

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição**

**Estudo da ação de diferentes proporções de torta de Castanha
do Brasil sobre a concentração dos hormônios da tireóide,
níveis sanguíneos de glutatona reduzida e alguns parâmetros
metabólicos em ratos Wistar**

**LUCIANE ISABEL BERNO
Bacharel em Ciências dos Alimentos**

**PROF. DR. MARIO ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR
Orientador**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição –
Área de Nutrição Experimental e Aplicada a Tecnologia
de Alimentos.**

**CAMPINAS- SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B457e Berno, Luciane Isabel
Estudo da ação de diferentes proporções de torta de castanha do Brasil sobre a concentração dos hormônios da tiróide, níveis sanguíneos de glutathione reduzida e alguns parâmetros metabólicos em ratos Wistar / Luciane Isabel Berno. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Júnior
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Hormônios da tiróide. 2. Glutathione reduzida. 3. Parâmetros metabólicos. 4. Ratos wistar I. Maróstica Júnior, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Study of the action of different proportions of Brazil nut defatted cake on the concentration of thyroid hormones, blood levels of reduced glutathione and some metabolic parameters in rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Brazil nut defatted cake, Thyroid hormones, Reduced glutathione, Metabolic parameters, Wistar rats

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Mário Roberto Maróstica Júnior

Cláudio Alvarenga de Oliveira

Solange Guidolin Canniatti Brazaca

Data da defesa: 18/12/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Dr. Mario Roberto Maróstica Junior

Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca

Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Dr. Jaime Amaya Farfan

AGRADECIMENTOS

Imensamente a Deus pelo suporte diário

A meus pais Ademir e Jandira pelo apoio incondicional, sem o qual jamais teria chegado até aqui. Ao meu querido José Ricardo Reato, por toda paciência e amor incessante. Vocês são os meus alicerces.

Aos meus avôs Aurélio e Irineu (*in memoriam*), minhas avós Diva e Doralice, tios, tias, primos e primas por todo apoio e admiração.

A família Reato por todo zelo.

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior pela orientação, compreensão e profissionalismo.

Às técnicas de laboratório Soely Maria Pissini Machado Reis, Carla de Marco Greggi e em especial a Maria Suzana Corrêa Alves da Cunha por toda ajuda, amizade e afeto.

Aos amigos e colegas de laboratório: Alice, Cláudia, Elisvânia, Fabiane (Flor), Maria Inés (PS: te adoro *bigorosamente*), Pablo e Elvis pelo apoio, risadas e companhia. Aprendi um pouquinho mais sobre a vida com cada um de vocês.

As meninas Camila Vilas Boas e Taís Vitoria Paiva do curso técnico de Nutrição do Colégio Bento Quirino, em especial ao menino Henrique de Mello Ferraz por toda dedicação, ajuda e divertimento.

Às amigas Liane e Priscila (Mimela), pelos bons momentos de amizade vividos.

Às minhas amigas/irmãs Lu (Já Era), Lígia (Maizna), Karim (Luly), Amanda (Amãdita), Débora (Roxê) e Vanessa (Padedeu) que mesmo longe e muitas vezes sem saber me deram muita força simplesmente pela verdadeira e eterna amizade existente entre nós.

Em especial a minha grande amiga Paula Telles Poeta, não só pela cumplicidade, companheirismo, ajuda e amizade durante esses 2 anos, mas sim pela lição de determinação e confiança pessoal que levarei gravado em minha memória eternamente.

A todos os colaboradores do Departamento de Alimentos e Nutrição – DEPAN da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Renato Grimaldi e sua equipe pela concessão do uso do Laboratório de Óleos e Gorduras – Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Ao Antonio Carlos C. Reinholz da Scott Tech Equipamentos pelo apoio e concessão de uso de seu Centro de Desenvolvimento.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e sugestões apresentadas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPITULO I	19
Revisão da Literatura	19
1. Características da castanha do Brasil	20
2 Selênio: descrição de sua ocorrência e de suas atividades biológicas	26
2.1 Glutationa e suas funções	27
2.2 Hormônios da Tireóide: ação fisiológica e selênio	29
3 Referência Bibliográficas	31
CAPITULO II	39
Effects of Selenium from the Brazil nut defatted cake on Thyroid Hormones of Wistar rats	39
RESUMO	40
ABSTRACT	40
1 Introduction	41
2 Materials and Methods	44
2.1 Characterization of the protein sources to be added to the rat diets	44
2.1.2 Analyzing the centesimal composition	44
2.2 Biological tests	45
2.2.1 Experimental conditions of biological tests	45
2.2.2 Experimental protocol	45
2.2.3 Biochemical analysis of samples obtained from the biological test	46
2.2.3.1 Collection of blood from the experimental animals	46
2.2.4 Determination of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) on prepared blood serum	47
2.2.5 Determination total triiodothyronine hormone (T3) and total thyroxine (T4)	47
2.3 Statistical analysis	47
3 Results and Discussion	48
3.1 Results	48
3.1.1 Centesimal composition of the diet and the Brazil nut defatted cake	48
3.1.3 Total Consumption	50
3.1.5 Concentration of alanine aminotransferase in the animal's blood serum	54
3.1.7 Triiodothyronine (T3)	55
3.2 Discussion	57
4 Conclusion	60
5 References	60
CAPITULO III	66
Effects of selenium from the Brazil nut residue on the concentration of reduced glutathione (GSH) in Wistar rat blood serum	66
1 Introduction	68
2 Materials and Methods	71
2.1 Obtaining Brazil nut residue	71

2.2 Brazil nut residue and casein aminogram	72
2.3.1 Experimental conditions of biological tests	73
2.3.2 Experimental protocol	73
2.4 Analysis of samples from biochemical assay	74
2.4.1 Blood collection	74
2.4.2 Determination of glutathione in the rat blood	74
3 Statistics	75
4.1.2 Aminogram	76
4.1.3 Concentration of GSH in the animals blood	79
5 Discussion	80
7 References	84
CAPITULO IV	90
Adição de torta de castanha do Brasil à dieta aumenta os níveis de hormônio da tireóide Triiodotironina (T3) em ratos Wistar	90
Abstract	91
Resumo	92
1 Introdução	93
1.1 Selênio e castanha do Brasil	95
2 Material e Métodos	97
2.1 Caracterização das fontes protéicas a serem adicionadas às rações dos animais	97
2.1.1 Obtenção da torta de castanha do Brasil	97
2.1.2 Análise da composição centesimal	98
2.1.3 Determinação do teor de selênio	98
2.2 Determinação da composição em ácidos graxos do óleo da torta de castanha	98
2.3 Descrição dos ensaios biológicos	99
2.3.1 Condições experimentais dos ensaios biológicos	99
2.3.2 Protocolo experimental	99
2.3.3 Análises bioquímicas das amostras obtidas no ensaio biológico	101
2.3.3.1 Coleta do sangue dos animais experimentais	101
2.2.3.2 Determinação da Glicemia	101
2.2.3.3 Determinação do colesterol total	101
2.3.5 Determinação do hormônio triiodotironina total (T3)	102
3. Análise estatística dos resultados	102
4. Resultados e Discussão	103
4.1 Resultados	103
4.1.1 Composição centesimal das rações e da torta de castanha do Brasil	103
4.1.2 Teor de selênio na torta de castanha do Brasil	105
4.1.3 Composição em ácidos graxos do óleo oriundo da torta de castanha do Brasil	105
4.1.4 Ganho de peso e consumo total	106
4.1.5 Hormônio tireoidiano - Triiodotironina (T3)	109
4.1.6 Parâmetros bioquímicos	111
4.1.6.1 Concentração sangüínea de glicose	111
4.1.6.2 Colesterol	113
4.2.1 Triiodotironina (T3) e glicemia	116
4.2.2 Triiodotironina (T3) e colesterol	117
5 Conclusão	119
6 Referências	119

CONCLUSÃO GERAL	124
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	126
ANEXO	128

APRESENTAÇÃO

Este manuscrito faz parte da dissertação da candidata Luciane Isabel Berno para obtenção de título de Mestre em Alimentos e Nutrição. Os experimentos aqui apresentados foram efetuados no laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e no Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo entre os meses de junho a dezembro de 2008, sob orientação do Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior e com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (bolsa de estudos). Parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, entre os meses de agosto e outubro de 2008.

O texto foi estruturado em 4 capítulos, sendo o primeiro a Revisão de Literatura e os outros três, na forma de artigos, nos quais serão abordados os efeitos do selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre (II) os hormônios da tireóide; (III) a concentração de glutathiona reduzida (GSH); (IV) alterações nos níveis de hormônio da tireóide triiodotironina (T3) e suas conseqüências sobre alguns parâmetros metabólicos.

