

HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINO

FATORES ANTINUTRICIONAIS E BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS
EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós -
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**À minha filha, Livia, e ao Helder,
pelo carinho, pelo amor,
pela felicidade e pelos momentos difíceis compartilhados.
Aos meus pais, Luzia e Jésus,
pelo incentivo e pela plena dedicação.**

AGRADECIMENTO

A Deus, pela presença e pela força.

À minha filha, Livia, e ao meu esposo, Helder, pelo amor, pelo convívio, pela ajuda e pelo constante incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa, em particular ao seu Departamento de Tecnologia de Alimentos; e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do Curs, pelo apoio financeiro e, também, pela oportunidade de realização do Doutorado-Sanduiche.

À professora Neuza, pela orientação, pelo incentivo, pela amizade e pela confiança.

Aos professores Josefina Bressan Resende Monteiro, Maurílio Alves Moreira e José Carlos Gomes, pela participação e pelas sugestões, e ao professor José Benício Paes Chaves, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, Adão, Ricardo, Mimorina e Elaine, e do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Geralda, Maria Rita, Adão, Sr. Zé e Sr. Valente, pelo auxílio.

Aos colegas de Curso, pela agradável convivência.

Aos meus pais Jésus, e Luzia; aos meus irmãos, Hertta e Hertulino; e aos meus sobrinhos, Danieli, Bruna e Igor, pelo carinho, amor e agradável convívio.

Aos meus cunhados, Alessandra e Francisco e aos primos, Celmar e Rita de Cássia, pelo carinho, pela alegria e pelo apoio nos momentos difíceis em West Lafayette, IN, EUA.

À minha amiga Elizabethe, que compartilhou todos os momentos difíceis e de alegria da minha vida, pela grande ajuda nos experimentos realizados na "Purdue University, West Lafayette, IN, EUA".

I am very thankful to Dr. Connie M. Weaver and Dr. Berdin Martin, from Food and Nutrition Department, Purdue University, West Lafayette, IN, USA, for their support and valuable contributions to this work. To Annia, Carol Sphar and David Caik, for their patience, help, teaching and attendance.

A todos que involuntariamente omiti e que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINO, filha de Jésus Duarte e Luzia Stampini Duarte, nasceu em 4 de abril de 1972, em Paula Cândido, Minas Gerais.

Em março de 1990, iniciou o curso de graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 1994.

Em agosto de 1996, obteve o título de *Magister Scientiae* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em outubro de 1996, iniciou o programa de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos nesta mesma instituição.

De maio de 1999 a maio de 2000, realizou treinamento, em nível de Doutorado - Sanduíche, no Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, EUA.

Em agosto de 2000, foi contratada como professora assistente B, pela UNIBH (Centro Universitário de Belo Horizonte - MG), para lecionar no curso de Nutrição.

Em fevereiro de 2001, submeteu-se à defesa de tese.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1 - Determinação de minerais e de fatores antinutricionais em variedades de soja	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Caracterização e preparo das farinhas de soja.....	10
2.2. Determinação de alguns minerais e fatores antinutricionais..	11
2.2.1. Umidade.....	11
2.2.2. Cinzas.....	11
2.2.3. Minerais.....	11
2.2.4. Fibra alimentar.....	12
2.2.5. Fitato.....	12
2.2.6. Inibidor de tripsina.....	13

2.2.7. Oxalato.....	14
2.3. Análise estatística	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
Capítulo 2 - Avaliação da biodisponibilidade de cálcio de variedades de soja em ratos.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Modelo experimental.....	31
2.2. Análises.....	32
2.2.1. Análise das dietas experimentais.....	32
2.2.2. Fêmur.....	32
2.2.3. Análise estatística	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
Capítulo 3 - Avaliação da biodisponibilidade de zinco de variedades de soja em ratos.....	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1. Modelo experimental.....	48
2.2. Preparo das dietas-testes.....	51
2.3. Análises	51
2.3.1. Análise das dietas-testes e experimentais.....	52
2.3.2. Fêmur	52
2.3.3. Análise estatística	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE.....	68
Capítulo 4 - Avaliação da biodisponibilidade de ferro de variedades de soja em ratos.	71
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	75

2.1. Modelo experimental.....	75
2.2. Preparo das dietas-teste.....	77
2.3. Análise das dietas-teste e de adaptação.....	78
2.4. Determinação de hemoglobina e hematócrito.....	79
2.5. Análise estatística	79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
APÊNDICE.....	93
5. RESUMO E CONCLUSÕES	95

RESUMO

MARTINO, Hércia Stampini Duarte, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Fatores antinutricionais e biodisponibilidade de minerais em soja geneticamente modificada**. Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Josefina Bressan Resende Monteiro.

Foram avaliados os fatores antinutricionais e minerais e a biodisponibilidade de cálcio, de zinco e de ferro em uma nova variedade de soja (UFV-116), em comparação com uma variedade comercial (OCEPAR-19). A farinha integral de soja da nova variedade apresentou maior teor de Ca, K e Mg, ácido fítico e oxalato que a variedade comercial. Para avaliar a absorção fracional de cálcio pela tomada de ^{45}Ca no fêmur, dois grupos receberam uma porção de 3g de dieta que continha farinha de soja integral, de cada variedade, marcada com 10 μCi de ^{45}Ca (dose oral). Dois outros grupos (controles) receberam dieta semelhante, sem marcador radioativo, e após 1 hora receberam uma dose intraperitonal (IP) de 0,3 mL de solução salina 0,9%, contendo 10 μCi de ^{45}Ca . A absorção foi equivalente entre a nova variedade de soja e a variedade comercial, sendo a nova variedade uma fonte comparável de biodisponibilidade de cálcio. A diferença da razão oxalato:cálcio e do conteúdo de

oxalato e fitato ($p<0,05$) entre as variedades não reduziu a absorção de cálcio. Para avaliar a absorção de zinco pela retenção corporal total e do fêmur de ^{65}Zn , os animais receberam 3 g de dieta-teste, marcada extrinsecamente com $^{65}\text{ZnCl}_2$ ($0,25\mu\text{Ci}$). As duas variedades foram testadas nos níveis de 9 e 30 ppm de zinco, de farinha de soja desengordurada. Os dois grupos-controle receberam clara de ovo como fonte de proteína e de zinco, $\text{ZnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. O percentual de retenção de ^{65}Zn nos fêmures e no corpo inteiro dos animais (WBC) foi maior ($p<0,05$) em ratos que receberam dietas deficientes em zinco. As variedades de soja não apresentaram diferença ($p<0,05$) na retenção de ^{65}Zn nos fêmures, para os diferentes níveis de zinco. Entretanto, a retenção de ^{65}Zn no corpo inteiro dos animais para UFV-116 foi menor ($p<0,05$) que para OCEPAR-19. A retenção de ^{65}Zn no fêmur correlacionou-se com a retenção corporal total de ^{65}Zn ($p=0,00$), sendo o WBC um indicador mais sensível. Para avaliar a absorção de ferro pela retenção corporal total de ^{59}Fe , os animais receberam 3 g de dieta-teste, marcada extrinsecamente com $^{59}\text{FeCl}_3$ ($0,2\mu\text{Ci}$). As duas variedades foram testadas nos níveis de 12 e 25 ppm de ferro, de farinha de soja desengordurada. Os dois grupos-controle receberam caseína como fonte de proteína e como fonte de ferro, receberam sulfato ferroso. O percentual de retenção de ^{59}Fe no corpo inteiro dos animais foi menor ($p<0,05$) para UFV-116 do que para OCEPAR-19. A retenção de ^{59}Fe foi bastante similar, em cada nível testado, entre as duas variedades. Entretanto, a retenção de ^{59}Fe das dietas-controle foi menor que a das variedades testadas. Este efeito foi dependente da dose de ferro administrada. A biodisponibilidade de zinco e de ferro foi menor na nova variedade (UFV-116), possivelmente por causa de seu maior conteúdo em fatores antinutricionais, especialmente fitato. Seu mais alto teor em oxalato, entretanto, não implicou redução na biodisponibilidade de cálcio.

ABSTRACT

MARTINO, Hércia Stampini DUARTE, D.S. University Federal of Viçosa, February, 2001. **Antinutritient factors and bioavailability of minerals in genetically modified soybeans.** Advisor: Neuza Maria Brunoro Costa. Committee Members: Maurílio Alves Moreira and Josefina Bressan Resende Monteiro.

Antinutritient factors, minerals and calcium, zinc and iron bioavailability were investigated in soybean from a new Brazilian variety (UFV-116) compared to a common Brazilian variety (OCEPAR-19). Whole fat soy flour of the variety 1 (UFV-116) showed higher ($p < 0,05$) Ca, K, Mg, phytic acid and oxalate than the variety 2 (OCEPAR-19), which has higher iron content ($p < 0,05$). To evaluate the calcium absorption using the femur ^{45}Ca uptake, two groups (test) received whole fat soy flour labeled with 10 μCi of ^{45}Ca (oral dose) and 2 groups (control) received an intraperitoneal injection containing 10 μCi of ^{45}Ca in 0.3 ml of 0.9% saline 1 h after receiving an unlabeled 3-g of the basal diet. Fractional absorption was

equivalent in the two varieties, therefore the new variety is a comparable source of bioavailable calcium. The difference of the oxalate:calcium molar ratio and of the oxalate and phytate level ($p < 0,05$) between the two varieties, didn't decrease calcium absorption. To evaluate zinc absorption using ^{65}Zn whole body retention and femur ^{65}Zn uptake, animals were given 3g of $^{65}\text{ZnCl}_2$ labeled test diet (0,25 μCi). The two varieties were tested at the level of 9 and 30 ppm of zinc as defatted soy flour. Two other groups (control) received egg white as source of protein and $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ as zinc source. ^{65}Zn retention measured by femur ^{65}Zn uptake and whole body was higher ($p < 0,05$) in rats fed diets marginally deficient in zinc. The soybeans varieties didn't show difference ($p < 0,05$) in terms of femur ^{65}Zn retention, to different levels of tested zinc. However, the whole body retention was lower ($p < 0,05$) for UFV-116 than for OCEPAR-19. The femur ^{65}Zn uptake method was correlated with the whole body retention, however whole body retention is more sensitive. To evaluate iron absorption, using ^{59}Fe whole body retention, animals were given a 3g $^{59}\text{FeCl}_3$ labeled test diet (0.2 μCi). The two varieties were tested at 12 and 25 ppm iron as defatted soy flour. Two other groups (control) received casein as source of protein and iron sulfate at 12 and 25 ppm. Whole body ^{59}Fe retention was lower ($p < 0,05$) for UFV-116 than for OCEPAR-19. Iron retention was equivalent in the two varieties tested for each level of iron. However, ^{59}Fe retention for control diet was lower than for deffated soy flours tested and was dose dependent. This effect was dependent of the administered dose of iron. The zinc and iron bioavailability was lower for a new variety (UFV-116), possibly due to its higher content in antinutritient factors, especially phytate. Its higher oxalate content, however didn't imply in decrease calcium bioavailability.

INTRODUÇÃO

A soja é a mais importante oleaginosa no mundo, e o Brasil é o segundo maior produtor. As exportações brasileiras de soja em grãos, farelo de soja e óleo de soja bruto e refinado chegaram a aproximadamente 22 bilhões de toneladas no ano de 2000 (<http://www.agricultura.gov.br>). Seu alto teor de proteínas proporcionou múltiplas utilizações e a formação de um complexo industrial destinado ao seu processamento. Assim, levando em consideração a grande participação da soja e de seus derivados (farelo e óleo) na receita das exportações, parece óbvia a contribuição econômica desse setor produtivo (MORAIS e SILVA, 1996).

O potencial de utilização de produtos de soja, como os isolados protéicos, é muito grande e o uso desses ingredientes em formulações tem crescido rapidamente em todo o mundo. A capacidade de absorção de água de produtos protéicos de soja é uma propriedade relevante em aplicações industriais. Enquanto a solubilidade é importante para utilização em bebidas carbonatadas e sopas, a absorção de água é característica interessante para aplicações em produtos cárneos, bolos e pães (GOMES et al., 1987).

As propriedades funcionais dos derivados da soja são de grande importância no sistema de alimentos, entre as quais incluem: emulsificação (formação e estabilização), absorção de gordura (promoção e absorção), absorção

de água (absorção e retenção), textura (viscosidade, formação de gel e formação de tiras), formação de massa de pão e filmes, adesão, coesão, elasticidade, controle de cor (branqueamento e escurecimento) e aeração (MORAIS e SILVA, 1996).

A soja constitui a base de dietas humanas e animais em muitos países orientais, por causa de seu elevado valor nutricional e baixo custo. O uso de produtos de soja tem aumentado em outros países, por ser uma boa fonte de proteína vegetal, além de desempenhar papel importante na saúde (GARCÍA et al., 1997).

Esse grão fornece ao organismo energia, proteínas e outros elementos essenciais, como ferro, potássio, fósforo, lecitina e vitamina E (PAES, 1994). A indústria tem desenvolvido um grande número de produtos, destinados especialmente a crianças e idosos. Embora a soja seja uma fonte desejável de nutrientes para pessoas com desnutrição, diabetes, hipercolesterolemia, câncer, osteoporose e alergia à proteína do leite de algumas espécies animais, ela contém fatores antinutricionais, alguns dos quais podem causar efeitos indesejáveis (GARCÍA et al., 1997).

As formulações à base de soja são geralmente bem-aceitas e não têm sido associadas a problemas nutricionais em crianças, embora a biodisponibilidade de minerais seja menor do que nos produtos semelhantes à base de leite de vaca, em razão de seu elevado conteúdo em ácido fítico (DAVIDSON et al., 1994).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a *Food and Agriculture Organization* (FAO) relatam que 2 bilhões de pessoas, cerca de um terço da população mundial, sofrem de deficiência de micronutrientes, afetando todos os estratos populacionais, principalmente as crianças e a população de baixa renda. A carência desses nutrientes afeta a nutrição e a saúde, o desenvolvimento físico e o aprendizado (FERREIRA, 1995).

O estudo da biodisponibilidade de nutrientes é particularmente importante, pois visa a prevenção de carências nutricionais, principalmente para indivíduos com hábitos alimentares não convencionais ou consumindo dietas

desbalanceadas, assim como para idosos, que consomem menor quantidade de alimentos e com menos frequência, ou fazem uso simultâneo de medicamentos. É especialmente importante para grupos populacionais com necessidades nutricionais aumentadas, como gestantes, lactantes, crianças e adolescentes, alcoólicos e consumidores de drogas (MUELER, 1989).

Alterações na composição da soja vêm ocorrendo em virtude de seu melhoramento genético e processamento. Então, é importante tanto para indústria quanto para a população que se determine a sua composição em nutrientes, assim como a sua biodisponibilidade de minerais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores antinutricionais e minerais e a biodisponibilidade de ferro, cálcio e zinco de uma nova variedade de soja (UFV-116) desenvolvida pelo BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, em comparação com uma variedade comercial (OCEPAR-19), na forma de farinha integral de soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAVIDSON, L., GALAN, P., KASTENMAYER, P., CHEROUVRIER, F., JULLERAT, M.A, HERCBERG, S., HURRELL, R.F. Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. **Pediatric Research**, v. 36, p.816-822, 1994.
- FERREIRA, K.S. **A desnutrição mineral na dieta básica brasileira**. Viçosa, MG: UFV, 1995.185p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal De Viçosa, 1995.
- GARCÍA, M.C., TORRE, M., MARINA, M.L., LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, p.361-391,1997.
- GOMES, J.C., ARAÚJO, M.F., MOREIRA, M.A., COELHO, D.T. Caracterização funcional de isolados e de um concentrado protéico de soja produzido no Brasil: solubilidade e capacidade de absorção de água. **Revista Ceres**, v.34, p.238-249, 1987.
- MORAIS, A.A.C. SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Médica e Científica, MDSI., 1996. 259p.
- MUELER, H.R. Importance of nutrient availability in relation to trends of food production and consumption In: SOUTHGATE, D.A.T., JOHNSON, I.T., FENWICK, G.R. **Nutrient availability: Chemical and Biological Aspects**. Royal Society of chemistry, 1989. V. 72, p.13-25.
- PAES, M.C.D. **Princípios básicos de nutrição e uso da soja na alimentação humana**. EMBRAPA-CNPSo, Londrina, PR, 1994. 52p.

CAPÍTULO 1

Determinação de minerais e de fatores antinutricionais em variedades de soja

1. INTRODUÇÃO

Entre os cereais e as leguminosas, a soja possui o maior conteúdo de proteína (~ 40%) e o segundo maior teor de lipídios (~20%), além de vitaminas (E, K, tiamina, riboflavina e ácido fólico), fosfolipídios e minerais (potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloreto, sódio, silício, ferro, zinco, manganês, cobre e molibdênio). Possui ainda muitos outros componentes, como ácido fítico, inibidores de tripsina e oligossacarídeos, que são biologicamente ativos, e os isoflavonóides, que estão sendo reconhecidos pelo potencial de prevenir e combater o câncer, a hipercolesterolemia, a obesidade, o diabetes e a osteoporose (LIU, 1997).

Em geral, os cultivares de soja possuem aproximadamente 8% de casca, 90% de cotilédone, onde está o maior porcentual de proteína e lipídio, e 2% de hipocotilédone. A composição da soja e de suas partes estruturais depende de muitos fatores, incluindo variedades, estação de crescimento, localização geográfica e estresse ambiental (LIU, 1997).

Cerca de 80 a 90% das proteínas da soja são globulinas, que são proteínas de estoque com solubilidade mínima em torno de pH 4,5 a 4,8. As principais proteínas de estoque são glicina (11S), β e Y-conglicina (7S), que representam 40, 28 e 3%, respectivamente. Existem outras menos abundantes, como a alfa-conglicina (2S), que inclui vários inibidores de tripsina, citocromo C e numerosas enzimas, além da 9S e 15S (contém urease) (GARCÍA et al., 1997; LIU, 1997).

As mais importantes enzimas da soja são: monofosfatase, fosfodiesterase, calmodulina, alfa-glicosidase, lactatodesidrogenase, lipoxigenases e β -amilase. Dentre essas enzimas, a lipoxigenase catalisa a peroxidação das estruturas cis, cis-1,4-pentadieno dos ácidos graxos poliinsaturados, formando hidroperóxidos. Essa reação leva à produção de compostos voláteis, como aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos, causando sabor estranho e rancificação de alguns produtos (GARCÍA et al., 1997).

Todos os nove aminoácidos essenciais requeridos pelos humanos podem ser encontrados na composição aminoacídica da soja. A digestibilidade de 100 a 95% tem sido encontrada em estudos com isolado protéico de soja, em animais e humanos, quando comparado com dietas de caseína (GARCÍA et al., 1997). Entretanto, esta é considerada de qualidade nutricional inferior quando comparada à proteína animal, pois os aminoácidos sulfurados, metionina e cistina, estão presentes em quantidades limitadas (MORAIS e SILVA, 1996).

Os lipídios estão contidos em organelas denominadas corpos lipídicos, situados no retículo sarcoplasmático. Durante o processamento, eles são extraídos por solventes orgânicos e são classificados como óleo bruto. Seus principais componentes são os triacilgliceróis, além de outros, como os fosfolipídios, os materiais não-saponificáveis (tocoferol, fitosterol e hidrocarbonetos) e os ácidos graxos livres, que variam de 1 a 3% (LIU, 1997).

A soja possui, em base seca, cerca de 35% de carboidratos. Contém quantidades-traço de monossacarídeos (glicose e arabinose) e quantidades significantes de di e oligossacarídeos, com 2,5 a 8,5% de sacarose, 0,1 a 0,9% de rafinose e 1,4 a 4,1% de estaquiose, que são basicamente açúcares não-redutores. Entre esses carboidratos solúveis, a rafinose e a estaquiose recebem mais atenção, porque estão ligadas à produção de flatulência e ao desconforto abdominal. Dentre os carboidratos insolúveis podem ser citadas a celulose, a hemicelulose, a pectina e as quantidades-traço de amido, que são encontradas principalmente na parede das células (LIENER, 1994).

Entre os principais componentes minerais da soja, o potássio é encontrado em maior concentração, seguido pelo fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloreto e sódio, que variam na faixa de 0,2-2,1%. Em menor proporção estão o silício, ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, flúor, cromo, selênio, cobalto, cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio e iodo, que variam de 0,01-140 ppm (LIU, 1997).

As vitaminas hidrossolúveis na soja incluem tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e ácido fólico. A quantidade de ácido acórbico é insignificante

em grãos maduros, embora esteja presente em quantidades apreciáveis nas sementes imaturas e germinadas. Dentre as vitaminas lipossolúveis, o conteúdo da vitamina A é pequeno em grãos maduros. A vitamina E vai para o óleo durante o processo de extração e é perdida, em grande, parte durante o refinamento dos grãos (LIU, 1997).

A soja contém menores componentes considerados antinutricionais, que podem influenciar a sua qualidade nutricional, como ácido fítico, oxalatos, inibidores de protease, saponinas, hemaglutininas, entre outros.

O ácido fítico (hexafosfato monoinositol) é a principal forma de estoque de fósforo na soja, e seu conteúdo varia de 1 a 2,3%. É localizado no corpo das proteínas, e sua função fisiológica na semente das plantas é servir como fonte de fósforo para germinação. Porém, tem sido documentado que esse ácido tem habilidade de formar quelatos com metais di e trivalentes, como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , e Fe^{+3} , formando compostos pobremente solúveis, que não são prontamente absorvidos no intestino (GARCÍA et al., 1997; LIU, 1997).

Os inibidores de proteases, a maioria dos quais localizados no cotilédone, junto com as principais proteínas de estoque, inibem a capacidade da enzima tripsina quebrar ligações peptídicas entre os aminoácidos específicos, lisina e arginina. Existem dois tipos de inibidores de protease: kunitz, que ocorre em maior quantidade, e Browman-Birk. No entanto, a maioria destes é inativada durante o tratamento térmico (GARCÍA et al., 1997).

A soja contém dois principais isoflavonóides, genisteína e daidzeína, e, em menor teor, gliciteína. Na semente, estes estão presentes na forma de β -glicosídeos, e a porção dos glicosídeos também é substituída no C-6 hidroxil da glicose pelo grupo malonil, os quais constituem aproximadamente 2% da semente (ANDERSON e WOLF, 1995). O derivados acetil também têm sido reportados (WANG e MURPHY, 1994), mas estes podem ser produtos de degradação, como resultado da descarboxilação durante a extração e elaboração de extratos (ANDERSON e WOLF, 1995).

Os isoflavonóides ingeridos em modesta quantidade são biotransformados pela microflora intestinal e absorvidos pela circulação enterohepática. Equol, um dos produtos derivados da daidzeína, possui atividade estrogênica de aproximadamente 0,2% do estrodiol, que pode competir com receptores de estrógenos (SETCHELL, 1998). A ginesteína é indicada como agente anticarcinogênico, provavelmente por inibir a atividade da proteína tirosina kinase (KAUFMAN et al., 1997). Estes também têm sido indicados no tratamento da osteoporose, de doenças cardiovasculares, do diabetes e outros (LIU, 1997).

Para o emprego da soja na indústria de alimentos e na nutrição humana, há necessidade de submetê-la a procedimentos que visam inativar fatores antinutricionais, reduzir agentes causadores de flatulência e melhorar o seu sabor e odor. Alguns tratamentos básicos, como remoção da casca, moagem fina para liberação do material digerível e aquecimento úmido, contribuem para inativação da maioria dos fatores antinutricionais.

