

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS METABÓLICOS DO CONSUMO DA
CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EM
HUMANOS SAUDÁVEIS**

TESE DE DOUTORADO

Elisângela Colpo

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**EFEITOS METABÓLICOS DO CONSUMO DA
CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EM
HUMANOS SAUDÁVEIS**

Elisângela Colpo

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Colpo, Elisângela

efeitos metabólicos do consumo da castanha do brasil (*bertholletia excelsa*) em humanos saudáveis /

Elisângela Colpo. – 2014 .

67 p. ; 30cm

Orientador: João batista Teixeira da Rocha

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós Graduação em bioquímica Toxicológica, RS, 2014

1. Perfil lipídico
2. Marcadores inflamatórios
3. Selênio
4. Estresse oxidativo
5. Interleucinas
6. Resposta inflamatória
7. Doenças cardiovasculares
8. Aterogênese.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais E Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**EFEITOS METABÓLICOS DO CONSUMO DA CASTANHA DO BRASIL
(*Bertholletia excelsa*) EM HUMANOS SAUDÁVEIS**

elaborada por
Elisângela Colpo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Adair Roberto Soares dos Santos, Prof. Dr. (UFSC)

Ricardo Brandão, Prof. Dr. (UFSM)

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Profª. Drª. (UFSM)

Sara Marchesan de Oliveira, Profª. Drª. (UFSM)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial a minha mãe que é a grande incentivadora dos meus estudos.

Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano, porque o humano é imperfeito.
Fernando Pessoa

Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.
Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando. Agradeço aos meus pais Eliane Zanini Colpo e Artur Colpo, minhas irmãs Andriele Colpo, Elis Elen Colpo e cunhados Anibal Cigana e Bernardo Pereira pelo amor, compreensão, incentivo, companheirismo em todos os momentos, minha gratidão eterna.

Ao Matheus Smidt Weise, pela compreensão nos momentos difíceis no decorrer desta trajetória. Muito obrigada pelo carinho, amor e dedicação sempre ao meu lado.

Ao meu orientador João Batista Teixeira da Rocha, por toda a sua inteligência e competência. Obrigada por nos incentivar a criar, refletir e buscar novos conhecimentos.

A banca examinadora Profs. Drs. Adair Roberto Soares dos Santos, Ricardo Brandão, Maria Rosa Chitolina Schetinger e Sara Marchesan de Oliveira pela acuidade crítica ao revisar este trabalho.

Agradeço imensamente aos colegas e amigos que se disponibilizaram em participar do estudo. Muito obrigada Matheus Smidt Weise, Bernardo Pereira, Tobias Bordin, Ângela Figueira, Ana Lima, Nilda Barbosa, Cláudia Oliveira, Rafael Ineu, João Batista Teixeira da Rocha, Rosane Souza dos Santos, Vitor Antunes de Oliveira e Luiz Gustavo Reetz.

Agradeço aos coletadores de plantão que me ajudaram inúmeras vezes e em vários momentos com as coletas de sangue. Obrigada Luiz Gustavo Reetz e Mara Lacerda.

Agradeço aos colegas que me ajudaram com as análises sanguíneas. Muito obrigada Daiane Meinerz, Douglas Mariano, Emily Waczuk, e em especial ao Carlos Dalton Vilanova que sempre estava a disposição para me ajudar.

Agradeço a Marta Duarte por se disponibilizar em fazer as análises bioquímicas e pela parceria.

Agradeço a Luciane Noal Calil pela parceria e disponibilidade em revisar a tese.

Agradeço aos professores Edson Müller, Érico Flores, Roger Wagner e a doutoranda Aline Müller pela parceria com as análises experimentais na castanha-do-Brasil.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pelo aprendizado.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

Ao Centro Universitário Franciscano pelo apoio na realização deste curso.

Ao CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro.

A minha grande colega e amiga Iria Luiza Gomes Farias que muito contribuiu com o meu trabalho, com ideias inteligentes e práticas.

Aos colegas do laboratório Rogério Saraiva, Ana Lima, Jean Paul Kamdem, Daniel Roos, Lilian Lissner, Ângela Figueira, Emily Waczuk, Romaiana Pereira, Claudia Klimaczewski e Cristiane Dalla Corte.

As minhas amigas lindas que sempre me apoiaram e incentivaram nesta caminhada, em especial Viviani Ruffo de Oliveira, Ana Lúcia Saccol, Franceliane Benedetti, Vanessa Ramos Kirsten, Cristina Moraes e Eliziane Ruiz.

Aos colegas do Centro Universitário Franciscano pela compreensão nos momentos de minha ausência.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS METABÓLICOS DO CONSUMO DA CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*) EM HUMANOS SAUDÁVEIS

AUTORA: ELISÂNGELA COLPO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2014.

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, família Lecythidaceae) é o alimento mais rico em selênio conhecido até hoje. O seu consumo já se mostrou eficiente em melhorar o perfil lipídico e os níveis plasmáticos de selênio, além de aumentar a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) em humanos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos metabólicos do consumo de uma única porção de castanha do Brasil ao longo de 30 dias em humanos saudáveis. Tratou-se de um ensaio clínico randomizado controlado, do tipo *cross-over* realizado com adultos declaradamente saudáveis. Fizeram parte do estudo 10 voluntários, de ambos os sexos, provenientes da região de Santa Maria, RS. Os voluntários que aceitaram participar da pesquisa consumiram uma porção de diferentes concentrações de castanha do Brasil, sendo divididos em quatro grupos: 0, 5, 20 ou 50 g. Foi Cada grupo coletou sangue antes do consumo das castanhas e 1, 3, 6, 9, 24, 48 horas, 5 e 30 dias após o consumo de castanhas. Foram avaliados os marcadores do estresse oxidativo como atividade das enzimas GPx e δ -aminolevulinato desidratase, níveis plasmáticos de selênio, marcadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon gama (INF- γ), interleucinas (IL) 1, 6 e 8; e a interleucina anti-inflamatória IL-10. Além disso, foram avaliados o hemograma, marcadores hepáticos e renais. Na castanha do Brasil foram analisadas concentrações de selênio, ácidos graxos, presença de compostos fenólicos e flavonoides. Os parâmetros bioquímicos dos voluntários se encontraram dentro da normalidade. Os resultados demonstraram que o consumo de castanha do Brasil aumentou significativamente os níveis plasmáticos de selênio nos voluntários que consumiram 20 e 50 g de castanhas em relação aos níveis basais, tendo o maior pico nas 6 h após o consumo das castanhas. Contudo, o consumo de uma porção de diferentes concentrações de selênio durante 30 dias não foi suficiente para aumentar a atividade dos níveis eritrocitários da GPx. Do mesmo modo, foi observado que os voluntários que consumiram uma porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil apresentaram melhora do perfil lipídico, com diminuição do colesterol total e LDL-c e aumento do HDL-c também a partir de 6 h após o consumo até o 30º dia. Além disso, os grupos que consumiram uma porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil tiveram concentrações séricas da IL-1, TNF- α , INF- γ diminuídas e a interleucina anti-inflamatória IL-10 aumentada, a partir de 9h após o consumo de castanhas até o 30º dia. Pode-se observar que o consumo de uma porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil em humanos saudáveis em um período de 30 dias melhorou o perfil lipídico e os parâmetros inflamatórios desses voluntários. Além disso, pode-se evidenciar que a interação dos compostos da castanha pode ter contribuído para os resultados apresentados. No entanto, apesar do presente estudo mostrar efeitos benéficos do consumo de uma porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil em 30 dias, ainda é muito precipitado modificar a recomendação de uma porção de 5 g de castanha diária. Mais estudos são necessários para esclarecer melhor estes efeitos.

Palavras-chave: Perfil lipídico; Marcadores inflamatórios; Selênio; Estresse oxidativo; Interleucinas; Resposta inflamatória; Doenças cardiovasculares; Aterogênese.

ABSTRACT

Thesis of Doctorate
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

METABOLIC EFFECTS OF BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*) INTAKE IN HEALTHY HUMANS

AUTHOR: ELISÂNGELA COLPO

ADVISER: PROF. DR. JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Defense Date and Place: Santa Maria, February 25th, 2014.

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, *Lecythidaceae* family) is the richest known food in selenium. Its consumption has demonstrated efficient in improving the lipid profile and the plasmatic selenium levels as well as to increase the activity of glutathione peroxidase (GPx) enzyme in humans. Thus, this study aims at evaluating the metabolic effects of a single portion of Brazil nut intake in healthy humans. It is a cross-over randomized controlled clinical trial with professedly healthy adults. A group of 10 volunteers were part of the study; they were from both sexes, coming from Santa Maria/RS, region. The volunteers who accept to take part in the study have consumed portions with different Brazil nut concentration, they were divided into four groups: 0, 5, 20 or 50 g. Each group collected blood before the nuts consumption and also 1, 3, 6, 9, 24, 48 hours, 5 and 30 after the Brazil nuts consumption. We then evaluated the oxidative stress markers with activity of the GPx and δ -aminolevulinic acid dehydratase enzymes, the selenium plasmatic levels, inflammatory markers such as pro-inflammatory cytokines: the tumor necrosis factor (TNF- α), interferon gamma (INF- γ) and interleukin (IL) 1,6 and 8; and the anti-inflammatory interleukin IL-10. Besides that, it was also evaluated the blood count and the hepatic and renal markers. In the Brazil nut we analyzed the selenium concentration, fatty acids and the presence of flavonoids and phenolic compounds. Volunteers' biochemical parameters were normal. The results demonstrated that Brazil nut intake significantly increased selenium plasmatic levels for the volunteers who consumed 20 and 50 g of Brazil nuts in relation to basal levels with the higher peak occurring 6 hours after the Brazil nut consumption. However, the consumption of portions with different selenium concentrations for 30 days was not enough to increase the GPx erythrocyte levels activity. The higher plasmatic selenium peak was observed 6 hours after the nuts consumption. In the same way, it was observed that the volunteers who consumed a portion of 20 or 50g of Brazil nut presented improvement in the lipid profile with reduction of total cholesterol and LDL-c and, an increase of HDL-c also 6 hours after consuming the nuts until the 30th day. And furthermore, the groups that consumed a portion of 20 or 50g of Brazil nut had their serum concentration of IL-1, TNF- α , INF- γ decreased and the anti-inflammatory interleukin IL-10 increased, starting from 9 hours after consuming the nuts until the 30th day. It was possible to observe that the consumption of a 20 or 50g portion of Brazil nut in healthy humans during a 30 days period has improved the lipid profile and the inflammatory parameters for these volunteers. We can also point that the interaction of Brazil nut compounds may have contributed for the achieved results. Nevertheless, although this study demonstrated benefic effects for the consumption of a 20 or 50g of Brazil nut in a 30 days period, it is precipitated to change the recommendation of a daily 5g Brazil nut portion. Further studies are necessary to better clarify these effects.

Key words: Lipid profile; Inflammatory markers; Selenium; Oxidative stress; Interleukins; Inflammatory response; Cardiovascular disease; Atherogenesis.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Fatores de risco relacionados com o estresse oxidativo que levam a disfunção endotelial.....	20
Figura 2 - Evolução da aterogênese.....	22
Figura 3 - Formação de EROS a partir do metabolismo celular pela ação de enzimas e remoção das EROS pelas enzimas antioxidantes.....	24
Figura 4 - Castanheira do Brasil (A) com ouriços (B) e sementes (C) com a castanha do Brasil (D).....	26
Figura 5 - Via pro-inflamatória e anti-inflamatória dos ácidos graxos linoleico e α -linolênico.....	30

ARTIGO 1

Figure 1 - Plasma levels of selenium in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. Measures repeated—ANOVA and Wilcoxon tests.....	37
Figure 2 - Seric levels of LDL-c in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. Measure repeated—ANOVA and Wilcoxon tests.	37
Figure 3 - Seric levels of HDL-c in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. Measure repeated—ANOVA and Wilcoxon tests.	37

ARTIGO 2

Figure 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of <i>Bertholletia excelsa</i> aqueous extract. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), resveratrol (peak 3), ellagic acid (peak 4), epicatechin (peak 5), rutin (peak 6), quercitrin (peak 7), quercetin (peak 8) and kaempferol (peak 9)	43
Figure 2 - Seric levels of IL-1 in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. A. With basal. B. Difference to the basal. Wilcoxon Test. * $p < 0.05$ compared to basal.....	44
Figure 3 - Seric levels of IL-6 in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. A. With basal. B. Difference to the basal. Wilcoxon Test. * $p < 0.05$ compared to basal.....	45
Figure 4 - Seric levels of TNF- α in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. A. With basal. B. Difference to the basal. Wilcoxon Test. * $p < 0.05$ compared to basal.....	45
Figure 5 - Seric levels of IFN- γ in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. A. With basal. B. Difference to the basal. Wilcoxon Test. * $p < 0.05$ compared to basal.....	46
Figure 6 - Seric levels of IL-10 in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. A. With basal. B. Difference to the basal. Wilcoxon Test. * $p < 0.05$ compared to basal.....	46

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1- Anthropometric and biochemical variables baselines of subjects.....	35
Table 2 - Fatty acids composition of the Brazil nut.....	37

ARTIGO 2

Table 1- Anthropometric measurements and biochemical characteristics of the volunteers.....	43
Table 2 - Fatty acids composition of the Brazil nut.....	43
Table 3 - Phenolics and flavonoids composition of Brazil nuts (<i>Bertholletia excels</i>) aqueous extracts.....	43
Table 4 - GPx erythrocytes activity of healthy volunteers after consumption of the Brazil nut.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

± mais ou menos

× vezes

= igual

> maior que

≥ maior ou igual a

< menor que

≤ menor ou igual a

≈ aproximadamente

% por cento

δ-ALA-D - Ácido delta-aminolevulínico desidratase

AA - ácido araquidônico

AGS - ácidos graxos saturados

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

AVE – acidente vascular encefálico

BMI - índice de massa corporal (do inglês *body mass index*)

CAT - catalase

CHD – doença arterial coronariana (do inglês *coronary heart disease*)

COX - ciclooxigenase

COX-2 - ciclooxigenase-2

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CT - colesterol total

Cu - cobre

DHA - ácido docosahexaenoico

DNA - ácido desoxirribonucleico

DRI - ingestão dietética recomendada (do inglês *dietary reference intakes*)

EAR – necessidade média estimada (do inglês *estimated average requirement*)

ECA - enzima conversora de angiotensina

EDE - ácido eicosadienóico

EPA - ácido eicosapentaenoico

EROs- espécies reativas de oxigênio

ETE - ácido eicosatrienóico

ET-1 - endotelina 1

FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FCDE - fator constritor derivado do endotélio

FFQ - questionário de frequência alimentar (do inglês *food frequency questionnaire*)

FHDE - fator hiperpolarizante derivado do endotélio

FRDE - fator relaxante derivado do endotélio

g/dL - grama por decilitro

GPx - glutationala peroxidase

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HDL-c - lipoproteína de alta densidade (do inglês *high-density lipoprotein*)

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)

hs- CRP - proteína C reativa de alta sensibilidade (do inglês *high-sensitivity C reactive protein*)

ICAM - molécula de adesão intercelular (do inglês *intercellular adhesion molecule*)

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1 (do inglês *intercellular adhesion molecule 1*)

IDL-c - lipoproteína de densidade intermediária (do inglês *intermediate-density lipoprotein*)

IL-1- interleucina-1

IL-6- interleucina-6

IL-8- interleucina-8

IL-10- interleucina-10

INF- γ - interferon gama

iNOS - óxido nítrico sintase

LDL-c - lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low-density lipoprotein*)

LOD - limite de detecção

LOQ - limite de quantificação

LOX - lipoxigenase

LT - leucotrieno

LTB₄ - leucotrieno B₄

mg - miligrama(s)

mg/dL - miligrama por decilitro

mg/mL - miligrama por ml

MMPs - metaloproteinases de matriz (do inglês *matrix metalloproteinase*)
MPO - mieloperoxidase
MUFA - ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acid*)
NADPH- nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NADPH-oxidase- Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidase
NF- κ B - fator nuclear- β
nmol - nanomol
NO - óxido nítrico
NOS- enzima óxido nítrico sintase
NRC – conselho nacional de pesquisa (do inglês *national research council*)
 \cdot OH - radical hidroxila
 $O_2^{\cdot-}$ - radical superóxido
 $OONO^-$ - peroxinitrito
pg - picograma
pg/mL - picograma por ml
PAF-AH - fator ativador de plaquetas – acetilhidrolase
PAI-1 - inibidor do ativador de plasminogênio 1
PG - prostaglandina
PGH₂- prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaciclina I₂
PON - paraoxonase
PUFA - ácido graxo poliinsaturado (do inglês *polyunsaturated fatty acid*)
RDA - recommended dietary allowance
Se - selênio
Sec - selenocisteína
SeMet - selenometionina
SFA - ácido graxo saturado (do inglês *saturated fatty acid*)
SOD - superóxido dismutase
TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG - triglicerídeos
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TrxRs - tioredoxina redutase
TX - tromboxano
TXA₂ - tromboxano A₂

VCAM - molécula de adesão das células vasculares (do inglês *vascular cell adhesion molecule*)

VCAM-1 - molécula de adesão das células vasculares-1 (do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*)

VLDL-c - lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoprotein*)

UFSM- Universidade Federal de Santa Maria

UL - limite superior tolerável de ingestão (do inglês *tolerable upper intake level*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

ω 3 - ácido graxo α -linolênico

ω 6 - ácido graxo linoleico

ω 9 - ácido graxo oleico

Zn - zinco

α - alfa

β - beta

γ - gama

δ - delta

μ - micro

μ g - micrograma

μ g/L - micrograma por litro

μ g/g - micrograma por grama

μ g/d - micrograma por dia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
Doenças cardiovasculares, estresse oxidativo e inflamação.....	19
Inflamação e aterosclerose.....	20
Espécies Reativas de oxigênio (EROS) e defesas antioxidantes.....	23
Castanha do Brasil.....	25
1.1 Objetivos.....	31
1.1.1 Objetivo geral.....	31
1.1.2 Objetivos específicos.....	31
2 ARTIGOS CIENTÍFICOS	32
2.1 ARTIGO 1 - A Single Consumption of High Amounts of the Brazil Nuts Improves Lipid Profile of Healthy Volunteers.....	33
ABSTRACT.....	34
1 BACKGROUND.....	34
2 METHODS.....	35
3 RESULTS.....	36
4 DISCUSSION.....	37
REFERENCES.....	38
2.2 ARTIGO 2 - Brazilian nuts consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters.....	41
ABSTRACT.....	42
1 INTRODUCTION.....	42
2 MATERIALS AND METHODS.....	43
3 RESULTS.....	45
4 DISCUSSION.....	46
REFERENCES.....	47
3 DISCUSSÃO.....	49
4 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	56

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma breve apresentação sobre os temas trabalhados nesta tese.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que compõem esta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item **RESULTADOS**. Nestes artigos constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontram-se no final desta tese, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

Doenças Cardiovasculares, estresse oxidativo e inflamação

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 7 milhões de pessoas morrem de doenças cardiovasculares por ano (WHO, 2011). As doenças cardiovasculares estão comumente descritas como doença multifatorial, caracterizada pela ativação do sistema neuro-humoral (sistema renina-angiotensina-aldosterona e simpático), inflamação, reprogramação celular e disfunção bioenergética (CHEN et al., 2008; CHURCHILL et al., 2010; FERREIRA et al., 2008; SHEN, YOUNG, 2012). Estas alterações estão relacionadas com o aumento do estresse oxidativo e do processo inflamatório, além da redução da capacidade antioxidante (STONER et al., 2013).

