

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**Consumo de extrato hidrossolúvel de soja diminui a  
qualidade do tecido ósseo de ratos machos jovens**

**Bruna Rezende Silva Martins de Oliveira**  
Enfermeira

**ARAÇATUBA – SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**Consumo de extrato hidrossolúvel de soja diminui a  
qualidade do tecido ósseo de ratos machos jovens**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina Veterinária  
da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” - UNESP -  
Campus de Araçatuba, como parte  
dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal  
(Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

**Bruna Rezende Silva Martins de Oliveira**

**Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada**

Co-orientador: Marco Antonio Rodrigues Fernandes

ARAÇATUBA – SP

2014

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

BRUNA REZENDE SILVA MARTINS DE OLIVEIRA - nascida em São José do Rio Preto (SP) no dia 04 de fevereiro de 1990, ingressou no curso de bacharelado em Enfermagem pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campus de Três Lagoas (MS) em Janeiro de 2008, obtendo o título de bacharel em Enfermagem em dezembro de 2011. Em agosto de 2012 ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada, responsável pelas disciplinas de Radioterapia e Biomecânica na pós-graduação em ciência animal e Biofísica no curso de graduação.

Buscando aprimoramento profissional obteve o título: Especialização em Docência em Enfermagem, Universidade Anhembi Morumbi.

Realizou diversos cursos aplicados a área, participou de inúmeros congressos, em destaque o 5º BRADOO – Congresso Brasileiro de Densitometria, Osteoporose e Osteometabolismo, onde recebeu premiação em 1º Lugar categoria Área Clínica - Prêmio Sérgio Ragi Eis de Incentivo à Pesquisa Clínica em Osteoporose e Osteometabolismo, pela Associação Brasileira de Avaliação Óssea e Osteometabolismo, com o trabalho: “Consumo excessivo de leite de soja afeta o desenvolvimento ósseo.”

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, na categoria de Bolsa no País - Programa Capacitação - Treinamento Técnico, nos períodos de 01/09/2012 a 31/05/2013 e 01/11/2013 a 31/07/2014.

Exerceu o cargo de Professora na Associação de Ensino de Mato Grosso do Sul – Faculdades Integradas de Três Lagoas/MS no período de 08/2013 à 08/2014.

## EPÍGRAFE

"Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,  
a eletricidade e a energia atômica: a vontade."  
(Albert Einstein)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudio e Meiry, e a minha irmã Fernanda,  
Que ansiaram por este momento, tanto quanto eu.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força me dada em todas as dificuldades encontradas, por não me proporcionar nada além do que eu era capaz de fazer.

Ao Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada, pela orientação científica e pessoal. Obrigada por abrir as portas e acreditar que eu tinha potencial para crescer e principalmente por fazer parte desse crescimento. Obrigada por ter me acolhido e acreditado na minha capacidade.

Aos meus pais, Cláudio e Meiry: que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Que ansiaram por este momento, tanto quanto eu. Por estarem perto, mesmo quando longe. Pelos exemplos de educação, humildade, caráter, honestidade, companheirismo, sem os quais hoje eu certamente não seria quem sou. Não há palavras que se aproximem da dimensão do meu amor e gratidão.

A minha irmã Fernanda, por este amor fraterno tão constante. Por ter colaborado no período experimental, por ser minha “cobaia” assistindo as minhas aulas, mesmo de madrugada. Por aguentar todas as minhas crises de nervosismo e ansiedade e me acalmar. Obrigada por ser minha irmã.

Ao Prof. Guilherme Nogueira, que talvez desconheça minha admiração. Obrigada pelo incentivo, indireto, que me conduziu até aqui.

A Profa. Tereza Cristina Cardoso da Silva, pela confiança, amizade, incentivo, pelos ensinamentos, por disponibilizar o laboratório, bem como ajudar na interpretação dos dados.

Ao Prof. Roberto Gameiro, pela disponibilidade em me ajudar, pelos ensinamentos durante as análises histológicas, pela alegria transmitida e amizade.

Ao Prof. Paulo Ciarlini, por gentilmente disponibilizar seu laboratório para análises bioquímicas, por ter aceitado o convite para compor a banca de qualificação, e por ter colaborado e incentivado neste trabalho.