A alternativa genética para superar o problema de oxidação e instabilidade da soja é cultivar linhagens sem lipoxigenases (LOXs). Essas enzimas catalisam a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da soja, produzindo hidroperóxidos que levam à formação de vários tipos de compostos voláteis responsáveis pelo *beany flavor*, o que reduz a qualidade do produto (LIU, 1997). Assim, a remoção das LOXs 2 e 3 da variedade 1 (UFV-116) foi para melhorar a qualidade do *flavor* dos produtos de soja e aumentar sua vida de prateleira. DAVIDES et al. (1987) prepararam farinha e extrato solúvel de soja de variedades sem LOX 1, LOX 2, LOX 3, LOX1 + 3 e LOX 2 + 3. O painel sensorial para *flavor* e aroma evidenciou que ambos, *off-flavors* e oxidação de lipídios (ácido tiobarbitúrico), foram menores em amostras preparadas de linhagens sem LOX 2, quando comparadas com o controle e as linhagens em que faltavam outras LOXs.

O objetivo deste trabalho foi determinar o teor de minerais e de fatores antinutricionais de uma nova variedade de soja (UFV-116) desenvolvida pelo BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa), sem as lipoxigenases 2 e 3, em comparação com uma

variedade comercial (OCEPAR-19), que possui lipoxigenases 1, 2 e 3, obtidas na forma de farinha integral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Nutrição e Saúde, da UFV, e no Laboratório de Análises de Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue, IN, EUA.

2.1. Caracterização e preparação das farinhas de soja

A variedade de soja UFV-116 foi desenvolvida pelo BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa). É uma linhagem quase isogênica, sem as lipoxigenases (LOX) 2 e 3, obtida por retrocruzamento (Backcross) e seleção entre a variedade Cristalina (normal) e os acessos sem lipoxigenases 2 (PI 86023) e 3 (Ichigowase). Neste caso, como os genes que determinam a ausência de LOX 2 e 3 são recessivos, primeiramente foram obtidos materiais sem cada isoenzima separadamente, e depois esses genes foram piramidados em uma única linhagem (UFV-116). Esta nova variedade não é uma linhagem transgênica que possui LOX 1, e foi cultivada na região de São Gotardo - MG, no ano agrícola 1998/99. A OCEPAR-19 é uma variedade comercial que possui todas as três isoenzimas (LOX 1, 2 e 3), e foi cultivada na Região Sudeste do Brasil, no ano agrícola 1998/99.

Após a seleção e lavagem, em uma panela que recebia calor seco de uma chama de gás, os grãos foram submetidos a um tratamento térmico (80 °C/10 minutos), revolvidos constantemente, para evitar a queima. Os grãos foram quebrados em moinho após o resfriamento, de forma a resultar em pedaços grandes, promovendo, assim, a retirada das cascas secas. A separação das cascas secas dos pedaços de grãos foi feita mediante o uso de peneiras de abanar e

limpar grãos. Posteriormente, os pedaços de grãos foram moídos em moinho de martelo, com peneira de 20 mesh (abertura 0,84 mm). A farinha integral de soja obtida foi embalada em sacos plásticos, que foram estocados sob refrigeração (GOMES e COELHO, 1989).

2.2. Determinação de alguns minerais e fatores antinutricionais

2.2.1. Umidade

A umidade foi determinada em estufa, a 105 °C, conforme o procedimento descrito nas Normas Analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

2.2.2. Cinzas

As cinzas foram determinadas por meio da calcinação das amostras em mufla a 550 °C, segundo o método descrito pela AOAC (1984).

2.2.3. Minerais

As amostras de farinha integral de soja foram secas em estufa a vácuo (70 °C, por 12 horas) e colocadas em mufla (300 °C por 6 horas e 600 °C por três dias, para que todos os nutrientes fossem queimados e ficassem apenas os minerais nas cinzas. As cinzas foram dissolvidas em 1 mol/L HCl. Para Ca, Na, K e Mg, as cinzas foram diluídas com lantânio a 0,5% como LaCl₃ em 0,5 mol/L HCl. Para Zn e Fe, as cinzas foram dissolvidas em 2,5% HNO₃, diluídas com lantânio a 0,5%, como LaCl₃ em 2,5% HNO₃, e analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer (Norwalk, CT) 5100 PC.

2.2.4. Fibra alimentar

A determinação dos teores de fibra alimentar total (FAT) e fibra alimentar insolúvel (FAI) das amostras de farinha integral de soja foram feitas de acordo com o método enzimático gravimétrico (AOAC, 1992). As fibras solúveis (FAS) foram obtidas por diferença entre FAT e FAI.

2.2.5. Fitato

Os fitatos foram determinados segundo a metodologia descrita por LATTA e ESKIN (1980). Foi pesado 0,1 g de amostra, que foi colocada em frasco de cintilação, e então foram adicionados 5 mL de HCl a 2,4%. Os frascos foram colocados em banho-maria, à temperatura ambiente, com agitação constante por 12 horas. Logo após, as amostras foram filtradas em bomba a vácuo, utilizando papel-filtro Whatman # 1; o papel-filtro e o frasco foram lavados com 20 mL de água deionizada. O filtrado foi mantido em um erlemeyer, para posteriormente ser corrido, em uma coluna de carga.

No preparo da coluna, foi pesado 0,5 g de resina de ânion trocável (AG1-X8, 200-400 mesh) e adicionado 0,05 M de NaCl, para dissolver a resina. Foram adicionados de 2 a 5 mL de NaCl 0,05M na coluna de ânion trocável, com a torneira fechada, e em seguida foi adicionada a resina diluída na coluna, esperando aproximadamente 10 minutos para a resina assentar. Logo após, a torneira foi aberta para que o NaCl 0,05M fosse eluído, carregando os fósforos inorgânicos. A coluna foi lavada com 10 mL de NaCl 2M, para que esta fosse carregada.

A amostra salva no erlemeyer foi colocada na coluna, e o eluente foi descartado. Em seguida, lavou-se a coluna com 15 mL de água deionizada, descartando o eluente, e com 15 mL de NaCl 0,05M, descartando novamente o eluente. Finalmente, foram corridos 15 mL de NaCl 2M e coletado o eluente que

continha fitato, dentro de um béquer, que foi analisado pelo método colorimétrico.

O fitato de sódio foi utilizado como padrão, preparando uma solução na concentração de 1mg/mL de ácido fítico, com as seguintes concentrações: 100, 75, 50, 25 e 10 µg/mL, respectivamente.

Foi adicionado 1 mL do reagente de Wade em cada 3 mL da amostra ou do padrão. Este reagente continha 0,03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,3 g de ácido sulfosalicílico, tendo sido diluído para 100 mL com água deionizada. A absorvância da solução foi determinada em espectrofotômetro, a 500 nm. Utilizou-se água deionizada como branco.

2.2.6. Inibidores de tripsina

Determinou-se a atividade de tripsina por meio do método descrito por ERLANGER et al. (1992) e BARBOSA (1997). Para isto, foram pipetados em tubo de ensaio 100 µL de extrato ou 100µL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2, contendo CaCl_2 20 mM, e 50µL da solução de tripsina. Esta mistura foi agitada lentamente e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de incubação, 500 µL dessa solução foram retirados e transferidos para outro tubo de ensaio, com 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo CaCl_2 20 mM, e 500 µL da solução de incubação (D, L-BapNA; $1,2 \times 10^3$ M). A mistura foi agitada rapidamente e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL de ácido acético 60% (v/v). A absorvância da solução foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm e o branco do controle foi preparado ao adicionar ácido acético 60% (v/v) antes da adição do substrato D, L-BapNA. Cada amostra foi analisada em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada a partir das leituras de absorbâncias do controle e do teste, sendo expressa em 1 mg de proteína nos extratos. Os resultados foram convertidos em mg de tripsina pura inibida por grama de proteína, por meio da equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/g de proteína} = A \times B/C \times 1.000 \times P$$

em que

A= absorvância do controle enzimático (410 nm) – absorvância da amostra (410 nm);

B = diluição da amostra;

C = fator de tripsina, ou seja, a hidrólise de 1µg de tripsina sob o substrato D,L-BapNA resulta em uma absorvância de 0,019 a 410 nm, nas condições do ensaio; e

P = concentração de proteína em g/mL no extrato, determinado pelo método semimicro kjeldahl.

2.2.7. Oxalato

Os teores de oxalato foram determinados de acordo com a metodologia de IWOHA e KALU (1995), com algumas modificações. No processo de digestão foi utilizado 0,25 g de amostra e adicionados 1 mL de HCl 6M e 20 mL de água destilada. A amostra foi aquecida a 100 °C por 1 hora e, em seguida, foi resfriada à temperatura ambiente, tendo o volume sido completado para 25 mL com água destilada e o filtrado sido mantido para análises posteriores.

Para obter o precipitado de oxalato de cálcio, foram adicionadas duas gotas de vermelho de metila e gotas de NH₄OH concentrado ao filtrado, até obter pH na faixa de 4,4, a 4,6. Após o aquecimento a 90 °C por 2 minutos, o filtrado foi resfriado, e filtrou-se novamente. O segundo filtrado foi aquecido a 90 °C, tendo sido adicionados 4 mL de CaCl₂ a 5%. No dia seguinte, o filtrado foi centrifugado a 2.200 x g por 30 minutos, filtrou-se novamente e o precipitado no papel-filtro foi dissolvido com 6 mL (3 X 2 mL) de H₂SO₄ a 20%. Em seguida, o filtrado foi recolhido em tubo de centrífuga que continha o precipitado. O conteúdo foi transferido para o erlemeyer, e o tubo de centrífuga foi lavado com 4 mL de H₂SO₄ a 20% e transferido para o erlemeyer. As paredes do erlemeyer

foram lavadas com 5 mL de água destilada, obtendo-se um volume final de 15 mL.

No processo de titulação, a solução do erlemeyer foi aquecida a 70 °C e titulada com solução de KMnO_4 0,1 N previamente padronizada. O porcentual de ácido oxálico foi calculado pela seguinte equação:

$$\% \text{ ácido oxálico} = \frac{V \text{ KMnO}_4 \times N \text{ KMnO}_4 \times 0,04502}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100$$

Em que

V = volume de KMnO_4 gasto na titulação (ml);

N = normalidade da solução de KMnO_4 ; e

0,04502 = massa miliequivalente de $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

ESTEVES (2000) analisou os teores de proteínas e lipídios, o perfil de aminoácidos e o perfil de ácidos graxos e isoflavonóides das variedades de soja UFV-116 e OCEPAR-19. No presente trabalho, o teor de carboidratos foi calculado por meio da diferença porcentual do somatório de lipídios e proteínas, realizado por ESTEVES (2000), e também por meio da umidade, das cinzas e da fibra alimentar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 está a composição centesimal da farinha integral de soja de duas variedades. Os estudos mostram que esta farinha possui em torno de 42% de proteína, 21% de lipídio, 4,7% de cinzas e menos de 10% de umidade (PRINGLE, 1974, STEINKE, 1992; LUSAS e RIAZ, 1995), os valores estes similares aos encontrados neste trabalho.

A soja contém de 33 a 35% de carboidratos, principalmente polissacarídeos e fibra alimentar. Os carboidratos incluem amidos, hemicelulose, celulose, estaquiose, rafinose, arabinose, glicose e sacarose (LUSAS e RIAZ, 1995). A farinha integral de soja, segundo PRINGLE (1974), possui em torno de

25,6% de carboidratos, o que corrobora com o obtido neste estudo. A diferença no teor de carboidratos entre os grãos e a farinha de soja provavelmente ocorreu em virtude da retirada da casca para o preparo da farinha, visto que parte desses carboidratos são fibras que se encontram principalmente na casca.

Quadro 1 - Composição centesimal das amostras de farinha integral de soja de duas variedades (g/100g)*

Composição	Farinha Integral de Soja	
	UFV-116	OCEPAR-19
**Proteína	39,37	37,83
**Lipídio	20,83	22,57
Cinza	6,62	4,31
Umidade	8,09	8,13
FAT	2,11	2,10
FAI	0,83	0,55
FAS	1,28	1,55
Carboidrato	22,98	25,06

*= média e desvio-padrão e** estudos realizados por ESTEVES (2000).

Com relação às fibras, a variedade OCEPAR-19 apresentou teores de 0,55, 1,55 e 2,10 g/100 g, enquanto a variedade UFV116 apresentou 0,83, 1,28 e 2,11g/100 g de fibra alimentar insolúvel (FAI), fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar total (FAT), respectivamente. Pode-se observar que as variedades apresentaram maior teor de fibra solúvel do que insolúvel, o que provavelmente tenha ocorrido porque a casca da soja foi retirada para produção das farinhas de soja. Sabe-se que sete variedades de soja cultivadas no Estado de São Paulo possuem conteúdo de fibras entre de 6,13 e 7,06%, e que 87% das fibras encontram-se na casca (MORAIS E SILVA, 1996). Segundo PRINGLE (1974) e USDA (1998), a farinha integral de soja possui um teor total de fibra em torno de

2,2 a 2,3 %. A composição da soja e de seus produtos varia com o genótipo, os fatores climáticos, a variedade, o armazenamento, o processamento etc. (MORAIS e SILVA, 1996).

A soja e seus produtos contêm a maioria dos minerais requeridos por humanos, embora sua biodisponibilidade dependa de muitos fatores, como a presença de inibidores (fitato e fibra) e promotores (ácido ascórbico e proteína), o pH, a temperatura, o processamento do alimento etc. (STEINKE, 1992). RIBEIRO (1992) reportou que as variedades de soja BR-13 e Paraná apresentaram teor de 1,8 e 1,5 mg/g de cálcio, de 1,8 e 2,0 mg/g de magnésio, de 19,8 e 22,9 mg/g de potássio, de 0,123 e 0,086 mg de ferro e de 0,026 e 0,036 mg de zinco, respectivamente.

Segundo USDA (1998), em 100 g de farinha de soja integral encontram-se 206 mg de Ca, 6,37 mg de Fe, 429 mg de Mg, 2515 mg de K, 13 mg de Na, 3,92mg de Zn, 494 mg de P, 2920 mg de Cu, 2275 mg de Mn e 7,5 mg de Se. No Quadro 2 está a composição de alguns minerais das farinhas integrais de soja. Os níveis de Ca, K e Mg da variedade 1 (UFV-116) são maiores que os da variedade 2 (OCEPAR-19). Dos minerais analisados, o potássio apresentou a maior concentração para ambas as variedades, seguido pelo magnésio e cálcio. Menores concentrações foram observadas, em ambas as variedades, para zinco e ferro. Os resultados encontrados estão próximos aos reportados pela USDA (1998), com exceção do potássio e magnésio, que apresentaram resultados inferiores.

O maior teor de magnésio encontrado na linhagem Ufv-116 é uma vantagem, pois sabe-se que, embora o magnésio reduza a absorção aparente de cálcio por competirem entre si por sítios de absorção intestinal, ele promove a formação óssea, previne a reabsorção óssea em ratas ovariectomizadas e também aumenta a força dinâmica dos ossos, o que pode ser benéfico na prevenção da osteoporose (TOBA et al., 2000).

Quadro 2- Teor de minerais das amostras de farinha integral de soja de duas variedades (mg/g) *

Minerais (mg/g)	Farinha Integral de Soja	
	UFV-116	OCEPAR-19
Ca	2,084	1,703
Fe	0,044	0,045
Zn	0,042	0,043
K	18,867	17,385
Na	0,245	0,255
Mg	3,165	2,613

*= média $\pm$ desvio-padrão.

Os fitatos são os sais de cálcio, magnésio e potássio do ácido inositol hexafosfórico, comumente conhecido com ácido fítico (LIU, 1997). Este ácido (monoinositol hexafosfato) é a principal forma de estoque de fósforo da soja. O conteúdo de ácido fítico da soja geralmente varia de 1 a 2,3% (LIENER, 1994; ANDERSON e WOLF, 1995). Entretanto, este conteúdo depende não somente da variedade, mas também das condições de crescimento e da metodologia utilizada para sua determinação (LIU, 1997).

Neste estudo, as variedades de soja encontram-se dentro dos níveis citados anteriormente, porém a variedade 1 possui maior teor de ácido fítico que a variedade 2 (Quadro 3). Este ácido pode, potencialmente, influenciar a absorção de minerais, quelando-os e tornando sua superfície absorviva indisponível. Ao mesmo tempo, ele inibe a ação de algumas importantes proteínas (alfa-amilase, pepsina e tripsina) durante a digestão, em pH baixo, e também afeta o ponto isoelétrico, a solubilidade e a funcionalidade das proteínas de soja (LIU, 1997). Entretanto, existem outros componentes dos vegetais, como os ácidos orgânicos (ascórbico, succínico e málico), que podem aumentar a biodisponibilidade de metais (ANDERSON e WOLF, 1995; GARCÍA et al., 1997). Sendo assim, a

variedade UFV-116 pode apresentar maior interferência na biodisponibilidade de minerais, como o cálcio, o magnésio, o zinco e o ferro, e na utilização da proteína.

Os inibidores de proteases são substâncias que, quando adicionadas a misturas de uma protease (como tripsina ou quimiotripsina) e um substrato, ligam-se à enzima e produzem uma redução na taxa de clivagem do substrato (LIU, 1997). Estes componentes estão presentes na soja e são considerados, tradicionalmente, como fatores antinutricionais (GARCÍA et al., 1997). A maior parte destes inibidores é removida pela germinação ou pelo tratamento térmico durante o processamento (LIENER, 1994).

Quadro 3-Teor de ácido fítico e de oxalato e atividade de tripsina das amostras de farinha integral de soja de duas variedades

Fatores antinutricionais	Farinha Integral de Soja	
	UFV-116	OCEPAR-19
*Fitato (g/100g)	1,33	1,03
*Oxalato	0,381	0,198
mg tripsina inibida/g proteína	9,02	7,22

*= média $\pm$ desvio-padrão.

Kakade et al. (1972), citados por LIU (1997), após analisarem 108 variedades de soja, relataram que elas continham de 35 a 123 mg de inibidor de tripsina/g de proteína. Quando a soja foi processada em farinha integral, nenhum dos inibidores foi removido, mas eles se tornaram enriquecidos na farinha em níveis de 28 a 32 mg/g de farinha, o que corresponde a, aproximadamente, 58 mg de inibidor/g de proteína. Dipietro e Liener (1989), citados por LIU (1997), fizeram uma diferenciação entre o conteúdo dos inibidores Kunitz e Bowman-Birk em farinhas, os concentrados e uma variedade de produtos de soja. As farinhas de soja apresentaram teores de 1,1 a 19,6 mg/g de amostra e <0,2 a

4,9mg/g de amostra para os inibidores Kunitz e Bowman-Birk, respectivamente. As amostras de concentrados apresentaram uma faixa de <0,5 a 6,1 mg/g de Kunitz e < 0,2 a 1,0 de Bowman-Birk, enquanto o isolado protéico apresentou conteúdo que variava de < 0,5 a 3,6 mg/g e 0,3 a 2,0 mg/g para Kunitz e Bowman-Birk, respectivamente.

As variedades estudadas foram avaliadas quanto ao conteúdo de inibidores de tripsina, por meio da atividade de tripsina. A porcentagem de inibição da tripsina foi de 9,02 e 7,22 mg tripsina inibida/g proteína, para UFV116 e OCEPAR-19, respectivamente.

Em 19 variedades de soja estudadas, foram encontrados de 35 a 123 mg de inibidor de tripsina/g de proteína nos grãos, enquanto na farinha integral de soja tostada o teor encontrado foi de 8 a 9 mg de inibidor de tripsina/g de amostra ou, aproximadamente, 16mg/g de proteína. Esta redução dos inibidores de tripsina aconteceu porque eles, sendo proteínas, estão sujeitos à desnaturação e inativação pelo calor (ANDERSON e WOLF, 1995). Neste estudo, a farinha integral de duas variedades de soja apresentou níveis inferiores aos obtidos anteriormente (Quadro 3).

O oxalato é também considerado um potente inibidor da absorção de minerais, que se encontra em maior concentração na casca de leguminosas. Verificou-se aqui que a variedade UFV-116 apresentou níveis superiores em relação a OCEPAR-19. Estudos realizados por WEAVER et al. (1993) mostram que o feijão-branco, o feijão-vermelho e o feijão-carioquinha "pinto beans" apresentam níveis de 0,34, 0,22 e 0,44 % de oxalato, respectivamente. Esses valores estão próximos aos encontrados no presente estudo.

O interesse na soja está sendo colocado no seu alto conteúdo de proteína e baixo de lipídio. A indústria tem desenvolvido um grande número de produtos de soja para facilitar o seu consumo, especialmente entre crianças e pessoas idosas, embora seja desejável também para pessoas com diabetes, osteoporose, doenças cradiovasculares, câncer etc. A soja também contém fatores antinutricionais,

alguns dos quais podem causar efeitos indesejáveis. Entretanto, seus efeitos benéficos excedem os efeitos adversos (GARCÍA et al., 1997).

As diferenças na composição da farinha de soja integral entre as variedades UFV-116 e OCEPAR-19 podem ser atribuídas ao genótipo, aos fatores climáticos, à variedade, ao armazenamento, ao processamento etc. A variedade UFV-116 apresentou maiores teores de proteínas (ESTEVES, 2000) e cinzas e menor teor de lipídios (ESTEVES, 2000), que a OCEPAR-19. Pequenas alterações na composição de aminoácidos foram observadas, com um teor de aminoácidos essenciais de 23,79 % para UFV-116 e 21,77 % para OCEPAR-19 e um teor de ácidos graxos saturados de 15,19 e 15,24 % e de insaturados de 63,12 e 62,89 %, respectivamente. A razão linoléico (W_6):linolênico (W_3) foi de 7,1 para UFV-116 e de 6,83 para OCEPAR-19 (ESTEVES, 2000).

Quanto ao teor de minerais, a UFV-116 apresentou maior teor de cálcio, potássio e magnésio. Possui também maiores teores de ácido fítico e de tripsina/g de proteína. Entretanto, segundo estudos realizados por ESTEVES, (2000), a UFV-116 possui maior teor de agliconas (dadzeína e ginesteína), que são consideradas os novos nutrientes na soja, por aumentarem as funções biológicas e, ou, prevenir doenças.

Embora algumas vezes sejam observadas diferenças significativas na composição de nutrientes entre as variedades estudadas, não se pode dizer que estas serão suficientes para afetar significativamente, em termos biológicos, a utilização destes nutrientes pelo organismo. A maioria dos resultados encontrados foi semelhante aos dados de literatura, para ambas as variedades, e as diferenças podem ser devido ao genótipo, aos fatores climáticos, à variedade, ao armazenamento, ao processamento, ao melhoramento genético e às diferenças metodológicas de determinação.

Como citado, a soja é reconhecida como um produto alimentar nutricionalmente significativa, em virtude de sua composição em nutrientes. Considerando seu valor nutritivo e sua disponibilidade no País, é necessário fazer um esforço para que seu consumo seja aumentado, diante dos inúmeros efeitos

benéficos de seus componentes. Sendo assim, é necessário desenvolver novas variedades, visando melhorar o sabor e aumentar o consumo, sem reduzir suas características nutricionais, já que ela desempenha um papel importante na saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R.L., WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.581S-588S, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 14.ed. Washington D.C., 1984. 1141p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 15.ed. Washington, D.C., 1992. p.136-138 (Supplement, 3).

BARBOSA, M.C.A. **Determinação de inibidores de protease em soja e produtos derivados**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.

ESTEVES, E. A., **Variedades de soja e seus efeitos na regulação do metabolismo do colesterol em ratos**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 82p. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

ERLANGER, B.F., KOLOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives Biochemistry Biophysiological**, v.95, p.129-134, 1992.

GARCÍA, M.C., TORRE, M., MARINA, M.L., LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, p.361-391, 1997.

GOMES, J.C., COELHO, D.T. **Leite de soja na alimentação humana**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1989. 35p. (Boletim de extensão).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**. 3. ed. São Paulo, 1985. v 1, 533p.

IWOHA, C.I., KALU, F.A. Calcium oxalate and physico-chemical properties of cocoyam (*Colocasia esculenta* and *Xanthosoma sagittifolium*) tuber flours as affected by processing. **Food Chemistry**, v.54, p.61-66, 1995.

