durante 30 minutos à temperatura de cerca de 21°C . O R_f dos lípidos é de 0,95 a 1,00, enquanto o I^- não se desloca, $R_f=0$ ⁽¹¹⁾. O teor de $^{125}\text{I}^-$ encontrado foi inferior a 5%*.

b) Determinação da fração lipídica

A fração lipídica foi determinada pelo processo de extração contínua em aparelho de Soxhlet⁽³⁸⁾ usando-se como solvente o éter etílico anidro.

c) Determinação da fração protéica

A determinação do teor percentual de proteínas das rações, foi executado pelo método de Kjeldahl modificado por Willfarth⁽⁴⁶⁾.

4.2.2. Físicos

a) Determinação da radioatividade na ração

A radioatividade na ração, foi determinada após homogeneização da mesma. Aliquotas de peso conhecido foram contadas como contagens por minuto (c.p.m.), por meio de detetor de cintilação do tipo cristal poço de iodeto de sódio ativado com tâlio (Automatic Gama Counting Systems Nuclear Chicago Corporation), e a radioatividade

* Admite-se o teor de I^- livre não superior a 5%.

de total é expressa em relação ao peso total da ração. Desta maneira, podíamos conhecer a radioatividade da mesma. A atividade específica do ácido oléico marcado foi em média, de 297 $\mu\text{Ci/g}$.

b) Determinação da radioatividade nos órgãos e líquidos biológicos

Inicialmente as amostras foram pesadas, e a radioatividade do ^{125}I foi determinada por meio do detetor de cintilação. Em todas as experiências foi mantida a mesma solução padrão de ácido oléico ^{125}I , a radioatividade desta relacionada com a dose administrada. O controle foi válido, desde que foi utilizada o mesmo aparelho de contagens e se mantiveram as mesmas características de operação com as amostras.

4.2.3. Biológicos

a) Balanço do ^{125}I

A partir dos dados obtidos através da absorção e eliminação urinária de ^{125}I pudemos determinar o balanço.

b) Determinação da captação do ^{125}I pelo fígado

Após o sacrifício dos animais, o fígado foi removido, lavado em solução fisiológica e a contagem realizada como descrita em 4.2.2.b.

c) Determinação da captação de ^{125}I pela tireóide

Após o sacrifício do animal e ablação da glândula tireóide procedemos à determinação da radioatividade como preconizada em 4.2.2.b.

d) Determinação da radioatividade retida pela carcaça

Na carcaça dos animais, procedemos a extração dos

lípidos, como descrito em 4.2.1.b. no material seco e desengordurado como também na fração etérea solúvel, procedemos à determinação da radioatividade como descrita em 4.2.2.b.

4.2.4. Estatísticos

A comparação dos resultados obtidos nos dois grupos estudados, foi realizada através de tratamento estatístico. Foram aplicados testes "T" de Student e Fisher para igualdade das médias. O nível crítico escolhido foi de 5%.

O erro padrão foi determinado pelo método de Mantel⁽³⁰⁾.

Os valores não expressos em percentagens foram considerados como tendo distribuição normal, e aqueles expressos em percentagens foram considerados como tendo distribuição anormal, por isso foram inicialmente transformados em arco seno da raiz quadrada da percentagem ($\text{arc. sen. } \sqrt{\%}$)⁽⁴¹⁾.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de compostos marcados com radioisótopos tais como ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{36}Cl , ^{40}Ca , ^{51}Cr , ^{56}Fe , ^3H etc, aumentou nas últimas décadas especialmente no campo da biologia e medicina. Devido a tais isótopos não apresentarem diferenças químicas aos isótopos estáveis podem ser utilizados como traçadores e assim incorporados em pequenas quantidades no organismo, pois sua presença e trajetória podem ser detetadas facilmente, resolvendo-se assim inúmeros problemas importantes.