O capítulo II foi disponibilizado em inglês conforme formatação da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos (C&TA) para a qual o mesmo foi enviado para publicação. O capítulo III também foi disponibilizado em inglês, ambos com o intuito de garantir maior acessibilidade dos resultados obtidos na tese tanto para a comunidade científica nacional quanto internacional.

RESUMO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar os efeitos do selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre a concentração dos hormônios da tireóide, níveis de glutatona reduzida e alguns parâmetros bioquímicos de ratos Wistar decorrentes da ingestão de dietas com diferentes proporções de torta de castanha. Assim, o estudo se iniciou com o recebimento das amêndoas de castanha do Brasil, provenientes da indústria Juta e Castanha®, localizada na cidade de São Paulo. Em seguida procedeu-se à sua prensagem para desengorduramento parcial das castanhas – o produto obtido desse processo foi denominado “torta desengordurada de castanha”. Para dar continuidade ao trabalho, foi determinada a composição centesimal das fontes protéicas utilizadas no estudo, torta desengordurada de castanha do Brasil e caseína, utilizada como proteína padrão. A partir desses dados, foram confeccionadas as dietas dos animais com 12% de proteína. As dietas continham diferentes teores de torta e caseína como fontes de proteína, resultando em oito dietas diferentes, sendo elas: G1: 100% caseína com mix-mineral AIN 93G; G2: 100% caseína com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se; G3: 65% caseína, 35% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se; G4: 65% caseína, 35% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G; G5: 75% caseína, 25% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se; G6: 75% caseína, 25% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G; G7: 87,5% caseína, 12,5% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se; G8: 87,5% caseína, 12,5% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G.

O ensaio biológico contou com 64 animais, divididos em oito grupos de oito animais cada, acondicionados em gaiolas separadas, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, durante o período de 28 dias do ensaio biológico. O consumo de dieta e o ganho de peso foram monitorados.

Ao final do experimento, os animais foram mortos por decapitação e o sangue foi coletado para realização das análises propostas.

Os níveis dos hormônios da tireóide apresentaram-se, para todos os grupos, dentro dos parâmetros descritos na literatura como ideais para roedores. Os grupos alimentados com as dietas que continham torta de castanha do Brasil apresentaram níveis de T3 significativamente maiores (1,19 a 1,41 nmol/L) que os encontrados nos grupos alimentados somente com caseína (1,04 e 1,07 nmol/L), o que revela que a torta de castanha do Brasil é um alimento que pode influenciar positivamente o metabolismo da tireóide.

A análise da concentração sanguínea de glutathione reduzida revelou que, assim como a caseína (proteína padrão), a torta de castanha do Brasil apresenta características nutricionais que contribuem para a manutenção adequada dos níveis sanguíneos de glutathione (88,49 a 94,70 mg/dl). No entanto, outros fatores, que não só as diferentes concentrações de selênio consumidas pelos animais influenciaram os níveis de glutathione SH sanguínea encontrados.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos analisados, glicemia (79,05 a 139,76 mg/dl) e colesterol (34,73 a 87,42 mg/dl), levaram à conclusão de que torta de castanha do Brasil, não só influencia positivamente o metabolismo da tireóide, mas também o metabolismo dos glicídios e lipídeos.

Para a análise estatística utilizou-se o software SAS INSTITUTE (1999). A análise de variância (ANOVA) foi calculada e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, com 5% de significância.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of selenium of the defatted cake from Brazil nuts on the concentrations of thyroid hormones, levels of reduced glutathione and some biochemical parameters of rats resulting from ingestion of diets with different proportions of defatted cake. The study began on receiving the Brazil nuts from Jute and Castanha® industry, located in São Paulo. Then the nuts were pressed partially eliminating the oil - the product of this process was called 'defatted cake'

The centesimal composition of protein sources used in the study was determined: defatted cake of the Brazil nut and casein (the later used as protein reference), and diets were prepared with 12% of protein. The diets contained different levels of defatted cake and casein, resulting in eight different diets, which were: Diet 1: (Standard diet) AIN 93G diet (protein source: casein, mineral mix AIN 93); Diet 2: (Control diet) AIN 93G diet (protein source: casein, mineral mix AIN 93 without selenium); Diet 3: AIN 93 Diet (protein sources: 65% casein/35% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93 without selenium); Diet 4: AIN 93G diet (protein sources: 65% casein/35% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93); Diet 5: AIN 93 Diet (protein sources: 75% casein/25% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93 without selenium); Diet 6: AIN 93G diet (protein sources: 75% casein/25% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN-93); Diet 7: AIN 93 Diet (protein sources: 87,5% casein/12,5% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93 without selenium); Diet 8: AIN 93G diet (protein sources: 87,5% casein/12,5% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN-93).

The assay had 64 animals, divided into eight groups with eight animals each, and packed in separate cages, on cycles light/dark of 12 hours, with controlled temperature and humidity during the 28 days of the assay. The consumption of diet and weight gain was monitored. At the end of the experiment, the animals were killed by decapitation and blood was collected to perform the analysis proposed.

The levels of thyroid hormones showed an increase for all groups, remaining the value described in the literature as ideal for rodents. The groups fed the diets containing defatted cake of the Brazil nut showed higher levels of T3 than those found in the groups fed only casein, which shows that Brazil nut cake may positively influence the thyroid metabolism.

The analysis of blood concentration of reduced glutathione revealed that the Brazil nut defatted cake presents nutritional characteristics that contribute to the maintenance of adequate blood levels of glutathione. However, other factors, independent of selenium concentrations consumed by the animals influenced the levels of blood glutathione.

The biochemical parameters examined, glucose and cholesterol, lead to the conclusion that the Brazil nut defatted cake influence positively not only the thyroid metabolism, but also the metabolism of carbohydrates and lipids.

For statistical analysis the software SAS INSTITUTE (1999) was used. The analysis of variance (ANOVA) was calculated and the mean values compared by the Tukey test with 5% significance.

INTRODUÇÃO GERAL

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é um produto nativo da Amazônia, de grande importância social, econômica e ambiental, sua amêndoa também é conhecida como castanha do Pará, e vem ocupando, desde 1911, um lugar de destaque na pauta das exportações de produtos da floresta amazônica (EMBRAPA, 2006).

O Brasil produz em torno de 30 mil toneladas de castanha por ano, porém pela ausência de estratégia de marketing para o mercado nacional para difundir seu consumo no país, vive na dependência do importador estrangeiro, sendo assim boa parte é exportada, principalmente para os países da Europa (Alemanha e Inglaterra) e da América do Norte (Estados Unidos) e apenas de 2 a 5% do total produzido anualmente são para consumo interno, principalmente na forma “in natura” (EMBRAPA, 2004; IBGE, 2006).

Dentre as opções de aplicação desta amêndoa, uma muito comum é sua utilização como matéria-prima para extração de óleo por prensagem para a indústria químico-farmacêutica, e o resíduo gerado, denominado de torta desengordurada, possui elevado valor nutricional, principalmente por conter elevados teores de proteínas (GLÓRIA; REGITANO-d'ARCE, 2000). Desta forma, enquanto a amêndoa contém, em média, 69,75% de lipídios, 16,25% de proteínas e 7,33% de carboidratos (RIBEIRO, 1992; SOUZA; MENEZES, 2004) a torta contém, em média, 25,13% de lipídios, 40,23% de proteínas e 3,37% de carboidratos (SOUZA; MENEZES, 2004).

O aminograma das proteínas da castanha do Brasil e de sua torta desengordurada revela teores apreciáveis de aminoácidos sulfurados (ROTENBERG; IACHAN, 1975; ANTUNES; MARKAKIS, 1977), sendo conhecida como a “carne vegetal” (TEIXEIRA,

1954). Por esse motivo, a castanha pode vir a se tornar uma excelente fonte alternativa de proteína.

A castanha do Brasil, além de ser conhecida pelo seu alto valor nutritivo em lipídeos e de proteínas, é o alimento que contém a maior quantidade do mineral selênio por grama de parte comestível (FREITAS et al., 2004), assim como sua torta. Segundo Souza e Menezes (2004), a torta (desengordurada) da castanha é uma excelente fonte de selênio apresentando uma quantidade deste mineral 3,56 vezes maior que o teor encontrado na amêndoa da castanha.

O selênio ocorre na natureza ligado às proteínas e tem uma relação funcional direta com os aminoácidos sulfurados, já que substitui covalentemente o enxofre desses compostos, formando, selenoaminoácidos. Assim, alimentos como a castanha do Brasil e sua torta, ricos em aminoácidos sulfurados, possuem a maior parte do selênio encontrado sob a forma de selenometionina (BRODY, 1993; COMBS; COMBS, 1986).