A Profa. Elisa, por ter aceitado o convite para compor a banca de qualificação mesmo sem antes me conhecer, pela disposição em ajudar e contribuir para com esse estudo.

Aos professores e amigos Wagner André Pedro, Luiz Eduardo Fonseca, Sérgio Diniz Garcia, Carlos Kaneto: por todas as palavras de conforto, pela preocupação e carinho para comigo.

Ao Pedro Luís Florindo, pelo carinho, confiança, amizade, pela ajuda durante as fases desse estudo, me apoiando e muitas vezes “brigando” por mim, obrigada pelas inúmeras alegrias de todos os dias.

Aos queridos amigos da UNESP, Luis Narciso, Carla Orloski, Priscila Preve, Fábio Kodama, Camila Pereira, que de alguma forma ou em algum momento participaram desta fase.

Aos Profs. Fernando Garcia e Cárís Maroni por, gentilmente, permitirem o acesso aos equipamentos e análises de seus laboratórios.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Odontologia.

Ao Prof. Mário Augusto Freitas, docente da UFMS, por todo incentivo durante a graduação, por despertar em mim o amor à pesquisa científica, por exaltar a disciplina e dedicação acadêmica.

Ao meu amigo Túlio Seraguci, pela amizade.

Aos companheiros de laboratório, Juliana Coêlho, Márcio Oliveira, Ronaldo Medeiros, Caroline Figueiredo, Melise Ueno, Bruno Souza, Wellington Nogueira, Jamila Baptistella, obrigada pela convivência agradável.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica, Filipe Augusto, Mayara Fernandes, Lumena Takahashi, Eduarda Freitas, Juliana Conde, Jefferson Cavazzana, pela disposição e por gentilmente ajudar quando precisei.

Ao Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial a Marta.

Aos funcionários amigos: Adão, Alexandre, Vanessa, Cilene, Donato, Nice, Neuza: pela amizade, incentivo e alegria transmitida.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia, em especial ao Camilo.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação, Secretaria e Biblioteca, pela contribuição e orientações para com este estudo.

A todos os graduandos, pós-graduandos, professores que passaram pelo laboratório de Biofísica, e que tive o prazer de contribuir em seus trabalhos, seja com o DXA e/ou ensaio mecânico, contribuíram muito para minha formação.

Ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

À Universidade Estadual Paulista, por ter sido o maior instrumento dessa etapa.

À FAPESP (processos: 12/16077-0 e 13/20559-2) e CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todas as pessoas que de modo direto ou indireto participaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	7
2	Objetivo.....	9
3	Material e método .....	9
3.1	Animais.....	9
3.2	Grupos experimentais .....	9
3.3	Massa corporal.....	10
3.4	Consumo de ração e ingestão de líquidos .....	10
3.5	Eutanásia dos animais .....	13
3.6	Densitometria óssea.....	13
3.7	Ensaio biomecânico .....	13
3.8	Componentes plasmáticos .....	13
3.9	Análise estatística .....	14
4	Resultados .....	14
5	Discussão .....	16
6	Conclusão.....	18
7	Referências .....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS

CMO =	Conteúdo mineral ósseo
DMO =	Densidade mineral óssea
EHS =	Extrato hidrossolúvel de soja

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Informações nutricionais do extrato hidrossolúvel de soja .....	11
FIGURA 2- Informações nutricionais da ração .....	12

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Média e desvio padrão das variáveis: massa corpórea, consumo de ração, ingestão de água, ingestão de EHS, densitometria óssea, ensaios biomecânicos e análises bioquímicas, referentes ao grupo controle (GC) e ao grupo suplementado com EHS (GS).. 15

## **CONSUMO DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS) DIMINUI A QUALIDADE DO TECIDO ÓSSEO DE RATOS MACHOS JOVENS**