Tem demonstrado que fatores como obesidade, tabagismo, sedentarismo e dislipidemia estejam associados com a aterogênese e com isso, envolvidos na formação de substâncias pró-inflamatórias como citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas e Espécies Reativas ao Oxigênio (EROS), conforme Figura 1. Estes mecanismos ainda não estão totalmente claros, mas sua associação com as complicações e a mortalidade por doenças cardiovasculares é evidente em diversos estudos clínicos experimentais (DAVIS, JUAREZ, HODGES, 2013; DHAUN et al., 2013; FRANCK, LEITTE, SUPPAN, 2013; PEDERSEN, 1994; WILSON et al., 1998).

As lipoproteínas (LPO) como de baixa densidade (LDL-c), de muito baixa densidade (VLDL-c) e de densidade intermediária (IDL-c) influenciam no potencial aterogênico. A LPO LDL-c oxidada tem relevante papel na inflamação vascular, na disfunção do endotélio e na formação de células espumosas na parede íntima (LIBBY, RIDKER MASERI, 2002). Algumas evidências sugerem que a lipoproteína β -VLDL tem o potencial de ativar funções inflamatórias das células endoteliais vasculares (DICHTL et al., 1999; MACKNESS et al., 1998). A LPO de alta densidade (HDL-c) protege contra a aterosclerose, pois faz o transporte reverso de colesterol, tendo função ateroprotetora. Além disso, partículas de HDL-c podem também transportar enzimas antioxidantes como o fator ativador de plaquetas - acetilhidrolase (PAF-AH) e paraoxonase (PON), que pode neutralizar os lipídios oxidados e neutralizar seus efeitos pró-inflamatórios (LIBBY, RIDKER MASERI, 2002).

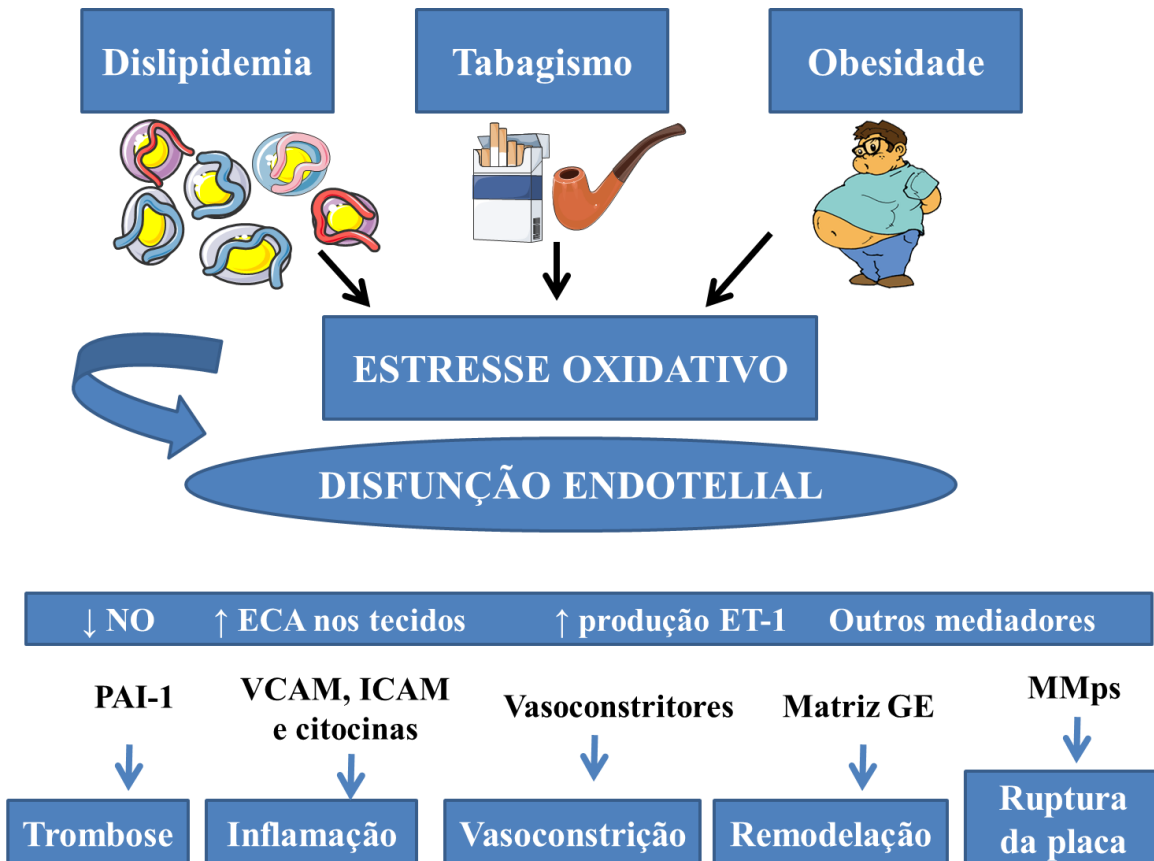


Figura 1: Fatores de risco relacionados com o estresse oxidativo que levam a disfunção endotelial. O estresse oxidativo causado por fatores como dislipidemia, tabagismo e obesidade resultam na diminuição do óxido nítrico (ON), no aumento da enzima conversora de angiotensina (ECA), no aumento da produção de endotelina 1 (ET-1) que, por sua vez, aumenta o estresse oxidativo. PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1; VCAM: molécula de adesão das células vasculares; ICAM: molécula de adesão intercelular; MMPs: metaloproteinases de matriz. Adaptado de Pashkow et al. (2008).

Inflamação e aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (ROSS, 1999).

A hipótese mais atual sobre a aterogênese envolve o papel da disfunção endotelial e da inflamação como etapas iniciais da formação da placa de ateroma. As células endoteliais das artérias são danificadas mecanicamente por agentes citotóxicos, como as LDL oxidadas. Tais lesões também podem ser causadas por agressões químicas (aumento da colesterolemia) e mecânicas (a circulação sanguínea pode causar lesões celulares, sendo estas mais comuns nas áreas de bifurcação, onde há maior trauma mecânico) (LIBBY, 2002).

As EROS favorecem a oxidação da lipoproteína LDL-c, no entanto, antioxidantes e ácidos graxos essenciais podem diminuir a oxidação da LDL-c (ESTERBAUER et al., 2002). Com a disfunção endotelial ocorre um aumento da permeabilidade leucocitária com migração e adesão de monócitos e plaquetas, favorecendo uma atividade pró-coagulante, aumento da expressão de moléculas de adesão como selectinas, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), síntese de citocinas e liberação de moléculas vasoativas pelo endotélio lesado. Assim, desencadeia-se a oxidação de LDL-c, que são fagocitadas por macrófagos, originando células espumosas, carregada de lipídeos, causando rápido acúmulo de gordura na parede dos vasos sanguíneos (ROSS, 1999; LIBBY, 2002), conforme Figura 2.

Segundo Pearson et al. (2003), os marcadores inflamatórios para avaliar risco de doenças cardiovasculares são: a LDL-c oxidada, citocinas pró-inflamatórias como Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), as moléculas de adesão como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e selectinas, estímulo inflamatório com efeito hepático (Interleucina-6 - IL-6) ou produtos de estimulação hepática como a proteína amiloide A, a proteína C-reativa (PCR) e outras proteínas de fase aguda. A interleucina anti-inflamatória IL-10, ao contrário, têm papel regulador importante na redução da liberação das interleucinas pró-inflamatórias, inibindo a síntese do TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 em monócitos e macrófagos.

Com a aceleração do processo inflamatório, ocorre a migração e a proliferação de células musculares lisas da camada média para a íntima, espessamento arterial e remodelamento da parede do vaso afetado. As lipoproteínas sanguíneas, particularmente as LDL-c, continuam entrando na camada íntima, contribuindo para o acúmulo lipídico. As células na lesão começam a secretar colágeno, elastina e glicosaminoglicanos, formando uma capa fibrosa, com cristais de colesterol no seu centro (placa fibrogordurosa) (ROSS, 1999; LIBBY, 2002).

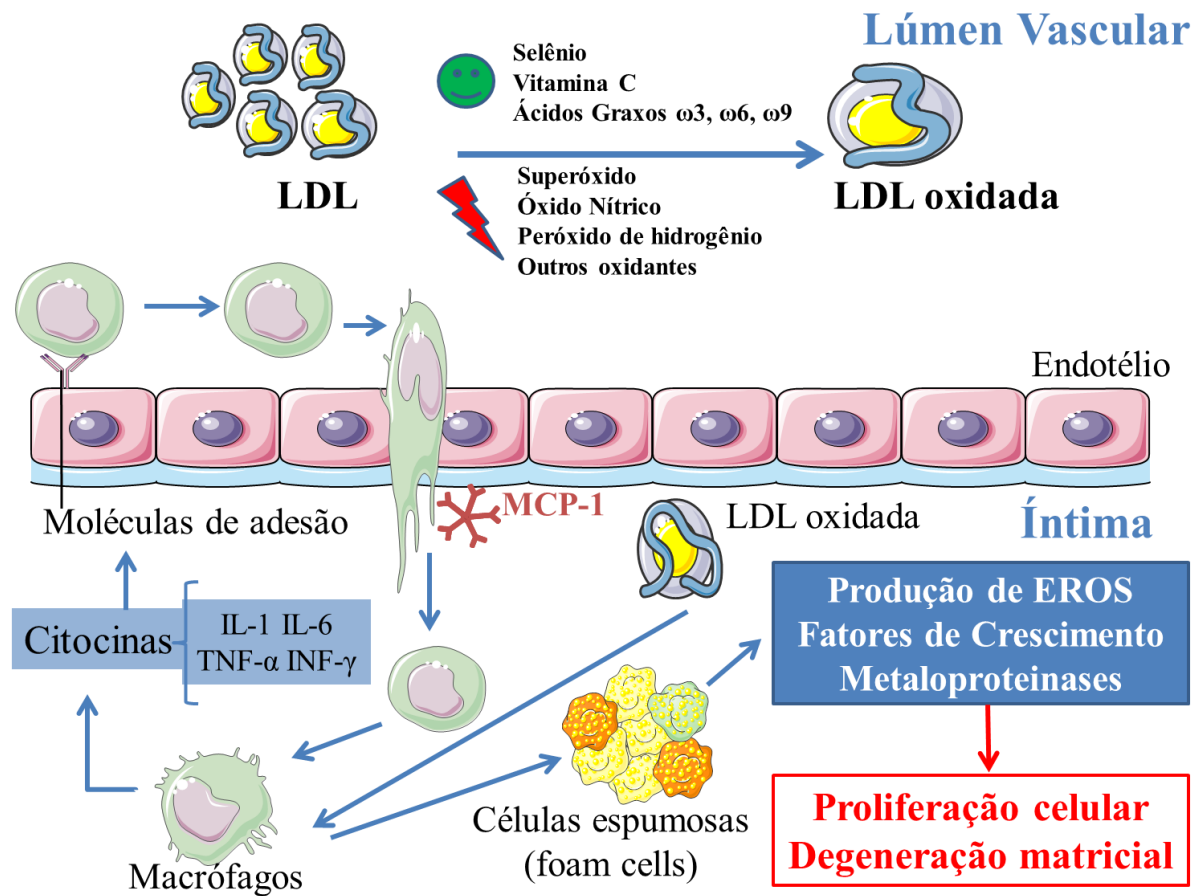


Figura 2: Evolução da aterogênese. Adaptado de Libby (2002).

A aterogênese produz vários compostos vasoativos, os vasodilatadores: fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE); os vasoconstritores: fator constritor derivado do endotélio (FCDE) como a angiotensina II, endotelina, tromboxano A_2 /prostaglandina H_2 (TXA_2/PGH_2) e íons superóxido e isoprostanos (ABEYWARDENA; HEAD, 2001).

Essa placa fibrogordurosa ou fibrosa gradativamente se calcifica, pois os depósitos de gordura atraem compostos de cálcio, o que irá espessar e enrijecer ainda mais a artéria lesada. Futuramente, poderão ocorrer complicações na placa como ulceração, trombose, hemorragia, embolia, que se for nas artérias coronárias, poderá levar à oclusão súbita da luz do vaso, causando um infarto do miocárdio; se for numa artéria cerebral, poderá causar um Acidente Vascular Encefálico (AVE) isquêmico (ROSS, 1999; LIBBY, 2002).

Espécies Reativas de Oxigênio e defesas antioxidantes

As Espécies Reativas de Oxigênio podem ser definidas como moléculas ou fragmentos moleculares que contém um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As EROS são produtos normais do metabolismo celular, sendo produzidas pelo sistema de elétrons localizado na membrana mitocondrial, pela ação das enzimas xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidase, ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), e pelo sistema de fagócitos NADPH oxidase/mieloperoxidase (MPO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), conforme Figura 3. Fontes externas como os constituintes dietéticos, a radiação ultravioleta, o tabagismo e os poluentes ambientais também podem contribuir para o aumento de substâncias oxidantes (FREI et al., 1994). As EROS podem se combinar com outros átomos e formar outras espécies reativas. Os prejuízos causados pelo excesso de espécies reativas consistem em danos celulares que podem atingir lipídeos de membranas, carboidratos, proteínas e DNA (VINCENT; TAYLOR, 2006).

Cerca de 95% do oxigênio produzido durante o metabolismo aeróbico é utilizado para a produção de energia, mas o restante não é totalmente oxidado em água e gera espécies reativas. As principais formas incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007; VINCENT; TAYLOR, 2006). O $O_2^{\cdot-}$ possui pouca reatividade em soluções aquosas, estando presente em quase todas as células aeróbicas, sendo produzido principalmente na cadeia respiratória mitocondrial e durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007). O $\cdot OH$ é a espécie de oxigênio mais reativa do sistema biológico. É frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Além disso, tem a capacidade de se combinar rapidamente com metais e outros radicais, podendo atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucléicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

O H_2O_2 , apesar de não possuir elétrons desemparelhados na última camada, é capaz de atravessar a membrana nuclear induzindo danos na molécula de DNA, além de participar das reações que produzem $\cdot OH$ (ANDERSON, 1996). Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico é uma espécie radical centrada no átomo de nitrogênio, apresenta meia-vida de 1 a 10 segundos e desempenha uma série de funções importantes no organismo humano em

processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, relaxamento da musculatura lisa e regulação do sistema imune. O NO pode reagir com as EROS, principalmente o radical superóxido, gerando peroxinitrito (OONO^\cdot), que é um potente agente oxidante capaz de causar fragmentação de DNA e oxidação lipídica (BERRY, HARE, 2004; CARR et al., 2000; CARRERAS et al., 1994).

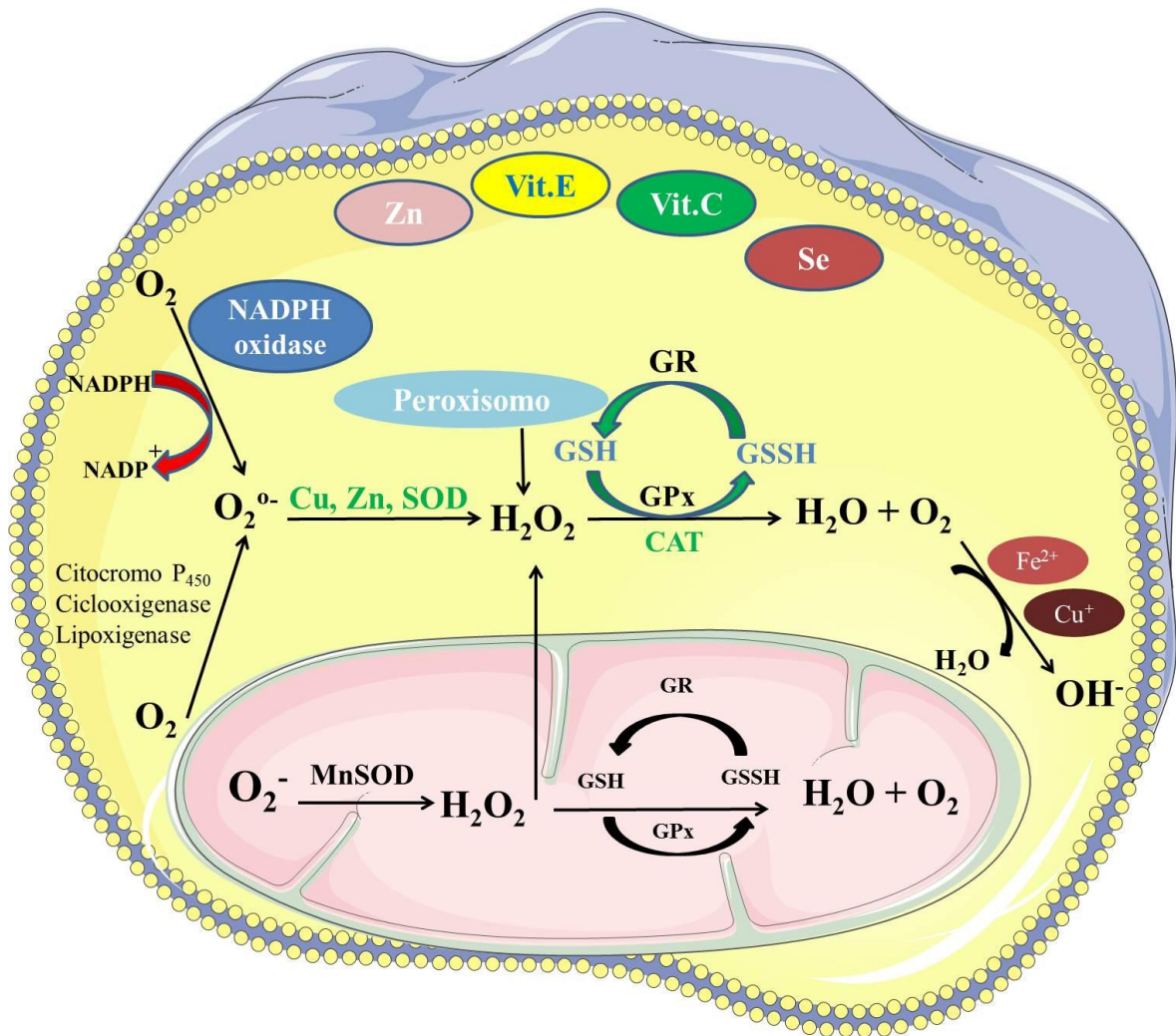


Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio a partir do metabolismo celular pela ação de enzimas e remoção das espécies reativas de oxigênio pelas enzimas antioxidantes. Adaptado de Yoshizumi et al. (2001).

O aumento do estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção das EROs e/ou de nitrogênio e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos (VALKO et al., 2006). O estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento de muitas doenças como o câncer (MARNETT, 2000; VALKO et al., 2006), doenças

cardiovasculares (LI, HORKE; FÖRSTERMANN, 2013; STOCKER AND KEANEY, 2004), Diabetes Mellitus (PÉREZ-MATUTE, ZULET, MARTÍNEZ, 2009; YAMAGISHI et al., 2001), entre outras (VALKO et al., 2007).

O organismo possui mecanismos de defesa para evitar maiores danos provocados pelas EROS. Halliwell e Gutteridge (2007) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs (Figura 3). Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil (BOVERIS; CADENAS, 1997). As defesas não-enzimáticas são compostas principalmente por antioxidantes hidrossolúveis, como o ácido ascórbico, a vitamina E e os polifenóis. Elementos como o Selênio (Se), Zinco (Zn) e Cobre (Cu) também possuem ação antioxidante, pois participam da síntese de enzimas antioxidantes como a SOD e a GPx, conforme Figura 3.