Embora a função mais conhecida do selênio seja a de atuar como antioxidante devido à sua associação com a enzima glutathione peroxidase, outras funções fisiológicas essenciais são atribuídas a este tripeptídeo, como, por exemplo, o seu papel na síntese hormonal da glândula tireóide.

Como antioxidante, o selênio acaba exercendo o papel de um importante elemento redutor, principalmente na neutralização dos radicais livres, apresentando assim ação protetora contra diversos tipos de doenças (RAYMAN, 2000). Outra função fisiológica atribuída ao selênio é a participação na conversão do hormônio ativo da tireóide triiodotironina (T3) a partir do precursor inativo (T4), através da enzima iodotironina desiodinase, uma enzima selenodependente. (HARDY; HARDY, 2004; YOSHIZAWA et al., 2003).

Desta forma, justifica-se um estudo da ação do selênio oriundo da torta desengordurada de castanha do Brasil, um subproduto muito produzido na região amazônica em decorrência da extração de óleo desta amêndoa, por meio da sua adição na dieta de ratos Wistar, buscando avaliar seus efeitos sobre os hormônios da tireóide, teores sanguíneos de glutatona reduzida e sobre alguns parâmetros bioquímicos.

Referências Bibliográficas

ANTUNES, A.J.; MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 25, n. 5, p. 1096-1098, 1977.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1993. 658 p.

COMBS, G.F.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**. New York: Academic Press, 1986. 532 p.

FREITAS, S. C. et al. **Selênio em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 01035231, RJ, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/ct71-2004.pdf>>. Acesso: 20 maio 2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisas com castanha terão apoio do Ministério**. Sessão: Banco de notícias. jul. 2004. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/julho/bn.2004-11-25.1907245320/mostra_noticia>. Acesso em: 18 jul.2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Workshop discute temas relevantes sobre a castanha do Brasil**. Belém: 2006. Seção: Notícias mar. 2006. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/marco/noticia.2006-03-30.5441113411/mostra_noticia> Acesso: 16 jul. 2007.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 1 - 20, 2000.

HARDY, G.; HARDY, I. Selenium: the Se-XY nutraceutical. **Nutrition**, New York, v. 20, n. 6, p. 590-593, jun., 2004.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Sessão: Comentário, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2006/comentario.pdf>. Acesso em 01.04.2009>. Acesso: 23 fev. 2009.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health, review. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

RIBEIRO, M. A. **Aproveitamento tecnológico de castanhas-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*): estudo da qualidade de conservação**. Piracicaba, 1992. 117p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ROTENBERG, B.; IACHAN, A. Estudo da proteína da castanha-do-Pará. **Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia (INT)**, v. 8, n. 7, p. 22-24, 1975.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p.120-128, 2004.

TEIXEIRA, E. **Frutas do Brasil**. Rio de Janeiro: MEC/INL, 1954. 281p.

YOSHIZAWA, K. et al. Prospective study of selenium levels in toenails and risk of coronary heart disease in men. **American Journal Epidemiology**, Oxford, v. 158, n. 9, p. 852-860, 2003.

CAPITULO I

Revisão da Literatura

Revisão bibliográfica

1. Características da castanha do Brasil

A castanheira é uma árvore pertencente à espécie botânica *Bertholletia excelsa* H.B.K da família Lecythidaceae. O gênero *Bertholletia* ocorre em países da América do Sul na região Amazônica e as maiores concentrações estão na Amazônia Brasileira. Trata-se de uma árvore de grande porte, que pode atingir até 60 m de altura e 2 m de diâmetro na base. O fruto da castanheira, também chamado de ouriço, pesa até 1,5 kg e contém entre 10 a 25 sementes (amêndoas). Esta parte comestível do fruto é conhecida popularmente como castanha do Pará ou castanha da Amazônia (COUTINHO, 2003). No entanto, o Decreto nº 51.209 de 18/08/1961 do Ministério da Agricultura denominou a castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) oficialmente de castanha do Brasil.

A castanha do Brasil (CB) vem sendo cada vez mais valorizada no mercado por seu alto valor nutritivo e sua relação com a conservação ambiental, sendo a única semente comercializada internacionalmente que tem que ser coletada na floresta (CREDIDIO, 2007).

No que se refere à produção de frutos, o Brasil fornece 75% da produção mundial de CB, alcançando uma produtividade de aproximadamente 30 mil toneladas anualmente. Segundo Campos (2009), é na região Norte que se concentra a maior parte da produção. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a região amazônica é responsável por 98% da produção nacional da castanha (basicamente no Pará, encontrando-se também nos Estados de Rondônia, Acre, Amazonas e norte de Goiás e Mato Grosso. A produção de CB também pode ser encontrada na Amazônia peruana e boliviana. Sendo assim, a CB tem importância social muito grande na região amazônica, já que a quase totalidade da produção é exportada, principalmente para Estados Unidos,

Alemanha, Inglaterra e França (CREDIDIO, 2007). Por ser destinada principalmente para o comércio de exportação, a CB confere às regiões produtoras uma alternativa de desenvolvimento sustentável (EMBRAPA, 2006). Por isso, a CB pode ser considerada como espécie-chave para aliar a conservação ao desenvolvimento, por ser abundante na região Amazônica, colhida quase que exclusivamente em florestas naturais, ser explorada por diversas comunidades no curto prazo e a baixo custo, por apresentar sólida demanda de mercado, além de a coleta ser de baixo impacto ambiental (TONINI, 2008).

Enquanto o comércio internacional de castanha é responsável por movimentar estimados R\$ 32 milhões por ano, o consumo interno é mínimo, cerca de 2 a 5% da produção nacional (EMBRAPA, 2004).

Há várias décadas a amêndoa de CB vem sendo estudada quanto as suas características de composição centesimal, por ser um alimento rico tanto em lipídios quanto em proteínas. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de composição centesimal desta amêndoa encontrados em estudos anteriores.

Tabela 1. Valores de composição centesimal da amêndoa de castanha do Brasil.

Nutriente	% ¹⁾	% ²⁾	% ³⁾	% ⁴⁾	% ⁵⁾
Proteína	20,73	17,4	14,29	16,25	16,5
Lipídio	63,87	65,0	67,3	69,75	66,7
Carboidrato	9,83	9,6	3,42	7,33	6,0
Cinzas	3,7	3,3	3,84	3,17	3,3
Umidade	1,87	4,7	3,13	3,5	4,5

1) RIBEIRO, 1992; 2) AGUIAR, 1996; 3) GLÓRIA;REGITANO-d'ARCE, 2000; 4) SOUZA; MENEZES, 2004; 5) VENKATACHALAM; SATHE, 2006.

Assim, a CB apresenta aproximadamente de 14 a 20% de proteínas, em torno de 66,5% de lipídeos e 7,2% de carboidratos (RIBEIRO, 1992; AGUIAR, 1996; GLÓRIA; REGITANO-d'ARCE, 2000; SOUZA; MENEZES, 2004; VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

Quando as amêndoas de CB se encontram fora do padrão de exportação e/ou consumo ou quebradas, são usadas para a extração de óleo para a indústria químico-farmacêutica, sendo que o resíduo desengordurado gerado nesse processo é denominado “torta” (PEREIRA, 2004). O processo mais comum de extração deste óleo é por meio de prensagem, seguida por extração com hexano (FREITAS, 2007; LAGO; FREITAS, 2006). No entanto, alguns fatores como a origem e tipo da castanha utilizada para a obtenção da torta e o método de extração, que se torna mais eficiente com o uso de solventes, podem ser os responsáveis pela grande variação nos teores de lipídios encontrados entre as tortas desengorduradas (SOUZA; MENEZES, 2004), como pode ser observado na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Valores de composição centesimal da torta desengordurada da amêndoa de castanha do Brasil

Nutriente	% ¹⁾	% ²⁾	% ³⁾
Proteína	54,5	47,6	40,22
Lipídio	1,0	1,2	25,13
Cinzas	7,3	13,1	8,85
Umidade	8,7	4,5	6,7
Carboidrato	28,5	33,6	19,1

1) ANTUNES; MARKAKIS, 1977; 2) GLÓRIA; REGITANO d'ARCE, 2000; 3) SOUZA; MENEZES, 2004.

A torta integral ou desengordurada de CB, já vem sendo objeto de estudos há muitos anos, devido ao seu alto teor protéico (MENEZES, 1967; ROTENBERG; IACHAN, 1975; ANTUNES; MARKAKIS, 1977).

Como se pode observar na Tabela 2, a torta de CB apresenta teores de proteína que variaram de 40,2 a 54,5%, sendo esta considerada como fonte de proteína.

Sendo assim, dado ao agradável sabor e reconhecido valor nutricional tanto da CB quanto de seu resíduo, a torta, ambas poderiam alcançar consumo considerável e mesmo se incorporar ao cotidiano alimentar da população brasileira, sendo uma forma de incentivar o desenvolvimento sócio econômico da região Amazônica.