### **RESUMO**

Nos últimos anos, a soja tem sido objeto de vários estudos devido ao aumento do consumo de seus derivados, no entanto ainda não há consenso sobre as reais efeitos deste alimento. A soja é uma leguminosa rica em proteínas, fonte de cálcio e isoflavonas. Um dos possíveis efeitos das isoflavonas é de reduzir a perda óssea na menopausa. A proposta desse estudo foi analisar a influência da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) na massa óssea de ratos jovens. Foram utilizados 16 ratos *Novergicus Albinus* linhagem Wistar, machos, jovens e saudáveis. Aleatoriamente, foram separados em dois grupos: controle (GC), que permaneceram por 11 semanas em gaiola comum recebendo 500 ml de água e 300g de ração diariamente, e suplementado (GS), ao qual foi oferecido além de água e ração, 500 ml de leite a base de soja, durante o mesmo período experimental do controle. Durante o período experimental o consumo de ração e ingestão de líquidos foram mensurados, bem como a massa dos animais. Ao final do período experimental os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina e realizou-se coleta de sangue por meio de punção cardíaca e depois eutanasiados por decapitação. Os ossos foram submetidos à densitometria óssea – DXA e ensaio mecânico, para avaliação da densidade mineral óssea - DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), Força Máxima (N) e Rigidez (kN/m). O sangue foi centrifugado para obtenção do plasma e determinação da concentração de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. O consumo de EHS provocou diminuição da DMO, força máxima e rigidez. Conclui-se assim, que o extrato hidrossolúvel de soja influenciou negativamente nas propriedades ósseas de ratos jovens machos.

**Palavras-chave:** densitometria; distúrbios do metabolismo do cálcio; leite de soja.

## **CONSUMPTION OF SOY EXTRACT SOLUBLE DECREASES THE QUALITY OF BONE TISSUE OF YOUNG MALE RATS**

### **ABSTRACT**

In recent years, soy has been the subject a lot of studies due to increased consumption of their products, however there is still no consensus on the actual properties of this food. Soybeans are a rich legume protein, a source of calcium and isoflavones. One of the possible effects of isoflavones is to reduce bone loss at menopause. The purpose of this study was to analyze the influence of diet supplemented with (SES) in bone mass in young rats. 16 rats Novergicus Albinus Wistar strain, male, young and healthy were used. Randomly separated into two groups, control (GC), which remained for 11 weeks in common cage receiving 500 ml of water and 300 g of feed daily, and the second group supplemented (GS), that was offered in addition to water and feed 500ml of milk to soy. During the experimental period, feed intake and intake of liquids were measured as well as the mass of animals. At the end of the experimental period the animals were anesthetized with ketamine and xylazine, held blood collection by cardiac puncture and then euthanized by decapitation. The bones underwent bone densitometry - DXA and mechanical testing for bone mineral density - BMD (g / cm<sup>2</sup>) Maximum Strength (N) and stiffness (kN / m), respectively. Blood was centrifuged to obtain the plasma to determine the concentrations of calcium, phosphorus, and alkaline phosphatase. The consumption of EHS caused decreased bone properties BMD, maximum strength and rigidity. Concluding that the water extract of soy beans caused a significant decrease of bone properties.

**Keywords:** densitometry; calcium metabolism disorders; soy milk.

## 1 Introdução

O crescimento e a manutenção do tecido ósseo dependem de uma grande variedade de fatores genéticos e ambientais. Fatores ambientais tais como dieta e estilo de vida contribuem com 30 a 40% da DMO. Um dos fatores ambientais de maior relevância para a saúde óssea é o teor dietético de cálcio (BUZINARO et al., 2006). Na infância o cálcio é necessário para a mineralização e crescimento ósseos adequados (MATAKOVIC et al., 1979). Este mineral é geralmente mais abundante e biodisponível no leite bovino e derivados (ANDERSON, 2003; WEAVER et al., 1999). Quando comparada a biodisponibilidade do cálcio do extrato hidrossolúvel de soja ao leite da vaca verificaram que a do primeiro correspondia a apenas 75% da do segundo. Considerando-se o papel que o cálcio representa para a manutenção da saúde óssea, a relevância da dieta no fornecimento dos requisitos diários deve ser ressaltada (HEANEY et al., 2000).

Com a mudança dos costumes e necessidades dietéticas das populações (pessoas optando por dietas vegetarianas exclusivas, grande incidência de pessoas com intolerância à lactose ou a alergia à proteína do leite de vaca) o consumo “leite de soja” tem aumentado, e este pode acarretar alguns problemas como perda da massa óssea, câibras, irritabilidade, além ser um mineral necessário na transmissão nervosa e na regulação dos batimentos cardíacos. (KROEZE, 1990).