Castanha do Brasil

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, família Lecythidaceae), nativa da região amazônica, é o alimento mais rico em selênio conhecido até hoje com concentrações que variam desde 0,03 até 512,0 µg/g (CHANG et al., 1995; FREITAS et al., 2008). A castanheira do Brasil é uma espécie arbórea de grande porte, da família das lecitidáceas. A árvore pode chegar a 50 metros de altura e seus frutos esféricos (ouriços) possuem de 12 a 25 sementes (SOUZA, 2006), conforme Figura 4.

Além de altas concentrações de Se presentes na castanha do Brasil, esta oleaginosa também apresenta importantes propriedades nutricionais para a saúde incluindo fontes de cálcio, magnésio, folato, sódio e potássio (DUMONT et al., 2006; SEGURA, 2006; YANG, 2009). A castanha do Brasil também é conhecida por apresentar importantes fontes de ácidos graxos insaturados, em ordem decrescente de concentração: o ácido graxo oleico – ω 9, o ácido graxo linoleico - ω 6 e ácido graxo α -linolênico – ω 3, além de ácidos graxos saturados

(AGS) em especial o ácido palmítico e o ácido esteárico (ALASALVAR; PELVAN, 2011; CHUNHIENG et al., 2008).

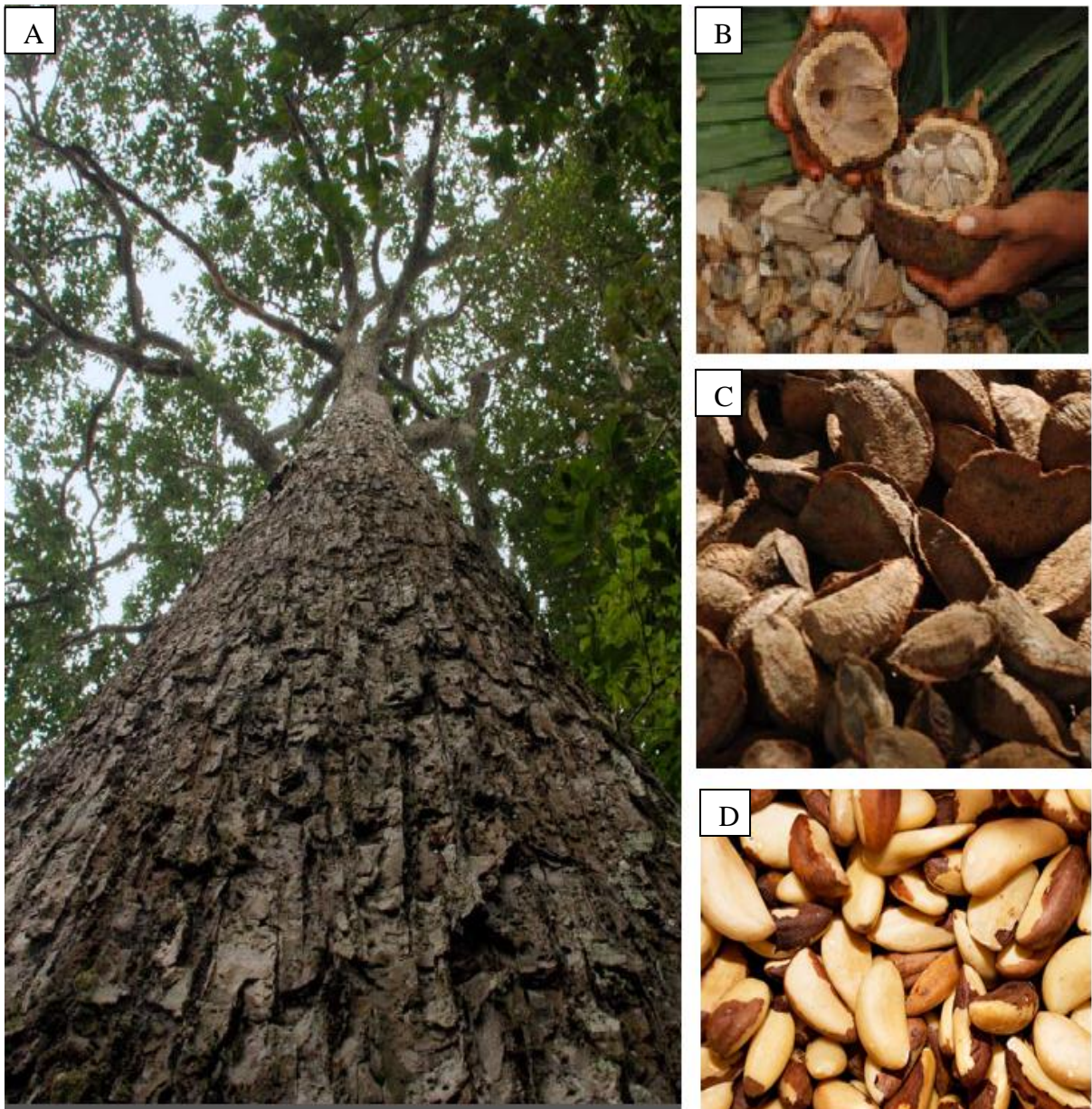


Figura 4: Castanheira do Brasil (A) com ouriços (B) e sementes (C) com a castanha do Brasil (D). Adaptado de Apiz (2008).

Outros alimentos como cogumelos, alfaça, frutos do mar, peixes, fígado, rins bovinos, ovos, leveduras, cereais e espécies de crucíferas como mostarda, repolho, brócolis e couve-flor também são consideradas boas fontes de Se (DUMONT et al., 2006; IP, 1998). O consumo diário de apenas uma castanha do Brasil pode ultrapassar as necessidades diárias de Se segundo as recomendações da *National Academy of Sciences* (NAP). No entanto, de acordo com vários estudos mostrando que o consumo de oleaginosas têm efeitos benéficos

sobre doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2008) e biomarcadores intermediários, como as lipoproteínas (SABATÉ; ODA; ROS, 2010), a Food and Drug Administration concluiu em 2003, que um consumo de 43 g de oleaginosas por dia, como parte de uma dieta com baixo teor lipídico, pode reduzir o risco de doenças do coração (FDA, 2003).

O selênio é um oligoelemento essencial para a saúde humana (RAYMAN, INFANTE, SARGENT, 2008) e suas funções biológicas são mediadas pela expressão de aproximadamente 20 selenoproteínas, que possuem selenocisteína em seus sítios ativos (KRYUKOV et al., 2003; NOGUEIRA, ROCHA, 2001). Algumas selenoproteínas como a GPx e a Tio redoxina Redutase (TrxRs) são enzimas importantes pois estão envolvidas no metabolismo das EROS (BURK, HILL, MOTLEY, 2003).

A família da GPx catalisa a redução de H_2O_2 e outros peróxidos em água ou álcool (CZUCZEJKO et al., 2003; RAYMAN, 2012). A GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm como sítio ativo o selênio, obtido da dieta, ligado ao aminoácido metionina em alimentos de origem vegetal (selenometionina - SeMet), principal precursor do aminoácido Selenocisteína (Sec) encontrado em alimentos de origem animal. O consumo adequado de selênio é essencial para diversas selenoproteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, para manutenção das reações de óxido-redução e regulação do sistema imune (REEVES; HOFFMANN, 2009). Estas selenoproteínas são predominantemente sintetizadas e secretadas pelo fígado (BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 2001; DEAGEN et al., 1993), principal órgão do metabolismo e homeostase do Se no corpo humano (BULJEVAC et al., 1996; WHANGER, 1998).

O aumento dos níveis de Se (acima de 2447 $\mu\text{g/L}$) no sangue total foi observado entre as pessoas que consumiram grandes quantidades de castanha do Brasil, particularmente durante o período de safra das castanhas, de dezembro a abril (LEMIRE et al., 2009). A quantidade do nutriente essencial considerado adequado para exigências humanas é determinada pela Ingestão Dietética Recomendada (DRI). O NRC (*National Research Council*) escolheu a concentração de selenoproteínas plasmáticas como parâmetro para determinar as necessidades de Se. Para tanto, em adultos, as concentrações de GPx otimizadas foram o indicador usado para o cálculo da EAR (*estimated average requirement*) e RDA (*recommended dietary allowance*), estudo que foi concluído com base em resultados de trabalhos de pesquisas de intervenção (COZZOLINO, 2009).

O primeiro estudo foi da China, cujo resultado demonstrou que uma ingestão de 41 $\mu\text{g/d}$ de Se é suficiente para saturar a atividade da GPx. Este estudo transposto para os moldes

da população norte-americana recomendou ingestão de 52 µg/d de Se. O mesmo modelo estudado na Nova Zelândia concluiu que 38 µg/d de Se são suficientes para saturar a atividade da GPx (IOM, 2001). A partir da média dos valores encontrados nesses estudos, foi possível estabelecer a EAR de 45 µg/d de Se e a RDA de 55 µg/d de Se para adultos. A NAP sugere uma quantidade ampla de Se de 55-200 µg/d como segura e adequada para adultos. Outros órgãos dos USA (ATSDR, 2003) concluíram que a ingestão de 350 µg/d de Se é pouco provável causar algum efeito adverso para a saúde durante toda a vida. Para Köhrle et al. (2000) quantidades inferiores a 20 µg/d são consideradas insuficientes podendo causar deficiência de Se e o aparecimento de doenças como Keshan e de Kaschin-Beck.

O limite superior tolerável de ingestão (UL) é definido como o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece nenhum efeito adverso à saúde, em quase todos os indivíduos de um estágio de vida ou de gênero (NAP, 2001). A UL para adultos segundo as DRIs é de 400 µg/d Se. Contudo, 800 µg/d foram definidos como o nível de ingestão de Se em que poucos indivíduos apresentariam sinais de ingestão excessiva (KÖHRLE, 2000; NAP, 2001; YANG et al., 1989).

No estudo de Stockler-Pinto et al. (2010), o consumo de uma castanha do Brasil por dia (≈ 5 g), com quantidades próximas a 290 µg de Se durante três meses aumentou quase 6 vezes os níveis de Se plasmático e em torno de 3 vezes os níveis de Se eritrocitário em pacientes em hemodiálise. Além disso, a atividade da GPx também se elevou após a suplementação de castanhas.

O consumo de castanha do Brasil já provou ser eficiente em melhorar o status de selênio em estudos nacionais e em um deles foi demonstrado também a eficácia em elevar a atividade plasmática e eritrocitária da enzima GPx (COMINETTI et al., 2012; STRUNZ et al., 2008). Do mesmo modo, a castanha do Brasil mostrou um efeito benéfico como fonte de selênio e ácidos graxos mono e poli-insaturados em mulheres obesas, demonstrando também neste estudo a influência do polimorfismo ProLeu no gene que codifica a GPx1, presente em altas quantidades nos mamíferos, sobre as concentrações sanguíneas de Se e a atividade eritrocitária total da GPx (COMINETTI, 2011).

Os ácidos graxos presentes na castanha do Brasil, como o ácido graxo linoleico ($\omega 6$) e ácido graxo α -linolênico ($\omega 3$) são considerados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese *de novo* (YEHUDA et al., 2002). O ácido graxo oleico – $\omega 9$, por sua vez é um ácido graxo não essencial e, a partir de reações enzimáticas, forma ácidos eicosadienóico (EDE) e eicosatrienóico (ETE). Já o ácido araquidônico (AA) é formado por uma cadeia de reações enzimáticas a partir do ácido graxo

linoleico ($\omega 6$) e, os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) são formados a partir de reações enzimáticas com o ácido graxo α -linolênico ($\omega 3$) (LE et al., 2009).

Em humanos, os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ são essenciais para manter sob condições normais as membranas celulares, desenvolvimento neurológico e a transmissão de impulsos nervosos (YOU DIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). Os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ exercem inúmeros efeitos sobre diferentes aspectos fisiológicos e do metabolismo, podendo influenciar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

O ácido araquidônico, produto dos ácidos graxos $\omega 6$ é precursor dos prostanóides das séries 1, 2 e 3, que são obtidos pelas enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, originando mediadores que contribuem para a resposta inflamatória como as prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) da série 2 (PGE₂, PGF₂, PGI₂, TXA₂) ou leucotrienos (LT) da série 4 (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄), respectivamente (Figura 5). Esses mediadores têm papéis bem conhecidos na imunidade e na inflamação (CALDER, 2013; KENDALL; NICOLAOU, 2013), contribuindo para a formação de EROS e conseqüentemente, o aumento do estresse oxidativo nas células, conforme Figura 3. Apesar do AA contribuir para a resposta inflamatória, ele também serve de substrato para outros eicosanoides com características anti-inflamatórias/antiagregantes, como a prostaciclina, a lipoxina A₄ (SERHAN, 2005) e ácidos epoxieicosatrienoicos, que possuem importante efeito vasodilatador (NODE et al., 1999).

O papel da relação $\omega 3/\omega 6$ na dieta sobre a patogênese de doenças cardiovasculares, inflamatórias e autoimunes tem causado controvérsias nos últimos anos. A importância da relação $\omega 3/\omega 6$ fundamenta-se na competição entre os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ pela ação da enzima Δ -6 dessaturase, que irá formar diferentes subprodutos (Figura 5). Além disso, um consumo elevado de ácido $\omega 6$ pode diminuir o metabolismo do ácido $\omega 3$ a EPA e DHA (LIOU et al., 2007), limitando seus benefícios. Segundo Santos et al. (2013), as recomendações dietéticas devem ser feitas com base no consumo total de ácidos graxos poli-insaturados $\omega 6$ e não apenas com base na relação $\omega 3/\omega 6$.

Por outro lado, os ácidos graxos saturados podem ter efeitos diversos no perfil lipídico e fatores de risco cardiovascular. Apesar de ser conhecido por aumentar o LDL-c, os AGS também aumentam HDL-c e não alteram a relação CT/HDL, se comparados ao consumo de carboidratos (MENSINK et al., 2003; VAN HORN et al., 2008).

Uma metanálise mostrou que, se comparado a carboidratos, o ácido graxo láurico (C12:0) é o que mais aumenta o LDL-c, seguido do mirístico (C14:0) e do palmítico (C16:0). Já o esteárico pode provocar pequena redução no LDL-c. No tocante ao HDL-c, na mesma

comparação com carboidratos, os AG láurico, mirístico e palmítico aumentam em maior % o HDL-c, enquanto o esteárico provoca um pequeno aumento no HDL-c (MICHA; MOZAFFARIAN, 2010).

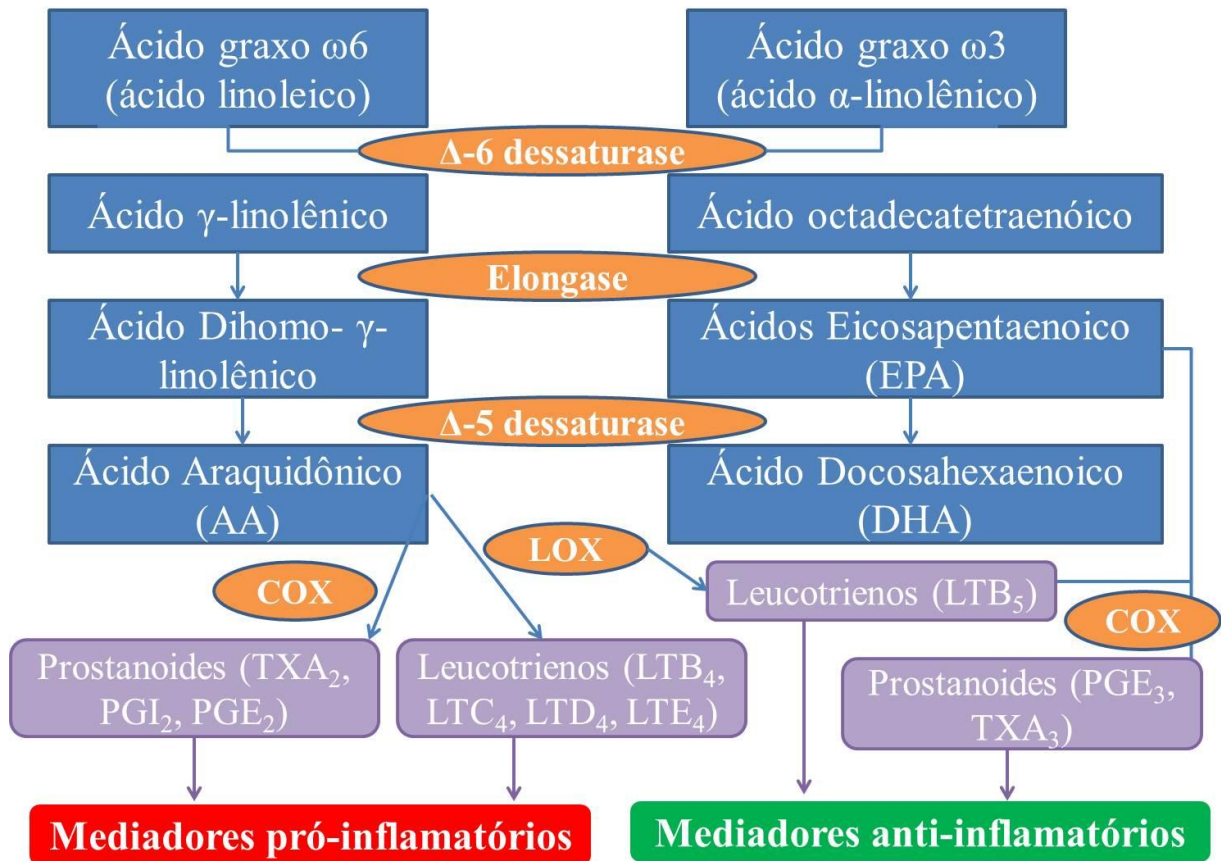


Figura 5: Via pró-inflamatória e anti-inflamatória dos ácidos graxos linoleico e α-linolênico. Adaptado de Calder (2013).

Diante de todos os efeitos observados na literatura sobre o consumo da castanha do Brasil em humanos, este estudo pretende avaliar qual a porção de castanha do Brasil possui melhores efeitos sobre a saúde humana e, se apenas uma porção ao longo de 30 dias tem efeitos satisfatórios em humanos saudáveis. Além disso, determinar se a biodisponibilidade de selênio e ácidos graxos essenciais presentes na castanha do Brasil possuem efeitos sobre o estresse oxidativo em humanos saudáveis.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos metabólicos do consumo de uma única porção de castanha do Brasil ao longo de 30 dias em humanos saudáveis.

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos em 30 dias de parâmetros pró e anti-inflamatórios após o consumo de castanha do Brasil em humanos;
- Investigar os efeitos em 30 dias do perfil lipídico após o consumo de castanha do Brasil em humanos;
- Verificar qual a quantidade de castanha do Brasil deve ser consumida para contribuir com o melhor efeito em relação aos parâmetros pró-inflamatórios e o perfil lipídico em humanos;
- Verificar quais os principais nutrientes da castanha do Brasil já conhecidos possuem efeitos benéficos para a saúde humana.

RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos (1 e 2). Os itens “Materiais e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências Bibliográficas” estão contidos no próprio artigo e manuscritos. O **artigo científico 1** está disponível na forma em que foi publicado no periódico *Journal of Nutrition and Metabolism - Hindawi*. O **artigo científico 2** está na forma “*proof*” pelo periódico *Nutrition Elsevier*.