Alguns estudos foram realizados a fim de se analisar a qualidade protéica da CB. Em 1937, Mitchell e Beadles realizaram ensaio de qualidade protéica com a CB, e revelando uma digestibilidade protéica de 95,7%. Antunes e Markakis (1977) realizaram estudo de suplementação de uma dieta de feijão com CB em ratos e também revelou que essa mistura promoveu o crescimento dos animais. Mais tarde, em 2006, Spini e colaboradores, em um estudo com suplementação da dieta de arroz e feijão com CB, demonstraram que a qualidade da proteína da castanha, rica em aminoácidos sulfurados, contribuiu para o crescimento dos animais.

Com relação ao aminograma da CB, segundo estudos realizados por Souza e Menezes (2004); Venkatachalam e Sathe (2006) e Glória e Regitano d'Arce (2000), a CB apresenta deficiência dos aminoácidos lisina e treonina. O aminoácido triptofano mostrou-se deficiente, de acordo com estudos realizados por Glória e Regitano d'Arce (2000). Em contraste, os aminoácidos sulfurados (metionina+cisteína) mostraram-se abundantes nos três aminogramas realizados pelo referido estudo, com quantidades três vezes maiores que o recomendado (FAO/WHO/UNU, 2002).

Devido à sua riqueza em aminoácidos sulfurados, geralmente deficientes em fontes vegetais, a CB e/ou a torta de CB pode ser incluída na alimentação do dia a dia para adequar os requerimentos destes aminoácidos, principalmente de feijão e soja, os quais são as maiores fontes de proteína dentre as leguminosas (MIZUBUTI, et al., 2000; COHEN, et al., 2006).

A metionina possui grande importância metabólica devido sua função na transmetilação e transulfuração em cisteína, a partir da transferência de 1 enxofre da metionina para a serina. A cisteína possui função na síntese de proteínas, na estrutura protéica, além de ser precursora da glutathiona (GSH), taurina e coenzima A, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento de mamíferos (FINKELSTEIN; MARTIN, 1986; BAKER, 2006).

A riqueza mineral encontrada na CB também é um apelo para o seu consumo. A CB, além de possuir elevado valor energético e protéico, vem sendo reconhecida também como fonte de selênio (Se), o qual substitui, por meio de ligações covalentes, o enxofre dos aminoácidos sulfurados, formando os selenoaminoácidos (FREITAS et al., 2004). Diversos autores, como Palmer et al. (1982); Secor e Lisk (1989); Chang et al.(1995); Coutinho e Cozzolino (1998), Reilly (1998); Souza e Menezes (2004); mencionados anteriormente, encontraram valores significativos de Se presentes na amêndoa da CB.

Segundo Souza e Menezes (2004), a torta (desengordurada) da castanha, além de conter, em média, 25,13% de lipídios, 40,23% de proteínas e 3,37% de carboidratos, também é uma excelente fonte de selênio. Esses mesmos autores encontraram 0,713 mg de Se/100g de torta, quantidade 3,56 vezes maior que o teor encontrado na amêndoa (0,204 mg/100g). Isto pode ser explicado pela grande quantidade de amêndoas com película

utilizadas para obtenção da torta e ao seu menor percentual de lipídico, sugerindo-se que a película da amêndoa poderá possivelmente, conter elevada concentração de selênio.

Experimentos com humanos evidenciaram que a CB, além de ser uma excelente fonte de Se, é também um alimento com alta biodisponibilidade do mineral, por produzir um significativo aumento na concentração de Se dos tecidos corporais (PALMER et al., 1982; THOMSON et al., 2008).

Embora os valores de Se na amêndoa/torta possam ultrapassar o valor de ingestão diária recomendada para adultos (50 a 70 $\mu\text{g}/\text{dia}$) segundo o NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1989), não se tem relatos de problemas de toxidez ao homem, de modo que a castanha é um dos alimentos básicos das populações que habitam a floresta amazônica, que as consomem das mais variadas formas, tanto pura como misturada com outros alimentos como peixes, carnes, café, mandioca (FREITAS et al., 2004; SOUZA; MENEZES 2004).

A maior parte do selênio encontrado nos vegetais está sob a forma de selenometionina, a qual estruturalmente é idêntica a metionina, exceto pela substituição do elemento enxofre pelo selênio. Essa selenoproteína é incorporada no lugar da metionina em uma variedade de proteínas (BRODY, 1993; COMBS; COMBS, 1986).

Quando o fornecimento de selênio dietético é interrompido, a reserva de selenometionina é mobilizada para disponibilizar selênio para o organismo, que pode ser incorporado em macromoléculas, transportado para outros órgãos ou excretado (UNRINE et al., 2007).

Os alimentos fontes de selênio, como a já mencionada CB, carnes, alimentos marinhos e alguns cereais, apresentam uma grande variabilidade em relação à biodisponibilidade de Se, em função da fitodisponibilidade (quantidade do elemento

presente no solo que pode ser facilmente absorvida e assimilada pelas plantas em crescimento) e da concentração de selênio presente no solo (COUTINHO, 2003).

Diversas funções essenciais ao bom funcionamento do organismo são atribuídas ao selênio, sendo a mais importante, a função antioxidante, caracterizada em 1973, devido à sua associação com a enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) (JUNIOR, 2001; SOUZA; MENEZES, 2004; FERREIRA et al., 2002). Nesta enzima, o selênio se encontra no centro ativo, ligado covalentemente na forma de selenocisteína, característica fundamental para sua ação na eliminação de peróxidos (ARTEEL; SIES, 2001; YOSHIZAWA et al., 2003).

2 Selênio: descrição de sua ocorrência e de suas atividades biológicas

O selênio (Se) é um mineral essencial a muitos processos fisiológicos. Sua importância como elemento essencial na dieta foi reconhecida após a descoberta da doença de Keshan, uma cardiopatia infantil com alta incidência em algumas regiões da China onde o solo é extremamente pobre em selênio (GE; YANG, 1993). As espécies de selênio estão distribuídas no organismo em diferentes órgãos, sendo que grandes quantidades deste elemento estão presentes em ordem de concentração: nos rins, fígado, baço, músculo cardíaco, pulmão e cérebro (DUMONT et al., 2006). Apesar da concentração de selênio cerebral não se apresentar elevada, este órgão é o único que mantém um suplemento adequado em caso de deficiência do elemento.

Sabe-se que, nos tecidos, o selênio está presente em duas formas: como selenocisteína (SeCys) e selenometionina (SeM). A SeM não pode ser sintetizada no organismo e deve ser fornecida pela dieta. Esta molécula pode substituir a metionina em uma variedade de proteínas (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

A selenocisteína é um composto análogo da cisteína contendo Se, considerada o 21º aminoácido codificado no DNA (RAYMAN, 2000; BURTIS; ASHWOOD, 2001). O selênio constituinte de proteínas (denominadas selenoproteínas, algumas das quais tem funções enzimáticas importantes) encontra-se na forma de selenocisteína, sendo a forma biológica ativa de selênio. São exemplos de selenoproteínas que contém SeCys a glutathione peroxidase (GSH Px), iodotironina deiodinase, selenoproteína P, selenoproteína W e tioredoxina redutase.

Sendo assim, a importância do selênio no organismo se dá por ele ser um componente das selenoproteínas, as quais apresentam importantes funções enzimáticas.

A função mais conhecida do selênio é a de atuar como antioxidante, devido a sua associação com a enzima glutathione peroxidase (selenoproteína), sendo importante na prevenção de danos às membranas celulares causados por peróxidos de lipídeos e radicais livres (HARDY; HARDY, 2004; YOSHIZAWA et al., 2003). Desta forma, o selênio acaba exercendo o papel de um importante centro redutor, principalmente na neutralização dos radicais livres. Sendo assim, o selênio apresenta ação protetora contra doenças cardiovasculares, ação de proteção celular em relação ao câncer, potencializa o sistema imune por meio da manutenção da integridade das células imunocompetentes (RAYMAN, 2000). Outra função fisiológica atribuída ao selênio é a participação na conversão do hormônio ativo da tireóide triiodotironina (T3) a partir do precursor inativo (T4), através da enzima iodotironina desiodinase, já mencionada.

2.1 Glutathione e suas funções

A glutathione reduzida (GSH, L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glicina) está presente na maioria das células e o tiol (-SH) é sua forma mais abundante no meio intracelular. Sua

capacidade redutora é determinada pelo grupamento-SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula sendo encontrado na maioria dos mamíferos e em muitas células procarióticas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ANDERSON, 1998; ARTEEL; SIES, 2001).