KAUFMAN, P.B., DUKE, J.A, BRIEMANN, H., BOIK, J., HOYT, J. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones,

- genistein and daidzein: Implications for human nutrition and health. **Journal Alternative Complementary Medicine**, v.3, p.7-12, 1997.
- LATTA, M., ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p.1313-1315, 1980.
- LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.31-67, 1994.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. New York: Chapman & Hall, ITP. 1997. 532p.
- LUSAS, E.W., RIAZ, M.N. Soy protein products: processing and use. **The Journal of Nutrition**, v.124, p.573S-580S, 1995.
- MORAIS, A.A.C., SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Médica e Científica, MDSI., 1996. 259p.
- PRINGLE, W. Full-fat soy flours. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.51, p.74A-76A, 1974.
- RIBEIRO, M.L.L. **Efeito do processo de germinação sobre os constituintes nutricionais e antinutricionais de dois cultivares de soja**. Londrina: UEL, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 1992.
- SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, 1333-1346, 1998.
- STEINKE, F.H. Nutritional value of soybean protein foods. In: WAGGLE, D.H. STEINKE, F.H, VOLGAREV, M.N. **New protein foods in human health: nutrition, prevention, and therapy**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992. p.59-66.
- TOBA, Y.B., KAJITA, Y., MASUYAMA, R., TAKADA, Y., SUZUKI, K., AOE, S. Dietary magnesium supplementation affects bone metabolism and dynamic strength of bone in ovariectomized rats. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.216-220, 2000.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Nutrient Database for Standard Reference. Food Group 16: Legumes and Legume products**. Release 12. [S.l.]:1998. [10/05/2000] (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>).

WEAVER, C.M., HEANEY, R.P., PROULX, W.R., HINDERS, S.M.,
PACKARD, P.T. Absorbability of calcium from common beans. **Journal of Food Science**, v.58, p.1401-1403, 1993.

WANG, H., MURPHY, P.A. Isoflavone content in comercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, v.42, p. 1666-1673, 1994.

CAPÍTULO 2

Avaliação da biodisponibilidade de cálcio de variedades de soja em ratos

1. INTRODUÇÃO

A quantidade de nutrientes na dieta não é necessariamente o melhor indicador de sua adequação. Isto se deve ao fato de nutrientes de diferentes fontes serem absorvidos com diferentes eficiências, e, uma vez absorvidos, a utilização pode ser influenciada por outros componentes na dieta ou no alimento, pelo estado nutricional ou pela forma química do nutriente. O balanço de cálcio do indivíduo é um fator significativo em estudos designados para comparar a biodisponibilidade relativa de diferentes fontes de cálcio não conhecida, podendo ser um dos fatores responsáveis pelo elevado número de dados conflitantes na literatura. Sendo assim, a biodisponibilidade deve ser vista como uma avaliação mais relativa do que absoluta e pode ser definida como a eficiência de utilização do nutriente no alimento ou na dieta em relação ao padrão apropriado, ou seja, é a quantidade do nutriente que é absorvida na forma em que é metabolicamente ativo (MILLER, 1989).

A rota metabólica de uma dieta, de um dia específico, ou de um alimento pode ser distinguida dos minerais de outras fontes, utilizando traçadores isotópicos (radioativos ou estáveis) como marcadores. Duas técnicas de marcação têm sido utilizadas. A marcação intrínseca consiste em fazer um alimento crescer, incorporando o marcador e fornecendo informações precisas da biodisponibilidade de alimentos isolados. Já na marcação extrínseca, uma quantidade-traço de um mineral é adicionada à dieta-teste, baseando no fato de que uma troca isotópica completa ocorra entre o marcador extrínseco e o mineral endógeno da dieta, de modo que a absorção e a utilização do isótopo adicionado extrinsecamente ocorram de forma idêntica à dos isótopos naturalmente presentes. Pode ser utilizada tanto para alimentos quanto para dietas (SANDSTROM et al., 1993).

NICKEL et al. (1996) mostraram que a absorção fracional de cálcio do leite e derivados foi similar, aproximadamente 30% em mulheres na pré-menopausa, e a absorção não foi afetada pela de técnica de marcação, extrínseca

ou intrínseca, pelo conteúdo de lactose, pela fermentação ou pela forma química do cálcio. Este estudo confirmou os resultados obtidos por BUCHOWSKI et al. (1989), ao compararem métodos que utilizam marcadores extrínsecos e intrínsecos para estimar a biodisponibilidade de cálcio no leite de cabra e derivados, em ratos, o que evidencia que a técnica que utiliza marcador extrínseco é válida para estes produtos. Mas estes resultados não podem ser generalizados para todos os alimentos. WEAVER et al. (1987), comparando a absorção de cálcio do espinafre e da couve marcados intrínseca e extrínsecamente, em ratos, verificaram que a absorção dos dois traçadores para couve foram similares, mas a absorção usando o marcador intrínseco para espinafre foi duas vezes maior do que quando foi usado o marcador extrínseco. WEAVER et al. (1992) observaram que a absorção fracional de ^{45}Ca marcado extrínseca e intrínsecamente foi similar para produtos de pão fermentado.

O cálcio pode ser obtido de alimentos que são naturalmente ricos em cálcio, de alimentos fortificados e bebidas, de suplementos ou da combinação dessas fontes. Tais fontes de cálcio devem ser avaliadas com base no seu conteúdo e na sua biodisponibilidade. A biodisponibilidade de cálcio dos alimentos pode ser afetada pelo seu conteúdo em oxalato e fitato. Em geral, sua absorção é inversamente proporcional ao conteúdo de ácido oxálico dos alimentos. Assim, a biodisponibilidade de cálcio é reduzida para as variedades americanas e chinesas de espinafre e ruibarbo, intermediária para batata-doce e elevada para couve e brócolis, que possuem baixo teor em ácido oxálico (WEAVER et al., 1997; WEAVER e HEANEY, 1999).

O ácido fítico, uma forma de estocar fósforo nas sementes, é um modesto inibidor da absorção de cálcio. É mais provável que o ácido fítico associado com alimentos ricos em fibra seja o componente que afeta a absorção de cálcio, uma vez que a fibra purificada não mostrou este efeito (WEAVER e HEANEY, 1999). Nos últimos 20 anos, vários estudos com animais e humanos têm mostrado que alimentos ou dietas ricas em fibra podem alterar o metabolismo de minerais, quando o fitato está presente (SANDSTEAD, 1992). Entretanto, tem

sido demonstrado em vários estudos que a fibra sozinha não afeta a absorção de elementos-traço (SUNVOLD et al., 1995) e que a inulina e a fibra de beterraba aumentam o balanço de cálcio, sem efeitos adversos na retenção de outros minerais (COUDRAY et al., 1997).

A absorção de cálcio da soja com teores baixo (108 mg) e elevado (352 mg) de fitato, marcado intrinsecamente com ^{45}Ca , foi avaliada em 16 mulheres normais e comparada com a de indivíduos que consumiram leite de vaca. A absorção de cálcio para ambos os grupos que utilizaram soja foi semelhante à do leite, entretanto a absorção fracional de cálcio da soja com baixo teor de fitato foi aproximadamente 25% superior à da soja com alto teor de fitato (HEANEY et al., 1991).

PROULX et al. (1993) estudaram a biodisponibilidade de cálcio em três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) marcados intrinsecamente com ^{45}Ca , contendo 1,7% de fitato e 0,37% de oxalato e com teores baixos (feijão cozido) e elevados (feijão cru) de inibidores de tripsina e tanino, em ratos. A absorção de cálcio não foi afetada pelos inibidores de tripsina e taninos em feijões crus, quando comparada com a de feijões cozidos. A absorção de cálcio foi aproximadamente 50% da dieta de caseína marcada extrinsecamente, entre os feijões, podendo a redução da absorção de cálcio ser atribuída aos teores de fitato e oxalato. O mesmo estudo foi conduzido por WEAVER et al. (1993), porém em humanos. A absorção fracional do leite foi duas vezes maior que a das diferentes espécies de feijão. Mas quando os autores trataram os feijões com fitase, a absorção de cálcio aumentou significativamente, porém continuou inferior à do leite, provavelmente por causa do teor residual de oxalato.

SAHA et al. (1994) avaliaram, em ratos, farelo de trigo marcado intrinsecamente, com diferentes níveis de fitato. A absorção de cálcio foi significativamente menor nos grupos com elevado teor de fitato, quando comparados com os grupos com baixo e médio teor de fitato.

Além desses fatores que afetam os aspectos da homeostase do cálcio pelo simples efeito na digestibilidade, vários constituintes dietéticos, como sódio,

proteína e cafeína, afetam a excreção urinária de cálcio, pois o sódio e cálcio e o sódio dividem o mesmo sistema de transporte no túbulo proximal. Assim, a cada 2.300 mg de sódio excretados pelos rins, de 40 a 60 mg de cálcio são carreados. Como as perdas urinárias de cálcio somam 50% da variabilidade na retenção de cálcio, o sódio dietético possui uma grande influência nas perdas ósseas (WEAVER e HEANEY, 1999; WEAVER et al., 1999).

A ingestão de proteína também aumenta a excreção urinária de cálcio, em virtude da redução da reabsorção fracional tubular. Para cada grama de proteína metabolizada, os níveis de cálcio urinário aumentam cerca de 1,75 mg por dia. Com a média de eficiência de absorção em torno de 30%, isto requer a adição de 5,83 mg de cálcio/dia. Assim, duplicando a quantidade de proteínas dietéticas purificadas, a excreção de cálcio é aumentada em torno de 50%, por isso as recomendações de cálcio dietético são influenciadas pela ingestão de proteína da população. Os sulfatos produzidos do metabolismo de aminoácidos sulfurados também aumentam a acidez da urina, causando maiores perdas de cálcio para o tamponamento. Apesar de os alimentos ricos em proteínas serem ricos em fósforo, o que poderia contrabalançar a perda de cálcio, por reduzir sua perda urinária, o fósforo aumenta o conteúdo de cálcio nas secreções digestivas, aumentando as perdas endógenas de cálcio nas fezes (WEAVER e HEANEY, 1999).

Em média, um copo de café (240 mL) diminui de 2 a 3 mg a retenção de cálcio. Assim, até mesmo um elevado consumo de cafeína possui um modesto efeito na perda de cálcio, na maioria das pessoas (WEAVER e HEANEY, 1999; WEAVER et al., 1999).

O cálcio dietético pode desempenhar um papel importante na prevenção da osteoporose, beneficiar crianças deficientes em lactase ou alérgicas ao leite de vaca, pessoas que têm intolerância à lactose não-persistente após a infância e as que não consomem produtos de origem animal. Portanto, grande ênfase está sendo dada à inclusão de leguminosas na dieta e na determinação da biodisponibilidade de cálcio desses alimentos e aos fatores que podem aumentar

ou reduzir sua absorção. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a absorção de cálcio de uma nova variedade de soja (UFV-116), em comparação com uma variedade comercial, pela técnica de marcação extrínseca com ^{45}Ca , no fêmur de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com os animais foi realizado no Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue (Animal Facility), IN, USA.

2.1. Modelo experimental

Foram utilizados 40 ratos machos *Sprague Dawley* (Harlan, Indianápolis, IN), com pesos iniciais entre 150 e 170 g. Os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em grupos de dez e distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável. A temperatura foi controlada para 25°C, e os animais foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12 horas. Os ratos receberam dieta-controle, baseada na dieta semipurificada AIN93-G (REEVES et al., 1993), e água deionizada *ad libitum* durante o experimento. Os animais foram adaptados a consumir 3g de dieta por um período de sete dias consecutivos, após o jejum de 12 a 16 horas. O tempo de jejum passou de 12 para 16 horas, por causa da dificuldade de os animais ingerirem a porção de 3 g de dieta durante 1 hora. Essa dieta era composta de 30% de farinha de soja, 62% de açúcar e 8 % de óleo de milho, e teve por finalidade acostumar os animais com essa forma de alimentação, para a posterior aplicação das dietas-teste. No oitavo dia, após 16 horas de jejum, dois grupos receberam uma dose de 3 g de dieta-teste, contendo farinha de soja integral, um de cada variedade, marcada com 10 μCi de ^{45}Ca (dose oral). Os outros dois grupos (controles) receberam dieta semelhante, sem marcador radioativo, e após 1 hora receberam uma dose intraperitonal (IP) de 0,3 mL de

solução salina 0,9%, contendo 10 μCi de ^{45}Ca (Quadro 1). Três horas após receberem a dosagem, os animais retornaram à dieta AIN93-G.

Quadro 1-Composição das dietas-teste (g/3g)

Dietas				
Componentes	UFV-116		OCEPAR-19	
	Controle ¹	Teste ²	Controle ¹	Teste ²
Farinha de soja, g	0,9	0,9	0,95	0,95
Açúcar, g	1,86	1,86	1,66	1,81
Óleo de milho, g	0,24	0,24	0,24	0,24
Cálcio, mg	1,876	1,876	1,618	1,618
CaCO ₃ , mg	-	-	0,645	0,645
Proteína, mg	360	360	360	360

1 = controle (sem marcador) e 2=teste (com $^{45}\text{CaCl}$, 10 μCi), n=10.

2.2. Análises

2.2.1. Análise das dietas experimentais

O teor de proteína foi analisado pelo método macro-kjeldahl, segundo FRITZ e SCHENK (1969), e o de cálcio por absorção atômica, segundo a metodologia descrita no Capítulo 1.

2.2.2. Fêmur

Quarenta e oito horas após receberem a dieta-teste, os animais foram sacrificados com CO₂ e seus fêmures direitos foram retirados para análise. Estes foram dissolvidos em 3mL HNO₃ concentrado, em balão volumétrico, e o volume completado para 25mL com água deionizada. Alíquotas de 1mL dessas soluções

foram diluídas com 15 mL de coquetel de líquido de cintilação (ICN, Biomedicals), para determinação de ^{45}Ca em cintilador Beckman LS (*Beckman instruments*). A absorção fracional de cálcio (^{45}Ca) nos animais que receberam dieta-teste foi calculada em relação à quantidade de ^{45}Ca no fêmur de cada rato que recebeu IP (injeção intraperitoneal), assumindo 100% de absorção:

$$\% \text{ Absorção fracional} = \frac{\% \text{ de dose oral de } ^{45}\text{Ca} / \text{femur}}{\% \text{ de dose intraperitoneal de } ^{45}\text{Ca} / \text{femur}} \times 100$$

2.2.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa (1993). Utilizou-se o teste “t” de Student para dados não-pareados, assumindo variâncias homogêneas para comparar entre si as médias dos grupos-teste.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de radioatividade proveu contagem adequada, sem perturbar os níveis normais de cálcio dos animais. Os animais foram pesados no início e no final do experimento. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) no ganho de peso, entre os grupos experimentais (Quadro 2).

Quanto ao teor de proteína e cálcio das dietas-teste, observou-se que não houve diferença significativa no teor de cálcio, embora o teor de proteína tenha sido significativamente superior na dieta da variedade-teste, (UFV-116), que possui maior teor de fitato (Quadro 3). Essa diferença, entretanto, não foi suficiente para reduzir a biodisponibilidade de cálcio, pois não foi observada diferença significativa entre as médias de absorção fracional de cálcio no fêmur

dos ratos alimentados com farinha de soja das duas variedades estudadas (Quadro 4).

Quadro 2 – Peso inicial (PI), peso final (PF) e ganho de peso (GP) dos animais experimentais*

	UFV-116		OCEPAR-19	
Peso (g)	Dieta-controle	Dieta-teste	Dieta-controle	Dieta-teste
PI	162,5 ± 12,31	165,1 ± 7,75	165,6 ± 6,93	165,9 ± 6,67
PF	214 ± 10,82	211,2 ± 6,32	213,3 ± 8,21	214 ± 10,82
GP	48,9 ± 6,24	48,7 ± 7,45	47,7 ± 4,97	44,2 ± 6,91

* média ± desvio-padrão. As médias encontradas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, por ANOVA, a 5% de probabilidade; n=10.

Quadro 3 - Teor de proteína e cálcio das dietas-teste

Nutriente (mg/g)	Dietas-teste		p
	UFV-116	OCEPAR-19	
Cálcio	0,654 ± 0,01	0,653 ± 0,07	0,4801
Proteína	128,15 ± 2,80	121,03 ± 1,82	0,0105

* = média e desvio-padrão e p = probabilidade pelo teste t de Student, para dados não-pareados.

Quadro 4 - Absorção fracional de ⁴⁵Ca no fêmur dos animais experimentais

	UFV-116		OCEPAR-19	
Dosagem	Dieta-controle* (IP)	Dieta-teste* (⁴⁵ Ca extrínseco)	Dieta-controle* (IP)	Dieta-teste* (⁴⁵ Ca extrínseco)
CPM/femur	498374,58 ± 24753,64	486160,80 ± 28186,65	490760,38 ± 18599,25	483470,18 ± 24898,37
% dose	3,62 ± 0,18	3,29 ± 0,19	3,56 ± 0,14	3,27 ± 0,17
Absorção de ⁴⁵ Ca **	-	90,84 ± 5,24	-	91,75 ± 4,72
p		0,3912		0,3912

* = média e desvio-padrão. ** As médias encontradas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t, para as duas amostras, assumindo variâncias homogêneas; p= probabilidade; e CPM = contagem por minuto, n=10.

Os inibidores potenciais da absorção de cálcio parecem não estar ativos nos produtos testados. Sabe-se que o fitato em sementes e grãos pode influenciar a absorção de minerais, quelando o mineral e tornando a superfície absorptiva indisponível. Sabe-se também que a maioria do cálcio dos alimentos está na forma de complexos com outros constituintes dietéticos. Esses complexos devem ser quebrados e o cálcio ser liberado em uma forma solúvel e ionizada, antes de ser absorvido. No trato gastrointestinal os constituintes dos alimentos são liberados, como glicose, ácidos graxos, fosfato e oxalato, que podem se ligar ao cálcio solúvel, resultando em formação de complexo com diferentes graus de solubilidade (ALLEN, 1982).

MASON et al. (1993) verificaram que o cálcio foi mais biodisponível em ratos alimentados com farinha de soja com mínima quantidade de fitato (0,11%) do que com farinha com elevado nível de fitato (1,12%). Nenhuma diferença na absorção de cálcio foi observada em dietas com 0,34, 0,63 e 1,12 % de fitato. No presente estudo, a absorção de cálcio foi similar entre a nova variedade, que possui 1,33% de fitato, e a variedade comercial, com 1,03% (Figura 1). Provavelmente esta diferença nos níveis de fitato, embora significativa, não seja suficiente para afetar a absorção de cálcio. Os resultados obtidos neste trabalho são similares aos de outro estudo realizado por MASON et al. (1993), no qual níveis diferentes de fitato (0,74 e 1,7%) em isolado protéico de soja não influenciaram a absorção de cálcio em ratos recém-desmamados e adultos. Em humanos, HEANEY et al. (1991) observaram que a absorção de cálcio em soja com menor teor de fitato foi maior do que em soja com maior teor de fitato.

WILLIAMS e TAYLOR (1985) verificaram que a hidrólise de fitato pela fitase bacteriana do intestino grosso é a principal responsável pela quebra de fitato, quando os ratos são alimentados com dietas sem fitase. Assim, a fitase intestinal pode aumentar a biodisponibilidade de cálcio e as diferenças nos teores de fitato entre dietas, como as aqui observadas, podem não afetar a absorção de cálcio, em ratos.

HEANEY et al. (1988,1993) estudaram a biodisponibilidade de cálcio do espinafre e da couve e verificaram que o cálcio da couve é mais disponível que o do espinafre e que a absorção de cálcio do espinafre foi apenas 5%, comparada com 27% do leite ingerido com o mesmo teor de cálcio. Parte da diferença na biodisponibilidade desses dois vegetais pode ser atribuída ao elevado teor de oxalato no espinafre. Entretanto, HEANEY e WEAVER (1989) reportaram que o oxalato de cálcio é mais bem absorvido que o cálcio do espinafre. Sendo assim, parte da diferença na biodisponibilidade de cálcio do oxalato e do espinafre pode ser devido à baixa digestibilidade do espinafre. Este fator pode também ser importante na diferença da biodisponibilidade de cálcio entre couve e espinafre (BRONNER, 1993).

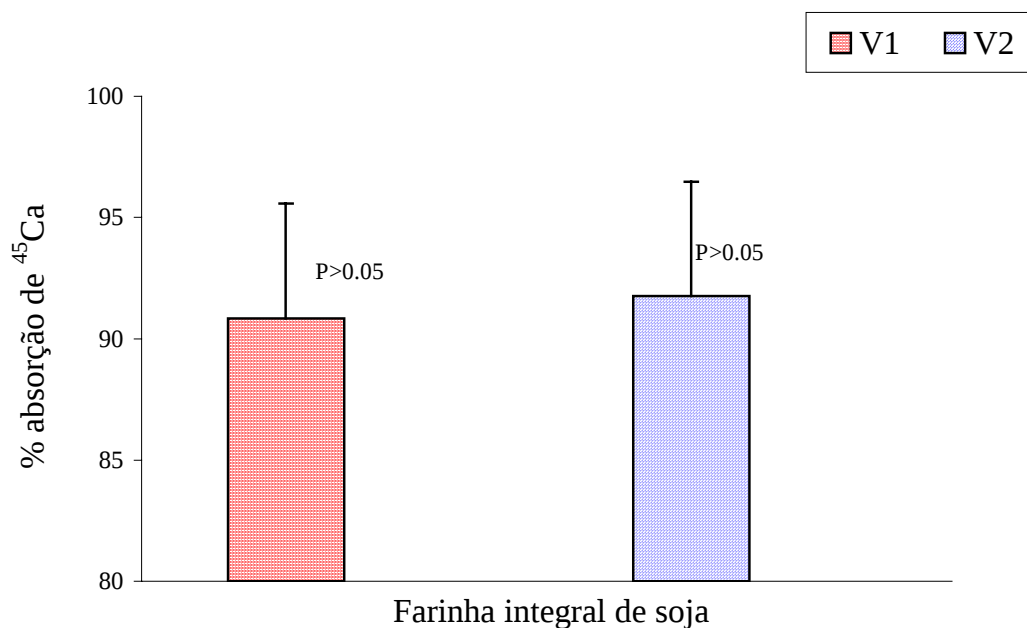


Figura 1 - Porcentual de absorção fracional de cálcio entre as variedades, V_1 (UFV-116) e V_2 (OCEPAR-19), estudadas.

Somente concentradas fontes de fitato, como cereal extrusado preparado com farelo de trigo e diferentes tipos de feijões, afetam a absorção de cálcio (WEAVER et al., 1991, 1993). Para outras plantas ricas em cálcio, do gênero *Brassica*, como brócolis, couve, repolho e mostarda, a biodisponibilidade de cálcio é tão boa quanto à do leite (HEANEY et al., 1993), provavelmente porque essas plantas não acumulam oxalato para desintoxicar do excesso de cálcio e proteger contra a morte celular. Uma notável exceção para esta generalização é a soja, que é rica em fitato e oxalato, e no entanto possui elevada biodisponibilidade de cálcio (WEAVER e HEANEY, 1999).

HEANEY et al. (1991) WEAVER et al. (1993) comparam a absorção fracional de cálcio do feijão e da soja com relação ao teor de ácido fítico. A absorção foi inversamente proporcional ao conteúdo de fitato, em ambas as espécies, no entanto a queda foi maior para feijão quando aumentou o teor de fitato, o que provavelmente foi devido à presença de outro inibidor no feijão, não presente na soja. SAHA et al. (1994) também observaram que a absorção de cálcio diminui com o aumento do conteúdo de ácido fítico em farinha de trigo marcada intrinsecamente com ^{45}Ca , em ratos.