Numerosos pesquisadores empregaram isótopos radioativos no campo da nutrição. Goransson⁽¹⁷⁾ utilizou ácido palmítico marcado com ^3H e ácido oléico marcado com ^{14}C para estudar o metabolismo destas gorduras em ratos. Corsini⁽¹²⁾ administrou por via oral o ácido oléico marcado com ^{82}Br e trioleína marcada com ^{131}I , a grupos de pacientes com a finalidade de estudar a digestão e absorção desses lípidos.

Neste trabalho utilizamos o ácido oléico marcado com ^{125}I e, através da medida da radioatividade dos órgãos e excreta dos animais utilizados, pudemos acompanhar o aproveitamento do ácido oléico, sob a influência de uma dieta de baixo valor biológico, devido à deficiência de metionina, amino-ácido este já referido pelos pesquisadores como fator lipotrópico por excelência⁽⁴⁾. Além deste

TABELA 1

PESO MÉDIO INICIAL, FINAL E PESO MÉDIO GANHO (g) DOS RATOS. INGESTÃO MÉDIA DA RAÇÃO (g).
RADIOATIVIDADE MÉDIA DA RAÇÃO CONSUMIDA (c.p.m.)*. COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR**.

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	PESO			INGESTÃO		COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR **
		INICIAL (g)	FINAL (g)	GANHO (g)	RAÇÃO (g)	RADIOATIVIDADE (c.p.m.) *	
CASEÍNA	6	36,4 ±1,5	92,5 ±7,1	55,9 ±5,8	280,9 ±20,0	6.776.032 ±2.601	0,2 ±0,008
SOJA	6	35,9 ±0,4	46,1 ±1,0	9,4 ±1,3	194,8 ±9,1	4.724.932 ±2.174	0,05 ±0,006

* Contagem por minuto

** O coeficiente de eficácia alimentar foi determinado pela fórmula:

$$CEA = \frac{\text{Peso Ganho}}{\text{Alimento Ingerido}}$$

fato, a metionina é um amino-ácido essencial, e sua deficiência promove também uma diminuição no crescimento dos animais. Este fato pode ser perfeitamente visualizado na Tabela 1, onde apresentamos o ganho de peso dos animais, assim como o consumo de ração.

Como se vê na Tabela 1, não houve diferenças significativas quanto ao peso inicial. O peso final e o peso ganho, o consumo de ração e radioatividade do grupo controle (A) foram significativamente superiores ao nível de 5% do grupo experimental (B).

O coeficiente de eficácia alimentar encontrado foi de $0,2 \pm 0,008$ e de $0,05 \pm 0,006$, respectivamente, para o grupo A e para o grupo B. Neste último grupo houve portanto, menor aproveitamento do alimento, fato esse, talvez devido aos fatores inibidores do crescimento, antitripticos, fitohemaglutininas, bociogênicas e deficiência de metionina encontrados na soja, como já foi citado na literatura (3,8).

Segundo Masek⁽³¹⁾ um dos quadros de má nutrição é a esteatorréia; assim é que no Kwashiorkor se observam modificações patológicas no trato intestinal e no pâncreas, conduzindo a uma má digestão, absorção pobre e esteatorréia.

Apresentamos na Tabela 2 os valores correspondentes à eliminação total de fezes e urina e os valores da radioatividade nelas encontradas.

Os resultados expressos na Tabela 2, mostram que há diferenças significativas ao nível de 5% entre as médias do total de fezes e urina eliminadas assim como da radioatividade das mesmas.

Relacionando percentualmente a eliminação de fezes e sua radioatividade com a quantidade de ração e radioatividade ingeridas, observamos que os resultados obtidos com o Grupo B, se bem que, ingerindo menor quantidade de ração, (vide Tabela 1) não mostraram diferenças com aqueles encontrados com o grupo A.