2 ARTIGOS

2.1 Artigo 1 – “Consumo de uma única porção de altas quantidades de castanha do Brasil melhora o perfil lipídico em voluntários saudáveis”

A Single Consumption of High Amounts of the Brazil Nuts Improves Lipid Profile of Healthy Volunteers

Elisângela Colpo, Carlos Dalton de Avila Vilanova, Luiz Gustavo Brenner Reetz, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Iria Luiza Gomes Farias, Edson Irineu Muller, Aline Lima Hermes Muller, Erico Marlon Moraes Flores, Roger Wagner, João Batista Teixeira da Rocha

Journal of Nutrition and Metabolism – Hindawi

v. 2013, pp. 1-7, 2013

Clinical Study

A Single Consumption of High Amounts of the Brazil Nuts Improves Lipid Profile of Healthy Volunteers

Elisângela Colpo,^{1,2} Carlos Dalton de Avila Vilanova,¹ Luiz Gustavo Brenner Reetz,³ Marta Maria Medeiros Frescura Duarte,^{1,4} Iria Luiza Gomes Farias,³ Edson Irineu Muller,¹ Aline Lima Hermes Muller,¹ Erico Marlon Moraes Flores,¹ Roger Wagner,⁵ and João Batista Teixeira da Rocha¹

¹ Department of Chemistry, Natural and Exact Sciences Centers, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105900 Santa Maria, RS, Brazil

² Department of Nutrition, Center Franciscan University (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brazil

³ Clinical Laboratory Analysis, University Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Lutheran University of Brazil (ULBRA), Santa Maria, RS, Brazil

⁵ Department of Technology and Food and Science, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to João Batista Teixeira da Rocha; jbtrocha@yahoo.com.br

Received 20 April 2013; Revised 15 May 2013; Accepted 15 May 2013

Academic Editor: Cindy Davis

Copyright © 2013 Elisângela Colpo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. This study investigates the effects of Brazil nut ingestion on serum lipid profile in healthy volunteers. **Methods.** Ten healthy subjects were enrolled in the study. Each subject was tested 4 times in a randomized crossover in relation to the ingestion of different serving sizes of the Brazil nut: 0, 5, 20, or 50 g. At each treatment point, peripheral blood was drawn before and at 1, 3, 6, 9, 24, and 48 hours and 5 and 30 days. Blood samples were tested for total cholesterol, high- and low-density lipoprotein cholesterol (HDL-c and LDL-c, resp.), triglycerides, selenium, aspartate and alanine aminotransferases, albumin, total protein, alkaline phosphatase, gamma GT, urea, creatinine, and C-reactive protein. **Results.** A significant increase of the plasma selenium levels was observed at 6 hours within the groups receiving the nuts. Serum LDL-c was significantly lower, whereas HDL-c was significantly higher 9 hours after the ingestion of 20 or 50 g of nuts. The biochemical parameters of liver and kidney function were not modified by ingestion of nuts. **Conclusions.** This study shows that the ingestion of a single serving of Brazil nut can acutely improve the serum lipid profile of healthy volunteers.

1. Background

Selenium is an essential nutrient for human health [1], and its biological functions are mediated by the expression of about 20 selenoproteins which have selenocysteine at their active centers [2–4]. Some selenoproteins, for example, glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR), are important antioxidant enzymes [3, 5–7]. However, high acute selenium ingestion can be toxic to mammals, and epidemiological observations have suggested that dietary overexposure to selenium increases the prevalence of chronic degenerative diseases such as type 2 diabetes, a myotrophic lateral sclerosis, and neoplasias [3, 8, 9].

Selenoproteins can promote cardiovascular benefits possibly via their antioxidant properties. Some isoforms of GPx are known for being able to prevent the oxidative modification of lipids (including those found in lipoproteins), inhibit platelet aggregation, and modulate inflammation by reducing the peroxide tonus [1, 3, 10–12]. Additionally, some animals as well as epidemiological studies in humans have identified a putative protective role of some GPx isoforms against cardiovascular damage [1, 13, 14]. However, some large randomized trials investigating the effects of the administration of selenium containing supplements have failed to show a significant protective effect on cardiovascular disease and mortality [14–16]. On the other hand, a meta-analysis

TABLE 1: Anthropometric and biochemical variables baselines of subjects.

Characteristic	Men (<i>n</i> = 6)	Women (<i>n</i> = 4)	Reference
Weight (Kg)	87 ± 13.8	59.5 ± 6.6	
BMI (Kg/m ²)	26.9 ± 3.9	23.4 ± 1.6	18.5–24.9
Plasma selenium (μg·L ⁻¹)	42.4 ± 16.6	36.6 ± 12.3	53 ± 20.7–161 ± 19
Leucocytes (10 ³ /mm ³)	7.2 ± 1.4	7.4 ± 1.7	3.6–11
Hematocrit (%)	44.4 ± 1.6	38.8 ± 2.8	§: 39–53 : 36–48
Hemoglobin (g/dL)	14.8 ± 0.6	12.8 ± 1	§: 12.8–17.8 : 11.6–15.6
Fasting glucose (mg/dL)	82.4 ± 7.8	82.9 ± 7.4	70–99
Albumin (g/dL)	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4	3.5–5.5
Total protein (g/dL)	6.5 ± 0.6	6.9 ± 0.3	6–8
Cholesterol total (mg/dL)	145 ± 4.8	143 ± 6.7	<200
HDL-c (mg/dL)	47.6 ± 2.3	47.8 ± 2.5	≥35
LDL-c (mg/dL)	87.7 ± 9.8	84.5 ± 6.5	<130
Triglycerides (mg/dL)	60.5 ± 16.9	53.3 ± 16	<150

Results are expressed as mean ± S.D. §: masculine; |: females.

of 25 observational studies showed a significant inverse association between selenium status with the risk of coronary heart disease (CHD), particularly within populations with low selenium intake or status [14]. A positive association between plasma selenium levels with lower atherogenic index (a reliable indicator of predisposition to heart diseases [17]) has been suggested in nutritional surveys among Japanese [18], Indians [19], and Koreans [20].

Cereals, nuts, meats, and seafood are the major sources of human dietary Se. The Se content in vegetables varies depending on several factors such as the soil in which they are grown, the Se concentration in the irrigating water, and the usage of Se-containing fertilizers [14]. Selenium concentration in Brazil nut varies between 8 and 83 μg/g and is among the highest found within foods consumed by humans [21–25]. Brazil nut is also a good source of other nutrients, including unsaturated fatty acids, proteins, fiber, magnesium, phosphorus, thiamin, niacin, vitamin E, vitamin B₆, calcium, iron, potassium, zinc, and copper. Moreover, the oily endosperm contains about 50% monounsaturated fatty acids (MUFA) [26].

As pointed out above, Se consumption and selenoenzymes (particularly GPx) have been associated with cardiovascular protection in rodents and humans [12, 14, 27, 28]. Brazil nut has a high content of selenium and could, therefore, have cardioprotective effects. In addition, different types of nuts such as peanuts, almonds, walnuts, and macadamia nuts, among others, have been shown to modulate the lipid profile in both unhealthy as well as healthy subjects [29–36]. This beneficial effect has been attributed to the high levels of MUFA and polyunsaturated fatty acids (PUFA) found in nuts [37].

Fatty acids from nuts are important contributors to the beneficial health effects which protect from the development of CHD [38]. Willett et al. [39] reported that high MUFA diets are associated with a reduced cardiovascular disease-associated mortality. Recently, a few studies have indicated

a beneficial effect of long-term Brazil nut intake on serum cholesterol among obese and nonobese subjects [36, 37, 40]. However, the acute effects of the ingestion of Brazil nut on the atherogenic index of healthy subjects have not yet been evaluated. In this study, we investigate the effects of moderate to high amount Brazil nut ingestion on lipid profile, hepatic and kidney biochemical parameters in healthy volunteers to determine either beneficial or potentially toxic effect of selenium.

2. Methods

2.1. Study Subjects. Fifteen healthy subjects (8 men and 7 women) were initially recruited at the Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. Study candidates (23–34 years old) were evaluated based on their self-reported medical history and laboratory tests. Early in the study, two male and one female subjects were excluded due to high acute alcohol intake. Two female subjects were diagnosed with hypothyroidism and were, therefore, excluded. Body weight was measured to the nearest 0.01 kg using a digital scale, and height was measured to the nearest 0.1 cm using a wall-mounted stadiometer. The body mass index (BMI) (kilograms per square meter) was calculated, and the subjects were classified according to the World Health Organization guidelines [41]. The demographics and baseline test results of the 10 selected participants (6 men and 4 women) are shown in Table 1. This study has been reviewed and approved by the Universidade Federal de Santa Maria's Internal Review Board (no. 0240.0.243.000-11), and informed consent was obtained from all participants.

2.2. Experimental Design. Each subject was tested 4 times following a randomized crossover regarding the administration of the different amounts of Brazil nut: 0, 5, 20, and 50 g. Two Latin squares of 4 × 4 for the 4 treatments were used to randomize participants into 4 orders of treatment. Prior to

each treatment, the volunteers underwent a 30-day washout period.

2.3. Brazil Nut Diet. The volunteers were given instructions by a nutritionist to exclude Se-rich foods from their diets (eggs, egg yolks, garlic, Brazil nut, whole wheat cereal, viscera, etc.) throughout the blood sampling period.

The volunteers were given a balanced diet with daily energy requirement of 25 kcal/kg/day, a diet normocaloric. We applied 24-hour dietary recall (24 hDR) and food frequency questionnaires (FFQ) after the last blood sampling to verify the types of foods consumed during the study period. According to the United States Department of Agriculture—USDA, Brazil nut contains (per 100 g) 14.5 g of protein, 15.1 g of carbohydrates, 63.7 g of total fat (15.3 g SFA, 27.4 g MUFA, and 21 g PUFA), and 7.9 g of dietary fiber, for a total of 2,690 kJ [42].

2.4. Se Determination in Brazil Nut. Samples with mass up to 500 was weighed, transferred to quartz vessels together with 6 mL of concentrated nitric acid. The vessels were heated in a microwave oven with maximum temperature and pressure of 280°C and 80 bar, respectively.

2.5. Lipid Determination in Brazil Nut. The extraction of Brazil nut was performed according to the method described by Blich and Dyer [43], grinding a known amount of Brazil nuts in the presence of a methanol/chloroform (1:2 v/v) mixture at 30 mL/g of fresh weight. The fatty acid methyl esters were analyzed by a gas chromatograph using a procedure described by Christie [44]. The results were expressed as relative percent of total fatty acids according to Visentainer [45].

2.6. Blood Samples Collection. Blood samples were collected by venous puncture prior to and at 1, 3, 6, 9, 24, and 48 hours and 5 and 30 days after the ingestion of nuts. Except for the 6- and 9-hour time points, all volunteers were at a 12-hour fasting period for the collection of blood. Blood samples were collected by venous puncture into Vacutainer (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with no anticoagulant and EDTA anticoagulant. Blood samples stored in ice were routinely centrifuged within 1 h after collection at 2500 ×g for 15 min. Aliquots of serum samples were immediately used to assess fasting glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides, aspartate and alanine aminotransferases (AST and ALT, resp.), albumin, total protein, alkaline phosphatase, gamma GT, urea, creatinine, and C-reactive protein (CRP). Aliquots of plasma were used for selenium measurements. Serum and plasma samples were then stored at -80°C for up to 4 weeks before the analyses.

2.7. Blood Tests. Hemoglobin levels and hematocrit were determined in a Cobas Micros system (Hematology Analyzer, Roche Diagnostics). Fasting glucose, TC, HDL-c, triglycerides, AST, ALT, albumin, total protein, alkaline phosphatase, gamma-GT, urea, creatinine, and CRP measurements were performed using Ortho-Clinical Diagnostics

reagents on a fully automated analyzer (Vitros 950 dry chemistry system, Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was calculated using the Friedewald equation [46].

2.8. Atherogenic Index (AI) Determination. The atherogenic index was calculated as the ratio between total cholesterol and HDL-c or as the ratio between LDL-c and HDL-c concentrations according to Kinoshian et al. [47] and Lemieux et al. [48].

2.9. Se Concentration in Plasma. The plasma Se concentration was determined using atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomizer (GFAAS) and Zeeman Effect background correction. Samples were diluted with Triton X-100. Palladium chemical modifier, wavelength 196.0 nm, pyrolysis temperature 140°C, and atomization temperature 220°C were used.

2.10. Statistical Analysis. Data are expressed as mean ± Standard Deviation (SD). The statistical analysis was performed using analysis of variance with measure repeated (ANOVA) and nonparametric tests (Wilcoxon). Descriptive statistics was performed for all baseline characteristics. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

The volunteers included in the study were 24.7 ± 3.4 years old (range 23–34 years old). Demographic, anthropometric, and laboratory characteristics are listed in Table 1.

The average Se concentration in Brazil nut was $31.25 \pm 18.7 \mu\text{g/g}$. Therefore, the net Se intake was about $156 \mu\text{g}$, $625 \mu\text{g}$, and $1560 \mu\text{g}$ for the groups ingesting 5, 20, and 50 g of nuts, respectively. The estimated fat intake from nuts is shown in Table 2.

The biochemical parameters of liver and kidney function in healthy volunteers, such as AST, ALT, alkaline phosphatase, Gama GT, urea, and creatinine, were not modified by ingestion of nuts, indicating an absence of hepatic and renal toxicity of high amounts of Brazil nuts intake. PCR was also evaluated, and there was no change in its levels after ingestion of Brazil nuts (data not shown).

Plasma selenium levels were significantly increased in all groups 6 hours after the ingestion of Brazil nut. Moreover, at the highest dose (50 g) the Se increase was evident starting at as early as 3 h and remained above baseline levels for up to 24 h (Figure 1). At 48 hours, the plasma Se levels did not differ from its baseline concentration (Figure 1).

Serum LDL-c levels were significantly lower starting at 9 hours after the ingestion of nuts within the groups receiving 20 or 50 g and reached a steady level at 48 hours (Figure 2). Subjects that consumed higher amounts of Brazil nut exhibited an increase in HDL-c starting at 6 hours after the intake which reached a stable level at 5 days (Figure 3, $P < 0.05$).

Interestingly, the ingestion of 20 g of Brazil nut determined a more pronounced decrease in LDL-c levels as well as a higher increase in HDL-c than did 50 g. These results

TABLE 2: Fatty acids composition of the Brazil nut.

Fatty acids	g/100 g	SD
AGS		
C14:0	0.03	0.00
C16:0	10.49	0.31
C17:0	0.09	0.04
C18:0	8.52	0.26
C22:0	0.04	0.00
Total	19.16	0.12
MUFA		
C16:1	0.28	0.02
C18:1n9 cis	28.61	1.52
C20:1	0.05	0.00
Total	28.94	0.51
PUFA		
C18:2n6 cis	26.25	1.07
C18:3n6	0.24	0.01
C18:3n3	0.06	0.01
Total	26.55	0.36

MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SFA: saturated fatty acids.

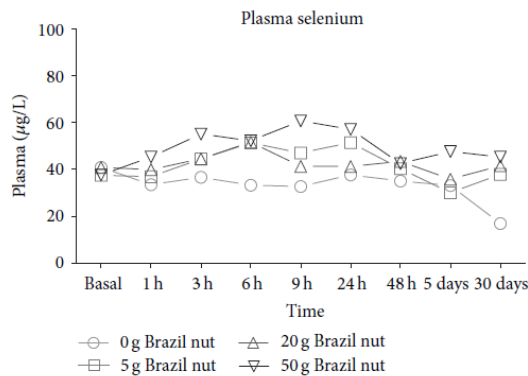


FIGURE 1: Plasma levels of selenium in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. Measures repeated—ANOVA and Wilcoxon tests.

suggest that eating an average of 4 nuts might be enough to improve the levels of LDL-c and HDL-c for up to 30 days.

Accordingly, the AI (TC/HDL-c and LDL-c/HDL-c ratio) was decreased in subjects that consumed 20 and 50 g of Brazil nut ($P < 0.05$, data not shown). Serum triglycerides and total cholesterol did not significantly vary ($P > 0.05$) within the study time frame (data not shown).

Even though the measured plasma Se concentrations did not significantly vary following the ingestion of 5, 20, or 50 g of nuts, changes in LDL-c and HDL-c were only observed with the ingestion of 20 or 50 g which persisted for up to 30 days. These results raise the question of whether the beneficial effects of Brazil nut on the atherogenic index may be due to factors other than selenium (MUFA and PUFA perhaps),

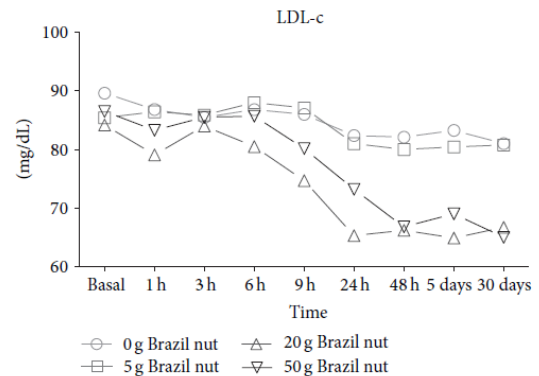


FIGURE 2: Seric levels of LDL-c in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. Measure repeated—ANOVA and Wilcoxon tests.

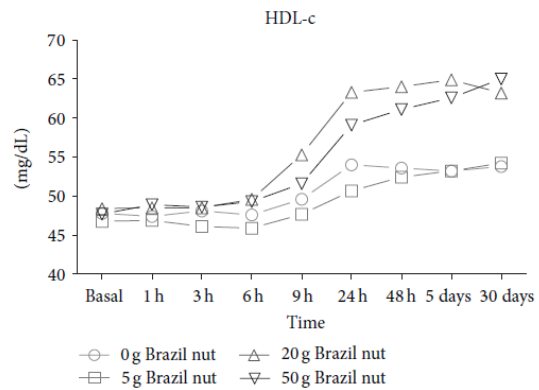


FIGURE 3: Seric levels of HDL-c in healthy volunteers after consumption of the Brazil nut. Measure repeated—ANOVA and Wilcoxon tests.

highlighting the importance of studying the separate and combined effect of selenium and fatty acids on atherogenic indexes.

4. Discussion

Regular nut intake has been associated with many health benefits in adults [37, 49, 50]. The results of this study support the notion that the consumption of a single serving of nuts can acutely beneficially modify serum lipids.

Contrasting with diets rich in SFA, MUFA- and PUFA-rich foods are potentially beneficial for health [38]. Nuts are generally low in saturated fatty acids and high in unsaturated fatty acids [51]. Unsaturated fatty acids (both mono- and polyunsaturated) have been shown to reduce serum TC and LDL-c. Brazil nut is a good source of unsaturated fat (~50% MUFA). However, despite knowing that the Brazil nut has high concentrations of unsaturated fatty acids when compared with other nuts such as macadamias, almonds,

walnuts, pecans, pistachios, and peanuts, the Brazil nut has a relatively higher content of SFAs.

Therefore, the increase in HDL-c observed in this present study may be attributed to the higher MUFA and SFA content in Brazil nut [52]. According to Riccardi et al. [53], SFA and MUFA increase HDL-c, whereas high intakes of PUFA decrease HDL-c. Unsaturated fatty acids have been shown to increase HDL-c less than SFAs do [54]. Furthermore, while the unsaturated fatty acid profile of nuts (high MUFA and PUFA) is thought to mediate the majority of the beneficial effects of nuts on serum lipids, other components such as fiber and selenium might contribute to these effects [14, 26, 31, 55].

Many studies have shown that chronic intake of varying amounts of nuts is effective to increase the blood concentrations of Se and improve lipid profile [29–37, 40, 56–59]. A meta-analysis by Flores-Mateo et al. [14] based on several observational studies pointed to an inverse correlation between plasma selenium concentrations and coronary heart disease incidence. But the validity of such correlations needs further confirmation. Stranges et al. [60] concluded that an increase in plasma selenium in adult population was associated with increased total and non-HDL cholesterol levels but not with HDL-c. Moreover, evidence showing that low selenium status is a cardiovascular risk factor must still be considered provisional.