A razão molar fitato:cálcio entre as dietas-teste que continham farinha de soja integral das variedades UFV-116 e OCEPAR-19 foi de 0,387 e 0,367, respectivamente. SAHA et al. (1994) verificaram que a absorção de cálcio reduziu significativamente quando a razão molar fitato:cálcio foi maior que 1,56, em dietas que continham farinha de trigo integral, em ratos. No entanto, WEAVER et al. (1991) reportaram que a razão molar fitato:cálcio não é melhor parâmetro para avaliar a absorção de cálcio do que o conteúdo total de fitato na dieta que utiliza produtos de trigo em humanos. Neste estudo, verificou-se que a razão molar fitato:cálcio entre as variedades foi próxima, o que pode explicar melhor a similar absorção de cálcio entre as variedades testadas do que os diferentes níveis de fitato das dietas-teste.

O ácido oxálico é o mais efetivo inibidor da absorção de cálcio, o qual tem sido reportado em várias plantas ricas em oxalato, como espinafre (HEANEY et

al., 1988) e soja (HEANEY et al., 1991). O conteúdo de cálcio das variedades UFV-116 e OCEPAR-19 é de 0,381 e 0,198%, respectivamente, apresentando diferença significativa. A razão molar oxalato:cálcio entre as dietas-teste que continham farinha de soja integral das variedades UFV-116 e OCEPAR-19 foi 0,81 e 0,52, respectivamente. Portanto, esta diferença da razão oxalato:cálcio e do conteúdo de oxalato entre as variedades não foi suficiente para reduzir a absorção de cálcio. O mesmo foi observado por WEAVER et al. (1993), utilizando diferentes variedades de feijão. Os autores verificaram que o feijão-carioquinha, *pinto beans*, que possuía maior relação oxalato:cálcio (1,29) e fitato:cálcio (0,73), não reduziu a absorção de cálcio em relação às outras variedades de feijão que tinham razão molar oxalato:cálcio de 0,84 e fitato:cálcio de 0,73 para o feijão-branco e o feijão-vermelho de 0,71 e 0,57, respectivamente. Tal fato evidência que nem todo fitato e oxalato do feijão pode formar complexos com o cálcio, pois cerca de 20% do cálcio do feijão está em compartimento separado do oxalato do feijão.

WEAVER et al. (1987) reportaram que a absorção de cálcio foi similar para CaCl_2 , CaCO_3 e couve, os quais não contêm ácido oxálico. Entretanto, a absorção de cálcio de oxalato de cálcio e espinafre foi de aproximadamente 10% das fontes citadas. HEANEY e WEAVER (1989) verificaram que a absorção fracional de cálcio do oxalato foi inferior à do leite que, quando o leite e o oxalato foram ingeridos juntos, a absorção aumentou, sendo maior que a absorção de cálcio do espinafre reportada por HEANEY et al. (1988). Segundo WEAVER et al. (1997), a absorção fracional de cálcio de vegetais chineses, mostarda e folha da flor de couve-chinesa, com baixo teor de oxalato, 0,22 e 0,20%, respectivamente, foi tão boa quanto à do leite. A absorção de cálcio foi reduzida para espinafre (~7,52% de oxalato), apresentando menor absorção de cálcio ($p < 0,001$) com relação ao leite e aos outros vegetais chineses. A absorção de cálcio da batata-doce e do ruibarbo foi de 42 e 24%, respectivamente, em relação ao leite.

O teor total de fibra alimentar de ambas as variedades foi de aproximadamente 2%. Foi por causa do baixo teor que provavelmente a fibra não interferiu na absorção de cálcio. Entretanto, alguns mecanismos têm sido propostos por MILLER (1989) para explicar o efeito da fibra na absorção de minerais: a fibra pode ligar a cátions via ácido carboxílico ou resíduos de ácidos urônicos, podendo resultar em reduzida absorção do mineral. Entretanto, substancial digestão pode ocorrer no cólon, podendo o cálcio ser liberado e absorvido. Por outro lado, as fibras solúveis aumentam a viscosidade e o tempo de esvaziamento gástrico, o que pode aumentar a absorção de minerais. A fibra pode aumentar o trânsito no intestino, reduzindo o tempo do nutriente na superfície da mucosa, podendo este protamente ser absorvido. Os alimentos ricos em fibras geralmente contêm fitato ou ácido oxálico, que podem interferir na absorção de cálcio. SHEN et al. (1998) verificaram que a lignina extraída de farelo de trigo e couve não alterou a absorção de cálcio. Assim, os efeitos observados na redução da absorção de cálcio podem ser devido a outros fatores, e não à fibra alimentar (MILLER, 1989).

Os elevados valores de absorção fracional de cálcio encontrados aqui foram provavelmente devido à baixa concentração de cálcio nas dietas testadas. Assim, os valores de absorção obtidos diferem e são superiores aos valores encontrados por MASON et al. (1993), utilizando farinha de soja com diferentes níveis de fitato, em ratos, cuja concentração de cálcio nas dietas-teste foi mais elevada. Com isto, apesar de os valores de absorção serem maiores, não se pode dizer que essas variedades de soja apresentam melhor absorção de cálcio.

O uso de técnicas radioisotópicas, como as utilizados neste estudo, possibilita de forma mais precisa avaliar a rota metabólica e a retenção do mineral no organismo, sendo de grande importância na prevenção e no combate da desnutrição, especialmente em se tratando de dietas à base de leguminosas, em que os fatores antinutricionais podem exercer efeitos adversos. Sendo assim, poderão ser obtidas informações da real absorção do mineral pelo organismo e fornecer à população recomendações precisas de suas necessidades nutricionais.

As duas variedades de soja estudadas apresentaram uma boa absorção de cálcio, quando comparadas com as de outros estudos. Tal fato pode ser importante para indivíduos e populações que utilizam soja na alimentação ou que não fazem uso de leite e seus derivados. Pode-se concluir que a absorção de cálcio foi equivalente entre a nova variedade ($0,91 \pm 0,05$) de soja e a variedade comercial ($0,92 \pm 0,05$). A nova variedade, sem as lipoxigenases 2 e 3, é uma fonte comparável de biodisponibilidade de cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, L.H. Calcium bioavailability and absorption: a review. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v. 35, p.783-808, 1982.
- BRONNER, F. Nutrient bioavailability, with special reference to calcium. **The Journal of Nutrition**, v.123, p.797-802, 1993.
- COUDRAY, C., BELLANGER, J., CASTIGLIA-DELAVALD, RÉMÉSY, C. VERMOREL, M., RAYSSIGNUIER, Y. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **European Journal Clinical Nutrition**, v.51, p. 375-380, 1997.
- FRITZ, J.S., SCHENK, G.H. **Quantitative analytical chemistry**. 2^a ed. Boston: Allyn and Bacon, 1969. 528-531p.
- HEANEY, R.P., WEAVER, C.M., FITZSIMMONS, M.L. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v. 53, p.745-747, 1991.
- HEANEY, R.P., WEAVER, C.M., HINDERS, S.M., MARTIN. B.R., PACKARD, P.T. Absorbability of calcium from brassica vegetables: broccoli, bok choy, and kale. **Journal of Food Science**, v.58, p.1378-1380, 1993.
- HEANEY, R.P., WEAVER, C.M.. Oxalato: effect on calcium absorbability. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.50, p.830-832, 1989.
- HEANEY, R.P., WEAVER, C.M., RECKER, R.R. Calcium absorbability from spinach. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.47, p.707-709, 1988.
- MASON, A.C., WEAVER, C.M., KIMMEL, S., BROWN, R.K. Effect of soybean phytate content on calcium bioavailability in mature and immature rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.246-249, 1993.
- MILLER, D.D. Calcium in the diet: food sources, recommended intakes, and nutritional bioavailability. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.33, p.103-56, 1989.
- NICKEL, K.P., MARTIN, B.R., SMITH, D.L., SMITH. J.B., MILLER, G.D.WEAVER, C.M. Calcium bioavailability from bovine milk and dairy products in premenopausal women using intrinsic and extrinsic labeling techniques. **The Journal of Nutrition**, v.126, p.1406-1411, 1996.

- PROULX, W.R., WEAVER, C.M., BOCK, M.A. Trypsin inhibitor activity and tannin content do not affect calcium bioavailability of three commonly consumed legumes. **Journal of Food Science**, v.58, p.382-384, 1993.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C.Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- SAHA, P.R., WEAVER, C.M., MASON, AC. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. **American Chemical Society**, v.42, p.2531-2535, 1994.
- SANDSTEAD, H.H. Fiber, phytates and mineral nutrition. **Nutrition Reviews**, v.50, p.30-31, 1992.
- SANDSTROM, B., FAIRWEATHER-TAIT, S.F. HURRELL, R.F., VAN DOKKUM, W. Methods for studying mineral and trace elements absorption in humans using stable isotopes. **Nutrition Research Reviews**, v.6, p.71-95, 1993.
- SHEN, X., WEAVER, C.M., MARTIN, B.R., HEANEY, R.P. Lignin effect on calcium absorption in rats. **Journal of Food Science**, v.63, p.165-167, 1998.
- SUNVOLD, G.D. TITGEMEYER, E.C., BOURQUIN, L.D., HAHEY, G.C. GARLEB, K.A Alteration of the fiber and lipid components of a defined-formula diet: effects on stool characteristics, nutrient digestibility, mineral balance and energy metabolism in humans. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.42, p.2531-2535, 1995.
- WEAVER, C. M., MARTIN, B. R., EBNER, J. S., KRUEGER, C. A. Oxalic acid decreases calcium absorption in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 117, p. 1903-1906, 1987.
- WEAVER, C.M., HEANEY, R.P. Calcium In: SHILLS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M., ROSS, A.C. **Modern nutrition in health and disease**. 9.ed. Baltimore: WILLIAMS & WILKINS, 1999. 141-154p.
- WEAVER, C.M., HEANEY, R.P., MARTIN, B.R., FITZSIMMONS, M.L. Human calcium absorption from whole wheat products. **The Journal of Nutrition**, v.121, p.1769-1775, 1992.

- WEAVER, C.M., HEANEY, R.P., MARTIN, B.R., FITZSIMMONS, M.L. Extrinsic versus intrinsic labeling of the calcium in whole-wheat flour. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.55, p.452-454, 1992.
- WEAVER, C.M., HEANEY, R.P., MARTIN, B.R., FITZSIMMONS, M.L. Human calcium absorption from whole-wheat products. **The Journal of Nutrition**, v.121, p.1769-1775, 1991.
- WEAVER, C.M., HEANEY, R.P., NICKEL, K.P., PACKARD, P.T. Calcium bioavailability from high oxalate vegetables: chinese vegetables, sweet potatoes and rhubarb. **Journal and Food Science**, v.62, p.524-525, 1997.
- WEAVER, C.M., HEANEY, R.P., PROULX, W.R., HINDERS, S.M., PACKARD, P.T. Absorbability of calcium from common beans **Journal and Food Science**, v.58, p.1401-1403, 1993.
- WEAVER, C.M., PROULX, W.R., HEANEY, R.P. Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v. 70, p.543-548, 1999.
- WILLIAMS, P.J., TAYLOR, T.G. A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. **British Journal of Nutrition**, v.54, p.429-535, 1985.

CAPÍTULO 3

Avaliação da biodisponibilidade de zinco de variedades de soja em ratos

1. INTRODUÇÃO

A biodisponibilidade de zinco é definida como a fração de zinco que é retida e utilizada para funções fisiológicas normais. Sua absorção ocorre em função do conteúdo de zinco na dieta e da solubilidade dos compostos que contêm zinco, do sítio de absorção e do status ou da necessidade corporal, pois os requerimentos fisiológicos podem variar, dependendo da idade, do sexo, do estágio de crescimento, da gravidez e da lactação (FAIRWEATHER-TAIT 1997 KING e KEEN, 1999).

O zinco tende a se ligar a compostos orgânicos em pH elevado. Ligantes de pequeno peso molecular, como aminoácidos e outros ácidos orgânicos, podem aumentar a solubilidade e facilitar a absorção. Entretanto, compostos de elevado peso molecular, como o ácido fítico, formam compostos pobremente solúveis, o que reduz a absorção. A competição entre zinco e outros minerais, como ferro e cobre, por sítios ligantes na mucosa da célula pode influenciar sua absorção. No entanto, a proteína animal tem aumentado sua absorção (SANDSTROM e SANDBERG, 1992; FAIRWEATHER-TAIT e HURREL, 1996; KING e KEEN, 1999).

Grandes quantidades de zinco ingeridas podem interferir na biodisponibilidade de cobre, por induzir à síntese de metalotioneína na mucosa da célula, que sequestra o cobre, tornando-o indisponível para transferência serosal e diminuindo sua absorção. No caso da interação de zinco com ferro, sugere-se que estes competem com um mesmo sítio para absorção dentro das células da mucosa, pois íons quimicamente similares podem competir por uma mesma posição dentro da rota de absorção (KING e KEEN, 1999).

WHITTAKER (1998) reportou que elevada concentração de ferro pode afetar negativamente a absorção de zinco em adultos, quando elementos-traço são dados em solução. No entanto, quando o ferro e o zinco são oferecidos juntos com a refeição, este efeito não é observado. FRIEL et al. (1998) verificaram que

uma elevada ingestão de zinco não interferiu na incorporação de ferro nos eritrócitos de crianças pré-maturas.

RUDLOFF e LÖNERDAL (1992) verificaram que a biodisponibilidade de cálcio e zinco foi elevada em fórmulas baseadas em proteína hidrolisada de leite, porém não foi significativamente superior aos hidrolisados de soja. Os elevados níveis de cálcio e zinco em fórmulas à base de soja compensaram a menor biodisponibilidade e resultaram em similares quantidades de cálcio e zinco retidas. WOOD e ZHENG (1997) verificam, em humanos, que a absorção de zinco foi reduzida em 50% quando os indivíduos receberam suplemento de cálcio durante a refeição e que a inclusão extra de zinco na dieta como parte da suplementação de cálcio compensa o efeito prejudicial de cálcio na absorção de zinco.

Carnes, fígado, ovos e peixes são considerados boas fontes de zinco, sendo sua absorção elevada em virtude da ausência de compostos que inibem sua absorção e da presença de certos aminoácidos, como cisteína e metionina, que aumentam a absorção, por formarem complexos solúveis (KING e KEEN, 1999). HUNT et al. (1995) observaram que a absorção de zinco foi cerca de 80% em dietas ricas em carnes (280 g/dia), quando comparadas com uma dieta pobre em carne (42 g/dia), em mulheres em pós-menopausa. No entanto, em produtos de cereais integrais, grãos e proteínas de plantas, como a proteína de soja, o zinco encontra-se numa forma menos disponível. O ácido fítico pode explicar parte desta menor disponibilidade do zinco nesses compostos (KING e KEEN, 1999).

GIBSON et al. (1998) citam algumas estratégias dietéticas para melhorar o conteúdo e a biodisponibilidade de zinco na dieta: aumentar a ingestão de peixes, carnes de galinha, carne de cabra e amendoim, pois estes contêm elevado conteúdo e boa biodisponibilidade de zinco; consumir alimentos que aumentam a absorção de zinco, como certos aminoácidos liberados durante a digestão da proteína animal e ácidos orgânicos, como cítrico, láctico, acético, butírico e fórmico, produzidos durante a fermentação, formando ligantes solúveis com o zinco ou prevenindo a formação de complexos insolúveis, como zinco-fitato, e

usar a germinação e a fermentação para induzir a enzima fitase a hidrolisar ácido fítico, como também métodos não-enzimáticos, como tratamento térmico.

O'DELL (1998) reportou o resultado da interação de cálcio, fitato e zinco em estudos conduzidos em seu laboratório, com ratos, porcos e galinhas, utilizando dietas baseadas em caseína e suplementadas com fitato. A elevada concentração de cálcio na dieta aumentou os requerimentos de zinco somente quando o fitato estava presente. O complexo cálcio-fitato-zinco foi menos solúvel que o complexo fitato-zinco.

LÖNNERDAL et al. (1984) verificaram a biodisponibilidade de zinco em jovens adultos alimentados com dietas que continham leite humano, leite de vaca e fórmulas de uma variedade de soja ou leite de vaca suplementados com fitato, cálcio e citrato, marcados extrinsecamente com ^{65}Zn . A adição de fitato em fórmulas que continham leite de vaca reduziu a absorção de zinco de 31 para 16%, tornando-a similar à absorção para formulas à base de soja (14%), de onde se conclui que o ácido fítico é o principal responsável pela redução da absorção de zinco. Além disto, o aumento da concentração de zinco em fórmulas à base de soja não levou a uma absorção semelhante ao leite de vaca. Assim, sugere-se que a redução do conteúdo de fitato em fórmulas à base de soja por processos tecnológicos possa ser a medida mais importante para aumentar a retenção de zinco.

A soja é reconhecida como um produto alimentar nutricionalmente significativa no controle da desnutrição, por causa de sua composição em nutrientes. Como novas variedades de soja estão sendo desenvolvidas, é importante estudar sua composição em nutrientes, assim como a biodisponibilidade de minerais. Este trabalho foi conduzido com o intuito de avaliar a absorção de zinco de uma nova variedade de soja (UFV-116), em comparação com uma variedade comercial (OCEPAR-19), na forma de farinha de soja desengordurada, pela técnica de marcação extrínseca com ^{65}Zn , avaliando seu porcentual de retenção corporal total e no fêmur, em ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com os animais foi realizado no *Animal Facility*, Department of Foods and Nutrition, Purdue University, IN, EUA.

2.1. Modelo experimental

Foram utilizados 60 ratos machos *Sprague Dawley* (Halan, Indianápolis - IN), com pesos iniciais entre 150 e 170 g. Os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em seis grupos de dez ratos e alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável. Temperatura foi controlada para 25°C, e os animais foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12 horas.

Dois grupos foram alimentados com dietas experimentais adequadas em zinco (30 mg/kg de dieta), e outros dois grupos com dietas deficientes em zinco (9 mg/kg de dieta), nos quais a farinha de soja desengordurada de diferentes variedades de soja foi utilizada por 14 dias. Dois outros grupos (controles) receberam clara de ovo em pó como fonte de proteína e $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como fonte de zinco (9 e 30 mg/kg de dieta), no mesmo período de tempo. Planejou-se um teor de 27,5% de proteína nas dietas.

Durante esse período, os animais foram submetidos a um treinamento para consumir 3 g de dieta após jejum de 16 horas, durante quatro dias consecutivos. Este período de jejum foi estipulado para que todos os animais pudessem consumir a porção da dieta-teste em aproximadamente 2 horas. Após o treinamento e 16 horas de jejum, cinco ratos de cada grupo receberam uma dose de 3 g de dieta (marcada), contendo 0,25 μCi de $^{65}\text{ZnCl}_2/\text{g}$ de farinha de soja desengordurada ou clara de ovo em pó. No dia seguinte, o restante dos animais recebeu a porção de 3 g da dieta-teste. Após a ingestão das dietas-teste, os ratos foram removidos das gaiolas e colocados individualmente em contador de corpo inteiro, para medir a retenção de ^{65}Zn , contanto a atividade de ^{65}Zn (cpm),

utilizando janelas com amplos canais “6x 6 weel crystal Whole–body gamma counter Harshaw Type

Quadro 1 - Composição das dietas experimentais (g/100 g)

Dietas						
Ingredientes	Zn (+)	Zn (-)	V1 (+)	V1 (-)	V2 (+)	V2 (-)
Clara de ovo em pó	35,6	35,6	0,0	24,9	0,0	25,0
Farinha de soja desengordurada	0,0	0,0	55,3	16,6	56,5	16,9
Amido de milho	24,1	24,1	4,2	18,0	2,9	17,5
Amido de milho dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Açúcar	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Fibra	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de milho	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Mistura mineral sem Zn	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
L-metionina	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Zinco (ZnSO ₄ .H ₂ O)	3,5 mg	0,9 mg	-	-	-	-

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

NaI (TI)", acoplado com um detector Canberra série 30 "multichannel analyser", localizado no "Radiological and Environmental Management Laboratory, Purdue University". As fontes de proteínas das dietas - teste marcadas com ⁶⁵Zn foram medidas regularmente, antes de contar os animais para corrigir o background e a decaída do radioisótopo. Após a contagem, eles foram colocados

em suas gaiolas e permitidos ingerir *ad libitum* dieta AIN-93G até o final do experimento. A radioatividade do corpo inteiro também foi medida 12 horas após a ingestão da dieta - teste e nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13, para determinar a porcentagem de retenção de ^{65}Zn (Anexo 1). O percentual de absorção de Zn^{65} foi calculado a partir da extrapolação da porção linear da curva, para o eixo y, obtida do percentual de absorção Zn^{65} *versus* o tempo, a partir dos dados transformados logaritmicamente, segundo a metodologia proposta por HEAT e HOEKSTRA (1965).

A divisão dos animais de um mesmo grupo experimental para receberem a porção de 3 g de dieta - teste marcada radioativamente foi para assegurar que os ratos não eliminassem o marcador radioativo pelas fezes e pela urina antes da primeira contagem. Com isto, reduziu-se a diferença do tempo de contagem da dose retida entre o primeiro e o último animal, no tempo zero.

A eficiência alimentar foi calculada nas duas primeiras semanas do experimento.

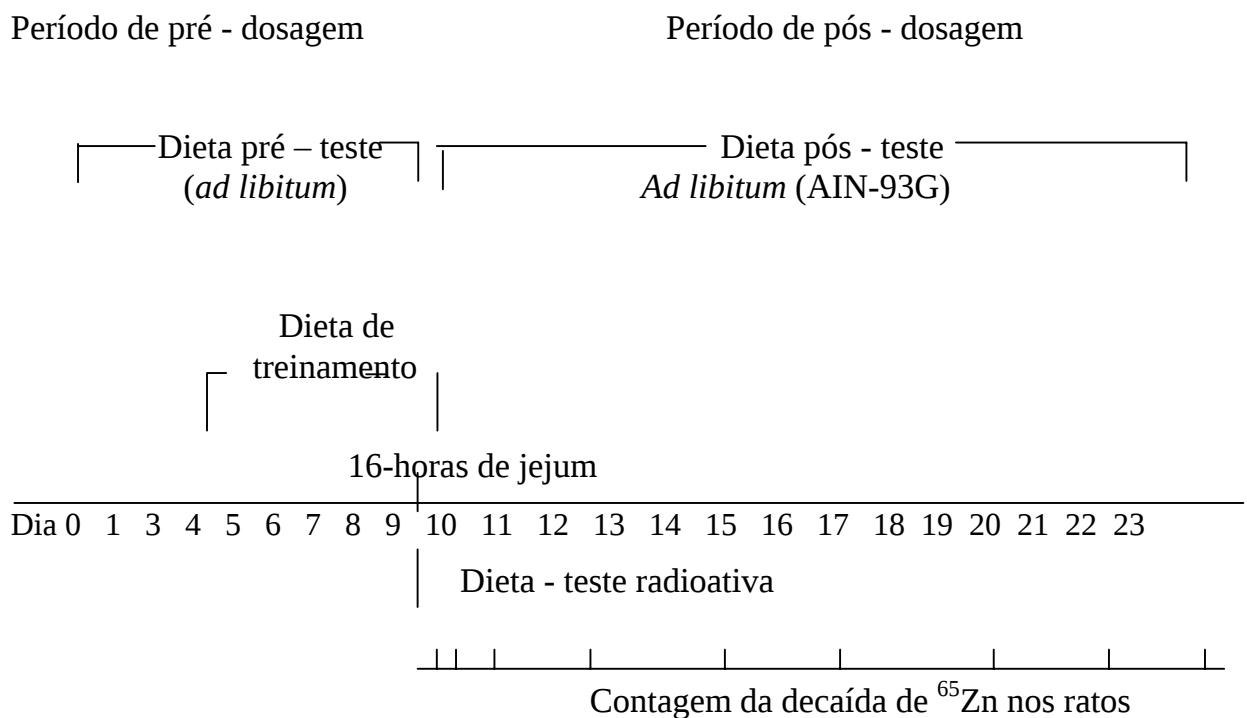


Figura 1 - Esquema do modelo experimental.