A glutathiona também é essencial na manutenção do balanço redox intracelular e dos grupos sulfidrilas das proteínas (HWANG; SINSKEY; LODISH, 1992). O equilíbrio da ligação dissulfeto com a célula é conhecido como regulador de diversos processos metabólicos também relacionados às funções da glutathiona, como atividade enzimática e atividade de transporte de aminoácidos (DELEVE; KAPLOWITZ, 1991; KAPLOWITZ et al., 1996; GREENE; HUTTER; TILL, 1997). Para a defesa celular contra o estresse oxidativo, é importante que haja equilíbrio nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSH:GSSG). Há dois principais mecanismos envolvidos para manter a concentração de GSH nos níveis considerados ideais: a redução de GSSG para a forma ativa reduzida GSH, por meio da enzima selênio-dependente glutathiona peroxidase, e a síntese de GSH reduzida usando γ -glutamilcisteína sintetase e glutathiona sintetase (SEN, 1997; ANDERSON, 1998; GRIFFITH, 1999; LU, 1999).

A enzima glutathiona peroxidase utiliza a glutathiona (GSH) como agente redutor. Uma das principais funções da GSH nos eritrócitos é a de eliminar redutivamente o H_2O_2 e os hidroperóxidos orgânicos, que são metabólitos reativos do oxigênio, os quais podem danificar irreversivelmente a hemoglobina e clivar algumas ligações C-C dos fosfolípidos presentes nas membranas celulares, atuando assim como defensor contra distúrbios causados pelos radicais livres e pela peroxidação lipídica (HARDY; HARDY, 2004; VOET; VOET; PRATT, 2000). Os radicais livres são formados durante processos

biológicos normais e patológicos, podendo causar danos às células e aos tecidos e estão relacionados com várias doenças incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento.

Vários estudos, como os de Angstwurm e Gaertner (2006) e Thomson et al. (2008), demonstram que variações na concentração de selênio podem influenciar diretamente a atividade da enzima GSH Px, interferindo no ciclo ilustrado acima. Sendo assim, variações na atividade da GSH Px podem, possivelmente, interferir na concentração de glutatona reduzida.

2.2 Hormônios da Tireóide: ação fisiológica e selênio

A glândula tireóide, responsável por secretar os hormônios da tireóide, inicialmente foi relacionada a funções de lubrificação da laringe, tendo sido posteriormente a primeira glândula endócrina descrita. Em 1850, pacientes sem tireóide foram descritos como portadores de uma forma de retardo mental e do crescimento, o “cretinismo”. Os hormônios tireoidianos exercem seus efeitos sobre praticamente todos os sistemas e órgãos do corpo (NUNES, 2003; AZEREDO, 2004).

A glândula tireóide secreta predominantemente tiroxina (T4) da qual deriva, por desiodação, a maior parte do T3 circulante. Praticamente, todos os tecidos do organismo dependem de T3, tendo em vista a sua atividade biológica ser no mínimo 5 vezes maior que a de T4, já que potencialmente todos os tecidos expressam receptores de HT. Desta forma, para a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo, níveis intracelulares adequados de T3 devem ser garantidos, o que depende da atividade tireoidiana e da geração intracelular deste hormônio, processos que estão acoplados, respectivamente, a integridade do eixo

hipotálamo-hipófise-tireóide e a atividade de enzimas específicas, as desidinasases (NUNES, 2003; AZEREDO, 2004; MATAMOROSA et al., 2008).

Em linhas gerais, a função tireoidiana é regulada pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH) produzido no hipotálamo que, por meio do sistema porta hipotálamo-hipofisário, se dirige à adeno-hipófise, ligando-se em receptores específicos no tireotrofo e induzindo a síntese e secreção de hormônio tireotrófico (TSH - Thyroid Stimulating Hormone). Este, por sua vez, interage com receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de HT, aumentando a atividade da célula tireoidiana e estimulando a secreção hormonal (NUNES, 2003).

Quanto às desidinasases, são as principais formadoras de T3 circulante e intracelular, e apresentam papéis específicos em função de suas distintas características e formas de regulação.

O selênio forma a estrutura de diferentes proteínas do organismo, sendo sua concentração na glândula tireóide mais alta do que em outros tecidos pelo fato de ser constituinte das iodotironina 5'- desidinasases (DI; EC 3.8.1.4), tipos I, II e III (HOWIE et al., 1995). A DI tipo I se expressa em diferentes órgãos, como fígado, rins e glândula tireóide, a tipo II age no sistema nervoso e no tecido adiposo pardo, e a tipo III no útero e na placenta. As DI catalisam a desidiação do pro-hormônio 3,5,3',5'-tetraiodotironina (L-Tiroxina, T4) a sua forma metabolicamente ativa a 3,5,3'-triiodotironina (T3) (MATAMOROS et al., 2008). Este fato indica que alterações na concentração de selênio do organismo podem ter alguma influência sobre a concentração dos HT. Segundo DIPLOCK et al. (1997) e MATAMOROS et al. (2008), uma deficiência de selênio poderia conduzir a distúrbios relacionados aos hormônios da tireóide.

3 Referência Bibliográficas

AGUIAR, J. P. L. Tabela de Composição de Alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.26, p. 121-126, 1996. Disponível em: <<http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/26-2/PDF/v26n2a11.pdf>>. Acesso: 03 jun. 2009.

ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemio-Biological Interactions**, Memphis, v. 111-112, p.1-14, abr., 1998.

ANGSTWURM, M. W. A., GAERTNER, R. Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. **Current Opinion Clinical Nutrition & Metabolic Care**, London, v. 9, p. 233-238, 2006.

ANTUNES, A.J.; MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 25, n. 5, p. 1096-1098, 1977.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 153-158, 2001.

AZEREDO, D. M. **Transtornos relacionados aos Hormônios da Tireóide**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no primeiro semestre de 2004. p. 1-16. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/transtornos_tireoide.pdf>. Acesso: 06 de ago. de 2008.

BAKER, D.H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, n. 6, p. 1670S–1675S, 2006. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/136/6/1670S>>. Acesso: 18 maio 2008.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1993. 658 p.

BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. In: **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**, 5. ed. W. B. Company, USA, 2001.

CAMPOS, T. **Castanha movimentou mais de R\$ 25 milhões em 2008 no Acre**. Agência de Notícias dos Acre. 14 maio 2009. Disponível em: <http://www.agencia.ac.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=8630&Itemid=26>. Acesso: 01 jun. 2009.

CHANG, C. C. et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

COHEN, K. O.; CHISTE, R. C.; MATHIAS, E. A. Produção de farinha parcialmente desengordurada de castanha do Brasil. **Circular Técnico - EMBRAPA**, Belém do Pará, n. 42. p. 1-5, fev. 2006. Disponível em: <www.cpatu.embrapa.br/.../producao-de-farinha-parcialmente-desengordurada-de-castanha.../PublicacaoArquivo>. Acesso: 23 abr. 2008.

COMBS, G.F.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**, New York: Academic Press, 1986. 532 p.

CREDIDIO, E. V. Propriedades Nutricionais da Castanha do Pará. “Alimentos Funcionais na Nutrologia Médica” - Editora Ottoni, Itu, SP, 2007 - 3ª Edição. **Associação Brasileira de Nutrologia**. Disponível em: <http://www.abran.org.br/inf_artigos/167.htm>. Acesso: 02 jun. 2009.

COUTINHO, V. F., COZZOLINO, S. M. F. Análise da concentração de selênio em castanhas do Pará (*Bertholletia excelsa* H. B. R.) In: XV Congresso Brasileiro de Nutrição – Segurança Alimentar e Nutricional no Brasil, 15, Brasília, 1998. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Nutrição**, Brasília, 1998.

COUTINHO, V. F. **Efeitos da suplementação com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao**

selênio. 2003. 176 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DELEVE, L.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology Therapy**, Amsterdam, v.52, n. 3, p.287-305, 1991.

DIPLOCK, A.T., et al. Interaction of selenium and Iodine deficiency diseases. In: Fischer PWF et al., eds. Trace Elements in Man and Animal-9. **Proceedings of the Ninth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals**. NRC Research Press, Ottawa, p. 63 – 68, 1997.

DUMONT, E; VANHAECKE, F; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 385, p. 1304-1343, 2006.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisas com castanha terão apoio do Ministério**. Sessão: Banco de notícias. jul. 2004. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/julho/bn.2004-11-25.1907245320/mostra_noticia>. Acesso em: 18 jul.2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Workshop discute temas relevantes sobre a castanha do Brasil**. Belém: 2006. Seção: Notícias mar.2006. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/marco/noticia.2006-03-30.5441113411/mostra_noticia>. Acesso: 16 jul. 2007.