In conclusion, the results obtained here suggest that the consumption of a single serving of Brazil nut is sufficient to improve the lipid profile of healthy volunteers (lowered LDL-c and raised HDL-c), without producing hepatic and renal toxicity of high amounts of Brazil nuts intake. However, further investigation is needed to validate the beneficial effects of Brazil nut because here we have used a small number of subjects. In addition, it is also important to evaluate the isolated and combined effects of selenium and/or unsaturated fatty acids found in Brazil nuts on atherogenic parameters in order to better understand their mechanistic role in modulating cardiac indexes in healthy and dyslipidemic subjects. In addition, the evaluation of the effects of chronic consumption of Brazil nuts and the inclusion of dyslipidemic patients are paths to be followed.

Abbreviations

GPx:	Glutathione peroxidase
TrxR:	Thioredoxin reductase
CHD:	Coronary heart disease
MUFA:	Monounsaturated fatty acids
PUFA:	Polyunsaturated fatty acids
SFA:	Saturated fatty acids
BMI:	Body mass index
24 hDR:	24-hour dietary recall (24 hDR)
FFQ:	Food frequency questionnaires
TC:	Total cholesterol
HDL-c:	High-density lipoprotein cholesterol
LDL-c:	Low-density lipoprotein cholesterol
AI:	Atherogenic index
AST:	Aspartate aminotransferases
ALT:	Alanine aminotransferases
CRP:	C-reactive protein.

Conflict of Interests

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interests.

Authors' Contribution

João Batista Teixeira da Rocha designed the research, analyzed and interpreted data and wrote the paper; Elisângela Colpo, Carlos Dalton de Avila Vilanova, Luiz Gustavo Brenner Reetz, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Iria Luiza Gomes Farias, Edson Irineu Muller, Aline Lima Hermes Muller, Erico Marlon Moraes Flores, and Roger Wagner conducted the research, compiled and interpreted the data, and edited the paper. All authors read and approved the final paper.

Acknowledgment

This work was financed by grants received from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq).

References

- [1] M. P. Rayman, H. G. Infante, and M. Sargent, "Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation," *British Journal of Nutrition*, vol. 100, no. 2, pp. 238–253, 2008.
- [2] G. V. Kryukov, S. Castellano, S. V. Novoselov et al., "Characterization of mammalian selenoproteomes," *Science*, vol. 300, no. 5624, pp. 1439–1443, 2003.
- [3] C. W. Nogueira and J. B. T. Rocha, "Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds," *Archives of Toxicology*, vol. 85, no. 11, pp. 1313–1359, 2011.
- [4] B. A. Carlson, M.-H. Yoo, P. A. Tsuji, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield, "Mouse models targeting selenocysteine tRNA expression for elucidating the role of selenoproteins in health and development," *Molecules*, vol. 14, no. 9, pp. 3509–3527, 2009.
- [5] R. F. Burk and K. E. Hill, "Regulation of selenoproteins," *Annual Review of Nutrition*, vol. 13, pp. 65–81, 1993.
- [6] R. F. Burk, K. E. Hill, and A. K. Motley, "Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P," *Journal of Nutrition*, vol. 133, no. 5, pp. 1517S–1520S, 2003.
- [7] M. P. Rayman, "Selenium and human health," *The Lancet*, vol. 379, no. 9822, pp. 1256–1268, 2012.
- [8] M. Vinceti, T. Maraldi, M. Bergomi, and C. Malagoli, "Risk of chronic low-dose selenium overexposure in humans: insights from epidemiology and biochemistry," *Reviews on Environmental Health*, vol. 24, no. 3, pp. 231–248, 2009.
- [9] M. Vinceti, F. Bonvicini, K. J. Rothman, L. Vescovi, and F. Wang, "The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study," *Environmental Health*, vol. 9, no. 1, pp. 77–84, 2010.
- [10] H. Tapiero, D. M. Townsend, and K. D. Tew, "The antioxidant role of selenium and seleno-compounds," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 57, no. 3, pp. 134–144, 2003.

- [11] A. F. D. Bem, M. Farina, R. D. L. Portella et al., "Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation *in vitro*," *Atherosclerosis*, vol. 201, no. 1, pp. 92–100, 2008.
- [12] S. Blankenberg, H. J. Rupprecht, C. Bickel et al., "Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 17, pp. 1605–1613, 2003.
- [13] M. Torzewski, V. Ochsenhirt, A. L. Kleschyov et al., "Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 27, no. 4, pp. 850–857, 2007.
- [14] G. Flores-Mateo, A. Navas-Acien, R. Pastor-Barriuso, and E. Guallar, "Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 84, no. 4, pp. 762–773, 2006.
- [15] S. Stranges, J. R. Marshall, M. Trevisan et al., "Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial," *American Journal of Epidemiology*, vol. 163, no. 8, pp. 694–699, 2006.
- [16] S. M. Lippman, E. A. Klein, P. J. Goodman et al., "Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)," *The Journal of the American Medical Association*, vol. 301, no. 1, pp. 39–51, 2009.
- [17] J.-P. Després, I. Lemieux, G.-R. Dagenais, B. Cantin, and B. Lamarche, "HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Québec cardiovascular study," *Atherosclerosis*, vol. 153, no. 2, pp. 263–272, 2000.
- [18] Y. Miyazaki, H. Koyama, M. Nojiri, and S. Suzuki, "Relationship of dietary intake of fish and non-fish selenium to serum lipids in Japanese rural coastal community," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 16, no. 2, pp. 83–90, 2002.
- [19] K. Hughes and C.-N. Ong, "Vitamins, selenium, iron, and coronary heart disease risk in Indians, Malays, and Chinese in Singapore," *Journal of Epidemiology and Community Health*, vol. 52, no. 3, pp. 181–185, 1998.
- [20] O. Lee, J. Moon, and Y. Chung, "The relationship between serum selenium levels and lipid profiles in adult women," *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 49, no. 6, pp. 397–404, 2003.
- [21] A. P. Vonderheide, K. Wrobel, S. S. Kannamkumarath et al., "Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 20, pp. 5722–5728, 2002.
- [22] E. Dumont, L. de Pauw, F. Vanhaecke, and R. Cornelis, "Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack?" *Food Chemistry*, vol. 95, no. 4, pp. 684–692, 2006.
- [23] J. C. Chang, W. B. Gutemann, C. M. Reid, and D. J. Lisk, "Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil," *Chemosphere*, vol. 30, no. 4, pp. 801–802, 1995.
- [24] S. S. Kannamkumarath, K. Wrobel, K. Wrobel, A. Vonderheide, and J. A. Caruso, "HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 373, no. 6, pp. 454–460, 2002.
- [25] E. Bodó, Z. Stefánka, I. Ipolyi, C. Sörös, M. Dernovics, and P. Fodor, "Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, no. 1, pp. 32–38, 2003.
- [26] J. Yang, "Brazil nuts and associated health benefits: a review," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 42, no. 10, pp. 1573–1580, 2009.
- [27] M. A. Forgione, A. Cap, R. Liao et al., "Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure," *Circulation*, vol. 106, no. 9, pp. 1154–1158, 2002.
- [28] J. H. Kelly Jr. and J. Sabaté, "Nuts and coronary heart disease: an epidemiological perspective," *The British Journal of Nutrition*, vol. 96, pp. S61–S67, 2006.
- [29] F. McKiernan, P. Lokko, A. Kuevi et al., "Effects of peanut processing on body weight and fasting plasma lipids," *British Journal of Nutrition*, vol. 104, no. 3, pp. 418–426, 2010.
- [30] M. Bes-Rastrollo, N. M. Wedick, M. A. Martinez-Gonzalez, T. Y. Li, L. Sampson, and F. B. Hu, "Prospective study of nut consumption, long-term weight change, and obesity risk in women," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, no. 6, pp. 1913–1919, 2009.
- [31] J. Sabaté, G. E. Fraser, K. Burck, S. F. Knutsen, H. Bennett, and K. D. Lindsted, "Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men," *The New England Journal of Medicine*, vol. 328, no. 9, pp. 603–607, 1993.
- [32] F. B. Hu, M. J. Stampfer, J. E. Manson et al., "Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study," *British Medical Journal*, vol. 317, no. 7169, pp. 1341–1345, 1998.
- [33] J. Sabaté and G. E. Fraser, "Nuts: a new protective food against coronary heart disease," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 5, no. 1, pp. 11–16, 1994.
- [34] A. Chisholm, K. Mc Auley, J. Mann, S. Williams, and M. Skeaff, "Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 284–292, 2005.
- [35] J. Sabaté, K. Oda, and E. Ros, "Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials," *Archives of Internal Medicine*, vol. 170, no. 9, pp. 821–827, 2010.
- [36] C. Cominetti, M. C. de Bortoli, A. B. Garrido Jr., and S. M. Cozzolino, "Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women," *Nutrition Research*, vol. 32, no. 6, pp. 403–407, 2012.
- [37] C. C. Strunz, T. V. Oliveira, J. C. M. Vinagre, A. Lima, S. Cozzolino, and R. C. Maranhão, "Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects," *Nutrition Research*, vol. 28, no. 3, pp. 151–155, 2008.
- [38] E. Ros and J. Mataix, "Fatty acid composition of nuts—implications for cardiovascular health," *The British Journal of Nutrition*, vol. 96, pp. S29–S35, 2006.
- [39] W. C. Willett, F. Sacks, A. Trichopoulos et al., "Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 61, no. 6, pp. 1402S–1406S, 1995.
- [40] P. A. Maranhão, L. G. Kraemer-Aguiar, C. L. de Oliveira et al., "Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial," *Nutrition and Metabolism*, vol. 8, pp. 32–40, 2011.
- [41] WHO, *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation*, WHO Technical Report Series, no. 894, WHO, Geneva, Switzerland, 2000.

- [42] USDA National nutrient database for standard reference, 2006, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
- [43] E. G. Blich and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, 1959.
- [44] W. W. Christie, "A simple procedure for rapid transmethylolation of glycerolipids and cholesteryl esters," *Journal of Lipid Research*, vol. 23, no. 7, pp. 1072–1075, 1982.
- [45] J. V. Visentainer, "Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos," *Química Nova*, vol. 35, no. 2, pp. 274–279, 2012.
- [46] W. T. Friedewald, R. I. Levy, and D. S. Fredrickson, "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge," *Clinical Chemistry*, vol. 18, no. 6, pp. 499–502, 1972.
- [47] B. Kinosian, H. Glick, and G. Garland, "Cholesterol and coronary heart disease: predicting risk by levels and ratios," *Annals of Internal Medicine*, vol. 121, no. 9, pp. 641–647, 1994.
- [48] I. Lemieux, B. Lamarche, C. Couillard et al., "Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men," *Archives of Internal Medicine*, vol. 161, no. 22, pp. 2685–2692, 2001.
- [49] C. Ip and D. J. Lisk, "Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance," *Nutrition and Cancer*, vol. 21, no. 3, pp. 203–212, 1994.
- [50] C. D. Thomson, A. Chisholm, S. K. McLachlan, and J. M. Campbell, "Brazil nuts: an effective way to improve selenium status," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, no. 2, pp. 379–384, 2008.
- [51] US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Database for Standard Reference—Release 15, 2001.
- [52] J. Mukuddem-Petersen, W. Oosihuizen, and J. C. Jerling, "A systematic review of the effects of nuts on lipid profiles in humans," *Journal of Nutrition*, vol. 135, no. 9, pp. 2082–2089, 2005.
- [53] G. Riccardi, A. A. Rivellese, and C. M. Williams, "The cardiovascular system," in *Nutrition and Metabolism*, M. J. Gibney, I. A. Macdonald, and H. M. Roche, Eds., pp. 224–246, Blackwell Science, Oxford, UK, 2003.
- [54] R. P. Mensink, P. L. Zock, A. D. M. Kester, and M. B. Katan, "Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 77, no. 5, pp. 1146–1155, 2003.
- [55] A. E. Griel and P. M. Kris-Etherton, "Tree nuts and the lipid profile: a review of clinical studies," *The British Journal of Nutrition*, vol. 96, pp. S68–S78, 2006.
- [56] C. E. O'Neil, D. R. Keast, V. L. Fulgoni, and T. A. Nicklas, "Tree nut consumption improves nutrient intake and diet quality in US adults: an analysis of National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2004," *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 19, no. 1, pp. 142–150, 2010.
- [57] M. B. Stockler-Pinto, J. Lobo, C. Moraes et al., "Effect of Brazil nut supplementation on plasma levels of selenium in hemodialysis patients: 12 months of follow-up," *Journal of Renal Nutrition*, vol. 22, pp. 434–439, 2012.
- [58] C. M. Alper and R. D. Mattes, "Peanut consumption improves indices of cardiovascular disease risk in healthy adults," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 22, no. 2, pp. 133–141, 2003.
- [59] M. J. Sheridan, J. N. Cooper, M. Erario, and C. E. Cheifetz, "Pistachio nut consumption and serum lipid levels," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 26, no. 2, pp. 141–148, 2007.
- [60] S. Stranges, M. Laclaustra, C. Ji et al., "Higher selenium status is associated with adverse blood lipid profile in British adults," *Journal of Nutrition*, vol. 140, no. 1, pp. 81–87, 2010.

2.2 Artigo 2 – “Consumo de castanha do Brasil por voluntários saudáveis melhora os parâmetros inflamatórios”

Brazilian nuts consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters

Elisângela Colpo, Carlos Dalton D. A. Vilanova, Luiz Gustavo B. Reetz, Marta M. M. F. Duarte, Iria Luiza G. Farias, Daiane F. Meinerz, Douglas O. C. Mariano, Raquel G. Vendrusculo, Aline A. Boligon, Cristiane L. Dalla Corte, Roger Wagner, Margareth L. Athayde and João Batista T.D. Rocha

Artigo aceito na Nutrition Elsevier



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrn.com

Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters

Q4 Elisângela Colpo^{a,c}, Carlos Dalton DA Vilanova^a, Luiz Gustavo B. Reetz^b,
 Marta MMF. Duarte^{a,d}, Iria Luiza G. Farias^b, Daiane F. Meinerz^a,
 Douglas OC. Mariano^a, Raquel G. Vendrusculo^e, Aline A. Boligon^f,
 Cristiane L. Dalla Corte^a, Roger Wagner^e, Margareth L. Athayde^f,
 Q2 João Batista T. da Rocha^{a,*}

^aDepartment of Chemistry, Natural and Exact Sciences Centers, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^bClinical Laboratory Analysis, University Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^cDepartment of Nutrition, Center Franciscan University, Santa Maria, Brazil

^dLutheran University of Brazil, Santa Maria, Brazil

^eDepartment of Technology and Food and Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^fDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2013

Accepted 5 October 2013

Keywords:

Human

Interleukin

Unsaturated fatty acids

Selenium

C-reactive protein

Nutrition

Oxidative stress

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of a single dose of Brazil nuts on the inflammatory markers of healthy individuals.

Method: A randomized crossover study was conducted with 10 healthy individuals (mean age 24.7 ± 3.4 y). Each individual was tested four times regarding intake of different portions of Brazil nuts: 0, 5, 20 and 50 g. At each testing period, peripheral blood was collected before and at 1, 3, 6, 9, 24, and 48 h after intake of nuts, as well as at 5 and 30 d after intake of various Brazil nut portions. Blood samples were tested for high-sensitivity to C-reactive protein, interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon (IFN)- γ , aspartate and alanine aminotransferases, albumin, total protein, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, urea, and creatinine.

Results: Consumption of nuts did not affect biochemical parameters for liver and kidney function, indicating absence of hepatic and renal toxicity. A single intake of Brazil nuts (20 or 50 g) caused a significant decrease in serum IL-1, IL-6, TNF- α , and IFN- γ levels ($P < 0.05$), whereas serum levels of IL-10 were significantly increased ($P < 0.05$).

Conclusion: The results indicate a long-term decrease in inflammatory markers after a single intake of large portions of Brazil nuts in healthy volunteers. Therefore, the long-term effect of regular Brazil nut consumption on inflammatory markers should be better investigated.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Nuts are recommended as an important constituent of a healthy diet [1]. They are energy-dense and provide 23.4 to 26.8 kJ/g of food with a high-fat content (45%–75% of weight), but mostly unsaturated fat [2]. For instance, Brazil nuts are a good source of unsaturated fatty acids and selenium [3,4]. The concentration of selenium in Brazil nuts varies from 8 to 83 $\mu\text{g/g}$ and is among the highest found within foods consumed by humans [5,6].

Selenium is an essential nutrient for human health [7] and its biological functions are mediated by the expression of about 20 selenoproteins, which have selenocysteine at their active sites [8, 9]. Some selenoproteins, e.g., the glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase isoforms, are important enzymes involved in the metabolism of reactive oxygen species [10]. However, the physiological role played by various other selenoproteins remains poorly understood.

In humans, selenium is implicated as a modulator of the immune function [11]. Accordingly, selenium supplementation has been reported to increase lymphocyte proliferation in response to mitogens [11,12], and the expression of high-affinity interleukin (IL) -2 receptor [11,13]. Selenium can also improve

Q3 * Corresponding author: Tel: ■■■■; fax: ■■■■.
 E-mail address: jbrocha@pq.cnpq.br (J. B. T. da Rocha).

2

E. Ângela Colpo et al. / Nutrition xxx (2013) 1–7

Table 1
Anthropometric measurements and biochemical characteristics of volunteers

Parameters	Before start of experiment		After end of experiment	
	Males (n = 6)	Females (n = 4)	Males (n = 6)	Females (n = 4)
Age (y)	27.6 ± 3.1	29.0 ± 4.4	28.0 ± 2.9	29.2 ± 4.8
Body weight (kg)	86.6 ± 12.5	59.5 ± 6.5	86.9 ± 12.5	59.2 ± 6.4
BMI (kg/m ²)	26.7 ± 3.5	23.4 ± 1.6	26.8 ± 3.7	23.1 ± 1.4
Leukocytes	7.3 ± 0.9	7.3 ± 2.2	7.4 ± 1.9	7.6 ± 1.5
Erythrocytes (mm ³)	5.4 ± 0.3	4.6 ± 0.2	5.4 ± 0.3	4.6 ± 0.4
Hemoglobin (g/dL)	14.5 ± 0.6	12.9 ± 1	15.3 ± 0.5	13.2 ± 1.1
Hematocrit (%)	44.6 ± 1.7	39.6 ± 3.3	43.7 ± 1.4	38.4 ± 3.6
Platelet (mm ³)	250.5 ± 88	279.5 ± 50	260.5 ± 65.5	266.2 ± 10.2
Glucose (mg/dL)	82.4 ± 7.8	82.9 ± 7.4	89.0 ± 9.3	86.9 ± 6.7
AST (UL)	18.6 ± 6.1	19.7 ± 6.6	19.4 ± 5.5	19.2 ± 6.4
ALT (UL)	20.5 ± 8.6	23.2 ± 8.6	21.3 ± 8.7	23.3 ± 9.4
Gamma GT (UL)	9.40 ± 5	10.50 ± 4.6	10.30 ± 4.7	10.40 ± 5
Phosphatase alkaline (UL)	38.2 ± 12.4	43.9 ± 10.2	38.2 ± 11.5	43.7 ± 7.8
Total protein (g/dL)	6.5 ± 0.6	6.8 ± 0.3	6.6 ± 0.6	6.8 ± 0.32
Albumin (g/dL)	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.32
Urea (mg/dL)	20.0 ± 7.5	20.2 ± 7.3	19.7 ± 6.3	21.4 ± 7.2
Creatinine (mg/dL)	0.75 ± 0.1	0.80 ± 0.1	0.78 ± 0.13	0.77 ± 0.13
C-reactive protein (mg/dL)	0.50 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.48 ± 0.08	0.52 ± 0.04

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; gamma GT, gamma-glutamyltransferase

Data are expressed as means ± SD. Test paired (Wilcoxon) in relation to sex.

lymphocyte-mediated tumor cytotoxicity and killer cells activity [14], and may affect the immune system by regulating peroxide levels in the immune cell microenvironment.