2.2. Preparo das dietas-teste

As dietas-teste radioativas apresentaram a mesma composição que as dietas experimentais, porém adicionadas de $^{65}\text{ZnCl}_2$. O marcador radioativo, Zn^{65} , foi adicionado na fonte protéica de cada dieta experimental. Assim, a farinha de soja desengordurada e clara de ovo em pó foram diluídas em água deionizada, até a formação de um líquido viscoso. Em seguida, adicionou-se a dose de Zn^{65} estimada ($0,25\mu\text{Ci}$ de $^{65}\text{ZnCl}_2/\text{g}$ de farinha de soja desengordurada ou clara de ovo em pó). Na clara de ovo em pó, também adicionou-se à fonte de zinco uma solução de sulfato de zinco com 9 ou 30 ppm de zinco (considerando para o cálculo da solução, que em 1g de sulfato de zinco contém 0,4 g de zinco). Após a homogeneização, as amostras foram secas em "*freeze Dryer*". Após a secagem, as amostras foram maceradas em cadinho de porcelana, reconstituídas no formato de pó. Antes do preparo das dietas-teste, analisou-se a radioatividade das fontes protéicas no contador gama "*Beckman 4000 counting system*" com eficiência de 2% e no contador de corpo inteiro, para certificar se a dose radioativa proveu a contagem adequada para realização do experimento.

2.3. Análises

2.3.1. Análise das dietas-teste e experimentais

As amostras das dietas-teste e experimentais foram secas em estufa a vácuo ($70\text{ }^\circ\text{C}$, por uma noite), pesadas e colocadas em mufla ($300\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas e a $600\text{ }^\circ\text{C}$ por três dias). As cinzas foram dissolvidas em 2,5% HNO_3 , diluídas com lantânio a 0,5%, como LaCl_3 em 2,5% HNO_3 , e analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica *Perkin Elmer (Norwalk, CT) 5100 PC*.

As farinhas de soja utilizadas foram desengorduradas conforme o procedimento descrito nas Normas Analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), em aparelho de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente extrator, com o objetivo de não ultrapassar o conteúdo de lipídio recomendado

nas dietas experimentais. O teor de proteína foi analisado pelo método macrokjeldhal, segundo FRITZ e SCHENK (1969).

2.3.2. Fêmur

No final do experimento, os ratos foram sacrificados com CO₂, e os fêmures direitos foram cuidadosamente removidos, limpos e pesados. A atividade de ⁶⁵Zn foi medida mediante o uso de um contador gama *Beckman 4000 counting system*, com eficiência de 2%. Em seguida, os fêmures foram secos em estufa a vácuo por 24 horas, a 75 °C, e pesados. Após esse período os ossos foram colocados em mufla a 300 °C, por 6 horas, e em seguida a 600 °C, por três dias consecutivos. As cinzas foram dissolvidas em 1mL de HCl, em balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com água deionizada. O conteúdo total de zinco nos fêmures foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica *Perkin Elmer (Norwalk, CT) 5100 PC Atomic Absorption Spectrophotometer*.

2.3.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelos programas SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) e Statística. Os dados qualitativos foram analisados pelo teste F, por ANOVA, a 5% de probabilidade. Utilizou-se contraste para avaliar as diferenças entre as médias dos tratamentos. Para os dados quantitativos utilizou-se o teste F, por ANOVA, seguido da análise de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biodisponibilidade de zinco das dietas - controle adicionadas de clara de ovo e sulfato de zinco e das dietas-teste contendo farinha de soja desengordurada,

com níveis normais e deficientes em zinco, foi estudada, utilizando a técnica de marcação extrínseca ^{65}Zn , em que o marcador foi adicionado na fonte protéica. Segundo MEYER et al. (1983), para produtos de soja a marcação extrínseca de ^{65}Zn não tende a superestimar a retenção de zinco quando o marcador é misturado na fonte protéica antes de ser incorporado na dieta, pois considera-se que existe uma troca completa entre os sais de zinco do radioisótopo e o zinco endógeno da fonte protéica estudada.

Analisando as dietas experimentais, pode-se observar que os teores de proteínas entre os grupos experimentais foram semelhantes (Quadros 1 e 2). O conteúdo de proteína entre os grupos experimentais deve ser controlado, pois sabe-se que alguns aminoácidos ligantes como histidina e cisteína promovem uma absorção de zinco mais eficiente (KING e KEEN, 1999). O Quadro 2 também apresenta a teor de zinco das dietas experimentais, não ocorrendo diferença significativa entre os grupos com maior e menor teor de zinco, conforme planejado.

Não foi observada diferença significativa no ganho de peso dos animais ao comparar grupos-controle e experimentais durante o período de adaptação (Quadros 1 e 2). Foi observada uma diferença significativa entre os grupos alimentados com soja (30 ppm de zinco), tendo o grupo alimentado com a variedade 2 (OCEPAR-19) com menor teor de fitato apresentado maior ganho de peso. Entretanto, essa diferença não foi significativa no final do experimento. ZHOU et al. (1992) não verificaram diferença no ganho de peso de animais alimentados à base de isolado protéico de soja com teores baixo (0,51) e normal de ácido fítico (1,01%) e dietas de clara de ovo em pó, ambas possuindo em torno de 9 ppm de zinco. Entretanto, STUART et al. (1986) verificaram que o ganho de peso em ratos alimentados com dieta de soja deficiente em zinco (8 ppm) foi significativamente menor quando comparado com os dos grupos alimentados com clara de ovo (~33,6 ppm de Zn) e carne de galinha (~11,6 ppm de Zn), durante 20 dias.

Quadro 1 - Ganho de peso (GP), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos alimentados com dietas experimentais no período de adaptação (14 dias) e teor de proteína e zinco das dietas experimentais*

Dietas	GP (g)	CEA (%)	Zinco (mg/g)	Proteína (%)
Zn (+)	79,80 ± 15,05	40,46 ± 5,20	0,054	28,68 ± 1,55
Zn (-)	82,20 ± 9,20	38,01 ± 6,63	0,012	29,31 ± 0,68
V1 (+)	69,89 ± 8,52	30,25 ± 3,38	0,055	29,57 ± 0,51
V1 (-)	78,30 ± 6,85	35,50 ± 3,20	0,012	28,18 ± 0,70
V2 (+)	83,20 ± 14,48	34,24 ± 5,17	0,044	28,91 ± 1,01
V2 (-)	83,70 ± 11,54	39,01 ± 3,04	0,011	28,29 ± 0,67

* Média desvio ± padrão.

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

Quadro 2 - Grau de liberdade (GL) e quadrado médio (QM) dos contrastes para ganho de peso (GP), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos alimentados com dietas experimentais no período de adaptação (14 dias) e do teor de proteína e zinco das dietas experimentais

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		GL	Quadrado Médio	
		GP	CEA		Zinco	Proteína
Dietas	(5)	(246,1985) ^{ns}	(124,3797)*	(5)	(0,00141)*	(0,91446) ^{ns}
Zn(+) x V ₁ (+)V ₂ (+)	1	69,3729 ^{ns}	425,6730*	1	0,000052 ^{ns}	0,6376 ^{ns}
Zn(-) x V ₁ (-) V ₂ (-)	1	9,6000 ^{ns}	3,7882 ^{ns}	1	0,000004 ^{ns}	2,3203 ^{ns}
Zn(+) V ₁ (+) V ₂ (+) x Zn(-)V ₁ (-) V ₂ (-)	1	209,3584 ^{ns}	86,8072*	1	0,0068*	0,9383 ^{ns}
V ₁ (+) x V ₂ (+)	1	839,3006 *	64,6929 ^{ns}	1	0,000178 ^{ns}	0,6597 ^{ns}
V ₁ (-) x V ₂ (-)	1	145,8000 ^{ns}	61,4735 ^{ns}	1	0,00001 ^{ns}	0,0162 ^{ns}
Resíduo	53	137,0922	21,4574	12	0,000186	0,8463

* As médias diferem entre si pelo teste F, por contraste, a 5% de probabilidade; e ns= não-significativo a 5% de probabilidade.

A diferença verificada neste estudo em relação à citada anteriormente foi provavelmente porque aqui trabalhou-se com ratos em fase final de crescimento,

não sendo possível detectar a diferença de ganho de peso entre grupos com dietas restritas e normais em zinco.

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) entre os grupos alimentados com dietas normais em zinco foi significativamente superior para o controle, quando comparado com os grupos com dietas de soja. Para os grupos deficientes em zinco, o grupo-controle não diferiu significativamente dos grupos alimentados com dieta de soja. Entretanto, foi observada diferença significativa no CEA quando foram comparados todos os grupos que receberam dietas normais em zinco com todos os demais que receberam dietas deficientes em zinco (Quadros 1 e 2).

MEYER et al. (1983) verificaram que o CEA em ratos alimentados com dietas com farinha de soja foi significativamente inferior quando comparado com clara de ovo em pó, ambas com um teor de 11 ppm de zinco. Diferenças no CEA não foram observadas entre grupos alimentados com dietas deficientes em zinco (~8,6ppm) à base de farinha de soja com e sem casca. KHAN e WEAVER (1989) observaram que o CEA de ratos alimentados com dieta de caseína foi superior ($p < 0,05$) àqueles alimentados com dieta de soja com teor de zinco que variava de 15 a 17 ppm e que o CEA diminuiu com o aumento do período de adaptação em ambas as dietas, sendo a redução maior ($p < 0,05$) para a dieta de caseína.

O peso dos fêmures e o conteúdo total de zinco nos fêmures foram similares entre os grupos alimentados com dieta de soja e clara de ovo em pó adicionada de sulfato de zinco, ambos possuindo teores baixos e elevados de zinco (Quadros 3 e 4). O conteúdo de zinco nos fêmures foi negativamente correlacionado com o peso dos animais ($r = -0,0883$ e $p = 0,22510$). Tal fato ocorreu por causa do curto período de adaptação dos ratos em dietas deficientes e normais em zinco e também porque os animais utilizados estavam na fase final de crescimento, pois, segundo KING (1990), ratos adultos e humanos ajustam à baixa ingestão de zinco, reduzindo sua excreção, e, também, a deficiência de zinco é mais difícil de ser induzida em animais adultos.

Quadro 3 - Peso, conteúdo de zinco total e retenção de ^{65}Zn nos fêmures dos ratos alimentados com dietas com $^{65}\text{ZnCl}_2$ de farinhas de soja desengorduradas e clara de ovo em pó, extrinsecamente marcadas*

Dietas	Fêmur		
	Peso Seco (g)	Conteúdo de Zn (mg)	Retenção de ^{65}Zn (% Dose)
Zn (+)	0,404 ± 0,033	0,297 ± 0,025	0,33 ± 0,05
Zn (-)	0,403 ± 0,019	0,270 ± 0,021	1,40 ± 0,23
V1 (+)	0,390 ± 0,023	0,295 ± 0,06	0,67 ± 0,13
V1 (-)	0,513 ± 0,33	0,258 ± 0,065	1,12 ± 0,11
V2 (+)	0,413 ± 0,026	0,308 ± 0,02	0,69 ± 0,06
V2 (-)	0,406 ± 0,02	0,267 ± 0,078	1,10 ± 0,12

* Média desvio ± padrão.

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

Quadro 4 - Grau de liberdade (GL) e quadrado médio (QM) dos contrastes para peso, conteúdo de zinco total e retenção de ^{65}Zn nos fêmures dos ratos alimentados com dietas com $^{65}\text{ZnCl}_2$ de farinhas de soja desengorduradas e clara de ovo em pó, extrinsecamente marcadas

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Peso seco (g)	Conteúdo de Zn (mg)	Retenção de ^{65}Zn (% Dose)
Dietas	(5)	(0,2059) ^{ns}	(0,0040) ^{ns}	(1,503346)*
Zn(+) x V ₁ (+)V ₂ (+)	1	0,00002 ^{ns}	0,00018 ^{ns}	0,8237*
Zn(-) x V ₁ (-) V ₂ (-)	1	0,0213 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,3751*
Zn(+) V ₁ (+) V ₂ (+) x Zn(-)V ₁ (-) V ₂ (-)	1	0,0218 ^{ns}	0,01825 ^{ns}	6,3037*
V ₁ (+) x V ₂ (+)	1	0,00268 ^{ns}	0,00086 ^{ns}	0,00437 ^{ns}
V ₁ (-) x V ₂ (-)	1	0,05706 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	0,0097 ^{ns}
Resíduo	54	0,1882 ^{ns}	0,00258 ^{ns}	0,1675

* As médias diferem entre si pelo teste F, por contraste, a 5% de probabilidade; e ns= não-significativo a 5% de probabilidade.

Outro fator a ser considerado neste estudo foi que os animais receberam uma mesma dieta-padrão (AIN-93G) após a ingestão das dietas-teste marcadas, o que pode ter aumentado o teor total de zinco nos fêmures dos grupos alimentados com dieta à base de soja, tornando - se semelhante às dietas-controle adicionadas de sulfato de zinco, que é uma das fontes mais disponíveis de zinco (KING e KEEN, 1999).

Diferente dos dados obtidos neste estudo, KHAN e WEAVER (1989) verificaram que ratos alimentados com dieta de caseína ganharam mais peso e tiveram significativamente maior teor de zinco na tíbia que ratos alimentados com dieta de soja nos períodos de 20, 44 e 68 dias. O teor de zinco da tíbia foi positivamente correlacionado com o peso corporal dos ratos, em ambos os grupos. O porcentual de retenção de ^{65}Zn nos fêmures foi significativamente maior em ratos alimentados com dietas deficientes em zinco, quando comparados com os ratos que receberam dietas normais em zinco, sendo a retenção maior ($p < 0,05$) nos ratos alimentados com dieta à base de clara de ovo, adicionada de sulfato de zinco (9 ppm), quando comparada com todos os grupos de soja com o mesmo teor de zinco na dieta. Entretanto, nos animais alimentados com dieta à base de clara de ovo, adicionada de sulfato de zinco (30 ppm), a retenção foi inferior ($p < 0,05$) à dos grupos experimentais alimentados com dietas de soja com mesmo teor de zinco. Nos grupos alimentados com farinha de soja desengordurada, de ambas as variedades, não foi observada diferença significativa na retenção de ^{65}Zn entre ratos que receberam dietas deficientes ou normais em zinco (Quadros 3 e 4).

ZHOU et al. (1992) não verificaram diferença no ganho de zinco na tíbia entre os grupos que receberam dieta restrita em zinco (6 ppm), enquanto diferenças foram observadas entre grupos alimentados com dieta moderada (9 ppm) em zinco. Os autores concluíram que, no caso de níveis restritos de zinco, o zinco absorvido foi mais usado para funções bioquímicas vitais do que estocado nos ossos, enquanto para o zinco em níveis moderados, o zinco disponível acumulou nos ossos, produzindo aumento de seu conteúdo total na

tíbia nos grupos alimentados com dieta adequada em zinco. Também, foi sugerido que as diferenças não encontradas no ganho de zinco na tíbia entre grupos com baixo teor de fitato (0,53) e controles ocorreram porque existe limiar mínimo de fitato para exercer efeito na redução de zinco.

STUARD et al. (1986) verificaram que ratos alimentados com dieta à base de clara de ovo com teor normal em zinco tiveram maior conteúdo deste elemento nos ossos, quando comparados com grupos alimentados com carne de galinha, soja e soja com carne de galinha, deficientes em zinco. A retenção de ^{65}Zn foi menor em ratos alimentados com dieta de soja do que aqueles alimentados com dieta à base de carne de galinha. Em outro estudo, estes autores verificaram que ratos alimentados com dietas deficientes em zinco (~10 ppm) não apresentaram diferença significativa no teor total de zinco da tíbia, nos dias 5,7 e 20 (Quadro 2).

Calculou-se o percentual de retenção e absorção corporal de ^{65}Zn a partir da equação de regressão linear da transformação logarítmica do percentual de absorção e do tempo, obtidos a partir de cada tratamento (Quadros 5 e 6). A curva do percentual de absorção apresentou uma rápida redução do dia zero ao dia três, aproximadamente, e após o terceiro dia de ingestão da dose radioativa a curva tendeu a uma linearidade, considerando que o ^{65}Zn não-absorvido tenha sido excretado. Assim, a extrapolação da porção linear da curva, para o eixo y, obtida pela decaída do isótopo ingerido pelos animais para o tempo zero, representa o percentual de ^{65}Zn absorvido (Figura 1).

O percentual de retenção e absorção de ^{65}Zn no corpo inteiro dos animais foi maior ($p < 0,05$) nos ratos alimentados com dietas deficientes em zinco, comparados com os ratos que receberam dietas adequadas em zinco. A retenção foi significativamente maior em ratos alimentados com dieta deficiente em zinco (controle), e significativamente menor em ratos alimentados com dieta normal em zinco (controle), quando comparados com os outros grupos alimentados com dietas à base de soja. A variedade 1 (UFV-116), que possui nível maior de fitato (1,33%), apresentou retenção de zinco menor ($p < 0,05$) que a da variedade

comercial 2, (OCEPAR-19), com teor de fitato de 1,03%, entre os grupos alimentados com farinha de soja desengordurada com dietas deficientes ou normais em zinco (Quadros 6 e 7). A Figura 1 apresenta a decaída do traçador ^{65}Zn entre os grupos experimentais, do dia zero ao dia 13.

Quadro 5 - Equação de regressão linear da transformação logarítmica do porcentual de absorção e do tempo, obtidos a partir de cada tratamento

Dietas	Equação	R ²	FA	p
Zn (+)	y=1,90975 - 0,767521*t	0,87	*	0,0000
Zn (-)	y= 2,01213 - 0,176113*t	0,55	ns	0,0001
V1 (+)	y=1,95571 - 0,497628*t	0,75	*	0,0001
V1 (-)	y=1,96587 - 0,279996*t	0,59	ns	0,0001
V2 (+)	y=1,93372 - 0,452406*t	0,66	*	0,0000
V2 (-)	y=1,99361 - 0,247003*t	0,89	ns	0,0000

y= % retenção, t = tempo (dias), FA = falta de ajuste da regressão, (* significativa, ns = não significativa) e p= probabilidade.

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

Estudos com ratos e macacos recém-desmamados têm demonstrado que a redução da absorção de zinco em produtos de soja é devido ao conteúdo de fitato e que a redução deste aumenta a biodisponibilidade de zinco (LÖNNERDAL et al., 1984, 1988; ZHOU et al., 1992; LEI et al., 1993). Entretanto, SIAN et al. (1996) verificam que a absorção fracional não diferiu entre mulheres jovens que consumiam quantidades deficientes e adequadas de zinco em suas dietas, porém o zinco endógeno foi conservado efetivamente pelo intestino nas mulheres que receberam dietas deficientes em zinco, o que evidencia que a regulação da excreção endógena de zinco pelo intestino é o principal responsável pela

Quadro 6 - Retenção e absorção de ^{65}Zn no corpo inteiro de ratos alimentados com dietas $^{65}\text{ZnCl}_2$ de farinhas de soja desengorduradas e clara de ovo em pó, extrinsecamente marcadas*

Dietas	Dieta-teste Zn (mg/g)	Dieta-teste Consumida (g)	Zinco Consumido (mg)	^{65}Zn Corpo Retenção dose (%)	Inteiro Absorção dose (%)	Zinco Absorvido*
Zn (+)	0,029 ± 0,03	2,89	0,084	10,48 ± 0,10	25,8	0,022
Zn (-)	0,0097 ± 0,004	2,93	0,0294	64,62 ± 0,09	82,1	0,024
V1 (+)	0,048 ± 0,002	3,00	0,144	24,30 ± 0,14	42,4	0,061
V1 (-)	0,013 ± 0,001	3,00	0,036	44,11 ± 0,14	62,2	0,022
V2 (+)	0,047 ± 0,001	3,00	0,141	26,01 ± 0,12	44,0	0,062
V2 (-)	0,013 ± 0,001	3,00	0,039	51,34 ± 0,13	70,00	0,027

*Total de zinco consumido x porcentual de dose absorvida e *média ± desvio-padrão.

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

Quadro 7 - Grau de liberdade (GL) e quadrado médio (QM) dos contrastes para teor de zinco nas dietas-teste, zinco consumido e retenção de ^{65}Zn no corpo inteiro de ratos alimentados com dietas com $^{65}\text{ZnCl}_2$ de farinhas de soja desengorduradas e clara de ovo em pó, extrinsecamente marcadas

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		Quadrado Médio			
		Dieta-teste Zn (mg/g)	GL	Dieta-teste consumida (g)	Zinco consumido (mg)	Zinco absorvido (mg)	Retenção de ^{65}Zn no dia 13 (% Dose)
Dietas	(5)	(0,000944)*	(5)	(0,02256) ^{ns}	(0,28019)*	(0,00382)*	(3985,845)*
Zn(+) x V ₁ (+)V ₂ (+)	1	0,00072*	1	0,079207 ^{ns}	0,051329*	0,010623*	1394,554*
Zn(-) x V ₁ (-) V ₂ (-)	1	0,000016*	1	0,030827 ^{ns}	0,000446*	0,000004 ^{ns}	4595,419*
Zn(+) V ₁ (+) V ₂ (+) x Zn(-)	1	0,003981*	1	0,002802 ^{ns}	0,116617*	0,008393*	14944,43*
V ₁ (-) V ₂ (-)							
V ₁ (+) x V ₂ (+)	1	0,000003 ^{ns}	1	0,000000 ^{ns}	0,000045 ^{ns}	0,000005 ^{ns}	0,6242*
V ₁ (-) x V ₂ (-)	1	0,00000001 ^{ns}	1	0,000000 ^{ns}	0,000045 ^{ns}	0,000120*	107,2043*
Resíduo	12	0,000001	54	0,027508	0,000017	0,000002	0,2186

As médias diferem entre si pelo teste F, por contraste, a 5% de probabilidade, e ns= não-significativo a 5% de probabilidade.

homeostase de zinco a longo prazo em humanos, quando a ingestão deste elemento é relativamente baixa.

LÖNNERDAL et al. (1999) verificaram, em estudo com macacos, que a absorção de zinco no primeiro mês foi maior (36%) em fórmula de soja com baixo teor de fitato do que em fórmula com teor regular de fitato (22%). Em outro estudo, estes autores reportaram que em ratos recém-desmamados a absorção de zinco foi significativamente maior em fórmulas de soja com baixo teor de fitato (78%) do que em fórmula de soja com regular conteúdo de fitato (51%) e que a adição de proteína hidrolisada não apresentou nenhum efeito significativo.

KHAN e WEAVER (1989) reportaram que em ratos alimentados com dieta basal de caseína ocorreu redução da absorção de ^{65}Zn em períodos de adaptação mais prolongados, o que pode ser atribuído ao aumento do estado nutricional de zinco durante o período de adaptação, assim como à natural redução da absorção que ocorre com a idade. Neste estudo foram utilizados ratos em fase final de crescimento, o que pode ter influenciado os resultados, pois sabe-se que a idade e o período de adaptação são inversamente correlacionados com a absorção de zinco.

O zinco está presente em todos os órgãos, tecidos, fluidos e secreções do corpo. Cerca de 95% do total de zinco no corpo encontra-se dentro das células, e destes 90% está nos músculos esqueléticos e ossos (KING e KEEN, 1999). Assim, o zinco dos ossos é um parâmetro utilizado para medir o estado nutricional de zinco do corpo. Neste estudo, a retenção de ^{65}Zn no fêmur foi realizada com o intuito de compará-la com a retenção corporal total de ^{65}Zn , as quais foram significativamente correlacionadas pelo teste "t" de Student, para dados pareados ($p=0,00$). Porém, a contagem de corpo inteiro foi um indicador mais sensível da retenção de ^{65}Zn , pois detectou-se diferença na retenção de zinco entre as variedades de soja testadas com diferentes teores de zinco (9 e 30 ppm de zinco) e fitato. STUARD et al. (1986) também observaram que em ratos alimentados com dietas deficientes em zinco a retenção corporal total de ^{65}Zn foi

um indicador mais sensível na biodisponibilidade de zinco do que a retenção de ^{65}Zn na tíbia. Em dietas deficientes em zinco, o ^{65}Zn absorvido da dieta-teste marcada é preferivelmente usado nos tecidos moles, onde estes são essenciais para várias enzimas dependentes de zinco, e secundariamente o zinco parece ser incorporado na matriz óssea. Assim, desde que o zinco na tíbia não reflita o *pool* de zinco nos tecidos moles, este pode não ser um indicador confiável da absorção de ^{65}Zn de uma simples dieta-teste, embora tenha apresentado uma correlação significativa com a retenção corporal total neste estudo.