FAO/WHO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **Report of a Joint Expert Consultant**, Geneva, Switzerland, 2002, 265p.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, vol. 43, n.1, jan./mar. 1997.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública / Pan American Journal of Public Health**, Washington, DC, v. 11, n.3, p. 172-177, 2002.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Methionine Metabolism in Mammals- Adaptation to methionine excess. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 261, n. 4. p. 1582 - 1587, 1986.

FREITAS, S. C. et al. **Selênio em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 01035231, RJ, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/ct71-2004.pdf>>. Acesso: 20 maio 2007.

GE, K., YANG, G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. **American Journal Clinical Nutrition (Suppl)**, v. 57, n. 2, p. 259S-263S, 1993.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 1 - 20, 2000.

GREENE, J. J.; HUTTER, D. E.; TILL, B. G. Redox state changes in densitydependent regulation of proliferation. **Experimental Cell Research**, v. 232, p.435-438, 1997.

GRIFFITH, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 922-935, nov. 1999.

HARDY, G.; HARDY, I. Selenium: the Se-XY nutraceutical. **Nutrition**, New York, v. 20, n. 6, p. 590-593, jun., 2004.

HWANG, C; SINSKEY, A.J.; LODISH, H.F. Oxidized Redox State of glutathione in the Endoplasmic Reticulum. **Science**, v. 257, p.1496-1502, set., 1992.

HOWIE A. F. et al. Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: A potential regulator of thyroid-hormone synthesis. **Biochemistry Journal**, v. 308, n. 3, p. 713-717, jun. 1995.

Disponível em: <
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1136783&blobtype=pdf>>. Acesso:
15 mar. 2009.

JUNIOR L. R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KAPLOWITZ, N. et al. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. **Biological Chemistry Hoppe - Seyler**, v. 377, n.5, p. 267- 273, may 1996.

LAGO, R. C. A.; FREITAS, S. P. Extração dos óleos de café verde e da borra de café com etanol comercial. **Comunicado Técnico**, n. 92, Rio de Janeiro. Ago. 2006. Embrapa, p. 1 - 6, 2006. Disponível em: < <http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/ct92-2006.pdf>>. Acesso: 02 dez. 2008.

LU, S. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **Faseb Journal**, v. 13, n. 10, p. 1169-1183, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/reprint/13/10/1169>>. Acesso: 08 nov. 2007.

MATAMOROS, R.; et al. Concentraciones séricas de triyodotironina, tiroxina y perfil lipídico en bovinos lecheros alimentados con una ración con bajo contenido de selenio. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 40, n. 1, p. 23-29, 2008.

MENEZES, T. J. B. A castanha do Pará na indústria de alimentos. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos**, n. 9, p. 23-30, 1967.

MITCHELL, H. H.; BEADLES, J. R. The nutritive value of the proteins of nuts in comparison with the nutritive value of beef proteins. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 14, n. 6, 1937. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/14/6/597.pdf>>. Acesso: 13 out. 2007.

MIZUBUTI, I. Y. et al. Propriedades químicas e cômputo químico dos aminoácidos da farinha e concentrado protéico de feijão guandu (*cajanus cajan (l.) millsp*). **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 237-248, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances (RDA)**. 10. ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

NAVARRO-ALARCON, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M. C. Essenciality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 249, p. 347-371, apr., 2000.

NUNES, M. T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 6, dez., 2003.

PALMER, I. S.; HERR, A. NELSON, T. Toxicity of selenium in Brazil nuts to rats. **Journal Food Science**, Chicago. Institute of Food Techonologists, Chicago, v. 47, p. 1595-1597, 1982.

PEREIRA, S. **Pesquisas com castanha terão apoio do Ministério**. Embrapa, Ecosistema/Amazônia, Acre, 25 nov. 2004. Disponível em: < http://www.embrapa.gov.br//noticias/banco_de_noticias/2004/julho/bn.2004-11-5.1907245320/mostra_noticia >. Acesso: 20 maio 2007.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health, review. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

REILLY, C. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 114-118, 1998.

RIBEIRO, M. A. A. et al. Shelled Brazil nuts canned under different atmospheres. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 105-107, jul./dez., 1995.

ROTENBERG, B.; IACHAN, A. Estudo da proteína da castanha-do-Pará. **Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia (INT)**, v. 8, n. 7, p. 22-24, 1975.

SECOR, C. L.; LISK, D. J. Variation in the selenium content in individual Brazil nuts. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 9, n. 4, p. 279 – 281, 1989.

SEN, C. K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. **Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 12, p. 660-672, dez. 1997.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p.120-128, 2004.

SPINI, V. B. M. G. et al. Efeito da adição de Castanha-do-Pará à dieta de arroz e feijão sobre o ganho de peso em camundongos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 89-93, 2006.

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, feb. 2008. Disponível em: <http://nutrition.otago.ac.nz/_data/assets/file/0017/3563/DTP_Nuts.pdf>. Acesso: 05 mar. 2008.

TONINI, H. et al. Relação da produção de sementes de castanha do Brasil com características morfométricas da copa e índices de competição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.11, p.1509-1516, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v43n11/09.pdf>>. Acesso: 03 jun. 2009.

UNRINE, J. M. et al. Selenomethionine Biotransformation and Incorporation into Proteins along a Simulated Terrestrial Food. **Chain Environmental Science and Technology**, Washington, v. 41, n. 10, p. 3601-3606, 2007.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nuts Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p. 4705-47014, 2006.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. Lipídios. In: **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

YOSHIZAWA, K. et al. Prospective study of selenium levels in toenails and risk of coronary heart disease in men. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 158, n. 9, p. 852-860, 2003.

CAPITULO II

Effects of Selenium from the Brazil nut defatted cake on Thyroid Hormones of Wistar rats

**(Artigo submetido à publicação na Revista Ciência e Tecnologia de
Alimentos – protocolado com o número: 4217-09)**

RELEVANCE OF WORK

The Brazilian nut (*Bertholletia excelsa*), as well as its residue (the defatted cake), have excellent nutritional characteristics, also being recognized as good source of selenium (Se), which play important functions it plays in animal and human metabolism. Thus, evaluating the effects of selenium from the Brazilian nut defatted cake on the thyroid hormones was undertaken as an alternative of understanding the benefits of Se both in animal and human nutrition.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de uma dieta com diferentes proporções de selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre a concentração dos hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) em ratos wistar. Determinaram-se os hormônios com auxílio de kits de radioimunoensaio e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todos os grupos apresentaram níveis de T4 e T3 dentro do considerado ideal para roedores. No entanto, concluiu-se que o selênio não foi o único fator a influenciar a concentração de T3 encontrada no soro sanguíneo dos animais.

Palavras Chaves: castanha do Brasil, torta, selênio, hormônios tireoidianos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of a diet with different proportions of selenium from the Brazil nut defatted cake on the thyroid hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) in Wistar rats. Hormones were determined by the aid of radioimmunoassay and the collected data was submitted to the analysis of variance

(ANOVA) and Tukey's test ($p \leq 0.05$). All groups showed levels of T4 and T3 considered within the ideal range for rodents. However, it was concluded that selenium was not the only factor influencing the concentration of T3 found in the blood serum of the experimental animals.

Key Words: Brazil Nut, defatted cake, Selenium, Thyroid Hormones

1 Introduction

The thyroid gland is responsible for secreting hormones that exert effects on virtually all systems and organs of the body (NUNES, 2003; AZEREDO, 2004). This gland predominantly secretes the hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3). These two hormones are responsible, respectively, for 90% and 10% of the total output of thyroid. Besides these two, the thyroid produces the so called reverse T3 or rT3 hormone and the three work altogether. The T4 works especially as a pre-hormone, and the monodeiodation of the outer ring of its molecular structure provides 75% of the daily production of T3, which is the main active hormone. Alternatively, the inner ring provides monodeiodation of rT3, which is biologically inactive. The proportion of T4 between T3 and rT3 regulates the availability of the active thyroid hormone.

Besides these three hormones, the thyroid produces calcitonin, which has an effect on the regulation of calcium ion in the body (CANALI; KRUEL, 2001).

In general, the function of the thyroid hormone is to regulate body metabolism and may increase the basal metabolic rate by up to 100% (GUYTON; HALL, 2006). Thus, for the maintenance of normal activity of the target tissue, adequate intracellular levels of T3 must be guaranteed, which depends on thyroid activity and intracellular generation of this hormone, processes that are coupled, respectively, to the integrity of the hypothalamic-

pituitary-thyroid activity and to the specific deiodinase (NUNES, 2003; AZEREDO, 2004; MATAMOROS et al., 2008).