Compared with other nuts, Brazil nuts are highly rich in unsaturated fatty acids and they have been associated with improved lipid profile and reduction in blood pressure, insulin resistance, and systemic levels of inflammatory markers [1,15]. Fatty acids from nuts are important contributors to the beneficial health effects, which protect from the development of coronary heart disease [2]. It was previously reported [16] that high monounsaturated fatty acid (MUFA) diets are associated with reduced cardiovascular disease-associated mortality. Recently, we observed that acute ingestion of Brazil nuts was non-toxic and modulated favorably the lipid profile of healthy volunteers, increasing their serum levels of high-density lipoprotein cholesterol and lowering low-density lipoprotein cholesterol [6].

However, blood levels of inflammatory mediators in response to acute consumption of Brazil nuts in humans, has yet to be investigated. Here, we hypothesized that consumption of Brazil nuts would be associated with lower levels of inflammatory markers. Thus, the objective of the present study was to investigate the effect of a single dose of Brazil nuts on inflammatory markers in healthy volunteers.

Table 2
Fatty acids composition of the Brazil nut

Fatty acid	g/100 g
C14:0	0.07 ± 0.03
C16:0	16.74 ± 1.06
C16:1	0.43 ± 0.09
C17:0	0.14 ± 0.15
C18:0	9.97 ± 1.42
C18:1n9	28.52 ± 1.99
C18:2n6	36.04 ± 2.26
C20:0	0.17 ± 0.05
C20:1n9	0.09 ± 0.02
C18:3n3	0.11 ± 0.03

Results are expressed as mean ± SD of three determinations

Table 3
Phenolics and flavonoids composition of Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) aqueous extracts

Compounds	Aqueous extract (mg/g)
Gallic acid	0.35 ± 0.1
Catechin	0.92 ± 0.2
Resveratrol	1.37 ± 0.1
Ellagic acid	1.74 ± 0.2
Epicatechin	0.84 ± 0.5
Rutin	0.60 ± 0.1
Quercitrin	0.64 ± 0.4
Quercetin	1.31 ± 0.1
Kaempferol	0.67 ± 0.3

Results are expressed as mean ± S.D. of three determinations

Materials and methods

Study participants

The study was a randomized crossover trial with 10 adult volunteers, ages 23 to 34 y. The mean age of the participants was 24.7 ± 3.4 y and 60% were men. Each participant was tested four times after the administration of the different amounts of Brazil nuts: 0, 5, 20, and 50 g. Two Latin squares of 4 × 4 for the four tests were used to randomize participants into four orders of treatment. Before each treatment, the volunteers underwent a 30-d washout period, to ensure that the active compounds or ingredients in the nuts were completely eliminated [6]. We recommended a balanced diet with daily energy containing about 25 kcal/kg. Furthermore, we requested volunteers avoid the ingestion of foods containing high quantities of selenium (eggs, egg yolks, garlic, Brazil nuts, whole wheat cereal, viscera, shellfish, and fish). We applied 24-h dietary recall and food frequency questionnaires after the last blood sampling to verify the types of foods consumed during the study period [6]. The volunteers always reported not ingesting the restricted foods.

This study has been reviewed and approved by the Universidade Federal de Santa Maria's Internal Review Board (No. 0240.0.243.000-11) and informed consent was obtained from all participants.

Body weight was measured to the nearest 0.01 kg using a digital scale, and height was measured to the nearest 0.1 cm using a wall-mounted stadiometer. The body mass index was calculated and the participants were classified according to World Health Organization guidelines [17].

According to the U.S. Department of Agriculture, Brazil nuts contain (per 100 g) 14.5 g of proteins, 15.1 g of carbohydrates, 63.7 g of total fats (15.3 g saturated fatty acids, 27.4 g MUFAs, 21 g polyunsaturated fatty acids [PUFAs]), as well as 7.9 g of dietary fibers, for a total of 2.690 kJ [18]. Corroborating earlier studies, Brazil nuts given to the participants contained 31.25 ± 18.7 µg/g of selenium [6].

Fatty acid determination Brazil nuts

The extraction of Brazil nut lipids was performed according to a previously described method [19], grinding a known amount of Brazil nuts in the presence

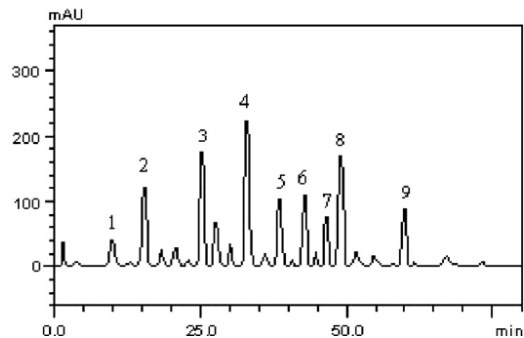


Fig. 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *Bertholletia excelsa* aqueous extract. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), resveratrol (peak 3), ellagic acid (peak 4), epicatechin (peak 5), rutin (peak 6), quercitrin (peak 7), quercetin (peak 8), and kaempferol (peak 9).

Table 4
GPx erythrocytes activity of healthy volunteers after consumption of the Brazil nut

	GPx (nmol NADPH•min ⁻¹ •erythrocytes)			
	0 g Brazil nut	5 g Brazil nut	20 g Brazil nut	50 g Brazil nut
Basal	12.5 ± 1.4	12.0 ± 1.5	12.0 ± 1.1	12.4 ± 1.2
1 h	12.4 ± 2.1	11.8 ± 1.5	12.6 ± 2.1	12.5 ± 2.2
3 h	12.7 ± 1.5	12.1 ± 1.5	13.0 ± 1.8	13.3 ± 2.4
6 h	13.6 ± 2.2	13.0 ± 0.8	12.5 ± 1.8	12.7 ± 1.4
24 h	11.2 ± 2.2	10.8 ± 1.2	12.2 ± 2.0	12.1 ± 0.9
48 h	12.7 ± 2.0	10.8 ± 1.2	11.5 ± 1.7	11.5 ± 0.9
30 d	12.1 ± 0.9	12.0 ± 1.2	12.5 ± 1.6	12.2 ± 1.5

GPx, glutathione peroxidase

Data are expressed as means ± SD

of a methanol/chloroform (1:2 v/v) mixture at 15 mL/g of fresh weight. The fatty acid methyl esters were obtained using a saponification and esterification procedure described previously [20] and analyzed by a gas chromatograph equipped with flame ionization detector. The results were expressed as concentration of each fatty acid per gram of lipid [21].

Chemicals, apparatus, and general procedures for quantification polyphenols

All chemicals were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, rosmarinic acid and ellagic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, rutin, and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High-performance liquid chromatography diode array detector (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20 A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to a DGU 20 A5 degasser with a CBM 20 A integrator, SPD-M20 A DAD and LC solution 1.22 SP1 software.

Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 × 150 mm) packed with 5 μm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% (B) for 2 min; 25% (B) until 10 min; 40%, 50%, 60%, 70%, and 80% (B) every 10 min; following the method described previously [22] with slight modifications. *Bertholletia excelsa* (aqueous extract) and mobile phase were filtered through 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath before use, the fennel aqueous extract was analyzed at a concentration of 50 mg/mL. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume 50 μL and the wavelength were 254 for gallic acid, 280 for catechin and epicatechin, 325 nm for ellagic and rosmarinic acids, and 365 nm for quercetin, quercitrin, rutin, and kaempferol. All samples and mobile phase were filtered through 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath before use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030 to 0.400 mg/mL for

kaempferol, quercetin, quercitrin, and rutin; and 0.025 to 0.250 mg/mL for rosmarinic acid, ellagic acid, gallic acid, catechin, and epicatechin. Chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200–600 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 12574x + 1350.7$ ($r = 0.9999$); catechin: $Y = 12605x + 1367.5$ ($r = 0.9998$); epicatechin: $Y = 11948x + 1376.4$ ($r = 0.9995$); rosmarinic acid: $Y = 13728x + 1257.9$ ($r = 0.9993$); quercitrin: $Y = 12591x + 1205.9$ ($r = 0.9997$); ellagic acid: $Y = 13050x + 1284.1$ ($r = 0.9993$); rutin: $Y = 11983x + 1321.5$ ($r = 0.9997$); quercetin: $Y = 12667x + 1352.4$ ($r = 0.9991$) and kaempferol: $Y = 13085x + 1253.6$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the SD of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the SD of the response and S is the slope of the calibration curve [23].

Selenium determination Brazil nuts

The levels of selenium in Brazil nuts were determined according to a modified version of a procedure previously described [24]. Samples of 0.5 g of the Brazil nuts were weighed and digested with 5.5 mL of HNO₃ acid (65%) and heating at 100°C for 12 h. Digested samples were diluted 10 times with ultrapure water before analysis using a Multitype ICP Emission Spectrometer (ICPE-9000, Shimadzu).

Laboratory measurements

Ten mL of venous blood samples were collected before and at 1, 3, 6, 9, 24, 48 h, and 5 and 30 d after the ingestion of the nuts. Except for the 6- and 9-h time points, all volunteers were at a 12-h fasting period for the collection of blood. Blood samples were collected by venous puncture technique into Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA plus sodium fluoride, sodium citrate, or no anticoagulants. Specimens were routinely centrifuged at 2500 g for 15 min at 4°C. Plasma (EDTA + sodium fluoride) was used to measure the levels of fasting glucose and serum was used to access the levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), IL-1, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon (IFN)- γ .

Hemoglobin levels and hematocrit were determined in a Cobas Micros system (Hematology Analyzer, Roche Diagnostics®). Fasting glucose, aspartate and alanine aminotransferases, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, urea, creatinine, albumin, total protein, and hs-CRP concentrations were measured with standard enzymatic methods by use of Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on the fully automated analyzer (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). Cytokines were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay with commercial kits for human IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , and IFN- γ , (eBIOSCIENCE, San Diego, CA, USA), according to manufacturer's instructions. Serum and plasma samples were stored at -80°C for up to 4 wk before analyses.

GPx Assay

The analysis of plasma glutathione peroxidase (GSH-Px) (EC 1.11.1.9) activity was assayed as described previously [25]. In brief, erythrocytes (100 μL, diluted

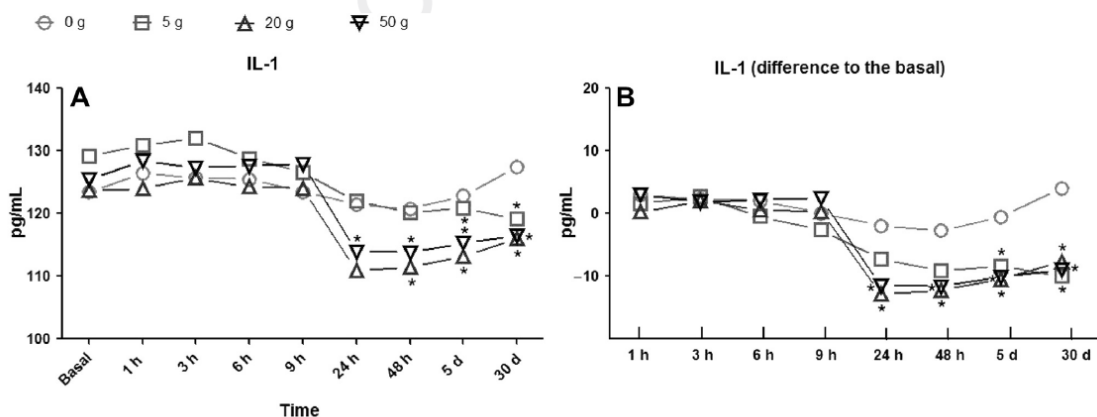


Fig. 2. Seric levels of IL-1 in healthy volunteers after consumption of Brazil nuts. (A) With basal. (B) Difference to the basal. Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared with basal.

4

E. Ângela Colpo et al. / Nutrition xxx (2013) 1–7

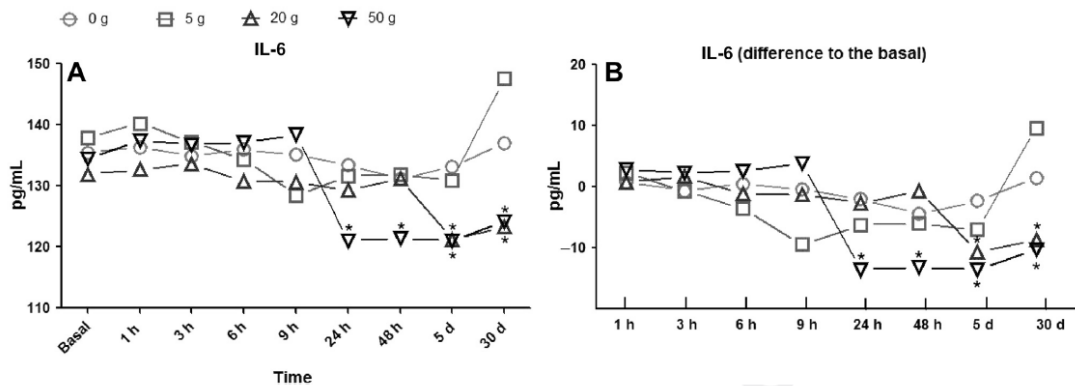


Fig. 3. Seric levels of IL-6 in healthy volunteers after consumption of Brazil nuts. (A) With basal. (B) Difference to the basal. Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared with basal.

1/100) were added to the assay mixture (total volume of 1000 μ L) and the reaction started by the addition of H_2O_2 to give a final concentration of 0.4 mM. Conversion of NADPH (final concentration of 0.15 mM) to $NADP^+$ was monitored continuously for 2 min at 340 nm. GSH-Px activity was expressed as micromole of NADPH oxidized per min/mL of plasma, using an extinction coefficient of 6.22×10^6 for NADPH.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. The statistical analysis was performed by analysis of variance and non-parametric test (Wilcoxon). Descriptive statistics was performed for all baseline characteristics. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Anthropometric measurements and biochemical characteristics of the volunteers are listed in Table 1. The biochemical parameters of liver, kidney function, hemogram, and anthropometric measurements in healthy volunteers, were not modified by ingestion of nuts, indicating an absence of hepatic and renal toxicity in response to high intake of Brazil nuts. There was no change in CRP levels after ingestion of Brazil nuts, as shown in Table 1.

The estimated fat intake from nuts is shown in Table 2. The quantity of the polyphenolic constituents found in Brazil nuts is

presented in Table 3. The average selenium concentration in Brazil nuts was $34.8 \pm 3.2 \mu$ g/g.

HPLC fingerprinting of Brazil nuts aqueous extracts revealed the presence of the following polyphenolic constituents: Gallic acid ($t_R = 10.05$ min; peak 1), catechin ($t_R = 14.97$ min; peak 2), resveratrol ($t_R = 24.85$; peak 3), ellagic acid ($t_R = 32.45$ min; peak 4), epicatechin ($t_R = 37.81$ min; peak 5), rutin ($t_R = 42.18$ min; peak 6), quercitrin ($t_R = 46.25$ min; peak 7), quercetin ($t_R = 48.61$ min; peak 8), and kaempferol ($t_R = 60.13$ min; peak 9; Fig. 1).

The erythrocytic glutathione peroxidase (Table 4) and DNA damage, measured by the comet assay (data not shown) in healthy volunteers was unaffected by ingestion of Brazil nuts. A single ingestion of Brazil nuts (20 or 50 g) caused a significant decrease in serum IL-1 levels, starting at 24 h, remaining stable for up to 30 d after the ingestion. The decrease in IL-1 caused by 5 g of nuts was less pronounced than that observed with 20 and 50 g (Fig. 2). Serum levels of IL-6 were markedly decreased in individuals who consumed 50 g of Brazil nuts from 24 h up to 30 d after consumption of nuts ($P < 0.05$; Fig. 3). In contrast, in the group that received 20 g of Brazil nuts, the decrease in IL-6 was apparent 5 and 30 d after ingestion ($P < 0.05$).

Serum levels of TNF- α and IFN- γ were decreased in individuals who consumed 20 or 50 g of Brazil nuts. This significant decrease was observed from 24 h up to 30 d after nut

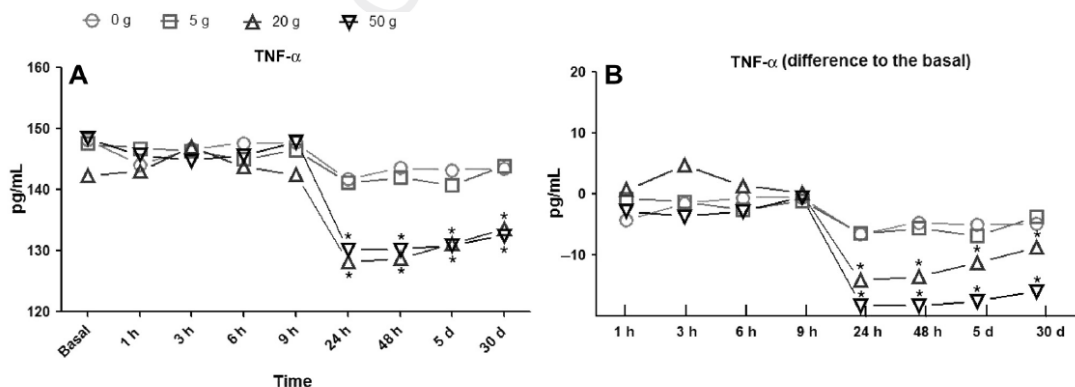


Fig. 4. Seric levels of TNF- α in healthy volunteers after consumption of Brazil nuts. (A) With basal. (B) Difference to the basal. Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared with basal.

Please cite this article in press as: Colpo Elisângela, et al., Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters, Nutrition (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005>

490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553

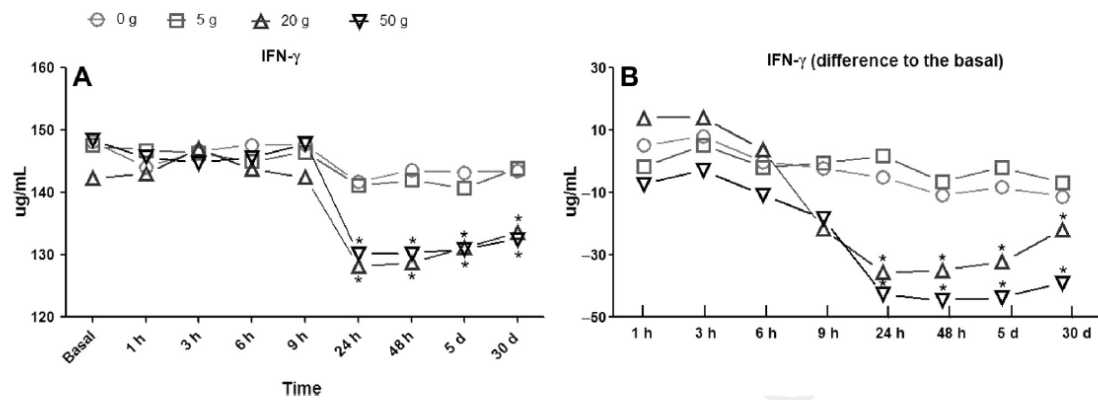


Fig. 5. Seric levels of IFN- γ in healthy volunteers after consumption of Brazil nuts. (A) With basal. (B) Difference to the basal. Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared with basal.

consumption ($P < 0.05$; Figs. 4 and 5, respectively). Serum levels of IL-10 were significantly increased in individuals consuming 20 or 50 g of Brazil nuts from 9 h up to 30 d (Fig. 6; $P < 0.05$). δ -Aminolevulinato dehydratase activity, a marker of oxidative stress was not modified by Brazil nut ingestion (data not shown).