A soja, *Glycinemax*, é uma leguminosa da família *Fabaceae*, muito usada nas dietas de países Asiáticos há milhares de anos, como alimento básico (DELIZA et al., 2002). Grãos de soja são sementes ricas em proteínas, fonte de cálcio e também a mais importante fonte alimentar de isoflavonas (COWARD et al., 1998).

Estudos em seres humanos, animais e cultura de células sugerem que este fitoestrogeno desempenha papel importante na prevenção de sintomas de menopausa, osteoporose, câncer e doenças cardíacas (KURZER; XÍA, 1997). Fitoestrógenos são compostos que exercem efeitos estrogênicos no sistema nervoso central (LIEBERMAN, 1996). Ressalta-se que isoflavonas mostram padrões similares de metabolismo e disposição em animais e humanos e

sofrem metabolismo significativo por bactérias no trato gastrointestinal (SETCHELL; ADLERCREVTZ, 1988). No entanto os efeitos do EHS são controversos (NIKANDER et al., 2004; MEI et al., 2001; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2004). Uma dieta elevada em proteínas de origem animal pode aumentar a absorção intestinal de cálcio em comparação a dietas elevadas com proteínas de origem vegetal, como a soja, o que sugere que as proteínas animais podem conferir maior benefício esquelético em comparação com a soja (GAFFNEY-STOMBERG et al. 2014).

Tal como acontece com muitos outros compostos como o álcool ou cafeína, há muitos prós e contras associados ao consumo de soja. Consumidores devem estar cientes de que a soja acarreta perturbação do sistema endócrino. Mulheres grávidas, amamentando ou tentando engravidar devem usar alimentos de soja com cautela e estar ciente de que a fórmula de soja pode não ser a melhor opção para seus bebês. Idosos especialmente aqueles com níveis elevados de colesterol, podem consumir produtos a base de soja, sugerindo efeitos modestos à saúde óssea e cardiovascular, e talvez diminuição do risco de carcinogênese (LAGARI; LEVIS, 2013).

O estrogênio desempenha papel significativo no tecido ósseo de mulheres (LAGARI; LEVIS, 2010). Os efeitos da proteína de soja sobre o metabolismo ósseo de mulheres têm sido atribuídos largamente ao seu conteúdo de fitoestrógenos. No entanto não há nenhuma alegação de saúde existente sobre consumo de soja para a saúde óssea do homem. Assim, a hipótese é que o fitoestrógeno, presente na soja, melhora a qualidade óssea de ratos Wistar machos jovens, por apresentar diminuição da atividade osteoclástica.

## **2 Objetivo**

Analisar a ação da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja na massa óssea de animais jovens machos e saudáveis.

## **3 Material e método**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados 16 ratos, machos, com 30 dias de idade, da raça *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Araçatuba, escolhidos aleatoriamente. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no Biotério da FMVA/UNESP/Araçatuba. O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Protocolo 2012-02399.

### **3.2 Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais:

Grupo Controle (C) e Grupo Suplementado (S) – contendo 8 animais cada, mantidos em caixas próprias para animais experimentais (4 animais por caixa).

### **3.3 Massa corporal**

A massa corporal dos animais foi mensurada uma vez por semana utilizando-se balança digital de precisão Toledo® sendo a primeira determinação no início do experimento e a última mensuração no dia do sacrifício dos animais.

### **3.4 Consumo de ração e ingestão de líquidos**

Para o grupo C foi ofertado bebedouro contendo água (500 mL) e ração (300g) Presence®, Paulínia, SP, Brasil, cujas informações nutricionais estão presentes na Figura 2. Para o grupo S foi ofertado bebedouro contendo água (500mL), outro contendo EHS (500mL) cuja informações nutricionais estão presentes na Figura 1, e ração (300g). Durante o período experimental, a ingestão de líquidos e o consumo de ração foram mensurados diariamente, no mesmo horário (9h). O consumo de ração foi encontrado pela diferença entre o colocado inicialmente e as sobras. O mesmo ocorreu para o controle de ingestão de água e EHS. As sobras foram desprezadas, fazendo-se reposição de água, EHS e da ração. Após 11 semanas todos os valores de consumo foram analisados, obtendo-se a média semanal do consumo por animal.