Quanto a quantidade de urina eliminada, vimos que foi bem

TABELA 2

TOTAL MÉDIO DE FEZES(g) E URINA(ml) ELIMINADOS. RADIOATIVIDADE TOTAL MÉDIA(c.p.m.) ELIMINADAS NAS FEZES E URINAS.
 PORCENTAGEM MÉDIA DE RADIOATIVIDADE INGERIDA ELIMINADA NAS FEZES E URINA (% e arc.sen.√%)

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	ELIMINAÇÃO TOTAL MÉDIA		RADIOATIVIDADE TOTAL MÉDIA		PORCENTAGEM MÉDIA DA RADIOATIVIDADE INGERIDA ELIMINADA			
		FEZES (g)	URINA (ml)	FEZES (c. p. m.)	URINA (c. p. m.)	FEZES		URINA	
						%	arc.sen.√%	%	arc.sen.√%
CASEÍNA	6	34,1 ±3,1	131,3 ±13,1	1.803.788 ±1.324	2.979.310 ±1.705	25,7 ±1,8	31,1 ±1,4	43,0 ±0,8	41,6 ±0,5
SOJA	6	21,8 ±0,8	30,0 ±2,0	1.142.641 ±1.068	2.427.069 ±1.590	24,2 ±1,5	29,4 ±1,0	53,0 ±0,8	47,0 ±0,8

superior para o grupo A. Ainda relacionando percentualmente a radioatividade ingerida com a radioatividade encontrada na urina verificamos que esta é maior para o grupo B. Segundo Olson e col. (36), nos casos de má nutrição observam-se distúrbios renais com hemorragia. Em nossa experiência, observamos que a urina dos animais do grupo B era hemorrágica.

No intuito de verificarmos se houve alguma alteração na eliminação de lípidos através das fezes, determinamos a quantidade de lípidos neste excreta.

Os resultados por nós obtidos acham-se na Tabela 3.

Pela análise dos resultados obtidos, quanto ao total de lípidos eliminadas nas fezes, verificamos que há diferenças significativas ao nível de 5% ($5,1 \pm 0,4$ para o grupo A e $3,8 \pm 0,1$ para o grupo B).

Tendo em vista que o consumo médio de lípidos para o grupo A foi de $28,1 \pm 2,0$ e de $19,5 \pm 0,9$ para o grupo B (dados obtidos por meio da radioatividade e por análise química), e relacionando percentualmente as quantidades de lípidos eliminadas com a ingerida, observamos que o grupo B eliminou maior quantidade de lípidos, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa; por essa razão, deixamos de considerar como ter havido uma possível esteatorrêia.

Por outro lado, a radioatividade mostra um comportamento semelhante e, o relacionamento percentual entre as quantidades ingeridas e eliminadas tem diferenças significativas ($9,7 \pm 0,3$ para o grupo A e $11,7 \pm 0,7$ para o grupo B). Este fato pode ser atribuído à eliminação de radioatividade não ligada ao ácido oléico, visto que, quando extraímos os lípidos das fezes com éter etílico parte da radioatividade ficava retida no material desengordurado.

Procuramos ainda em nossa experiência, verificar o comportamento do fígado, da tireóide e da carcaça, após a ingestão de pro

TABELA 3

QUANTIDADE MÉDIA DE LÍPIDES ELIMINADOS NAS FEZES (g, %, arc. sen. $\sqrt{\%}$).
MÉDIA DA RADIOATIVIDADE DOS LÍPIDES DAS FEZES (c.p.m.). MÉDIA DA RADIOATIVIDADE DOS LÍPIDES INGERIDOS(arc. sen $\sqrt{\%}$,%)

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	QUANTIDADE MÉDIA DE LÍPIDES NAS FEZES			MÉDIA DA RADIOATIVIDADE DOS LÍPIDES DAS FEZES (c.p.m.)	MÉDIA DA RADIOATIVIDADE DOS LÍPIDES INGERIDOS	
		(g)	%	arc. sen. $\sqrt{\%}$		%	arc. sen. $\sqrt{\%}$
CASEÍNA	6	5,1 ±0,4	15,1 ±1,3	23,1 ±0,8	682.986 ±826	9,7 ±0,3	18,1 ±0,5
SOJA	6	3,8 ±0,1	17,7 ±0,5	24,8 ±0,4	538.361 ±734	11,7 ±0,7	19,1 ±0,3

teínas oriundas do leite ou da soja. Os nossos resultados acham-se na Tabela 4.