The conversion of T4 into T3, biologically active forms of thyroid hormones, occurs by the action of specific deiodinase enzymes, which have selenium in their structure. The selenium forms the structure of different proteins of the body. In the thyroid gland its concentration is higher than in other tissues (HOWIE et al., 1995); due to the fact that it is constituent of iodotironina 5'-deiodinases (DI; EC 3.8.1.4), types I, II and III. The DI catalyses the deiodination of the pro-hormone 3,5,3',5'-tetraiodothyronine (L-Thyroxin, T4) to its metabolically active form, the 3,5,3'-triiodothyronine (T3) (MATAMOROS et al., 2008). This fact indicates that a deficiency of selenium may also lead to disorders related to thyroid hormones.

The main source of selenium for humans is food, whose concentration may change depending on the content of that element present in the soil (BRATAKOS et al., 1990; REILLY, 1991; KECK; FINLEY, 2006).

The protein concentration is a factor related to the content of selenium in food. Food with protein sources incorporate selenium more efficiently, primarily the ones with a greater concentration of amino acids containing sulfur (methionine and cysteine) leading to the formation of seleno-amino acids (SeAA) (COUTINHO, 2003).

According to a study by FERREIRA et al. (2002), it was observed that the levels of selenium are higher in animal products, especially in fish, than in food of plant origin, whose levels of selenium were frequently less than 5,0 µg/100g of food.

FAIRWEATHER-TAIT (1997) cites among other foods, the Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*), also known as Pará nuts, as one of the main sources of selenium. It is important to highlight the concentrations of selenium found in Brazil nuts. Several authors

such as REILLY (1998), SOUZA; MENEZES (2004), PAREKH et al. (2008), FREITAS et al. (2008) and THOMPSON et al. (2008) found values of Se ranging from 0,03 to 51,2 mg/100g in the kernel of the Brazil nut. BEHR (2004) found values of 17,29 g of selenium $\mu\text{g/g}$ in Brazil nuts or 51,87 μg per nut (average weight of 3 grams), which is the food that contains the highest amount of selenium per gram of the edible portion.

According to SOUZA; MENEZES (2004), the residue generated by the extraction of oil from the nuts, the defatted cake, besides containing on average 25,13% of lipids, 40,23% protein and 3,37% carbohydrates, is also an excellent source of selenium. These authors found that 0,713 mg of Se/100g of the defatted cake, an amount 3,56 times higher than the level found in almonds (0.204 mg/100g) by these same authors. This can be explained by the large amount of almonds with skin used to make the defatted cake and its lower percentage of lipids, suggesting that the skin of the Brazil nuts may possibly contain high concentrations of selenium. Experiments with humans showed that the Brazil nut is an excellent source of Se and is also a food with high bioavailability of Se, for it produces a significant increase in the concentration of Se in body tissues (THOMSON et al., 2008).

Although the values of Se in nut or defatted cake may exceed the value of recommended daily intake for adults (50 to 200 $\mu\text{g/day}$) according to the NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1989), there are no reports that consumption of these foods cause toxic problems to humans, giving that the nut is one of the basic foods for the people who live in the Amazon forest, who consume its most varied forms, both pure and mixed with other foods such as fish, meat, coffee, cassava (FREITAS et. al., 2004; SOUZA; MENEZES 2004).

Considering the issues, the aim of this study was to evaluate the effects of a diet rich in selenium coming from Brazil nut residue on the thyroid hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) in Wistar rats.

2 Materials and Methods

The Brazil nuts were provided by the company 'Juta e Castanha', located in São Paulo, São Paulo.

2.1 Characterization of the protein sources to be added to the rat diets

Two protein sources were used: casein, a standard protein generally used in animal feed and the Brazil nut defatted cake in different proportions, as partial replacer of the casein in the experimental diets. The protein sources were characterized by their centesimal composition and the amount of selenium present in the nut residue was determined.

2.1.1 Production of the Brazil nut defatted cake

The defatted cake was obtained by first grinding the Brazil nut. The ground nuts were placed in the Scott Tech® SMR 600-E oven and heated to approximately 60 C° for half an hour. Then the oil was extracted using the Scott Tech® ERT-60-II oil extractor from approximately 5 kg of nuts at a time.

2.1.2 Analyzing the centesimal composition

The determination of the centesimal composition was performed in both protein sources to be used (casein and defatted cake) and in the prepared diets to be offered to the animals. The moisture, protein and ash determination were performed according to the method described in the ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC, 1995). The content of lipids was determined by Soxhlet, according to the method

of the INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). The carbohydrates were obtained by difference of summing all other constituents.

2.1.3 Determination of selenium content

This analysis was performed by the Biominerals laboratory, located in the city of Campinas, São Paulo. Atomic Emission Spectrometry by Inductively Coupled plasma (IRIS - AP - Thermo Jarrell Ash) was used. The sample was digested in nitric acid in closed and pressurized bottle and heated in microwave. The result is expressed in milligrams per kilogram (mg/Kg).

2.2 Biological tests

The experimental and testing conditions were approved by the Ethics Committee of Animal Experiments, Institute of Biology, University of Campinas, number 1679-1, on November 1, 2008.

2.2.1 Experimental conditions of biological tests

The biological tests were performed at the Laboratory of Biological Testing, Department of Foods and Nutrition, School of Food Engineering, UNICAMP. The animals were accommodated stainless steel cages, the 24°C and cycles of 12 hours day: night with allowing free access to food and water.

2.2.2 Experimental protocol

Sixty four male rats Wistar strain SPF (21 days, 55 ± 5 g) were used. The animal were furnished by the Center of Multidisciplinary Investigation in Biology (CEMIB) of UNICAMP and distributed randomly in 8 experimental groups, which were fed modified AIN 93 G diets, according to specifications of REEVES et al. (1993) with different protein

sources. All diets were prepared to contain approximately 12% protein, according to GOENA et al. (1989).

GROUP 1: (Standard diet) AIN 93G diet (protein source: casein, mineral mix AIN 93); **GROUP 2:** (Control diet) AIN 93G diet (protein source: casein, mineral mix AIN 93 without selenium); **GROUP 3:** AIN 93 Diet (protein sources: 65% casein/35% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93 without selenium); **GROUP 4:** AIN 93G diet (protein sources: 65% casein/35% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93); **GROUP 5:** AIN 93 Diet (protein sources: 75% casein/25% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93 without selenium); **GROUP 6:** AIN 93G diet (protein sources: 75% casein/25% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN-93); **GROUP 7:** AIN 93 Diet (protein sources: 87,5% casein/12,5% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN 93 without selenium); **GROUP 8:** AIN 93G diet (protein sources: 87,5% casein/12,5% Brazil nut defatted cake, mineral mix AIN-93).

The experiment lasted approximately 35 days, and 7 days were used to divide animals into groups and adapt them to new food. At the end of the experimental period, the animals were killed by decapitation and their blood was collected for subsequent analysis as specification bellow.

2.2.3 Biochemical analysis of samples obtained from the biological test

2.2.3.1 Collection of blood from the experimental animals

For the analysis of the thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) total, Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST), blood was collected at the death of the animal in a flask without EDTA and kept at room temperature for subsequent separation of the serum in centrifuge for 25 minutes at 2500 rpm.

2.2.4 Determination of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) on prepared blood serum

Given that diets with excess amounts of nutrients may cause possible liver and renal disorders, ALT and AST were determined to check the normal function of liver and kidney.

The enzyme Aspartate Aminotransferase (AST) was determined with the aid of a kit from a specific manufacturer, Laborlab S/A, products for laboratory (Guarulhos, SP), Kit-AST (GOT) with reading obtained by the kinetic method - UV (00300). The Alanine Aminotransferase (ALT) was determined by using the kit that comes from a specific manufacturer, Laborlab S/A, products for laboratory (Guarulhos, SP), Kit-ALT (GPT) making up the reading by the kinetic method - UV (002200).

2.2.5 Determination total triiodothyronine hormone (T3) and total thyroxine (T4)

The total T4 and T3 were determined using the kit Coat-a-Count from DPC-SIEMENS, which is a solid-phase radioimmunoassay labelled with ^{125}I called for the quantitative determination of total circulating thyroxine (T4 total Coat-A-Count) and triiodothyronine total (T3 total Coat-A-Count) in serum or plasma.

For concentration of T4 and T3 present in serum samples were used for calibration curves (standard) for each hormone.

2.3 Statistical analysis

Collected data was submitted to the analysis of variance (ANOVA). Tukey test (T-Test of minimal statistical difference) was used to compare the means of treatment ($p \leq 0.05$). The software SAS INSTITUTE (1999) was used.

3 Results and Discussion

3.1 Results

3.1.1 Centesimal composition of the diet and the Brazil nut defatted cake

Table 1 show the results of the analysis of centesimal composition of the casein, defatted cakes and the diets offered to animals.

Table 1. Average values of Centesimal Composition for Casein, Defatted Cake, obtained after grinding the Brazil nut, and Diets, expressed in g/100g.