<b>Informações nutricionais</b>		
Porção de 200 ml (1copo)		%VD*
	77 kcal - 323	
Valor energético	KJ	4%
Carboidratos, dos quais:	7,4 g	3%
Lactose	0 g	**
Açúcares	6,5 g	**
Proteínas	5,1 g	7%
Gorduras totais, das quais:	3 g	6%
Gorduras saturadas	0,4 g	2%
Gorduras trans	0 g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,8 g	**
Gorduras poliinsaturadas	1,8 g	**
Colesterol	0 mg	**
Fibra alimentar	0,7 g	3%
Sódio	190 mg	8%
Cálcio	240 mg	24%
Zinco	1,1 mg	15%
Vitamina C	6,8 mg	15%
Vitamina E	1,5 mg	15%
Vitamina B <sub>6</sub>	0,20 mg	15%
Vitamina A	90 µm	15%
Ácido fólico	36 µm	15%
Vitamina D	2,0 µm	40%
Vitamina B <sub>12</sub>	1,0 µm	40%
Vitamina B <sub>2</sub>	0,20 mg	40%

Fonte: Site do fabricante, <http://www.ades.com.br/produtos/detalhe/645217/ades-original-1l>

**FIGURA 1** - Informações nutricionais do extrato hidrossolúvel de soja

<b>Informações nutricionais</b>	
Magnésio	0,006 mg
Ferro	180 mg
Cobre	30 mg
Zinco	110 mg
Manganês	110 mg
Iodo	1 mg
Selênio	0,2 mg
Cobalto	2 mg
Vitamina A	25.577 UI
Vitamina D3	4.000 UI
Vitamina E	82 mg
Vitamina K	6,40 mg
Ácido Fólico	13 mg
Biotina	0.16 mg
Colina	2.800 mg
Niacina	220 mg
Pantotenato de cálcio	90 mg
Tiamina	11 mg
Riboflavina	12 mg
Piridoxina	vit. B6
	HCl
Antioxidante	200 mg
Ácido propiônico	1.486 mg
Carboidratos	55%
Umidade máxima	13%
Proteína bruta (min.)	23%
Extrato etéreo (min.)	4%
Matéria fibrosa (max.)	7%
Matéria mineral	10%
(max.)	
Cálcio (min.)	1,20%
Cálcio (máx.)	1,30%
Fósforo (min.)	0,85%

Fonte: Fornecidas pelo fabricante, Nutrimentos Presence®, via email.

**FIGURA 2-** Informações nutricionais da ração

### **3.5 Eutanásia dos animais**

Os animais foram anestesiados com Ketamina (80mg/Kg) e Xilazina 2% (10mg/Kg) intraperitoneal, para que pudesse ser realizada a punção cardíaca e em seguida foram decapitados utilizando guilhotina.

### **3.6 Densitometria óssea**

A avaliação densitométrica foi realizada após a eutanásia dos animais. As tíbias e os fêmures esquerdos foram desarticulados e dissecados, e submersos em recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida scaneados, capturando sua imagem por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) por meio de densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR, com software especial para pequenos animais com alta resolução. Posteriormente, as imagens foram manualmente contornadas para obtenção dos valores de área (cm<sup>2</sup>), conteúdo mineral ósseo – CMO (g) e densidade mineral óssea areal – DMO<sub>A</sub> (g/cm<sup>2</sup>).

### **3.7 Ensaio biomecânico**

As tíbias esquerdas foram submetidas ao ensaio de flexão à três pontos e os fêmures aos ensaios de compressão da cabeça e terço médio. Realizados em máquina universal EMIC®, modelo DL 3000, com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min e força de 2000N. Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento. Foi registrada a força máxima admitida. Com a curva força x deslocamento calculou-se a rigidez (inclinação da curva na fase elástica).