Como se vê na Tabela 4, os pesos médios do fígado não apresentam diferenças ao nível de 5%.

Apesar do grupo B ter ganho menos peso podemos observar que o fígado teve, no final da experiência, um peso médio quase igual ao grupo A. Relacionando-se percentualmente o peso do fígado com o peso corporal, notamos que aquele do grupo B é bem superior ao do grupo A (9,7 g/100 g de peso corporal para o grupo B e 5,8 g/100 g de peso corporal para o grupo A).

A medida de radioatividade também foi superior no grupo B, deduzindo-se pois, que houve depósito de lípidos no fígado dos animais deste grupo. Esse fato pode ser devido a numerosos fatores, entre os quais a carência de metionina ou de colina, carência esta, suficiente para o desenvolvimento de fígados gordurosos. Existem outros fatores que apenas influenciam a quantidade de triglicérides depositados no fígado. Em casos de esteatose hepática podem ser encontradas situações em que: 1) a relação de síntese de triglicérides hepáticos é normal, porém há um maior bloqueio na sua utilização; 2) não existe diminuição na utilização de triglicérides hepáticos, porém sua síntese é aumentada; 3) há aumento na síntese de triglicérides com um bloqueio na sua utilização e provavelmente; 4) a síntese de triglicérides se realiza num compartimento de células que não são do retículo endoplasmico onde tais sínteses ocorrem normalmente (2,9,15,29,39).

Em relação à tireóide, vemos que o peso médio do órgão para os animais do grupo A ($0,14 \pm 0,01$) foi superior ao peso médio dos do grupo B ($0,10 \pm 0,03$). Entretanto, se compararmos tamanho da tireóide e peso corporal, verificamos que aquele é bem maior para o grupo B (0,21 g/100 g de peso corporal para o grupo B e 0,15g/100 g de peso corporal para o grupo A), fato que demonstra haver uma hiperplasia, característica de hipofunção tireoidiana. Esse fato pode ser melhor visualizado quando observamos a radioatividade fixa

TABELA 4

PESOS MÉDIOS(g) DO FÍGADO, DA TIREÓIDE E DA CARÇAÇA. RADIOATIVIDADES MÉDIAS(c.p.m.) DO FÍGADO, TIREÓIDE E CARÇAÇA. RADIOATIVIDADES MÉDIAS ABSORVIDAS NO FÍGADO, TIREÓIDE E CARÇAÇA (% e arc.sen√%).

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	FÍGADO				TIREÓIDE				CARÇAÇA			
		PESO MÉDIO (g)	MÉDIA DE RADIO ATIVIDADE (c.p.m.)	RADIOATIVIDADE MÉDIA ABSORVIDA		PESO MÉDIO (g)	MÉDIA DE RADIO ATIVIDADE (c.p.m.)	RADIOATIVIDADE MÉDIA ABSORVIDA		PESO MÉDIO (g)	MÉDIA DE RADIO ATIVIDADE (c.p.m.)	RADIOATIVIDADE MÉDIA ABSORVIDA	
				%	arc.sen√%			%	arc.sen√%			%	arc.sen√%
CASEÍNA	6	5,4 ±0,4	5.376 ±73,3	0,10 ±0,003	18,7 ±0,3	0,14 ±0,01	20.040 ±142	0,42 ±0,05	40,1 ±2,8	75,7 ±6,5	828.539 ±91.917	14,5 ±0,8	23,9 ±1,0
SOJA	6	4,5 ±0,1	13.546 ±116	0,38 ±0,03	38,2 ±2,1	0,10 ±0,03	5.010 ±71	0,08 ±0,006	16,5 ±3,2	37,4 ±0,8	229.059 ±17.792	6,3 ±0,6	14,5 ±0,8

da nesta glândula. Como podemos ver na Tabela 4, a radioatividade detetada na tireóide foi de 20.040 c.p.m. \pm 142 e 5.010 c.p.m. \pm 71, respectivamente, para o grupo A e B; mesmo quando relacionamos a radioatividade fixada na tireóide com a quantidade de radioatividade ingerida, notamos que essa diferença se mantém permitindo em primeira instância deduzir que se trata de um caso de bôcio.