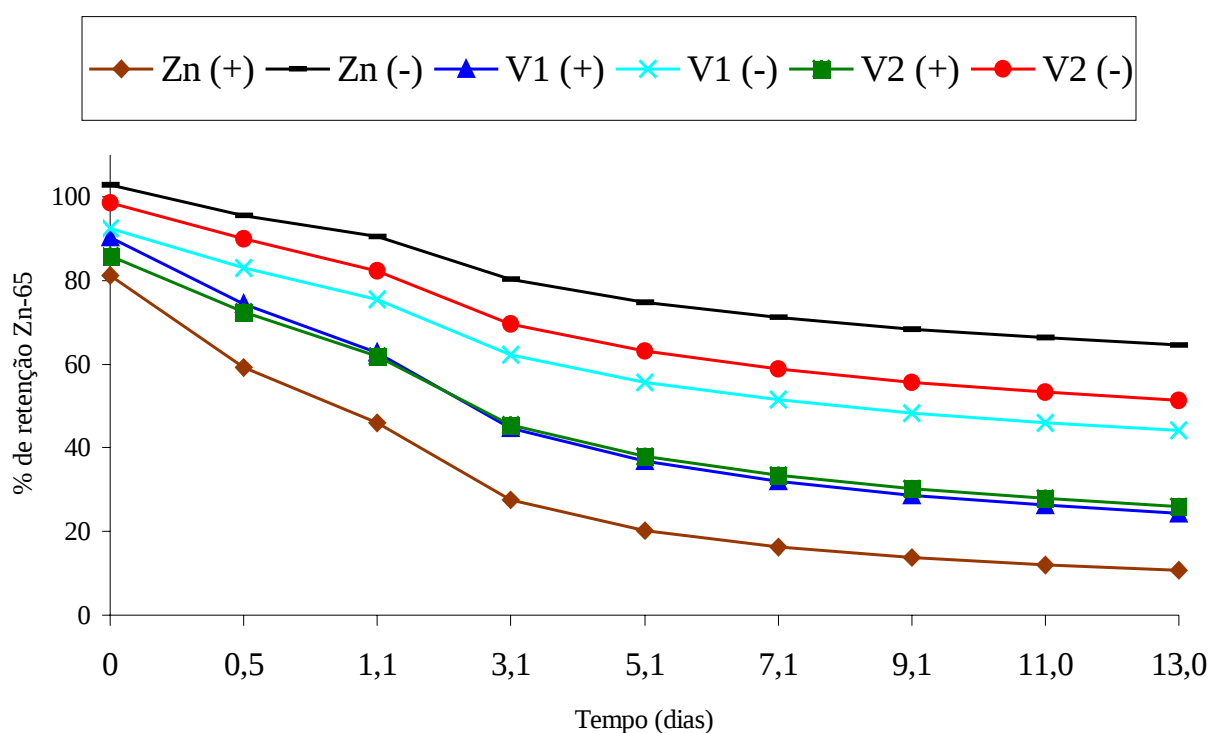


Figura 1 - Decaída do percentual de retenção de ^{65}Zn entre os grupos experimentais.

Tem sido reportado que a razão molar ácido fítico:zinco na dieta pode ser usada como um parâmetro para avaliar o efeito do ácido fítico na biodisponibilidade de zinco. Valores maiores que 10 têm sido associados com a

deficiência de zinco, reduzindo o crescimento, e a razão molar acima de 20 pode ser associada com evidências clínicas e químicas de deficiência de zinco (OBERLEAS e HARLAND, 1981; SOLOMONS, 1982). Neste experimento, a razão molar fitato:zinco para a nova variedade 1(UFV-116) foi de 31,37 e para a variedade comercial 2 (OCEPAR-19), de 23,73, sendo aproximadamente duas a três vezes maior que a recomendada. A diferença na razão molar entre as variedades estudadas pode explicar a maior retenção de zinco da OCEPAR-19.

Trabalhos realizados por FORDYCE et al. (1987) e GIBSON et al. (1991) demonstraram que a razão molar ácido fítico x cálcio: zinco é o melhor parâmetro para avaliar a biodisponibilidade de zinco, pois concentrações elevadas de cálcio na dieta levam à neutralização das cargas negativas do fitato que inibe a absorção de zinco. Neste estudo, a razão molar foi de 0,16 para UFV-116 e 0,10 para OCEPAR 19. SAHA et al. (1994) verificaram que a significativa redução da absorção de zinco foi observada quando a razão molar foi igual ou superior a 0,13, em ratos alimentados com farelo de trigo com diferentes níveis de fitato. Segundo os autores, o conteúdo total de fitato na dieta é o melhor indicador da absorção de zinco que a razão molar de fitato:zinco e fitato x cálcio: zinco, uma vez que grandes quantidades de zinco são secretadas nos fluidos pancreáticos e salivares, os quais reduzem a razão molar fitato:zinco. Neste estudo, tanto as razões molares fitato:zinco e fitato x cálcio: zinco quanto os níveis de fitato entre as variedades de soja explicam o efeito do fitato na redução da absorção de zinco entre as variedades de soja testadas.

O teor total de fibra alimentar de ambas as variedades foi de aproximadamente 2%. Por causa do baixo teor, provavelmente a fibra não interferiu na absorção de zinco. SANDSTROM et al. (2000) avaliaram o efeito da elevada ingestão de farelo de aveia na biodisponibilidade de zinco em humanos que receberam dieta à base de proteína animal, com baixo teor de fibra. A absorção de zinco foi maior e não afetada pela adição de farelo de aveia na dieta, o que levou a uma maior excreção endógena de zinco.

Pode-se concluir que os ratos que ingeriram dietas deficientes em zinco, à base de farinha de soja desengordurada ou clara de ovo, tiveram um aumento na absorção de zinco, quando comparados com os animais com dietas normais em zinco. A nova variedade com maior teor de fitato, sem lipoxigenases 2 e 3, apresentou redução na absorção de zinco ($p < 0,05$), quando comparada com a variedade comercial, OCEPAR-19. O melhoramento genético realizado com o objetivo de obter uma variedade com melhor sabor é de grande importância, entretanto deve-se preocupar com os fatores antinutricionais, como fitato, pois este pode afetar a absorção de zinco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Minerals and trace elements-Summary. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.S3, 1997.(Supl.1).
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J., HURRELL, R.F. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutrition Research Reviews**, v.9, p.295-324, 1996.
- FORDYCE, E.J., FORBES, R.M., ROBBINS, K.K., ERDMAN, J.W. Phytate X calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? **Journal of Food Science**, v.52, p.440-444, 1987.
- FRIEL, J.K., SERFASS, R.E., FENNESSEY, P.V., MILLER, L.V., ANDREWS, W.L., SIMMONS, B.S., DOWNTON, G.F., KWA, P.G. Elevated intakes of zinc in infant formulas do not interfere with iron absorption in premature infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.27, p.312-316, 1998.
- FRITZ, J.S., SCHENK, G.H. **Quantitative analytical chemistry**. 2^a ed., Boston: Allyn and Bacon, 1969. 528-531p.
- GIBSON, R.S., VANDERKOOY, P.D.S., THOMPSON, L. Dietary phytate X calcium/ zinc milimolar ratios and zinc nutriture in some Ontario preschool children. **Biological Trace Element Research**, v.30, p.87-94, 1991.
- GIBSON, R.S., YEUDALL, F., DROST, N., MTITIMUNI, B., CULLINAN, T. Dietary interventions to prevent zinc deficiency. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.68, p. 484-487, 1998.
- HEAT, D.A., HOEKSTRA, W.G. Zinc-65 absorption and turnover in rats.I. A procedure to determine the zinc-65 absorption and the antagonistic effect of calcium in a practical diet. **The Journal of Nutrition**, v.85, p.367-374, 1965.
- HUNT, J.R., GALLAGHER, S.K., LYKKEN, G. High versus low meat diets: effects on zinc absorption, iron status, and calcium, copper, iron, magnesium, manganese, nitrogen, phosphorus, and zinc balance in postmenopausal women. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.62, p. 621-632, 1995.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**. 3. ed. São Paulo: 1985. v 1, 533p.

- KHAN, A., WEAVER, C.M. Bioavailability of zinc to rats from soybeans and casein as affected by protein source and length of adaptation. **Nutrition Research**, v.9, p.327-336, 1989.
- KING, J.C. Assessment of zinc status. **The Journal of Nutrition**, v.120, p.1474-1479, 1990.
- KING, J.C., KEEN, C.L. Zinc. In: SHILLS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1999. 223-237p.
- LEI, X., KU, P.K., MILLER, E.R., ULLREY, D.E., YOKOYAMA, M.T. Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. **The Journal of Nutrition**, v.123, p. 1117-1123, 1993.
- LÖNNERDAL, B., BELL, J.G., HENDRICKX, A.G., BURNS, R.A., KEEN, C.L. Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula. **Am. J. Clin. Nutr.** v.48, p.1301-1306, 1988.
- LÖNNERDAL, B., CEDERBLAD, A., DAVIDSSON, A., SANDSTRÖM, B. The effect of individual components of soy formula and cows'milk formula on zinc bioavailability. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.40, p.1064-1070, 1984.
- LÖNNERDAL, B., JAYAWICKRAMA, L., LIEN, E.L. Effect of reducing the phytate content and of partially hydrolyzing the protein in soy formula on zinc and copper absorption and status in infant rhesus monkeys and rat pups. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.69, p.490-496, 1999.
- MEYER, N.R., STUART, M.A , WEAVER, C.M. Bioavailability of zinc from defatted soy flour, soy hulls and whole eggs as determined by intrinsic and extrinsic labeling techniques. **The Journal of Nutrition**, v.113, p.1255-1264, 1983.
- O'DELL, B.L. Personal reflections on a galvanizing trail. **Annual Review of Nutrition**, v.18, p. 1-18, 1998.
- ORBELEAS, D. HARLAND, B.F. Phytate content of foods: effect on dietary zinc bioavailability. **Journal American of Dietetic and Association**, v.79, p.433-436, 1981.
- RUDLOFF, S., LÖNNERDAL, B. Calcium and zinc retention from protein hydrolysate formulas in suckling rhesus monkeys. **AJCD**, v.146, p.588-591, 1992.

- SAHA, P.R., WEAVER, C.M., MASON, A.C. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. **American Chemical Society**, v.42, p.2531-2535, 1994.
- SANDSTRÖM, B., BÜGEL, S., McGAW, B.A., PRICE, J., REID, M.D. A high oat-bran an intake does not impair zinc absorption in humans when added to a low-fiber animal protein-based diet. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.594-599,2000.
- SANDSTROM, B., SANDBERG, A. S. Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. **Journal of Trace Elements Electrolytes in Health Disease**, v.6, p.99-103, 1992.
- SIAN, L., MINGYAN, X., MILLER, L.M., TONG, L., KREBS, N.F., HAMBIDGE, K.M. Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young Chinese women with marginal zinc intakes. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.63, p.348-353, 1996.
- SOLOMONS, N.W. Biological availability of zinc in humans. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.35, p.1048-1075, 1982.
- STUART, S.M., KETELSEN, S.M., WEAVER, C.M., ERDMAN, J.W. Bioavailability of zinc to rats as affected by protein source and previous dietary intake. **The Journal of Nutrition**, v.116, p.1423-1431, 1986.
- WHITTAKER, P. Iron and zinc interactions en humans. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.68, p.442-446S, 1998.
- WOOD, R.J., ZHENG, J.J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.65, p.1803-1809, 1997.
- ZHOU, J.R., FORDYCE, E.J., RABOY, V., DICKINSON, D.B., WONG, M.S., BURNS, R.A., ERDMAN, J.W. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 122, p.2466-2473, 1992.

APÊNDICE

Quadro 1 - Nuclídeo: _____ $\frac{1}{2}$ vida: _____ Código: _____

Data	Tempo (horas)	BKG (CPM)	Total de Counts (CPM)

Quadro 2 - Declínio do percentual de retenção de ^{65}Zn em ratos alimentados com farinha de soja desengordurada de diferentes variedades de soja e clara de ovo em pó

Tempo	Zn (+)	Zn (-)	V1 (+)	V1 (-)	V2 (+)	V2 (-)
0	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00
0,5	76,60 ± 8,43	96,45 ± 2,21	89,22 ± 14,78	79,68 ± 11,33	81,69 ± 27,85	92,67 ± 17,8
1	43,16 ± 9,49	96,49 ± 6,35	60,61 ± 9,52	76,18 ± 13,26	54,40 ± 5,23	82,11 ± 4,16
3	18,66 ± 3,93	80,05 ± 8,77	37,52 ± 7,25	60,54 ± 12,98	38,98 ± 4,85	67,85 ± 5,85
5	16,31 ± 3,18	74,85 ± 12,48	33,80 ± 7,66	55,31 ± 12,54	35,32 ± 4,75	62,04 ± 5,50
7	14,78 ± 1,43	63,31 ± 8,48	27,16 ± 6,60	43,24 ± 7,96	30,42 ± 24,48	55,78 ± 14,89
9	14,70 ± 2,65	70,51 ± 13,53	30,62 ± 7,27	50,89 ± 11,68	31,12 ± 4,20	57,01 ± 5,17
11	14,09 ± 2,62	67,83 ± 12,33	29,54 ± 7,09	49,24 ± 11,39	30,21 ± 3,96	54,23 ± 4,71
13	13,67 ± 2,56	67,34 ± 12,45	28,82 ± 7,17	47,95 ± 10,74	29,31 ± 3,79	52,39 ± 4,71

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

Quadro 3 - Ganho de peso dos animais durante o período experimental (n=10).

Dietas	Peso Inicial	Peso Final	Ganho de Peso
Zn (+)	198,7 ± 9,71	319,8 ± 16,35	121,1 ± 23,14 ^{ns}
Zn (-)	197,80 ± 9,98	317,90 ± 13,49	120,10 ± 12,28 ^{ns}
V1 (+)	195,2 ± 8,02	310,2 ± 20,97	115 ± 14,48 ^{ns}
V1 (-)	199,7 ± 8,92	317,20 ± 11,98	117,50 ± 11,02 ^{ns}
V2 (+)	197,50 ± 7,26	318,70 ± 17,91	121,20 ± 16,60 ^{ns}
V2 (-)	197,00 ± 7,92	314,70 ± 18,35	117,70 ± 17,06 ^{ns}

As médias diferem entre si pelo teste F, por contraste, a 5% de probabilidade, e ns= não-significativo a 5% de probabilidade.

Zn (+) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 30 ppm de zinco).

Zn (-) - Controle (adicionado de sulfato de zinco, fornecendo 9 ppm de zinco).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 30 ppm de zinco.

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 9 ppm de zinco.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 30 ppm de zinco.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 9 ppm de zinco.

CAPÍTULO 4

Avaliação da biodisponibilidade de ferro de variedades de soja em ratos

1. INTRODUÇÃO

A anemia tem sido reconhecida como um problema que afeta uma significativa proporção da população do mundo, em todas as idades. Entretanto, sua prevalência varia amplamente, com as maiores taxas em regiões menos desenvolvidas. A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia, afetando em torno de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, sendo mais prevalente em bebês, crianças, gestantes e lactantes (BOTHWELL, 1995; HURRELL, 1997).

O ferro é o quarto elemento e o segundo metal mais abundante na superfície da Terra. Entretanto, ele se encontra quase exclusivamente no estado oxidado (Fe^{+3}), logo sua reduzida biodisponibilidade pode explicar a alta prevalência de deficiência de ferro (BOTHWELL, 1995). A biodisponibilidade de ferro é definida como a quantidade de ferro ingerida e que é absorvida e utilizada em funções metabólicas normais. Como pouco ou nenhum ferro é excretado, a absorção é sinônimo de biodisponibilidade (HURRELL, 1997).

O ferro dietético consiste de ferro heme, encontrado no músculo de vaca, porco, galinha, peixe e em outros tipos de carnes. Sua absorção é de três a cinco vezes maior que em alimentos que contêm ferro não-heme, como nos vegetais, nos cereais e nas leguminosas (LAYRISSE e GARCÍA-CASAL, 1997). A fonte dietética de ferro influencia bastante a eficiência de sua absorção. A quantidade de ferro absorvida varia de menos de 1% para mais de 20%, dependendo do alimento. Alimentos de origem vegetal são menos absorvidos, sendo esta absorção intermediária para leite e derivados e maior para carne, porque seu ferro heme é mais bem absorvido (YIP, 1997).

O ferro heme e não heme são absorvidos por duas vias no organismo. O ferro heme é absorvido pelas células da mucosa intestinal na forma intacta, no complexo ferro-porfirina, e sua absorção quase não é influenciada por fatores dietéticos e nem pelos níveis de ferro do indivíduo. Por outro lado, a absorção de ferro não-heme é influenciada por fatores dietéticos e fisiológicos (FAIRBANKS, 1999). A absorção de ferro não-heme pode variar de 2% em

indivíduos normais que consumiram dieta de baixa biodisponibilidade a 20% em indivíduos deficientes consumiram uma dieta de alta biodisponibilidade. Por outro lado, a biodisponibilidade de ferro heme é similar em indivíduos normais (de 15 a 25%) e deficientes em ferro (de 25 a 35%) (CARPENTER e MAHONEY, 1992; LAYRISSE e GARCÍA-CASAL, 1997).

A biodisponibilidade de ferro na dieta depende não somente de seu conteúdo de ferro heme e não-heme e de sua biodisponibilidade de ferro, mas do balanço entre o número de promotores e redutores de sua absorção. Entretanto, essas influências parecem ser mais importantes em dietas que contêm um simples alimento ou poucos alimentos, como consumido em regiões subdesenvolvidas do mundo, do que em regiões desenvolvidas com vários componentes na dieta, provavelmente pelo fato de os promotores e inibidores da absorção de ferro estarem diluídos numa dieta mista (BENITO e MILLER, 1998; BAYNES e STIPANUK, 2000).

Os principais ligantes dos alimentos que aumentam a absorção de ferro não-heme parecem ser os ácidos orgânicos, incluindo o ácido ascórbico, cítrico, málico e láctico em estudos que utilizam um simples alimento, mas sua significância em dietas mistas é menos clara. O efeito da ingestão crônica de altas doses de vitamina C ou suplementos de multivitaminas não apresentou qualquer efeito do ácido ascórbico no nível de ferro em indivíduos que consomem dieta mista. Conseqüentemente, o impacto desses ácidos orgânicos no balanço de ferro a longo prazo, em indivíduos que consomem dieta mista, parece ser modesto. Seu efeito pode ser mais pronunciado em populações que consomem dietas com pouca variedade e constituídas por alimentos de baixa biodisponibilidade (BAYNES e STIPANUK, 2000). O ácido ascórbico pode promover condições ácidas dentro do estômago, podendo o ferro da dieta ser facilmente solubilizado. O ferro no estado férrico pode ser reduzido para estado ferroso, tornando-o solúvel. O ácido ascórbico pode formar quelatos com o íon férrico solubilizado dentro do estômago, conseqüentemente mantendo a

solubilidade do íon férrico quando o alimento entra no pH alcalino do intestino delgado (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

A carne pode aumentar a absorção de ferro não-heme pela estimulação da produção de ácido gástrico, promovendo a solubilização de ferro dentro do estômago. A secreção de suco gástrico é dependente da quantidade de proteína alimentar ou aminoácidos e da fonte protéica (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Um grande número de ligantes inibitórios da absorção de ferro é encontrado nos alimentos. Dentre eles podem ser citados fitato, polifenóis, cálcio e fibra alimentar. Os fitatos são amplamente distribuídos em vários grãos e vegetais e limitam a absorção de ferro pela formação do complexo fitato diférrico e tetraférrico. Os polifenóis são amplamente distribuídos em vários vegetais e são encontrados em bebidas como chá e café. Em estudos em que são utilizadas simples refeições-testes, os polifenóis e o fitato inibem significativamente a absorção de ferro, mas seus efeitos numa dieta mista não são bem definidos. O cálcio pode também inibir a absorção de ferro. Seu efeito depende da quantidade, do tamanho e da composição da refeição, sendo mais proeminente quando a refeição é relativamente de baixa biodisponibilidade e em refeições simples, como pães. Certos componentes da fibra alimentar podem causar modesta redução na absorção de ferro não-heme (FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996; BAYNES e STIPANUK, 2000). Entretanto, a principal contribuição para inibição da absorção de ferro parece ser a presença de outras substâncias encontradas, associadas com a fibra da dieta, como fitato e polifenóis (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Em leguminosas, como a soja, o ácido fítico está presente no corpo da proteína do endosperma. Este pode ser concentrado quando a proteína é isolada para adição em produtos manufaturados. HURRELL et al. (1992) verificaram que a absorção de ferro aumentou de quatro a cinco vezes quando o ácido fítico no isolado protéico de soja foi removido enzimaticamente, antes de alimentar indivíduos com uma fórmula líquida.

A soja é a leguminosa que tem a maior quantidade de proteína, portanto é muitas vezes utilizada como fonte protéica alternativa para lactentes e crianças. Entretanto, ela diminui a biodisponibilidade do ferro não-heme (ANGELIS e CTENAS, 1993). A média de absorção de ferro a partir de produtos de soja é de 0,46%, enquanto a partir da albumina do ovo é de 2,49% e de caseína é de 2,74% (COOK et al., 1981).

A soja é extensivamente utilizada em alimentos vegetarianos, em produtos cárneos, em produtos de padaria e em produtos derivados de leite. As fórmulas infantis à base de soja têm aumentado significativamente, e produtos de proteína de soja são também os principais componentes de alimentos utilizados em programas de suplementação em países subdesenvolvidos (LYNCH et al., 1994).

Como a maior fonte de ingestão alimentar da população carente vem de alimentos que contêm ferro não-heme, torna-se importante estudar a sua biodisponibilidade. Assim, estudos de biodisponibilidade de ferro em soja são de grande importância, uma vez que ela é amplamente utilizada na alimentação infantil e vegetariana e no combate à desnutrição. Este trabalho foi conduzido com o intuito de avaliar a absorção de ferro de uma nova variedade de soja (UFV-116), em comparação com uma variedade comercial (OCEPAR-19), na forma de farinha de soja desengordurada, pela técnica de marcação extrínseca com ^{59}Fe , avaliando seu percentual de retenção corporal total, em ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com os animais foi realizado no *Animal Facility*, Department of Foods and Nutrition, Purdue University, IN, USA.

2.1. Modelo experimental

Foram utilizados 54 ratos machos *Sprague Dawley* (Halan, Indianápolis - IN), com peso inicial entre 150 e 170 g. Os animais foram pesados e divididos

aleatoriamente em seis grupos de nove ratos e alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável. A temperatura foi controlada para 25°C e foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12 horas.

Doze dias antes de receberem as dietas- teste, os ratos receberam uma dieta de adaptação, com o objetivo de padronizar os níveis de ferro do organismo com uma dieta que fornecia $16,54 \pm 0,89$ % de proteína, 7% de lipídio e 25 ppm de ferro ($0,137 \pm 0,006$ mg Fe/g de isolado protéico de soja) (Quadro 1). Assim, um isolado protéico de soja foi utilizado como fonte de ferro e proteína.

Os animais foram deixados em jejum por um período de 16 horas, após o qual receberam 3 g de dieta experimental, durante três dias consecutivos, com a finalidade de adaptar os animais a consumir em a porção de 3 g. Um dia antes de receberem as dietas-teste, foi seccionado um pequeno segmento da porção terminal da cauda de cada animal, para medir os níveis de hematócrito e hemoglobina. Os ratos foram distribuídos em grupos, de modo que apresentassem similar peso corporal, hemoglobina e hematócrito.