### **3.8 Componentes plasmáticos**

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção cardíaca e foi utilizada heparina como anticoagulante sendo coletado 5ml de cada animal. O

sangue foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada (2°C). O plasma foi fracionado e armazenado a -80°C para posterior determinação da concentração de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. As análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II e utilizando reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Foi determinado cálcio total, fósforo e fosfatase alcalina. Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

### **3.9 Análise estatística**

Os dados obtidos foram apresentados como média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 3.0., o teste t de Student não pareado sendo  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo.

## **4 Resultados**

Os resultados estão apresentados na tabela 1, como média e desvio padrão.

**TABELA 1** - Média e desvio padrão das variáveis: massa corpórea, consumo de ração, ingestão de água, ingestão de EHS, densitometria óssea, ensaios biomecânicos e análises bioquímicas, referentes ao grupo controle (GC) e ao grupo suplementado com EHS (GS).

	<b>Controle</b>	<b>Suplementado</b>	<b>P</b>
<b>Massa corpórea (g)</b>			
1ª semana	101,4±0,045	100,8±0,21	0,614
11ª semana	472,6±0,082	435,7±0,088	0,0217
<b>Consumo de ração semanal por grupo (g)</b>	140,91±14,92	69,45±19,33	0,0001
<b>Ingestão de água semanal por grupo (mL)</b>	325,91±57,83	66,36±29,76	0,0001
<b>Ingestão de EHS semanal por grupo (mL)</b>		421,82±40,45	
<b>Densitometria óssea</b>	<b>Fêmures</b>		
CMO (g)	0,381±0,042	0,359±0,038	0,0287
Área (cm <sup>2</sup> )	1,630±0,087	1,664±0,124	0,5267
DMO <sub>A</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	0,233±0,015	0,216±0,013	0,0287
	<b>Tíbias</b>		
CMO (g)	0,254±0,028	0,215±0,026	0,0112
Área (cm <sup>2</sup> )	1,428±0,115	1,466±0,070	0,4327
DMO <sub>A</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	0,178±0,008	0,146±0,014	0,0001
<b>Ensaio biomecânicos</b>	<b>Fêmures</b>		
Força máxima cabeça (N)	134,35±9,43	110,63±21,93	0,0012
Rigidez cabeça (10 <sup>3</sup> N/m)	277,19±10,20	239,64±11,55	0,0001
Força máxima terço médio (N)	590,03±84,88	472,54±46,78	0,0041
Rigidez terço médio (10 <sup>3</sup> N/m)	1997,38±108,80	1774,75±122,13	0,0018
	<b>Tíbias</b>		
Força máxima (N)	88,27±5,07	73,58±5,25	0,0001
Rigidez (10 <sup>3</sup> N/m)	173,44±10,33	139,64±11,55	0,0001
<b>Concentração plasmática</b>			
Cálcio (mg/dL)	8,61±0,94	6,92±0,46	0,0004
Fósforo (mg/dL)	5,79±0,83	5,79±0,94	0,9934
Fosfatase alcalina (U/l)	73,77±17,63	60,09±10,34	0,079

## 5 Discussão

As análises ósseas de ratos Wistar submetidos à dieta suplementada com EHS foram comparados aos de animais controle sendo evidenciada a influência deste alimento diretamente no metabolismo ósseo. Foi evidenciado, também, mudança no comportamento alimentar nos animais do grupo S que reduziram o consumo de ração e água e passaram a ingerir o EH, que de acordo com Sclafani e Xenakis (1984) e Noveli et al. (2007) pode ser explicada pela elevada palatabilidade do EHS.

No presente trabalho, foi realizado a densitometria óssea do osso inteiro ao final do experimento. Quando comparadas as variáveis CMO e  $DMO_A$  das tíbias, observaram-se diferenças significantes entre os grupos, no entanto não foi acusada diferença na variável área. Quando comparadas as mesmas variáveis nos fêmures, encontrou-se diferença significativa para  $DMO_A$ . Na literatura é encontrado estudo com ratos machos expostos a isoflavonas que, também, não apresentaram efeitos benéficos para o fêmur e vértebra lombar dos animais. Sugerindo que o efeito da exposição precoce a isoflavonas pode ser determinado pelo sexo (KALUDJEROVIC; WARDY, 2009). No entanto, a prole feminina quando exposta a isoflavonas da soja apresentaram maior  $DMO_A$  e melhor estrutura do fêmur e vértebras lombares (PIEKARZ; WARD, 2007; THAM et al., 1998).