Vários autores⁽³⁾ evidenciaram a presença de fatores biogênica na soja. Nos resultados por nós obtidos, pudemos também deduzir que a possível diminuição da quantidade de radioatividade fixada na tireóide acompanhada pelo seu aumento de tamanho é devida à presença desses fatores tóxicos, os quais agiram inibindo as oxidasas do epitélio tireoidiano, não permitindo a fixação do iôdo na molécula de tireoglobulina.

No estudo dos resultados obtidos na análise das carcaças dos dois grupos, rejeitamos as hipóteses de igualdade entre a média de seus pesos, bem como entre seus valores de radioatividade total e percentual absorvidos.

Conforme foi visto na discussão dos valores da Tabela 1, a média dos pesos ganhos pelos animais do grupo A foi superior à média dos pesos ganhos pelos animais do grupo B, e dessa forma observamos na Tabela 4, que a média dos pesos das carcaças dos animais do grupo A, é superior à média dos animais do grupo B, como era previsto, posto que os animais do grupo A tiveram alimentação normal o que não ocorreu com os de B; relacionando a radioatividade absorvida na carcaça com os pesos dos animais, verificou-se que a fixação em A foi maior que em B, o que indica uma maior quantidade de lípidos nos tecidos do grupo controle A.

Analisando todos os dados em conjunto, relacionando a quantidade de alimento e radioatividade ingeridas: com o peso ganho, com a quantidade de fezes, urina e radioatividade eliminadas pelos referidos excretas, e com a radioatividade fixada no fígado, tireóide e carcaça, podemos notar que os animais alimentados com proteína isolada da soja tiveram um menor coeficiente de eficácia alimentar,

crescimento deficiente, esteatose hepática, urina muito concentrada, menor fixação de lípidos na carcaça e menor fixação de ^{125}I na tire
óide que os animais alimentados com caseína.

Provavelmente, esses fatos são devidos ao teor mais baixo de metionina na soja que na caseína, e aos fatores tóxicos da cita
da leguminosa.

Graças ao emprego de traçador radioativo foi possível acompanhar com maior precisão o caminho seguido pelo ácido oléico e a influência que uma dieta à base de proteína isolada da soja po
de exercer sobre o metabolismo dessa gordura.

6. CONCLUSÕES

Pelo exposto, nas condições experimentais de trabalho, podemos concluir:

1. Que a proteína isolada da soja promove maior fixação de lípidos no fígado (determinado através do ^{125}I).
2. Que a alimentação à base de proteína isolada da soja promove um menor aproveitamento do alimento e um crescimento deficiente comparativamente à caseína.
3. Que a proteína isolada da soja promove menor captação de iodo pela tireóide.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AMARAL, A. - Soja e nutrição. São Paulo, Departamento da Produção Vegetal, 1958. p.17.
2. AOYAMA, Y. et alii. - Effect of dietary protein and amino acid in a choline accumulation in rat liver. J.Nutr., Baltimore, 101 (6): 739-45, 1971.
3. AYKROYD, W.R. & DOUGHTY, J. - Las leguminosas em la alimentación humana. Roma, F.A.O., 1964, 152p.(Publicaciones de la F.A.O. sobre nutrición, 19).
4. BEST, C.H. & RIDOUT, J. - The lipotropic action of methionine. J. Physiol.Lond., Boston, 97: 489, 1940.
5. BOCHERS, R. - Raw soybean growth inhibitor. Fedn.Proc.Fedn. Am.Socs.exp.Biol., Baltimore, 24 (2): 1.494-7, 1965.
6. BROCK, J.F. & AUTRET, M. - El Kwashiorkor en África. Roma, F.A.O., 1951. p1-2. (Publicaciones de la F.A.O. sobre nutrición, 8).