Após a adaptação e 16 horas de jejum, quatro ratos de cada grupo receberam uma dose de 3 g de dieta, contendo $0,2\mu\text{Ci}$ de $^{59}\text{FeCl}_3$ /g de farinha de soja desengordurada ou caseína. No dia seguinte, o restante dos animais recebeu a porção de 3 g da dieta-teste. Após a ingestão das dietas-teste, os ratos foram removidos das gaiolas e colocados individualmente em contador de corpo inteiro, para medir a retenção de ^{59}Fe , contanto a atividade de ^{59}Fe (cpm), utilizando janelas 6×6 *weel crystal Whole-body gamma counter Harshaw Type NaI (TI)*, acoplado com um detector Canberra série 30 *multichannel analyser*, localizado no *Radiological and Environmental Management Laboratory of Purdue University*. As dietas-teste marcadas com ^{59}Fe foram medidas regularmente, antes de contar os animais para corrigir o background e a decaída do radioisótopo. Após a contagem, eles foram colocados em suas gaiolas e permitidos ingerir, *ad libitum*, a mesma dieta utilizada no período de adaptação, até o final do experimento. A radioatividade do corpo inteiro também foi medida nos dias 1, 3, 5, 7 e 9, para determinar a porcentagem de retenção de ^{59}Fe .

A divisão dos animais de um mesmo grupo experimental para receberem a porção de 3 g de dieta-teste marcada radioativamente foi para assegurar que os ratos não eliminassem o marcador radioativo pelas fezes e pela urina, antes da primeira contagem. Com isto, reduziu-se a diferença do tempo de contagem da dose retida entre o primeiro e o último animal, no tempo zero.

O peso corporal dos animais foi monitorado no começo do experimento, antes de receberem as dietas-teste, e no final do experimento.

Quadro 1- Composição da dieta de adaptação

Ingredientes	(g/100 g)
Isolado protéico de soja	18,3
Amido de milho	41,2
Amido de milho dextrinizado	13,2
Açúcar	10,0
Fibra	5,0
Óleo de milho	7,0
Mistura mineral sem Fe, AIN-93G	3,5
Mistura vitamínica, AIN-93G	1,0
L-cistina	0,3
L-metionina	0,3
Bitartarato de colina	0,3
Ferro (mg)	2,5

2.2. Preparo das dietas-teste

O marcador radioativo, Fe^{59} , foi adicionado na fonte protéica de cada dieta-teste. Assim, a farinha de soja desengordurada e a caseína em pó foram diluídas em água deionizada, até a formação de um líquido viscoso. Em seguida, adicionou-se a dose de Fe^{59} estimada ($0,2\mu\text{Ci}$ de $^{59}\text{FeCl}_3/\text{g}$ de farinha de soja desengordurada ou caseína). Na caseína, também adicionou-se a fonte de ferro, uma solução de sulfato ferroso com 12 ou 25 ppm de ferro (considerando para o cálculo da solução, que em 15g de sulfato ferroso contém 3 g de ferro). Após a homogeneização, as amostras foram secas em *freeze dryer*. Após a secagem, as

amostras foram maceradas em cadinho de porcelana, reconstituídas no formato de pó, tendo sido adicionados os outros ingredientes de acordo com a dieta AIN 93G (Quadro 2). Antes do preparo das dietas-teste, analisou-se a radioatividade das fontes protéicas no contador gama *Beckman 4000 counting system* com eficiência de 48 %.

Quadro 2- Composição das dietas-teste (g/3g)

Ingredientes/Dietas	Fe (+)	Fe (-)	V1 (+)	V1 (-)	V2 (+)	V2 (-)
Caseína	0,80	0,80		0,41	0,06	0,45
Farinha de soja desengordurada			1,35	0,65	1,29	0,62
Amido de milho	0,98	0,98	0,43	0,72	0,44	0,72
Amido de milho dextrinizado	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Açúcar	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Fibra	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Óleo de milho	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Mistura mineral, sem Fe, AIN-93G	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Mistura vitamínica, AIN-93G	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
L-cistina	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
L-metionina	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Bitartarato de colina	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ferro (mg)	0,08	0,04	0,08	0,04	0,08	0,04
FeS04 (mg)	0,37	0,18	-	-	-	-

Fe (+) – Controle (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 25 ppm de ferro).

Fe (-) – Controle, (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 12 ppm de ferro).

V1(-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 12 ppm de ferro.

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 25 ppm de ferro

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 12 ppm de ferro.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 25 ppm de ferro.

2.3. Análise das dietas-teste e de adaptação

As amostras das dietas-teste e de adaptação foram secas em estufa a vácuo (70 °C, por uma noite), pesadas e colocadas em mufla (a 300 °C por 6 horas e, após, a 600 °C por três dias). As cinzas foram dissolvidas em 2,5% HNO₃,

diluídas com lantânio a 0,5%, como LaCl_3 em 2,5% HNO_3 , e analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica *Perkin Elmer (Norwalk, CT, 5100 PC)*.

As farinhas de soja utilizadas foram desengorduradas conforme o procedimento descrito nas Normas Analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), em aparelho de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente extrator.

As dietas-teste e de adaptação foram analisadas quanto ao teor de proteína, pelo método macro-kjeldahl, segundo FRITZ e SCHENK (1969).

2.4. Determinação de hemoglobina e hematócrito

Os níveis de hemoglobina sangüínea foram determinados pelo método de cianeto de metahemoglobina " Sigma Chemical Co", proposto pela AOAC (1984), e o hematócrito foi determinado utilizando tubos capilares de microhematócrito heparinizados. Colocou-se a cauda do rato em um recipiente de água morna e, em seguida, seccionou-se um pequeno segmento da porção terminal da cauda de cada animal, tendo o sangue sido rapidamente coletado nos tubos heparinizados, preenchendo três quartos de seu volume total para análise do hematócrito. Foram pipetados 20 μL de sangue diretamente da cauda do animal e colocou-se em tubos de ensaio que continham 5mL de uma solução de cianeto e ferrocianeto de potássio (solução de Drabkin). Nesse método, o íon ferroso (Fe^{+2}) foi obtido pelo cianeto ionizado, formando cianeto de metahemoglobina, cuja concentração foi medida a 540 nm, em espectrofotômetro.

2.5. Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio dos programas SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) e o Statística. Os dados qualitativos foram analisados pelo teste F, por ANOVA, a 5% de probabilidade. Utilizou-se contraste para avaliar as diferenças entre as médias dos tratamentos. Para os

dados quantitativos utilizou-se teste F, por ANOVA, seguido da análise de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biodisponibilidade de ferro de dietas-controle adicionadas de caseína e sulfato ferroso e de dietas-teste que continham farinha de soja desengordurada, com níveis normais e deficientes em ferro, foi estudada, utilizando a técnica de marcação extrínseca, ^{59}Fe , em que o marcador foi adicionado na fonte protéica. O método que utiliza marcador extrínseco é baseado na demonstração de que o ferro marcado extrínseco e ou intrinsecamente é similarmente absorvido em uma ampla variedade de alimentos (COOK et al., 1972), indicando que existe quase completa troca de ferro em simples *pool* de ferro não-heme (HALLBERG et al., 1974; JOHNSON et al., 1987). Entretanto, WEAVER et al. (1984) reportaram que a técnica de marcação extrínseca pode estar associada a um erro de 20% na estimativa da biodisponibilidade de ferro. Segundo MONSEN (1974), o marcador extrínseco entra no *pool* solúvel de ferro não-heme e pode servir para estimar a extensão da absorção de ferro daquele *pool*.

Neste estudo, os animais não foram submetidos a um período de depleção, pois, conforme reportado em outros estudos, em ratos anêmicos, com dieta de depleção e repleção de hemoglobina, a absorção de ferro foi superestimada (ROTRUCK e LUHRSEN, 1979; WEAVER et al., 1984; HURRELL, 1997). O nível de ferro do organismo é um dos mais importantes fatores fisiológicos que afeta a absorção de ferro. Esta absorção aumenta em resposta à depleção dos estoques de ferro do corpo, e vice-versa (BENITO e MILLER, 1998).

A absorção de ferro, quando medida por técnicas que utilizam ferro radioativo em animais, normalmente envolve a depleção dos animais com dieta basal que contém caseína como fonte protéica, seguido de uma dieta-teste marcada radioativamente (WELCH e VANCAMPEN, 1975). Utilizou-se, neste estudo, isolado protéico de soja como fonte de proteína, na dieta de adaptação,

para facilitar a ingestão da dieta-teste à base de farinha de soja desengordura, já que os estudos reportados por JOHNSON e WEAVER (1983) mostram que o tipo de proteína dietética em dietas pré-testes tem pouca influência nas medidas de absorção de ferro.

Após 12 dias de dieta de adaptação com níveis normais de ferro (25 ppm), os níveis de hemoglobina e hematócrito dos animais não apresentaram diferença significativa (Quadros 3 e 4).

No Quadro 5 está o teor de ferro das dietas-teste. As dietas das variedades de soja com menor teor de ferro apresentaram 16 ppm e as dietas com maior teor de ferro apresentaram aproximadamente 24 ppm.

Embora os ratos de diferentes grupos experimentais tenham recebido uma mesma dieta durante o período de adaptação e o experimental, diferindo apenas na ingestão da dieta-teste, houve diferença de ganho de peso quando os grupos experimentais foram comparados. Foi observada uma diferença significativa entre os grupos alimentados com dietas-teste de soja (16 ppm de ferro) e entre o grupo controle, Fe (-) e testes com mesmo nível de ferro (16 ppm). Não foi observada diferença significativa no ganho de peso dos animais entre os grupos que ingeriram dietas-teste de soja, UFV-116 e OCEPAR-19, com nível de aproximadamente 24 ppm de ferro. O mesmo foi observado ao comparar o grupo-controle, Fe (+) e testes com mesmo nível de ferro (~24 ppm) (Quadros 3 e 4). Essas diferenças de ganho de peso não eram esperadas, visto que os grupos experimentais receberam apenas 3 g de dietas-teste com diferentes níveis e fontes de ferro e proteína (caseína ou soja), sendo o restante da dieta consumido, semelhante para todos os grupos. JOHNSON et al. (1987) observaram que o aumento de peso e do consumo alimentar em ratos com dieta de repleção por 11 dias (12 para 25 ppm de ferro), nos grupos que receberam sulfato ferroso, pode ser atribuído à sua elevada biodisponibilidade e ao potencial biológico do sulfato ferroso.

Analisando as dietas-teste, pode-se observar que os teores de proteínas entre os grupos experimentais apresentaram diferenças pequenas, embora

significativas ($p < 0,05$) (Quadros 3 e 4). Sabe-se que dietas com baixos teores de proteína afetam a absorção e a retenção de ferro (FITCH et al., 1964). JOHNSON e WEAVER (1983) verificaram que o ferro total absorvido de refeições-teste à base de farinha de soja foi maior em ratos recém-nascidos que recebiam dieta que continha proteína animal (caseína ou galinha) do que ratos recém-nascidos alimentados com dieta que continha proteína vegetal (soja e trigo), mas a diferença não foi estatisticamente significativa. A absorção de ferro de farinha de soja desengordurada não foi significativamente diferente da farinha de soja desengordurada não-autoclavada. Os resultados indicaram que o tipo de proteína na dieta pré-teste possui pouca influência na absorção de ferro, em uma simples dieta-teste.

O percentual de dose retida e absorvida de ^{59}Fe no corpo inteiro dos animais foi significativamente menor em ratos alimentados com dietas deficientes e normais em ferro de sulfato ferroso nos grupos controles e significativamente maior em ratos alimentados com dietas normais e deficientes em ferro da variedade 1, UFV-116, e variedade 2, OCEPAR-19. Tal fato ocorreu em virtude de o teor de ferro da dieta-controle ser acidentalmente 100 vezes superior ao da dieta-teste. A porcentagem de ferro absorvida cai com o aumento da ingestão de ferro, e a absorção de ferro aumenta em resposta à depleção dos estoques de ferro corporal, e vice-versa (LAYRISSE e GARCÍA-CASAL, 1997; BENITO e MILLER, 1998). Neste estudo, embora todos os animais apresentassem os níveis parcialmente repletados de hemoglobina e hematócrito, a dose de ferro oferecida na dieta controle foi 100 vezes maior que das dietas-teste, o que levou à redução do percentual de dose retida e absorvida de ^{59}Fe .

Calculou-se o percentual de retenção e absorção corporal de ^{59}Fe a partir da equação de regressão linear da transformação logarítmica do percentual de absorção e do tempo obtidos a partir de cada tratamento (Quadros 5 e 7). A curva do percentual de absorção apresentou uma rápida redução do dia zero ao dia cinco, aproximadamente, e após o quinto dia de ingestão da dose radioativa a curva tendeu a uma linearidade, considerando que o ^{59}Fe não-absorvido tenha

sido excretado. Assim, a extrapolação da porção linear da curva, para o eixo y, obtida pela decaída do isótopo ingerido pelos animais para o tempo zero, representa o porcentual de ^{59}Fe absorvido (Figura 1).

Quadro 3 - Níveis de hemoglobina e hematócrito dos ratos após a ingestão da dieta de adaptação por 12 dias, ganho de peso dos ratos durante o experimento e teor de proteína das dietas-teste*

Dietas	Hemoglobina (%)	Hematócrito (%)	Ganho de Peso (g)	Proteína (%)
Fe (+)	9,13 ± 0,9	40,72 ± 2,25	115,11 ± 10,88	21,95 ± 0,47
Fe (-)	9,01 ± 0,89	41,28 ± 2,75	115,33 ± 8,54	20,78 ± 0,42
V1 (+)	9,33 ± 0,82	41,50 ± 1,32	111,0 ± 12,20	22,04 ± 0,36
V1 (-)	9,00 ± 0,63	41,22 ± 1,56	109,89 ± 11,94	21,56 ± 0,41
V2 (+)	9,17 ± 1,2	43,28 ± 4,99	110,44 ± 15,01	23,04 ± 0,07
V2 (-)	9,10 ± 0,67	41,11 ± 1,92	99,44 ± 4,1	22,55 ± 0,21

*Média ± desvio-padrão.

Fe (+) – Controle (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 25 ppm de ferro).

Fe (-) – Controle, (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 12 ppm de ferro).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 25 ppm de ferro

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 12 ppm de ferro.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 25 ppm de ferro.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 12 ppm de ferro.

Quadro 4 - Grau de liberdade (GL) e quadrado médio (QM) dos contrastes para hemoglobina e hematócrito dos ratos após a ingestão da dieta de adaptação por 12 dias, ganho de peso dos ratos durante o experimento e teor de proteína das dietas-teste

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			Quadrado Médio	
		Hemoglobina	Hematócrito	Ganho de Peso	GL	Proteína
Dietas	(5)	(0,1266) ^{ns}	(7,2740) ^{ns}	(300,5074)*	(5)	(1,8437)*
Fe(+) x V ₁ (+)V ₂ (+)	1	0,0847 ^{ns}	16,6667 ^{ns}	115,5741 ^{ns}	1	0,7138 *
Fe(-) x V ₁ (-) V ₂ (-)	1	0,0093 ^{ns}	0,0740 ^{ns}	682,6667*	1	3,2626 *
V ₁ (+) x V ₂ (+)	1	0,1057 ^{ns}	14,2222 ^{ns}	1,3889 ^{ns}	1	1,4954*
V ₁ (-) x V ₂ (-)	1	0,0446 ^{ns}	0,0556 ^{ns}	490,8889*	1	1,46218*
V ₁ (+) V ₁ (-) x V ₂ (+) V ₂ (-)	1	0,0064 ^{ns}	6,2500 ^{ns}	272,2500 ^{ns}	1	2,9574 *
Resíduo	48	0,7885 ^{ns}	7,5752 ^{ns}	120,7963	12	0,1242

As médias diferem entre si pelo teste F, por contraste, a 5% de probabilidade; ns= não-significativo a 5% de probabilidade.

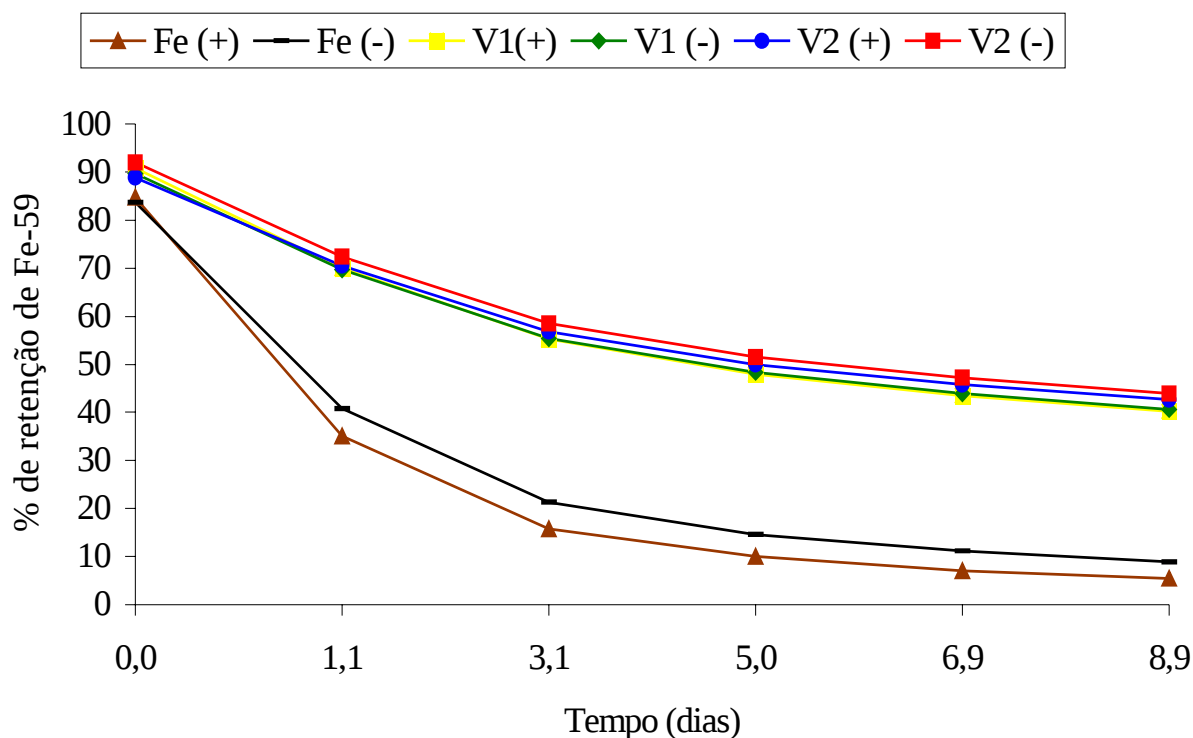


Figura 1 - Decaída do percentual de retenção de ^{59}Fe entre os grupos experimentais.

O percentual de retenção e absorção de ^{59}Fe no corpo inteiro dos animais foi maior ($p < 0,05$) nos ratos alimentados com dietas que tinham ferro da variedade 2, OCEPAR -19, quando comparado com os ratos que receberam dieta com ferro da variedade 1, UFV-116, nos níveis normais e deficientes de ferro (Quadros 5 e 6). A variedade 1 (UFV-116), que possui nível maior de fitato (1,33%), promoveu retenção de ferro menor ($p < 0,05$) do que a variedade comercial, 2 (OCEPAR-19), com teor de fitato de 1,03%, entre os grupos alimentados com farinha de soja desengordurada com dietas deficientes ou normais em zinco (Quadros 6 e 7). A Figura 1 apresenta a decaída do traçador ^{59}Fe entre os grupos experimentais, do dia zero ao dia nove.

LYNCH et al. (1994) verificaram que a absorção de ferro de isolado protéico de soja foi 18 vezes menor que a do isolado protéico de soja tratado com

enzima para retirada do fitato. Quando isolaram as frações de glicina e conglícina da soja, verificaram que estas reduziram a absorção de ferro. A redução de fitato da fração de glicina (11S) e conglícina (7S) diminuiu o efeito inibitório da absorção de ferro da glicina, e não da conglícina. Assim, os autores concluíram que os dois fatores inibitórios principais na absorção de ferro são o ácido fítico e a proteína da fração da conglícina. Por outro lado, BEARD et al. (1988) não reportaram efeito do conteúdo elevado e baixo de fitato (1,74 e 0,85, respectivamente) e variado teor de fósforo na absorção de ferro, em ratos que receberam soja marcada intrinsecamente com ferro radioativo. O mesmo foi observado em humanos, quando o conteúdo de fósforo e fitato foi alterado. Segundo esses autores, não é possível excluir a influência inibitória do conteúdo de fosfato e fitato na absorção de ferro não-heme da soja, em ratos e humanos, porque a influência é relativamente independente da concentração de fitato quando o *threshold* é alcançado.

HURRELL et al. (1992) mediram a absorção de ferro em uma fórmula líquida hidrolisada que continha amido de milho, óleo de milho e clara de ovo ou uma série de isolado protéico de soja com diferentes conteúdos de fitato em humanos. Foi verificado que a absorção de ferro aumentou de quatro a cinco vezes quando ácido fítico foi reduzido de 4,9 a 8,4 para menos que 0,01 mg/g de isolado protéico de soja. Até mesmo uma quantidade residual pequena de ácido fítico foi inibitória, e esta foi reduzida para menos de 0,3 mg/g de isolado para se observar um aumento significativo da absorção de ferro, considerando neste estudo que o ácido fítico é o principal fator inibitório na absorção de ferro.

SHAW et al. (1995) verificaram, em seus estudos com jovens chineses que ingeriram dieta não-vegetariana e vegetariana, que a dieta vegetariana rica em produtos de soja limitou a biodisponibilidade de ferro, não sendo adequada para manter o balanço de ferro em homens e mulheres. HUH et al. (1999) observaram que a casca da soja, que possui 32% do ferro total da semente, apresentou elevada biodisponibilidade de ferro em ratos normais e anêmicos, sendo portanto uma efetiva fonte de suplementação de ferro.

Quadro 5 - Retenção e absorção de ^{59}Fe no corpo inteiro de ratos alimentados com dietas de farinhas de soja desengorduradas e caseína, extrinsecamente marcadas com $^{59}\text{FeCl}_3^{**}$

Dietas	Dieta-teste	Dieta-teste	Ferro	^{59}Fe corpo	Inteiro	Ferro
	Ferro (mg/g)	consumida (g)	consumido (mg)	Retenção (%)	Absorção dose (%)	absorvido* (mg)
Fe (+)	3,193	2,54 ± 0,48	8,104 ± 1,517	5,44 ± 0,08	16,0	1,297
Fe (-)	1,666	2,83 ± 0,21	4,714 ± 0,354	8,93 ± 0,09	21,0	0,99
V1 (+)	0,024	2,96 ± 0,07	0,071 ± 0,002	40,70 ± 0,13	60,0	0,043
V1 (-)	0,016	2,97 ± 0,08	0,048 ± 0,001	40,17 ± 0,11	59,5	0,028
V2 (+)	0,023	2,72 ± 0,32	0,063 ± 0,007	43,91 ± 0,09	62,0	0,039
V2 (-)	0,016	2,99 ± 0,04	0,048 ± 0,001	42,60 ± 0,12	61,0	0,029

*Total de ferro consumido x percentual de dose absorvida. **Média ± desvio-padrão.

Fe (+) – Controle (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 25 ppm de ferro).

Fe (-) – Controle, (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 12 ppm de ferro).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 25 ppm de ferro

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 12 ppm de ferro.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 25 ppm de ferro.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 12 ppm de ferro.