Não há muitos estudos com ingestão de EHS por machos jovens. No entanto são encontrados estudos com mulheres na pós-menopausa recebendo 90mg/dia de proteína de soja enriquecida com isoflavona em comparação com a proteína do leite que mostraram diminuição da  $DMO_A$  da coluna lombar das mulheres que consumiram o fitoestrógeno (IKEDA et al., 2006). Outro estudo com grupo de mulheres chinesas na pós-menopausa que ingeriram leite de vaca enriquecido com cálcio e outro grupo que ingeriram leite de soja contendo isoflavona resultou em decréscimo significativo da  $DMO_A$  nas pacientes que ingeriram a soja. Curiosamente, o leite de vaca aumentou significativamente a  $DMO_A$  no quadril e colo do fêmur destas mulheres (CHIECHI et al., 2002). Estudos em mulheres norte-americanas, utilizando alimentos fortificados com

soja, leite de soja, e comprimidos contendo várias preparações de isoflavona extraídas a partir de proteína de soja, não apresentaram resultados benéficos significativos para o fitoestrógeno (LAGARI et al., 2013).

As variáveis biomecânicas advindas dos testes de flexão da tíbia, flexão da cabeça e terço médio do fêmur, apresentaram diferenças entre os grupos desse estudo. As tíbias e os fêmures dos animais do Grupo C mostraram aumento significativo nas variáveis força máxima e rigidez quando comparados ao Grupo S. As variáveis do ensaio mecânico fornecem informações sobre as propriedades ósseas (TURNER; BURR, 1993). Esses dados são similares aos achados de Gaffney-Stomberg et al. (2014), que afirmam que por ter uma estrutura semelhante ao estrógeno, a isoflavona da soja acarretou na perda de massa óssea de ratos machos orquiectomizados.

A concentração de fosfatase alcalina apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando que a formação óssea está alterada. No entanto não foi encontrada diferença significativa de cálcio e fósforo. É encontrado na literatura afirmações de que as isoflavonas impactam o metabolismo ósseo estimulando a atividade osteoblástica (BRYNIN, 2002).

Na literatura é encontrado, também, afirmações de que dieta elevada em proteínas de origem animal pode aumentar a absorção intestinal de cálcio em comparação a dieta elevada com proteínas de origem vegetal, como a soja, o que sugere que as proteínas animais podem conferir maior benefício esquelético em comparação com a soja (GAFFNEY-STOMBERG et al., 2014).

Várias organizações fazem recomendações sobre a ingestão de soja e seus efeitos sobre a saúde óssea. A “US National Institutes of Health”, a “North American Menopause Society” e a “Belgian Bone Club” afirmaram que estudos sobre a soja não são conclusivos, impedindo quaisquer recomendações no que diz respeito a sua utilização para a saúde dos ossos. A “Association of Clinical Endocrinologists” não recomenda o uso de produtos à base de soja a mulheres com histórico familiar de doença cardiovascular e câncer hormônio dependente.

## **6 Conclusão**

O estudo não confirma a hipótese, pois o consumo de EHS provocou diminuição significativa dos valores das propriedades ósseas de ratos jovens machos, como: densidade, força máxima admitida, rigidez, concentração plasmática de cálcio, mostrando que o consumo de EHS por ratos Wistar machos e jovens prejudicou o tecido ósseo.

## 7 Referências

ANDERSON, J. J. B. Minerais. IN: MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. (ed). **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2003. 106-145.

BRYNIN, R. Soy and its isoflavones: a review of their effects on bone density. **Altern. Med. Rev.**, v.7, p.317-327, 2002.

BUZINARO, E.F.; ALMEIDA, R. N. A.; MAZETO, G. M. F. S. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 852-861, 2006.

CHIECHI, L.M.; SECRETO, G.; D'AMORE, M.; VENTURELLI, E.; CANTATORE, F.; VALERIO, T.; LASELVA, G.; LOIZZI, P. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. **Maturitas**, v.42, p. 295-300, 2002.

COWARD, L.; KIRK, M.; ALBIN, N.; BARNES, S. Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry. **Clin. Chim. Acta**. v. 29, p. 121-142, 1998.