* De acordo com "Norma Brasileira de Referências Bibliográficas" , PNB 66 da A.B.N.T.
As abreviaturas dos títulos de periódicos foram feitas como "World List of Scientific Periodicals" 4. ed., London, 1964.

7. BURTON, B.T. - Nutrici3n humana. Washington, OPAS, 1966. p.51-2 (Publicaci3n cient3fica, 146).
8. CANTARON, A. & SCHEPARTZ, B. - Biochemistry. Philadelphia, Saunders, 1967. p.630-4.
9. CHANNON, H.J. & WIKILSON, H. - Protein and the dietary pro-
duction of fatty livers. Biochem. J., Liverpool, 29: 350,
1935.
10. CHANNON, H.J. et alii. - The action of amino acids and pro-
teins on liver fat deposition. Biochem. J., Liverpool,
37: 483, 1943.
11. CORREIA, R. et alii. - Manual de controles radiofarmac3uticos.
Buenos Aires, Comici3n Nacional de Energia At3mica, 1970.
p.106.
12. CORSINI, G. - Examination of the digestion and absorption of
lipids by administration of fats labeled with ¹³¹I and
⁸²Br. Archo.Stud.Fisiopatol.Clin.Ricam., 25 (4-5): 394-
406, apud Chem.Abstr., Easton,Pa, 60: 13.706 g, 1964.
13. CRAVIOTO, J. et alii. - Fat metabolism in chronic severe
malnutrition. Lipo-protein in children with Kwashiorkor.
Metabolism., New York, 8 : 722-30, 1959.
14. ENWONWU, C.O. & SREEBY, L.M. - Experimental protein caloric
malnutrition in rats. Exptl.Molec.Path., New York, 12
(8): 332-53, 1970.
15. FLORES, H. et alii. - Triglyceride transport in protein - de-
pleted in rats. J.Nutr., Baltimore, 100 (3): 735-9, 1970.
16. FOX, M.R.S. & BRIGGS, G.M. - Salt mixtures for purified-type
diets III An improved salt mixture for chicks. J.Nutr.,
Baltimore, 72 (2): 242-50, 1960.

17. GORANSSON, G. & OLIVECROMA, T. - The metabolism of fatty acids in the rat. II. Oleic acid. Acta physiol.scand. , Stockholm, 63 : 121-7, 1965.
18. HAMILTON, R. et alii. - Lipid transport in liver. I. Electron microscopic identification of very low density lipoproteins in perfused rat liver. Lab. Invest., New York, 16: 305, 1967.
19. HARROW, B. & MAZIER, A. - Bioquímica básica. 9 ed. México. Interamericana, 1967. p.259-61.
20. INSTITUTO DE CENTRO AMÉRICA Y PANAMÁ - Valor nutritivo de los granos y raíces. Guatemala, 1966. s.p.
21. INSTITUTO DE CENTRO AMÉRICA Y PANAMÁ - Discusión de los grupos básicos de la alimentación. Guatemala, 1955. s.p.
22. IVANOV, N.-(Relation between protein and lipid metabolism)Zhi votnovud Nauki., Budapest, 6 (4): 105-13, 1969.
23. KONIJN, A.M. et alii. - Pancreatic enzyme pattern in rats as affected by dietary soybean flour. J.Nutr., Baltimore, 100 (3): 361, 1970.
24. KRATZER, F.H. - Soybean protein - mineral interrelationships. Fedn.Proc.Fedn.Am.Socs.exp.Biol., Baltimore, 24 (2):1498-500, 1965.
25. LAJOLO, F.M. et alii. - Influencia da cor no consumo de rações por ratos. Revta.Fac.Farm.Bioquím., São Paulo, 7:95-103, 1969.
26. LEVEILLE, G.A. et alii. - The influence of dietary on plasma lipids in human subjects. J.Clin.Invest., Baltimore, 41 : 1007-12, 1962.
27. LEWIS, B. et alii. - Plasma free fatty acids in Kwashiorkor

and the pathogenesis of the fatty liver. Am.J.clin.Nutr., New York, 15: 161, 1964.