Quadro 6 - Grau de liberdade (GL) e quadrado médio (QM) dos contrastes para retenção e absorção de ^{59}Fe no corpo inteiro de ratos alimentados com dietas de farinhas de soja desengorduradas e caseína, extrinsecamente marcadas com $^{59}\text{FeCl}_3$

Fonte de Variação	Quadrado Médio				Quadrado Médio		
	GL	Dieta-teste Fe (mg/g)	GL	Dieta-teste Consumida (mg)	Ferro Consumido (mg)	Retenção de ^{59}Fe no Dia 13 (% Dose)	Ferro Absorvido* (mg)
Dietas	(5)	(5,3515)*	(5)	(0,2839)*	(107.1728)	(2909,678)	(3,034483)*
						*	
Fe(+) x V ₁ (+)V ₂ (+)	1	20,0975*	1	0,5541*	387,5674*	8152,646*	9,4636*
Fe(-) x V ₁ (-) V ₂ (-)	1	5,4625*	1	0,1320 ^{ns}	130,6708*	6318,602*	5,5447*
V ₁ (+) x V ₂ (+)	1	0,000001 ^{ns}	1	0,2520 ^{ns}	0,000318 ^{ns}	46,6341*	0,000065 ^{ns}
V ₁ (-) x V ₂ (-)	1	0,000044 ^{ns}	1	0,0016 ^{ns}	0,0000001 ^{ns}	26,4310*	0,000004 ^{ns}
V ₁ (+) V ₁ (-) x V ₂ (+) V ₂ (-)	1	0,000027 ^{ns}	1	0,1067 ^{ns}	0,000148 ^{ns}	71,6407*	0,000019 ^{ns}
Resíduo	12	0,0151	54	0,06454	0,4045	0,01064	0,0107

* As médias diferem entre si pelo teste F, por contraste, a 5% de probabilidade, e ns= não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 7 - Equação de regressão linear da transformação logarítmica do porcentual de retenção e do tempo obtidos a partir de cada tratamento

Dietas	Equação	R ²	FA	p
Fe (+)	y=1, 92756 - 1,19211*t	0,83	*	0,00
Fe (-)	y= 1,92296 - 0,978951*t	0,83	*	0,00
V1 (+)	y=1,95291 - 0,344642*t	0,43	ns	0,00
V1 (-)	y=1,95829 - 0, 356494*t	0,60	*	0,00
V2 (+)	y=1,96351 - 0,321965*t	0,38	ns	0,00
V2 (-)	y=1,94855 - 0,320709*t	0,40	ns	0,00

y= % retenção, t = tempo (dias), FA = falta de ajuste da regressão,* significativa, ns = não-significativa e p= probabilidade.

Fe (+) – Controle (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 25 ppm de ferro).

Fe (-) – Controle, (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 12 ppm de ferro).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 25 ppm de ferro

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 12 ppm de ferro.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 25 ppm de ferro.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 12 ppm de ferro.

SAHA et al. (1994) verificaram que a razão molar fitato: Fe⁺², em três refeições-teste, com baixo, médio e elevado teor de fitato, foi de 2,65, 14,71 e 21,14, respectivamente. A significativa redução da absorção de ⁵⁹Fe foi observada em ratos alimentados com refeição-teste à base de farelo de trigo, em que a razão molar foi igual ou superior a 14,71. Neste estudo, a razão molar fitato:ferro foi de 0,039 para UFV-116 e 0,052 para OCEPAR-19, não podendo explicar a pequena redução (p< 0,05) da retenção de ⁵⁹Fe na variedade 1, UFV-116, com maior teor de fitato.

JOHNSON e WEAVER (1983) verificaram que a retenção de ⁵⁹Fe foi significativamente maior para sulfato ferroso por gavagem do que para aqueles animais que receberam dieta-teste marcada. Tal fato pode ser atribuído à menor quantidade de ferro total na dose por gavagem do que na refeição-teste.

JOHNSON et al. (1987) verificaram que a biodisponibilidade de ferro de proteína de soja foi 96%, comparado à do sulfato ferroso. Neste estudo, não foi

possível fazer esta comparação, porque os teores de ferro entre as dietas com fonte de ferro de sulfato ferroso e das variedades de soja foram diferentes.

WEAVER et al. (1984) reportaram que a retenção de ^{59}Fe em farinha de soja desengordurada foi $38,7 \pm 8,9$, consumindo um total de 196 μg de ferro numa porção de aproximadamente 7 g de dieta-teste, em ratos anêmicos com hematócrito de 30% e hemoglobina em torno de 6,4 g/100 mL, enquanto em ratos normais em ferro, com hematócrito em torno de 54 % e hemoglobina 16 g/100 mL a retenção foi de $10,7 \pm 3,9$, consumindo um total de 190 μg de ferro. No presente estudo, a retenção de ^{59}Fe em farinha de soja desengordurada das diferentes variedades de soja foi superior à dos estudos citados, provavelmente pelo fato de o conteúdo total de ferro ingerido na dieta-teste ter sido menor. Também, no estudo citado anteriormente, os animais receberam isolado protéico de soja somente seis dias antes de receberem a dieta-teste, enquanto neste estudo os animais receberam isolado protéico de soja por 12 dias. É possível que animais mantidos com isolado protéico de soja por um período de ajustamento maior sejam capazes de se adaptar a componentes da soja que inibem a absorção de ferro, reduzindo, assim, a influência inibitória de produtos de soja.

O teor total de fibra alimentar de ambas as variedades foi de aproximadamente 2%. Em virtude do baixo teor, provavelmente a fibra não interferiu na absorção de ferro. HUH et al. (1999) observaram que o ferro da casca da soja apresenta elevada biodisponibilidade em ratos em crescimento, embora a quantidade de fibra da dieta de repleção com casca da soja seja aproximadamente duas vezes maior que o grupo com dieta-controle, de onde se pode concluir que a fibra presente na casca da soja não afeta a absorção de ferro. O mesmo foi observado por FLY et al. (1996), em que a hemicelulose presente na casca da soja não afetou a biodisponibilidade de ferro em galinhas que receberam dieta que continham casca de soja.

O teor de ferro absorvido não diferiu entre as dietas que continham farinha de soja desengordurada da variedade 1, UFV-116, e da variedade 2, OCEPAR-

19. Entretanto, as dietas-controle, adicionadas de sulfato ferroso e caseína, apresentaram maior nível de ferro consumido ($P < 0,05$) em relação as variedades de soja, por causa do erro experimental no preparo da porção de 3 g de dieta.

Pode-se concluir os ratos que ingeriram uma porção de 3 g de dietas-teste com níveis normais e deficientes em ferro (~ 24 e 16 ppm), à base de farinha de soja desengordurada, apresentaram retenção de ^{59}Fe similar. A nova variedade, UFV-116 com maior teor de fitato, sem lipoxigenases 2 e 3, apresentou menor retenção de ^{59}Fe ($p < 0,05$) que a variedade comercial, OCEPAR-19. O melhoramento genético realizado com o objetivo de obter uma variedade com melhor sabor é de grande importância, entretanto deve-se preocupar com os fatores antinutricionais, como fitato, pois este pode afetar a absorção de ferro, assim como a de zinco reportado no Capítulo 3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELIS, R.C. de, CTENAS, M.L.B. **Biodisponibilidade de ferro na alimentação infantil**; Nestlé - Serviço de Informação Científica, 1993. 53p. (Temas de pediatria, 52).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 14. ed. Arlington, 1984. 1141p.
- BAYNES, R.D., STIPANUNUK, M.H. Iron. In: STIPANUK, M.A. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. 1007p.
- BEARD, J.L., WEAVER, C.M., LYNCH, S.R, JOHNSON, C.D., DASSENKO, S., COOK, J.D. The effect of soybean phosphate and phytate content on iron bioavailability. **Nutrition Research**, v.8, p.345-352, 1988.
- BENITO, P., MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an update review. **Nutrition Research**, v.18, p.581-603, 1998.
- BOTHWELL, T.H. Overview and mechanisms of iron regulation. **Nutrition Reviews**, v.53, p.237-245, 1995.
- CARPENTER, C.E., MAHONEY, AW. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, v.31, p.333-367, 1992.
- COOK, J.D. Food iron absorption measured by na extrinsic tag. **Journal Clinical Investigation**, v.51, p.805-815, 1972.
- COOK, J.D., MORCK, T.A, LYNCH, S.R. The inhibitory effect of soy products on non heme iron absorption in mam. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.34, p. 2622-2629, 1981.
- FAIRBANKS, V.F. Iron in medicine and nutrition. In: In: SHILLS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1999. p. 223-237.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J., HURREL, R.F. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutrition Research Reviews**, v.9, p.295-324, 1996.
- FITCH, C.E., HARVILLE, W.E., DINNING, J.S., PORTER, F.S. Iron deficiency in monkeys fed diets containing soybean protein. **Proceedings of**

- the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.116, p.130-133, 1964.
- FLY, A.D., CZARNECKI-MAULDEN, G.L., FAHEY, G.C., TITIGEMEYER, A.C. Hemicellulose does not affect iron bioavailability in chicks. **The Journal of Nutrition**, v.126, p.308-316, 1996.
- FRITZ, J.S., SCHENK, G.H. **Quantitative analytical chemistry**. 2.ed. Boston: Allyn and Bacon, 1969. p.528-531.
- HALLBERG, L. The pool concept in food iron absorption and some of its implications. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.33, p.285-291, 1974.
- HUH, M.H., SHIN, M.H., LEE, Y.B., SOHN, H.S. Effect of soybean hull iron on growth, iron bioavailability, and behavioral function in anemic rats induced by iron deficiency during gestation or lactation. **Nutrition Research**, v.19, p.1749-1761, 1999.
- HURRELL, R.F. Bioavailability of Iron. **The European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.4-8, 1997. (Suppl., 1).
- HURRELL, R.F., JUIILLERAT, M., REDDY, M.B., LYNCH, S.R., DASSENKO, S.A, COOK, J.D. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.56, p.573-578, 1992.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**. 3. ed. São Paulo: 1985. v 1, 533p.
- JOHNSON, C.D., WEAVER, C.M. Effect of previous diet on iron absorption from na intrinsically labeled soy flour testmeal. **The Nutrition Report International**, v.28, p.1129-1135, 1983.
- JOHNSON, C.D., WEAVER, C.M., GORDON, D.T. A comparison of the hemoglobin regeneration bioassay and absorption of a radio-iron test meal for assessing iron bioavailability. **Nutrition Research**, v.7, p.183-196, 1987.
- LAYRISSE, M., GARCÍA-CASAL, M.N. Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. **Nutrition Reviews**, v.55, p.233-239, 1997.
- LYNCH, S.R., DASSENKO, S.A, COOK, J.D., JUIILLERAT, M, HURRELL, R. Inhibitory effect of a soybean-protein-related moiety on iron absorption in humans. **The American of Journal Clinical Nutrition**, v.60, p.567-72, 1994.

- MONSEN, E.R. Validation of an extrinsic iron label in monitoring absorption of nonheme food iron in normal and iron-deficient rats. **The Journal of Nutrition**, v.104, p.1490-1495, 1974.
- ROTRUCK, J.T., LUHRSEN, K.R. A comparative study in rats of iron bioavailability from cooked beef and soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, p.27-33, 1979.
- SAHA, P.R., WEAVER, C.M., MASON, A.C. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. **American Chemists Society**, v.42, p.2531-2535, 1994.
- SHAW, N., CHIN, C., PAN, W. A vegetarian diet rich in soybean products compromises iron status in young students. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.212-219, 1995.
- WEAVER, C.M., NELSON, N., ELLIOTT, J.G. Bioavailability of iron to rats from processed soybean fractions determined by intrinsic and extrinsic labeling techniques. **The Journal of Nutrition**, v.114, p.1042-1048, 1984.
- WELCH, R.M., VANCAMPEN, D.R. Iron availability to rats from soybeans. **The Journal of Nutrition**, v. 105, p.253-56, 1975.
- YIP, R. The challenge of improving iron nutrition: limitations and potentials of major intervention approaches. **The European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.16-24, 1997.

APÊNDICE

Quadro 1 - Decaída do porcentual de retenção de ^{59}Fe em ratos alimentados com farinha de soja desengordurada de diferentes variedades de soja e caseína

Tempo	Fe (+)	Fe (-)	V1 (+)	V1 (-)	V2 (+)	V2 (-)
0	100,0 $\pm$ 0,00	100,0 $\pm$ 0,00	100,0 $\pm$ 0,00	100,0 $\pm$ 0,00	100,0 $\pm$ 0,00	100,0 $\pm$ 0,00
1	43,02 $\pm$ 17,83	46,43 $\pm$ 14	71,00 $\pm$ 22,7	72,09 $\pm$ 19,93	77,39 $\pm$ 27,36	70,67 $\pm$ 23,13
3	10,07 $\pm$ 5,02	12,97 $\pm$ 3,02	48,63 $\pm$ 16,90	46,50 $\pm$ 9,77	51,55 $\pm$ 18,62	49,49 $\pm$ 16,36
5	8,12 $\pm$ 2,62	12,50 $\pm$ 2,72	47,01 $\pm$ 16,17	45,14 $\pm$ 9,22	50,81 $\pm$ 18,56	49,16 $\pm$ 15,92
7	8,13 $\pm$ 2,75	12,68 $\pm$ 2,87	48,05 $\pm$ 16,98	45,93 $\pm$ 10,61	51,7 $\pm$ 18,97	50,25 $\pm$ 16,28
9	8,45 $\pm$ 2,89	12,65 $\pm$ 2,74	49,82 $\pm$ 17,37	47,66 $\pm$ 11,12	53,23 $\pm$ 19,32	51,53 $\pm$ 16,74

Fe (+) – Controle (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 25 ppm de ferro).

Fe (-) – Controle, (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 12 ppm de ferro).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 25 ppm de ferro

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 12 ppm de ferro.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 25 ppm de ferro.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 12 ppm de ferro.

Quadro 2 - Ganho de peso dos animais durante o período experimental (n=9)

Dietas	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de Peso (g)
Fe (-)	179,22 $\pm$ 9,65	294,33 $\pm$ 14,31	115,11 $\pm$ 10,88
Fe (+)	179,67 $\pm$ 8,35	295,0 $\pm$ 15,35	115,33 $\pm$ 8,54
V1 (+)	180,22 $\pm$ 7,26	291,22 $\pm$ 15,16	111,0 $\pm$ 12,20
V1 (-)	179,67 $\pm$ 7,26	289,56 $\pm$ 16,16	109,89 $\pm$ 11,94
V2 (+)	180,11 $\pm$ 7,77	290,55 $\pm$ 18,26	110,44 $\pm$ 15,01
V2 (-)	180,67 $\pm$ 7,02	280,11 $\pm$ 9,28	99,44 $\pm$ 4,1

Fe (+) – Controle (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 25 ppm de ferro).

Fe (-) – Controle, (adicionado de sulfato ferroso, fornecendo 12 ppm de ferro).

V1 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 25 ppm de ferro

V1 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 1 (UFV-116), com 12 ppm de ferro.

V2 (+) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 25 ppm de ferro.

V2 (-) - Farinha de soja desengordurada da variedade 2 (OCEPAR-19), com 12 ppm de ferro.

RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores anti-nutricionais, o teor de minerais e a biodisponibilidade de ferro, cálcio e zinco de uma nova variedade de soja (UFV-116) desenvolvida pelo BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa), sem as lipoxigenases 2 e 3, em comparação com uma variedade comercial (OCEPAR-19), que possui lipoxigenases 1, 2 e 3, que foram obtidas na forma de farinha integral.

Inicialmente, determinou-se o teor de fibra alimentar, fitato, oxalato, inibidor de tripsina e minerais, entre as variedades. Os teores de fibra alimentar total para variedade 1, UFV-116, e variedade 2, OCEPAR-19, foram de 2,11 e 2,10, respectivamente. A variedade 1 possui significativamente maior teor de ácido fítico (1,33%) e oxalato (0,381%) que a variedade 2 (fitato, 1,03% e oxalato 0,198 %). A porcentagem de inibição da tripsina foi de 9,02 e 7,22 mg tripsina inibida/g proteína para UFV-116 e OCEPAR-19, respectivamente.

Quanto aos minerais, os níveis de Ca, K e Mg da UFV-116 foram superiores ($p < 0,05$) aos de OCEPAR-19, que por sua vez possui maior teor de ferro. Não houve diferença significativa para o teor de zinco e sódio entre as variedades. Dos minerais analisados, o potássio apresentou a maior concentração

para ambas as variedades, seguido pelo magnésio e cálcio. Menores concentrações foram observadas, em ambas as variedades, para zinco e ferro.

Os resultados encontrados foram, em sua maioria, semelhantes aos dados de literatura para as duas variedades, e as diferenças podem ser devido ao genótipo, aos fatores climáticos, à variedade, ao armazenamento, ao processamento, ao melhoramento genético e às diferenças metodológicas de determinação.

No primeiro experimento, a absorção de cálcio entre as variedades testadas foi avaliada pela técnica de marcação extrínseca com ^{45}Ca , no fêmur dos animais. Ratos machos (de 150 a 170g) *Sprague Dawley* foram distribuídos em quatros grupos (n=10/grupo). Todos os animais foram adaptados a consumir 3 g de dieta-teste, contendo 30% de farinha de soja (UFV-116 e OCEPAR-19), 60% de açúcar e 8% de óleo de milho. As dietas continham aproximadamente 128,15 e 121,03 mg Ca/g para as variedades UFV-116 e OCEPAR-19, respectivamente. A razão molar oxalato:cálcio entre as dietas-teste, que continham farinha de soja integral das variedades UFV-116 e OCEPAR-19, foi 0,81 e 0,52, respectivamente.

Dois grupos receberam uma dose de 3g de dieta-teste, contendo farinha de soja integral, um de cada variedade, marcada com 10 μCi de ^{45}Ca (dose oral). Os outros dois grupos (controles) receberam dieta semelhante sem marcador radioativo e, após 1 hora, receberam uma dose intraperitonal (IP) de 0,3 mL de solução salina 0,9% contendo 10 μCi de ^{45}Ca . Quarenta e oito horas após receberem as dietas-teste, os animais foram sacrificados e analisou-se o teor de ^{45}Ca em seus fêmures. A absorção fracional foi equivalente entre a nova variedade de soja e a variedade comercial. A nova variedade, sem as lipoxigenases 2 e 3, é uma fonte comparável de biodisponibilidade de cálcio. Assim, a diferença da razão oxalato:cálcio e do conteúdo de oxalato ($p<0,05$) entre as variedades não parece ter sido capaz de reduzir a absorção de cálcio.

No segundo experimento, a absorção de zinco entre as variedades testadas foi avaliada por meio do método de retenção corporal total e do fêmur, do

marcador radioativo ^{65}Zn . Ratos machos, da raça *Sprague-Dawley* (de 150 a 170 g), foram distribuídos em seis grupos (n=10). Duas semanas antes de receberem as dietas-teste, dois grupos foram alimentados com dietas experimentais adequadas em zinco (30 mg/kg de dieta), e outros dois grupos com dietas deficientes em zinco (9 mg/kg de dieta), nos quais farinha de soja desengordurada de diferentes variedades de soja foram utilizadas. Dois outros grupos (controles) receberam clara de ovo em pó como fonte de proteína (28,9%) e $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como fonte de zinco (9 e 30 mg/kg de dieta). Os animais receberam 3 g de dieta-teste, semelhante às dietas experimentais, marcada com $^{65}\text{ZnCl}_2$ (0,25 μCi). A retenção de ^{65}Zn (cpm) foi medida num contador de corpo inteiro, durante 13 dias. Os fêmures direitos dos animais foram retirados e a atividade de ^{65}Zn e o teor total de zinco foram analisados.

O porcentual de retenção de ^{65}Zn nos fêmures e no corpo inteiro dos animais foi maior ($p < 0,05$) em ratos que receberam dietas deficientes em zinco. A retenção foi maior ($p < 0,05$) em ratos alimentados com dieta deficiente em zinco (controle) e menor ($p < 0,05$) em ratos alimentados com dieta normal em zinco (controle), quando comparado com os outros grupos alimentados com dietas à base de soja. Nos grupos que receberam farinha de soja desengordurada, de ambas as variedades, não foi observada diferença ($p < 0,05$) na retenção de ^{65}Zn nos fêmures entre ratos que receberam dietas deficientes ou normais em zinco. Entretanto, a retenção e a absorção de ^{65}Zn no corpo inteiro dos animais para a variedade 1 (UFV-116), que possui nível maior de fitato (1,33%), apresentou uma retenção de zinco menor ($p > 0,05$) do que a variedade comercial, 2 (OCEPAR-19), com teor de fitato de 1,03%.

A retenção de ^{65}Zn no fêmur correlacionou-se com a retenção corporal total de ^{65}Zn , pelo teste "t" de Student, para dados pareados ($p = 0,00$). Porém, a contagem de corpo inteiro foi um indicador mais sensível da retenção de ^{65}Zn , pois detectou-se diferença na retenção de zinco entre as variedades de soja testadas com diferentes teores de zinco (9 e 30 ppm de zinco) e fitato. As razões molares fitato:zinco e fitato x cálcio:zinco e os níveis de fitato entre as

variedades de soja podem explicar o efeito do fitato na redução da absorção de zinco entre as variedades de soja testadas. Assim, ratos que ingeriram dietas deficientes em zinco apresentaram maior absorção do mineral. As variedades de soja apresentaram uma boa absorção de zinco, embora a nova variedade com maior teor de fitato, sem lipoxigenases 2 e 3, tenha apresentado uma redução na absorção de zinco ($p < 0,05$), quando comparada com a variedade comercial, OCEPAR-19.

No terceiro experimento, a absorção de ferro entre as variedades testadas foi avaliada pela técnica de marcação extrínseca com ^{59}Fe , avaliando seu porcentual de retenção corporal total, em animais. Ratos machos (de 150 a 170 g) foram distribuídos em grupos de seis ($n = 9$ ratos/grupo), os quais foram previamente adaptados, por um período de 12 dias, a consumir uma dieta à base de isolado protéico de soja, fornecendo 16 % de proteína e 25 ppm de ferro. Um dia antes de receberem a dieta-teste, os animais foram distribuídos de forma a padronizar os níveis de hematócrito ($\sim 42\%$), hemoglobina (~ 9 g/dl) e peso entre os grupos experimentais. Após 16 horas de jejum, os animais receberam 3 g de dieta-teste marcada com $^{59}\text{FeCl}_3$ ($0,2\mu\text{Ci}$). As duas variedades foram testadas nos níveis de 12 e 25 ppm de ferro, de farinha de soja desengordurada. Dois outros grupos-controle receberam caseína como fonte de proteína e sulfato ferroso, como fonte de ferro. Todas as dietas continham $\sim 29\%$ de proteína. A retenção de ^{59}Fe (cpm) foi medida num contador de corpo inteiro durante nove dias.

O porcentual de retenção e absorção de ^{59}Fe no corpo inteiro dos animais foi maior ($p < 0,05$) nos ratos alimentados com dietas de farinha de soja desengordurada da variedade 2, OCEPAR -19, quando comparado com ratos que consumiram a variedade 1, UFV-116, nos níveis normais e deficientes em ferro. Os ratos que ingeriram dietas-teste com níveis normais e deficientes em ferro (~ 24 e 16 ppm), à base de farinha de soja desengordurada, apresentaram retenção de ^{59}Fe similar. Entretanto, a retenção de ^{59}Fe da dieta-controle foi menor que das farinhas de soja desengorduradas testadas. Tal fato aconteceu porque as dietas-controle apresentaram um teor de ferro ~ 100 vezes superior ao

da dieta-controle, podendo ser explicado, neste caso, que o efeito da absorção depende da dose administrada de ferro. No entanto, pode-se concluir que a nova variedade, UFV-116 com maior teor de fitato, sem lipoxigenases 2 e 3, apresentou menor retenção de ^{59}Fe ($p < 0,05$), quando comparada com a variedade comercial, OCEPAR-19.

A biodisponibilidade de zinco e de ferro foi menor na nova variedade (UFV-116), possivelmente devido ao seu maior conteúdo em fatores antinutricionais, especialmente de fitato. Seu mais alto teor em oxalato, entretanto, não implicou redução na biodisponibilidade de cálcio.