Discussion

The results of our study with healthy volunteers indicated a long-term decrease in inflammatory markers after a single ingestion of high quantities of Brazil nuts. This positive effect may be related to the high amounts of selenium and unsaturated fatty acids and PUFAs present in Brazil nuts [4,16,26,27]. Several acute [28–30] and chronic [31,32] human clinical trials have demonstrated lower concentrations of circulating levels of proinflammatory cytokines or endothelial cell adhesion molecules in individuals consuming nuts or olive oil (Mediterranean diet) compared with those consuming other types of oils or fat sources. In agreement, the consumption of the Mediterranean diet has been associated with a reduction in inflammatory markers in blood [33–35].

It has been shown that the content of saturated fatty acids from Brazil nuts was about 20%, with higher concentrations of palmitic and stearic acids [6]. For MUFA, this value was about 30%, representing mostly oleic acid— ω -9. The content of PUFAs

was about 25%, representing mostly linoleic acid— ω -6. Earlier data indicate that MUFA and PUFAs can exhibit anti-inflammatory properties in different experimental models of inflammation [36]. The mechanisms by which dietary fatty acids inhibit cytokine production are unknown, but may be related to inhibition of the inflammatory cascade at the level of cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) [37].

Consequently, the beneficial effect of different types of nut consumption has been described in pathologic conditions, such as cardiovascular disease [2,6,16,27,32,38,39], dyslipidemia [6,31,40], diabetes mellitus [41], hypertension, [42] and other chronic diseases [1,26,43]. Moreover, moderate selenium supplementation has been shown to cause beneficial effects in immune function and a decrease in oxidative stress [11,16,33,44]. Modulation of oxidative stress (particularly a reduction of peroxide levels) can decrease inflammation [45]. Notably, fatty acid levels and selenium status are important modulators of the expression of GPx that may influence the levels of oxidative stress and fatty acid metabolism in the endothelium [46]. Human clinical trials have reported an increase in the antioxidant defense mechanism after tree nut consumption due to an increase in erythrocyte catalase activity and a decrease in reduced glutathione to oxidized glutathione ratio [47]. In the present study, the content of selenium in Brazil nuts may have contributed to the diminished inflammatory response, in the absence of modified of GPx activity.

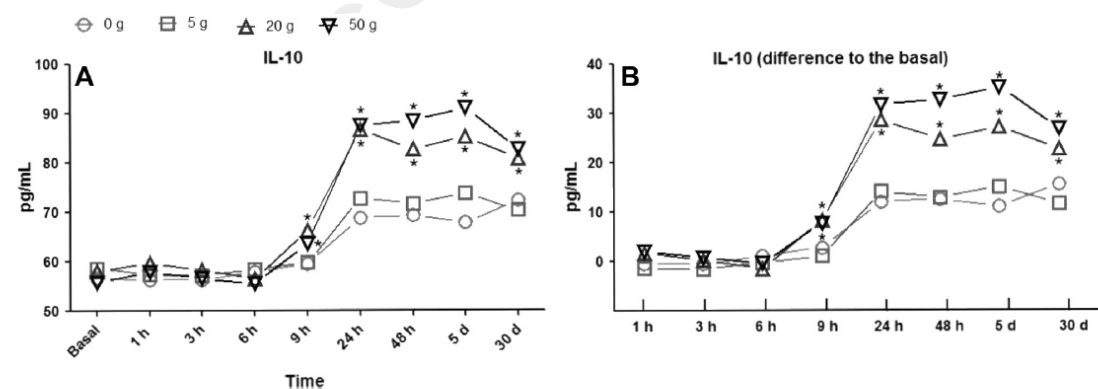


Fig. 6. Seric levels of IL-10 in healthy volunteers after consumption of Brazil nuts. (A) With basal. (B) Difference to the basal. Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared with basal.

Please cite this article in press as: Colpo Elisângela, et al., Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters, Nutrition (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005>

554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617

6

E. Ângela Colpo et al. / Nutrition xxx (2013) 1–7

Various polyphenolic compounds have been identified in Brazil nuts [48]. In accordance with previous results here we demonstrated the presence of similar quantities of total polyphenolic contents in Brazil nuts. Additionally, we demonstrated here the presence of the following main components: Resveratrol, ellagic acid, quercetin, catechin, epicatechin, kaempferol, quercitrin, and rutin. The phenolic compounds present in foods can have antioxidant and anti-inflammatory properties [49], and may be one of the active compounds responsible for the beneficial effects of Brazil nuts reported here. Furthermore, specific phenolic compounds can inhibit both COX and LOX pathways, thus decreasing the production of inflammatory metabolites [50].

In summary, a single consumption of 20 to 50 g of nuts decrease inflammatory markers in healthy individuals up to 30 d after ingestion. The results presented here raise the following questions: Is it better to ingest a single large portion of Brazil nuts intermittently? Or is it better to ingest small portions of Brazil nuts daily or chronically? Furthermore, we propose that long-term effects of regular or intermittent consumption of Brazil nuts on the course of dyslipidemia should be further investigated.

Acknowledgments

This work was financed by grants received from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq).

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- Vadivel V, Kumyanga CN, Biesalski HK. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition* 2012;28:1089–97.
- Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts—implications for cardiovascular health. *Br J Nutr* 2006;96:S29–35.
- Ros E, Estruch R. Inhibition of circulating immune cell activation: A molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr* 2009;89:248–56.
- Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *Food Science Technol* 2009;42:1573–180.
- Dumont E, De Pauw L, Vanhaecke F, Cornelis Rita. Speciation of Se in *Bertholletia excels* (Brazil nut): A hard nut to crack? *Food Chem* 2006;95:684–92.
- Colpo E, Vilanova CDAD, Reetz LGB, Duarte MMMF, Farias JLG, Muller EL, et al. A single consumption of high amounts of the Brazil nuts improves lipid profile of healthy volunteers. *J Nutr Metab* 2013;2013:1–7.
- Rayman MP, Infante HG, Sargent M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. *Br J Nutr* 2008;100:238–53.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehab O. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003;300:1439–43.
- Nogueira CW, Rocha JBT. Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 2001;85:1313–59.
- Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr* 2003;133:1517S–20S.
- Roy M, Kiremidjian-Schumacher L, Wishe H, Cohen MW, Stotzky G. Supplementation with selenium and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression. *Biol Trace Elem Res* 1994;41:103–14.
- Peretz A, Neve J, Desmedt J, Duchateau J, Dramaix M, Famaey JP. Lymphocyte response is enhanced by supplementation of elderly subjects with selenium-enriched yeast. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1323–8.
- Petrie HT, Klaseen LW, Kay HD. Selenium and immune response: I. modulation of allo reactive human lymphocyte functions in vitro. *J Leukoc Biol* 1989;45:207–14.
- Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G. Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells. *Biol Trace Elem Res* 1994;41:115–27.
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. *Ann Intern Med* 2006;145:1–11.
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1402S–6S.
- WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic: Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series, n.894). Geneva: WHO; 2000.
- USDA National nutrient database for standard reference. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/2006>.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.
- Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 1973;22:475–6.
- Visentainer JV. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* 2012;35:274–9.
- Amaral GP, Carvalho NR, Barcelos RP, Dobrachinski F, Portella RL, Silva MH, et al. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food Chem Toxicol* 2013;55:48–55.
- Boligon AA, Kubica TF, Mario DN, Brum TF, Piana M, Weiblen R, et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiol Plant* 2013;35:2229–39.
- Prigol M, Brünning CA, Martini F, Nogueira CW. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. *Biol Trace Elem Res* 2012;150:272–7.
- Pagalía DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
- López-Uriarte P, Nogueú R, Saez G, Bulló M, Romeu M, Masana L, et al. Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2010;29:373–80.
- Zhao G, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr* 2004;134:2991–7.
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 2007;190:181–6.
- Cortés B, Nunez I, Cofan M, Gilabert R, Perez-Heras A, Casals E, et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1666–71.
- Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marín C, Pérez-Martínez P, Ruano J, et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 2009;204:E70–6.
- Ros E, Nunez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: A randomized crossover trial. *Circulation* 2004;109:1609–14.
- Mena MP, Sacanella E, Vazquez-Agell M, Morales M, Fitó M, Escoda R, et al. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *J Am Coll Nutr* 2007;26:225–32.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: A randomized trial. *JAMA* 2004;292:1440–6.
- Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1505S–19S.
- Das UN. Essential Fatty acids—a review. *Curr Pharm Biotechnol* 2006;7:467–82.
- Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J Ethnopharmacol* 2011;136:504–10.
- Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* 2001;62:1433–8.
- Cominetti C, Bortoli MCD, Purgatto E, Ong TP, Moreno FS, Garrido AB Jr, et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198 Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. *Nutrition* 2011;27:891–6.
- Griell AE, Kris-Etherton PM. Tree nuts and the lipid profile: A review of clinical studies. *Br J Nutr* 2006;96:S68–78.
- Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Jerling JC. A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *J Nutr* 2005;135:2082–9.
- Kendal CWC, Josse AR, Esfahani A, Jenkins DJA. Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *Br J Nutr* 2010;104:465–73.
- Djoussé L, Rudich T, Gaziano JM. Nut consumption and risk of hypertension in US male physicians. *Clin Nutr* 2009;28:10–4.
- Stockler-Pinto MB, Mafra D, Farage NE, Boaventura GT, Cozzolino SMF. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition* 2010;26:1065–9.

Please cite this article in press as: Colpo Elisângela, et al., Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters, *Nutrition* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005>

- 146 [44] Broome CS, McArdle F, Kyle JAM, Andrews F, Lowe NM, Hart CA, et al. An in-
 147 crease in selenium intake improves immune function and poliovirus handling
 148 in adults with marginal selenium status. *Am J Clin Nutr* 2004;80:154–62. 755
 149 [45] Smith WL. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr*
 150 *Opin Cell Biol* 2005;17:174–82. 756
 151 [46] Sneddon AA, Wu H, Farquharson A, Grant I, Arthur JR, Rotondo D, et al.
 152 Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human
 153 endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis*
 154 2003;171:57–65. 757
 [47] Canales A, Benedí J, Nus M, Librelotto J, Sánchez-Montero JM, Sánchez-
 status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk
 factor. *J Am Coll Nutr* 2007;26:225–32. 758
 [48] John JA, Shahidi F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil
 nut (*Bertholletia excelsa*). *J Funct Foods* 2010;2:196–209. 759
 [49] Tomas-Barberan F, Espin JC. Phenolic compounds and related enzymes as
 determinants of quality of fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 2001;
 81:853–76. 760
 [50] Loughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houlst JR, Halliwell B. Inhibition of
 mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and
 phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron
 ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673–81. 761
 762
 763

UNCORRECTED PROOF

3 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o consumo de castanha do Brasil em uma única dose apresentou efeitos benéficos em humanos saudáveis em um período de 30 dias. O consumo da castanha do Brasil nas porções de 20 ou 50 g apresentou benefícios nos parâmetros de perfil lipídico, aumentando o HDL-c e diminuindo o LDL-c. Além disso, apresentou diminuição das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ , além de aumentar a interleucina anti-inflamatória IL-10.

Antes do consumo das castanhas do Brasil, os voluntários saudáveis apresentaram níveis médios de colesterol total e LDL-c normais de acordo com Xavier et al. (2013). No entanto, no parâmetro HDL-c, os valores médios iniciais da amostra estudada ($47,7 \pm 2,3$ mg/dl) estavam abaixo dos valores desejáveis para ambos os gêneros (> 60 mg/dL). Com o consumo de uma porção de castanha do Brasil estes valores aumentaram, sendo que nos grupos que consumiram quantidades maiores de castanhas (20 ou 50 g), alcançaram valores de HDL-c desejáveis: $63,2 \pm 10,7$ mg/dL para o consumo de 20 g de castanha do Brasil no 30º dia e $65,0 \pm 11,8$ mg/dL para o consumo de 50 g de castanha do Brasil no mesmo período. Esse aumento significativo não foi observado no grupo que consumiu uma porção de 5 g, tendo um resultado semelhante ao grupo controle ($54,2 \pm 8,8$ mg/dL e $53,8 \pm 11,8$ mg/dl, respectivamente) no 30º dia após o consumo de castanhas. Pode-se observar que no grupo controle também ocorreu um aumento da HDL-c. Esse resultado pode ter ocorrido por ser um estudo *cross-over*, podendo ter um efeito cumulativo do consumo das castanhas nos voluntários durante o período do estudo.

Vários estudos demonstram os benefícios do consumo da castanha do Brasil para a saúde humana (COMINETTI et al., 2011; COMINETTI et al., 2012; DUMONT et al., 2006; IP; LISK, 1994; MARANHÃO et al., 2011; STOCKLER-PINTO et al., 2012; STRUNZ et al., 2008; THOMSON et al., 2008; YANG, 2009). Como já relatado, a castanha do Brasil apresenta quantidades significativas de ácidos graxos essenciais como ácido oleico ($\omega 9$) e ácido linoleico ($\omega 6$) (ALASALVAR; PELVAN, 2010), além de apresentar altas concentrações de selênio, vitamina E (MIRALIKBARI; SHAHIDI, 2008), compostos fenólicos e flavonoides, que contribuem para o potencial antioxidante no organismo e, além disso, possuir concentrações importantes de fitosteróis (MIRALIKBARI; SHAHIDI, 2008;

SEGURA, 2006), contribuindo assim para melhorar o perfil lipídico, reduzindo o colesterol total e LDL-c (HICKS; MOREAU, 2001; PLAT et al., 2000).

A importância do Se na saúde humana já está bem evidenciada (CLARKE et al., 2010; DUMONT, VANHAECKE; CORNELIS, 2006; FINLEY, 2007; GONG et al., 2012; HAWKES et al., 2009; NAVARRO-ALARCÓN; LÓPEZ-MARTINEZ, 2000; THOMSON et al., 2007). Muitos estudos mostram o papel do Se para a manutenção do sistema imune (ESKEW et al., 1985; ROY et al., 1994; SPALLHOLZ; BOYLAN; LARSEN, 1990) em que altas concentrações de Se foram associadas com a diminuição da 8-iso-prostaglandina F_{2α} em idosos, sugerindo um efeito mediador na rota inflamatória pelas ciclooxigenases (HELMERSSON et al., 2005). Por outro lado, baixos níveis de Se foram associados com um aumento da concentração da IL-6 e da mortalidade em humanos (WALSTON et al., 2006).

Outro efeito importante que o Se apresenta para a saúde humana e que também evidenciamos no presente estudo é o seu papel nas doenças cardiovasculares. Sabe-se que as selenoproteínas, em especial a GPx previne a oxidação de lipídeos, como a lipoproteína LDL-c, envolvida no processo de aterogênese (BLANKENBERG et al., 2003; FLORES-MATEO et al., 2006; NOGUEIRA; ROCHA, 2011; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003).

No presente estudo, o consumo de uma única dose de castanha do Brasil em diferentes concentrações não teve resposta no aumento da atividade da GPx, no entanto, aumentou os níveis plasmáticos de Se na população estudada.

Apesar da castanha do Brasil ser rica em Se, a concentração deste oligoelemento nas castanhas é bem variável (0,03 a 512,0 µg/g), o que dificulta a definição da quantidade adequada de ingestão diária. No presente estudo, o grupo que consumiu 20 ou 50 g de castanhas do Brasil em uma única dose teve um consumo médio de 625 µg e 1560 µg de Se respectivamente, valores bem acima do recomendado pela RDA diário (55 µg/d Se) e também ultrapassando o limite superior tolerável de ingestão (UL) para adultos que, segundo as DRIs é de 400 µg/d Se. Mesmo assim, pode-se perceber que as concentrações plasmáticas de Se mantiveram-se dentro da faixa de normalidade segundo Versieck and Cornelis (1989) que é de 53±20,7 a 161±19 µg Se L⁻¹.

O valor médio mais alto da concentração de Se plasmático nos grupos que consumiram 20 ou 50 g de castanhas do Brasil foi de 51,6±22 e 52,2±16 µg/L, respectivamente 6 horas após a ingestão das castanhas. No entanto, esses valores se mantiveram por mais tempo no grupo que consumiu 50 g de castanhas, apresentando uma média de 56,2±3,8 µg/L Se entre 3 h e 24 h após o consumo das castanhas, sendo este período de tempo, as maiores concentrações plasmáticas de Se observadas neste grupo. Já o grupo que

consumiu 20 g de castanhas neste mesmo intervalo de tempo apresentou concentrações médias de $44,7 \pm 5,2$ $\mu\text{g/L}$ Se. O grupo que consumiu 5 g apresentou concentrações médias de $48,2 \pm 3,4$ $\mu\text{g/L}$ de Se e o controle uma média de $44,7 \pm 5,2$ $\mu\text{g/L}$. A concentração média de Se plasmático antes do consumo das castanhas nos voluntários saudáveis foi de $37,7 \pm 12,8$ $\mu\text{g/L}$, valores normais, no entanto, no limite inferior ($32,3$ $\mu\text{g/L}$) segundo os valores médios de referência apresentados. Da mesma forma que observamos que a concentração sérica de HDL-c teve um aumento do grupo controle, este aumento das concentrações plasmáticas de Se neste grupo pode estar relacionado a um efeito cumulativo do consumo das castanhas pelos voluntários.

O fato de os níveis plasmáticos de Se aumentar após o consumo de castanhas do Brasil pode ter contribuído para os resultados satisfatórios encontrados no presente estudo, principalmente por observarmos concentrações plasmáticas de Se dentro do limite inferior segundo os padrões de referência no início do estudo. Além disso, o perfil lipídico dos voluntários que consumiram 20 ou 50 g de castanhas apresentou melhora a partir das 6 h após a ingestão das castanhas e os marcadores inflamatórios apresentaram resultados satisfatórios a partir de 9 h após o consumo de 20 ou 50 g de castanhas do Brasil. O período de 6 e 9 h após o consumo de castanhas do Brasil está diretamente relacionado com o período em que os níveis plasmáticos de Se estavam mais elevados nos voluntários estudados.

A associação concomitante da alta concentração de Se presente nas castanhas com quantidades significativas de ácidos graxos essenciais como oleico ($\omega 9$) e linoleico ($\omega 6$) e uma concentração razoável de compostos fenólicos e flavonoides pode ter contribuído para esta resposta satisfatória nos voluntários que consumiram as castanhas. Estudos mostram que altas quantidades de oleaginosas (≈ 50 a 90 g) contêm concentrações importantes de compostos fenólicos e estão associadas a diminuição da peroxidação lipídica em humanos (ANDERSON et al., 2001; TORABIAN et al., 2009).

É evidente que as concentrações de compostos fenólicos e flavonoides encontrados nas castanhas estão aquém das encontradas em alimentos considerados ricos nestas substâncias como o cacau, o vinho tinto e chás verde e preto (KARLSSON et al., 2010; LEE et al., 2003; PAPOUTSI et al., 2008). No entanto, a sinergia destes compostos pode ter sido um fator decisivo nos resultados apresentados do presente estudo, já que está comprovado que estes elementos apresentam importantes efeitos benéficos para a saúde em humanos.

Alguns estudos mostraram que altas quantidades de ácidos graxos monoinsaturados como o ácido oleico ($\omega 9$) presentes em uma dieta, tem o potencial de diminuir o colesterol total e LDL-c (GEIGER, 2009; GRIEL; KRIS-ETHERTON, 2006; TERNUS; LAPSLEY).