28. LOMBARDI, B.- Pathogenesis of fatty liver. Fed.Proc.Fedn.Socs. exp.Biol., Baltimore, 24 (2): 1.200-5, 1965.
29. LOMBARDI, B. - Fatty liver. Lab.Invest., New York, 15:1-20, 1966.
30. MANTEL, N. - Rapid stimation of standard errors of small samples. Am.Statistn., Washington, 5: 26-7, 1951.
31. MASEK, J. - Childhood diarrhea in rural Guatemala. Nutr. Rev., New York, 28 (3):61-3, 1970.
32. MAYER, J. - Pancreatic enlargement by tripsin inhibitor and low molecular weight compounds. Nutr.Rev., New York, 27 (9): 266-9, 1969.
33. MAYER, J. - Fatty liver in Kwashiorkor. Nutr.Rev., New York, 27 (9): 261-3, 1969.
34. MAYES, P.A. - The role of the liver in fatty acid transport. Biochm.J., Liverpool, 111 (4): 47p-9p, 1969.
35. MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R. - Manual de soluções, reagentes & solventes. 2. ed. São Paulo, Edgard Blucher, 1972, p.150.
36. OLSON, R.E. et alii. - The effect of dietary protein, fat and choline, upon the serum lipids and lipoproteins of the rat. Am.J.clin.Nutr., New York, 6: 111-8, 1968.
37. PASSMORE, D. - Human nutrition and dietetics. 3.ed. Edinburgh, Livengstone, 1966, p.69.
38. PERLMAN, P. - General laboratory techniques. New Jersey.Franklin Publications, 1964. p.134.

39. RACKIS, J.J. - Physiological properties of soybean trypsin inhibitors and their relationships to pancreatic hypertrophy and growth inhibition of rats. Fedn.Proc.Fedn.Am. Socs.exp.Biol., Baltimore, 24 (2): 1.488-93, 1965.
40. SCRIMSHAW, N.S. & BEHAR, M. - Chemical form of specific nutrients. In BEATON, G. & Mc.HENRY, E.W. Nutrition. New York, Academic Press, 1964. p.387-8.
41. SNEDECOR, G.W. - Statistical methods. Ames.Iowa, State College Press, 1956. p.316.
42. TREADWELL, C.R. et alii. - The relationship of methionine to fatty liver productions and growth. J.biol.Chem., Baltimore, 156: 237, 1944.
43. TUCKER, H.F. & ECKSTEIN, H.C. - The effect of supplementary methionine and cystine on the production of fatty liver by diet. J.biol.Chem., Baltimore, 121: 479, 1937.
44. WADA, SH. et alii. - Chemical composition and end groups of the soybean hemagglutinin. J.biol.Chem., Baltimore, 233: 395, 1958.
45. WHYTE, A. et alii. - Princípios de bioquímica. 2. ed.Madrid, Ediciones del Castillo, 1964, pl.020-3.
46. WILLFARTH. - Chem.Ztg., Berlin, 9: 562, 1885. Apud: WINTON, A.L. & WINTON, K.B. Análisis de alimentos. Buenos Aires, Hispano Americana, 1957. p.49.
47. ZUCAS, S.M. et alii. - Gaiola metabólica para ratos, testados por meio de zinco radioativo (⁶⁵Zn) Revta Fac. Farm. Bioquím., São Paulo, 7 (2): 353-9, 1969.

ERRATA

PROTEÍNA ISOLADA DA SOJA (*glycine max*). INFLUÊNCIA NO METABOLISMO
DO ÁCIDO OLÉICO VERIFICADA COM O EMPREGO DE ^{125}I

<u>Página</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Leia-se</u>
Agradecimento	4	Centro	Comissão
Resumo	5	administrados	administrado
11	10	0,100 g	100,000 g
28	11	radiofarmacêutico	radiofarmacêutico
28	18	lipo-proteína	lipoproteína