DELIZA, R.; SERNA SALDIVAR, S.; GERMANI, R.; BENASSI, V.T.; CABRAL, L.C. The effects of colored textured soybean protein (TSP) on sensory and physical attributes of ground beef patties. **J. Sens. Stud.**, v. 17, p. 121-132, 2002.

GAFFNEY-STOMBERG, E.; CAO, J.J.; LIN, G.G.; WULFF, C.R.; MURPHY, N.E.; YOUNG, A.J.; MCCLUNG, J.P.; PASIAKOS, S.M. Dietary protein level and source differentially affect bone metabolism, strength, and intestinal calcium transporter expression during ad libitum and food-restricted conditions in male rats. **J. Nutr.**, v.144, p.821-829, 2014. doi:10.3945/jn.113.188532.

HEANEY, R.P.; DOWELL, M.S.; RAFFERTY, K.; BIERMAN, J. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p. 1166-1169, 2000.

IKEDA, Y.; IKI, M.; MORITA, A.; KAJITA, E.; KAGAMIMORI, S.; KAGAWA, Y.; YONESHIMA, H. Intake of fermented soybeans, Natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis study. **J. Nutr.**, v.31, p.400-419, 2010.

KALUDJEROVIC, J.; WARD, W.E. Neonatal exposure to daidzein, genistein, or the combination modulates bone development in female CD-1 mice. **J. Nutr.**, v.139, p. 467-473, 2009.

KREIJKAMP-KASPERS, S.; KOK, L.; GROBBEE, D.E.; HAAN, E.H.; ALEMAN, A.; LAMPE, J.W.; VAN DER SCHOUW, Y.T. Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **J. Am. Med. Assoc.**, v.292, p.65, 2004.

KROEZE, J.H.A. The perception of complex taste stimuli. In: MCBRIDE, R.L.; MASCFIE, H.J.H. **Psychological basis of sensory evaluation**, London: Elsevier Applied Science, 1990. 41-68.

KURZER, M. S.; XIA, X. Dietary phytoestrogens. **Ann. Rev. Nutr.**, v.17, p. 353-381, 1997.

LAGARI, V.S.; LEVIS, S. Phytoestrogens and bone health. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v.17, p.546-553, 2010.

LAGARI, V.S.; LEVIS, S. Phytoestrogens in the prevention of postmenopausal bone loss. **J. Clin. Densiton.**, , v. 16, p. 445-449, 2013.

LIEBERMAN S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical? **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p.5217-5221, 2001.

MATKOVIĆ, V.; KOSTIAL. K.; SIMONOVIĆ. I.; BUZINA, R.; BRODAREC, A.; NORDIN, B.E. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.32, p. 540-549, 1979.

MEI, J.; YEUNG, S.S.; KUNG, A.W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p. 5217-5221, 2001.

MESSINA, M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.100, p. 4235-4305, 2014.

NIKANDER, E.; METSÄ-HEIKKILÄ, M.; YLIKORKALA, O.; TIITINEN, A. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, p. 1207-1212, 2004.

NOVELLI, M.; D'ALEO, V.; LUPI, R.; PAOLINI, M.; SOLETI, A.; MARCHETTI, P.; MASIELLO, P. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model. **Pancreas**, v.35, p. e10-17, 2007.

PIEKARZ, A.V.; WARD, W.E. Effect of neonatal exposure to genistein on bonemetabolism in mice at adulthood. **Pediatr. Res.**, v.61, p. 48-53, 2007.

SCLAFANI, A.; XENAKIS, S. Sucrose and polysaccharide induced obesity in the rat. **Physiol. Behav.**, v.32, p. 169-174, 1984.

SETCHELL, K.D.R.; ADLERCREUTZ, H. Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: ROWLAND, I.R. (Ed) **Role of the gut flora intoxicity and cancer**. London: Academic Pren, 1988. p.315-345.

THAM, D.M.; GARDNER, C.D.; HASSELL, W.L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, p.2223-2235, 1998.

TURNER, C.H.; BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v.14, p.595-608, 1993.

WEAVER, C.M.; PROULX, W.R.; HEANEY, R. Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.70, p. 5435-5485, 1999.