Baer et al. (2004) mostraram que a ingestão de ácido oleico inibiu a concentração da IL-6 em adultos em relação ao consumo de ácidos graxos saturados, demonstrando um possível efeito anti-inflamatório. No estudo de James; Gibson e Neuman (1993) observaram que os ratos alimentados com ácido eicosatrienóico, converte esse ácido em leucotrieno A₃, um potente inibidor da síntese do leucotrieno B₄ (LTB₄), que possui potencial pró-inflamatório.

Estudos demonstram que dietas contendo ácidos graxos monoinsaturados em substituição aos poliinsaturados tornam a LDL menos suscetível à oxidação, o que pode resultar, em teoria, em inibição do processo aterogênico (REAVEN et al., 1991; REAVEN; GRASSE; TRIBBLE, 1994). Estudo de Toborek et al. (2002) mostrou que os ácidos graxos insaturados podem induzir efeito pró-inflamatório em células vascular endotelial de humanos, em especial o ácido linoleico (ω 6). Entretanto, o mesmo estudo mostrou que o ácido oleico (ω 9) diminuiu a ativação de genes pró-inflamatórios em diversos células endoteliais.

Vários estudos em humanos demonstram que o consumo de castanhas ou azeite de oliva, conforme a dieta do mediterrâneo tem o potencial de diminuir as concentrações séricas de citocinas ou moléculas de adesão endotelial quando comparados com o consumo de outras fontes de óleos ou gorduras (BOGANI et al., 2007; CORTÉS et al., 2006; JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2009; MENA et al., 2007; ROS et al., 2004). Além disso, a dieta do mediterrâneo tem sido associada com a redução de marcadores inflamatórios sanguíneos (ESPOSITO et al., 2004; CALDER, 2006; DAS, 2006), além da redução da mortalidade pelas doenças cardiovasculares (ESTRUCH et al., 2006; KASTORINE et al., 2011; WILLETT; SACKS, 1995). Em publicação recente de Bao et al. (2013) foi demonstrado associações inversas entre o consumo de oleaginosas com a mortalidade total por causa específica, independente de fatores preditores de morte.

Estudo de Jiang et al. (2005) mostrou que o consumo de oleaginosas está inversamente associado com doenças cardiovasculares e o Diabetes Mellitus, após demonstrarem uma redução nos marcadores inflamatórios como a IL-6, a PCR e o fibrinogênio. Casas-Agustench et al. (2011) mostraram em seu estudo que o consumo crônico de oleaginosas não apresentou muitos efeitos sobre o perfil lipídico, no entanto, melhorou a sensibilidade a insulina após a ingestão de 30 g de um mix de oleaginosas durante 12 semanas.

Diante de uma série de estudos apresentados no presente trabalho percebe-se que a castanha do Brasil é um alimento rico em componentes importantes para minimizar alterações oxidativas nas células. Os resultados aqui apresentados comprovam os benefícios da castanha do Brasil e a importância desta oleaginosa fazer parte de uma alimentação saudável.

Diante disso, neste ano de 2013, a autora da pirâmide alimentar Brasileira, a nutricionista Sonia Tucunduva Philippi, em parceria com o Ministério da Saúde fez algumas adaptações a pirâmide, em decorrência de estudos indicando um aumento do excesso de peso na população brasileira nos últimos anos associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (IBGE, 2010; OMS, 2011). Além da inclusão de carboidratos complexos integrais, redução do valor energético médio diário para 2.000 kcal e o incentivo à prática de atividades físicas, a nova pirâmide também orienta o consumo de 1 porção de oleaginosas por dia, equivalente a 5 g, como a castanha do Brasil por ser uma oleaginosa típica de algumas regiões brasileiras (PHILIPPI et al., 1999).

4 CONCLUSÕES

O consumo de diferentes concentrações de castanha do Brasil numa única porção em voluntários saudáveis apresentou as seguintes conclusões:

- Uma única porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil por 30 dias apresentou efeitos satisfatórios em humanos saudáveis em relação ao perfil lipídico como a redução do LDL-c e aumento do HDL-c.
- O consumo de uma porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil por voluntários saudáveis durante 30 dias melhorou os níveis de marcadores inflamatórios diminuindo a IL-1, o TNF- α , o INF- γ e aumentando a IL-10.
- A castanha do Brasil apresenta inúmeros compostos importantes para a saúde já comprovados na literatura como Se, ácidos graxos essenciais, compostos fenólicos, flavonoides, entre outros. A interação destes compostos possivelmente está relacionada com os efeitos benéficos apresentados no presente estudo.
- O fato de observarmos efeitos benéficos pelo consumo de apenas uma porção de 20 ou 50 g de castanha do Brasil durante 30 dias, e não o consumo de doses menores diárias desta oleaginosa, como sugerido por diversos estudos referenciados na literatura, ainda é uma questão que precisa ser muito discutida e estudada. Apesar dos resultados encontrados serem favoráveis é muito cedo para recomendar o consumo de castanha do Brasil em doses elevadas com uma única porção durante um período de tempo. Mais estudos são necessários para esclarecer melhor este achado.
- A recomendação de doses diárias em menor quantidade de castanha do Brasil deve ser continuada de acordo com Philippi et al. (1999): uma porção diária de 5g de castanha do Brasil. No entanto, como a concentração de Se nas castanhas apresenta uma variabilidade alta como observado no presente estudo e na literatura, a recomendação de duas unidades de castanha do Brasil diária, o equivalente a \approx 10g, deve ser incentivada para suprir as necessidades de Se em humanos.

- Observamos efeitos benéficos do consumo da castanha do Brasil em voluntários saudáveis. Estudos em outras populações, como em pacientes dislipidêmicos, com doenças cardiovasculares, diabéticos ou com câncer devem ser realizados para verificar o papel da castanha do Brasil em populações que apresentam alterações metabólicas. Desta forma, a castanha do Brasil pode apresentar efeitos benéficos nesta população, favorecendo melhora do prognóstico destes pacientes.

REFERÊNCIAS

ABEYWARDENA, M. Y.; HEAD, R. J. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. **Cardiovascular Research**, v.52, p.361–371, 2001.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2003. **Toxicological profile for selenium**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp92.html>>. Acesso em: 22 out. 2013.

ALASALVAR, C.; PELVAN, E. Fat-soluble bioactives in nuts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, n8, p.943-949, 2011.

ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANDERSON, K. J. et al. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. **Journal of Nutrition**, v.131, n.11, p. 2837-2842, 2001.

ASSOCIAÇÃO DO POVO INDIGENA ZORÓ – APIZ. **Boas práticas de coleta, armazenamento e comercialização da castanha do Brasil**. Projeto de Conservação da Biodiversidade e Uso Sustentável das Florestas do Noroeste de Mato Grosso. Secretaria de Estado do Meio Ambiente de Mato Grosso (SEMA), 2008, 42 p.

BAER, D. J. et al. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.6, p.969–973, 2004.

BAO, Y. et al. 2013. Association of Nut Consumption with Total and Cause-Specific Mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 369, p.2001-2011, 2013.

BEHNE, D; KYRIAKOPOULOS, A. Mammalian selenium-containing proteins. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p.453-473, 2001.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Journal of Physiology**, v. 555, n3, p. 589-606, 2004.

- BLANKENBERG, S. et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v.349, n.17, p.1605-1613, 2003.
- BOGANI, P. et al. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. **Atherosclerosis**, v.190, n.1, 181-186, 2007.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch L, Massaro D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. Marcel Decker: New York. 1997.
- BULJEVAC, M. et al. Serum selenium concentration in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Acta Medica Croatica**, v.50, n.1, p.11-14, 1996.
- BURK, R. F.; HILL, K. E.; MOTLEY, A.K. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*, v.133, p.1517S-1520S, 2003.
- CALDER, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, n.6, 1505S-1519S, 2006.
- CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.75, n.3, p.645-662, 2013.
- CARRERAS, M. C. et al. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during respiratory burst of human neutrophils. **FEBS letters**, v. 341, n.1, p.65-68, 1994.
- CARR, A. et al. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.20, n.7, p.1716-1723, 2000.
- CASAS-AGUSTENCH, P. et al. Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 2, p. 126-135, 2011.
- CHANG, J. C. et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v.30, n.4, p.801-802, 1995.

CHEN, C. H. et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. **Science**, v.321, n.5895, p.1493-1945, 2008.

CHUNHIENG, T. et al. Detailed study of Brazil nut (*bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: Phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n7, p.1374-1380.

CHURCHILL, E. N. et al. Ischaemic preconditioning improves proteasomal activity and increases the degradation of deltaPKC during reperfusion. **Cardiovascular Research**, v.85, n.2, p.385–394, 2010.

COLPO, E. et al. A Single Consumption of High Amounts of the Brazil Nuts Improves Lipid Profile of Healthy Volunteers. **Journal of Nutritional and Metabolism**, v.2013, n.1, p.1-7, 2013.

COMINETTI, C. et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v.27, n.9, p.891-896, 2011.

COMINETTI, C. et al. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v.32, n.6, p.403–407, 2012.

CORTÉS, B. et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. **Journal of the American College of Cardiology**, v.48, n.8, p.1666-1671, 2006.

COZZOLINO, S.M.F. **Disponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009.

CZUCZEJKO, J. et al. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. **Acta Biochimica Polonica**, v.50, n.4, p. 1147-1154, 2003.

DAS, U. N. Essential Fatty acids - a review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.7, n.6, p.467-82, 2006.

DAVIS, J.; JUAREZ, D.; HODGES, K. Relationship of ethnicity and body mass index with the development of hypertension and hyperlipidemia. **Ethnicity and Disease**, v.23, n.1, p.65-70, 2013.

DEAGAN, J. T. et al. Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n.1, p. 176-181, 1993.

DHAUN, N., et al. Endothelin-A receptor antagonism modifies cardiovascular risk factors in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.24, n1, p.31-36, 2013.

DICHTL, W. et al. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ B in endothelial cells. **Circulation Research**, v.84, p.1085–1094, 1999.

DUMONT, E. et al. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chemistry**, v.95, n.4, p.684-692, 2006.

ESKEW, M. L. et al. Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function. **Immunology**, v.54, n.1, p.173-180, 1985.

ESPOSITO, K. et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. **JAMA**, v.292, n.12, p.1440-1446, 2004.

ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine (IOM). “Introduction to dietary reference intakes”. In: **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**, 2001, cap.1, p.21-34. Disponível em: <<http://www.nap.edu/openbook>>. Acesso em: 10 set. 2013.

ESTERBAUER, H. et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL (Review). **Free Radical Biology and Medicine**, v.13, n.4, p.341-390, 2002.

ESTRUCH, R. et al. Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors. **Annals of Internal Medicine**, v.145, n.1, p1-11.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, 35-43, 1997.

FERREIRA, J. C. et al. The role of local and systemic renin angiotensin system activation in a genetic model of sympathetic hyperactivity induced heart failure in mice. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.294, n.1, p.R26–R32, 2008.

FLORES-MATEO, G. et al. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.84, n.4, p.762-773, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Qualified health claims**: letter of enforcement discretion — nuts and coronary heart disease. Rockville, MD: Food and Drug Administration, July 14, 2003.

FRANCK, U.; LEITTE, A. M.; SUPPAN, P. Multiple exposures to airborne pollutants and hospital admissions due to diseases of the circulatory system in Santiago de Chile. **Science of the Total Environment**, v.468-469C, p.746-756, 2013.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **American Journal of Medicine**, v.97, n.3, p.5-13, 1994.

FREITAS, S. C. D. E. et al. Meta-analysis of selenium content in Brazil nuts. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.1, p.54-62, 2008.

GRIEL, A. E.; KRIS-ETHERTON, P. M. Tree nuts and the lipid profile: A review of clinical studies. **British Journal of Nutrition**, 96, 68S–78S, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

HELMERSSON, J. et al. Serum selenium predicts levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2alpha in a 27 year follow-up study of Swedish men. **Free Radical Research**, v.39, n.7, 763-770, 2005.

HICKS, K. B.; MOREAU, R. A. Phytosterols and phytosterols: Functional food cholesterol busters. **Food Technology**, v.55, p.63-67, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 - **Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Rio de Janeiro, 2010.

IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **Journal of Nutrition**, v.128, n.11, p.1845-54, 1998.

IP, C.; LISK, D. J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutrition and Cancer**, v.21, n.3, p.203–212, 1994.

JAMES, M. J. et al. Effect of dietary supplementation with n-9 eicosatrienoic acid on leukotriene B4 synthesis in rats: a novel approach to inhibition synthesis. **Journal of Experimental Medicine**, v.178, n.6, p.2261–2265, 1993.

JIANG, R. et al. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi-ethnic study of atherosclerosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 3, p. 222-231, 2006.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, Y. et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. **Atherosclerosis**, v.204, n.2, p. e70-e76, 2009.

KARLSSON, S. et al. Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in human monocytes. **British Journal of Nutrition**, v.103, n.8, p.1102-1109, 2010.

KASTORINE, C. M. et al. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. **American College of Cardiology**, v.57, n.11, p.1299-313, 2011.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**. 52, n.1, p.141-164.

KÖHRLE, J. et al. Selenium in biology: facts and medical perspectives. **Biological Chemistry**, v. 381, n.9-10, p.849-64, 2000.

KRIS-ETHERTON, P.M. et al. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. **Journal of Nutrition**, v.138, 1746S-1751S, 2008.

KRYUKOV, G. V., et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v.300, n.5624, p.1439–1443, 2003.

LE, H. D. et al. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.81, n.1-2, p.165-170, 2009.

LEE, F. L. et al. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.25, p.7292-7295, 2003.

LEMIRE, M. et al. Biomarkers of selenium status in the amazonian context: blood, urine and sequential hair segments. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v.19, n.2, p.213–22, 2009.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.34, n.6, p.313-319, 2013.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, n.6917, p.868-874, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, n9, p.1135-1143, 2002.

LIOU, Y. A. et al. Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. **Journal of Nutrition**, v.137, n.4, p. 945-52, 2007.

MACKNESS, M. I. et al. Paraonase and coronary heart disease. **Current Opinion in Lipidology**, v.9, n.4, p.319–324, 1998.

MARANHÃO, P. A. et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutrition and Metabolism**, v.8, p.32–40, 2011.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p. 361–70, 2000.

MENA, M. P. et al. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. **Journal of the American College of Cardiology**, v.26, n.3, p.225-232, 2007.

MENSINK, R.P. et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.5, p.1146-55, 2003.

MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. **Lipids**, v.45, n.10, p.893-905, 2010.

MIRALIKBARI, H., SHAHIDI, F., Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents. **Journal Food Lipids**, v.15, n.1, p.81-96, 2008.

NODE, K. et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. **Science**, v.285, n.5431, p.1276-1279, 1999.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v.85, n.11, p.1313-1359, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact Sheet n.317, 2011. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>>. Acesso em: 13 set. 2013.

PAPOUTSI, Z. et al. Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. **British Journal of Nutrition**, v.94, n.4, p.715-722, 2007.

PASHKOW, F. J.; WATUMULL, D. G.; CAMPBELL, C. L. Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v.101 (10 SUPPL.), S58-S68, 2008.

PEARSON, T. A. et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the american heart association. **Circulation**, v. 107, n.3, p. 499-511, 2003.

PEDERSEN, T. R. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The scandinavian simvastatin survival study (4S). **The Lancet**, v.344, n.8934, p.1383-1389, 1994.

PÉREZ-MATUTE, P.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Reactive species and diabetes: Counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, n.6, p.771-779, 2009.

PHILIPPI, S.T. et al. Pirâmide alimentar adaptada; guia para escolha dos alimentos. **Revista de Nutrição**, v.12, n.1, p.65-80, 1999.

PLAT, J. et al. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.9, p.671–677, 2000.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v.379, n.9822, p.1256-1268, 2012.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v.100, p.238-253, 2008.

REAVEN, P. et al. Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of lowdensity lipoprotein to oxidative modification in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.4, p.701-706, 1992.

REAVEN, P. D.; GRASSE, B. J.; TRIBBLE, D. L. Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with alpha-tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. **Arteriosclerosis Thrombosis**, v.14, n.4, p.557-566, 1994.

REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, n. 15, p.2457–78, 2009.

ROS, E. et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. **Circulation**, v.109, n.13, p.1609-1614, 2004.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v.340, n.2, p. 115-26, 1999.

ROY, M. et al. Supplementation with Se and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression. **Biological Trace Element Research**, v.41, n.1-2, p.103–114, 1994.

SABATÉ J, ODA K, ROS E. Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. **Archives International of Medicine**, v.170, p.821-7, 2010.

SANTOS, R.D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, n.1, supl.3, p.1-40, 2013.

SEGURA, R. et al. Other relevant components of nuts, phytosterols, folate and minerals. **British Journal of Nutrition**, v.96, S36-S44, 2006.

SERHAN CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.73, n.3-4, p.141-62, 2005.

SHEN, J. Z.; YOUNG, M. J. Corticosteroids, heart failure, and hypertension: a role for immune cells? **Endocrinology**, v.153, n.12, p.5692–5700, 2012.

SOUZA, I. F. **Cadeia produtiva de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) no estado de Mato Grosso**. 2006, 152f. Dissertação - Departamento de Economia e Administração, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

SPALLHOLZ, J. E.; BOYLAN, L. M.; LARSEN, H. S. Advances in understanding selenium's role in the immune system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 587, p.123–139, 1990.

STOCKER, R.; KEANEY Jr., J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v.84, n.4, p. 1381-1478, 2004.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients, **Nutrition**, v.26, n.11-12, p.1065-9, 2010.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. Effect of Brazil nut supplementation on plasma levels of selenium in hemodialysis patients: 12months of follow-up. **Journal of Renal Nutrition**, v.22, p.434–439, 2012.

STONER, L. et al. Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. **Clinical Biochemistry**, v.46, n.15, p.1353-1371, 2013.

STRUNZ, C. C. et al. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v.28, n.3, p.151–155, 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.57, n.3, p.134-144, 2003.

TERNUS, M. E.; LAPSLEY, K.; GEIGER, C. J. In: ALASALVAR, C., SHAHIDI, F. (Eds.). **Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects**. Florida: Taylor & Francis Group, 2009.

THOMSON, C. D. et al. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, n.2, p.379–384, 2008.

TOBOREK, M. et al. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cell. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 1, p. 119-125, 2002.

TORABIAN, S., et al. Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 22, n.1, p. 64-71, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p. 44-84, 2007.

VAN HORN, L. et al. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v.108, n.2, p.287-331, 2008.

VERSIECK, J.; CORNELIS, R. (eds.). In: **Trace elements in human plasma or serum**. CRC Press, Boca Raton, 1989.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity**, v.30, n.3, p.400-418, 2006.

WALRAND, S. et al. Aging: a barrier to renutrition? Nutritional and immunologic evidence in rats1–3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.3, p.816–24, 2000.

WALSTON, J. et al. Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. **American Journal of Epidemiology**, v.163, n.1, p.18-26, 2006.

WILLETT, W. C. et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, 1402S-1406S, 1995.

WILSON, P. W. F. et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v.97, n.18, p.1837-1847, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Mendis, S.; Puska, P.; Norrving, B. editors. Geneva, 2011.

XAVIER H. T., et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.4, supl.1, p.1-36, 2013.

YAMAGISHI, S. et al. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. **Diabetes**, v. 50, n.6, p. 1491-94, 2001.

YANG, G. et al. Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China. I. Selenium intake and tissue selenium levels of the inhabitants. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, v.3, n.2, p.77-87, 1989.

YEHUDA, S. et al. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiology of Aging**, v.23, n.5, p.843-53, 2002.

YOSHIZUMI, M.; TSUCHIYA, K.; TAMAKI, T. Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. **Journal of Investigative Medicine**, v.48, p. 11-24, 2001.

YOUUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, n.4-5, p.383-99, 2000.