Samples	Humidity	Ash	Protein (%N x 5,46)	Lipids	Carbohydrates
Casein	9,97 ± 0,20	3,14 ± 0,13	77,80 ± 0,58	0,29 ± 0,07	8,80
Defatted cake	3,84 ± 0,06	14,26 ± 0,13	27,79 ± 1,07	32,90 ± 0,35	21,21
Diet 1	10,24 ^{b,a} ± 0,49	2,5 ^{f,e} ± 0,10	12,75 ^{b,c} ± 0,21	7,17 ^{d,e} ± 0,18	67,34
Diet 2	9,99 ^{b,a} ± 0,93	2,34 ^f ± 0,03	11,59 ^d ± 0,39	7,38 ^{d,e} ± 0,08	68,70
Diet 3	10,84 ^{b,a} ± 0,93	2,91 ^{b,a} ± 0,09	12,35 ^{b,c,d} ± 0,29	7,05 ^e ± 0,34	66,85
Diet 4	9,37 ^b ± 0,35	3,09 ^a ± 0,07	12,94 ^{b,c,d} ± 0,29	7,25 ^{d,e} ± 0,11	67,35
Diet 5	9,35 ^b ± 0,02	3,01 ^{b,a} ± 0,12	11,85 ^{c,d} ± 0,04	8,07 ^{b,c} ± 0,02	67,72
Diet 6	10,46 ^{b,a} ± 0,12	2,84 ^{b,c} ± 0,03	12,96 ^b ± 0,27	8,58 ^a ± 0,09	65,16
Diet 7	11,24 ^a ± 0,05	2,55 ^{d,e} ± 0,01	14,04 ^{b,a} ± 0,79	7,59 ^{d,c} ± 0,23	64,58
Diet 8	11,38 ^a ± 0,25	2,70 ^{d,c} ± 0,01	14,12 ^a ± 0,19	8,36 ^{b,a} ± 0,10	63,44

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

As expected, all percentage protein diets was around 12%, except for diets 7 and 8.

The lipid content of the diets ranged between 7,05 and 8,58%.

The variation in protein concentration in the diets 7 and 8 may be justified by differences in way weigh the ingredients, since the diets were prepared in the laboratory,

the ingredients of the same heavy hand in an analytical balance and mixed in the same way for the homogenization of same. Other factors that may have contributed to this difference are possible variations in the analysis of chemical composition (protein, lipid, ash and moisture) of the diets.

3.1.2 Content of selenium in Brazil nut defatted cake

The content of selenium found in Brazil nut defatted cake was 35 mg/kg, a result well above the levels of selenium found in to the literature mentioned above (SOUZA; MENEZES, 2004; FREITAS et al., 2008; THOMPSON et al., 2008).

3.1.3 Total Consumption

Figure 1 shows the average total consumption of diet (g) by the animals of standard groups (G1), control (G2) and experimental (G3, G4, G5, G6, G7 and G8). And Figure 2 represents the average total consumption of selenium in these animals at the end of 28 days of experimentation.

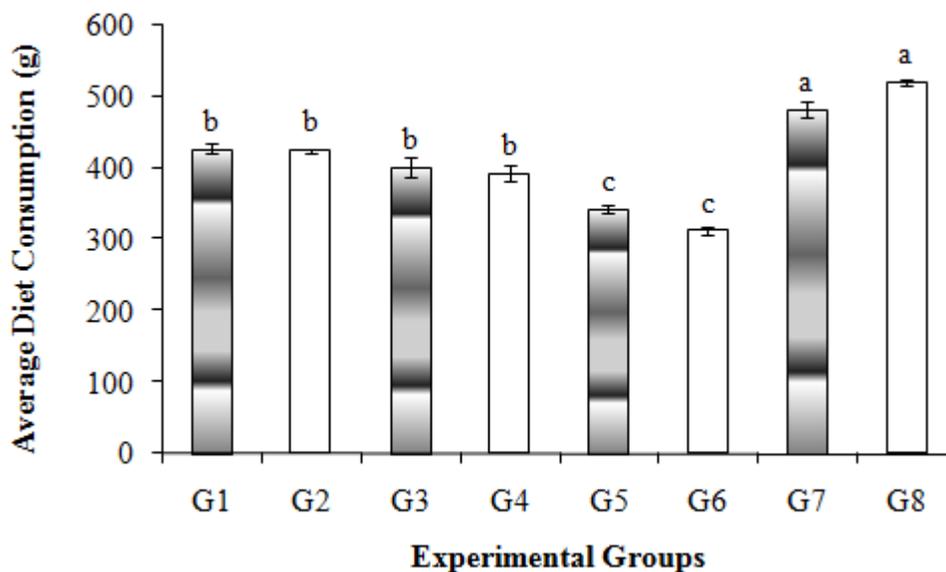


Figure 1. Total average consumption of diet (g) by experimental animals (n = 8)

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

Analyzing the data of Figure 1, it is observed that the groups that received diets with a lower proportion of the Brazil nut defatted cake had a larger intake amount of diet (G7 and G8); however, the groups that received higher concentrations of nut defatted cake in the diet were those whose diet was eaten in smaller amounts (G3, G4, G5 and G6).

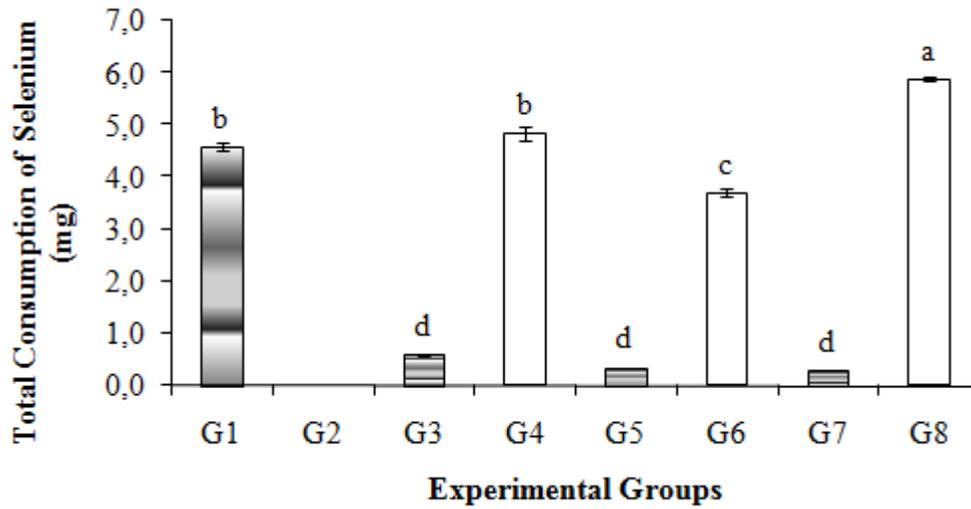


Figure 2. Average total consumption of selenium by the experimental animals (n = 8)

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

In Figure 2, it is observed that the animals of the groups that received the Brazil- nut residue as the only source of selenium consumed smaller quantities of selenium in relation to the standard group, and to the experimental groups that received either the selenium as defatted cake or as the AIN 93G mineral mix.

3.1.4 Concentration of aspartate aminotransferase in the animal's blood serum

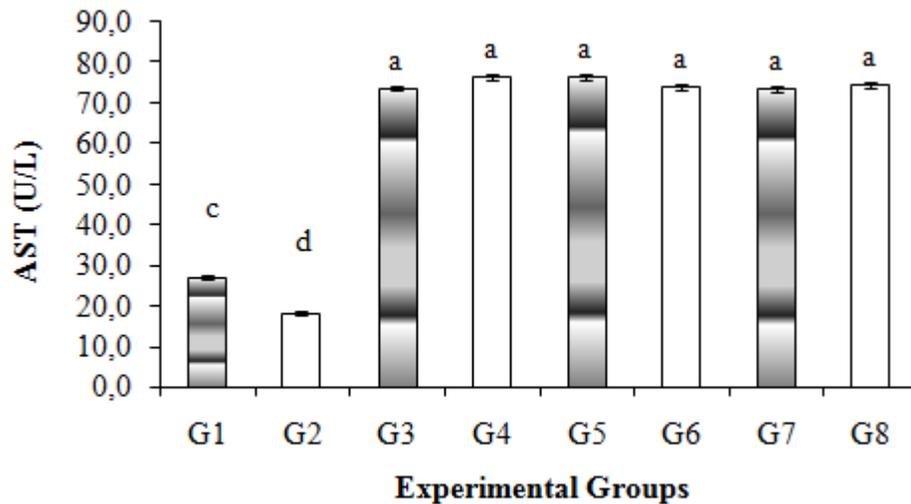


Figure 3. Average concentration of AST (U/L) in the blood serum of experimental animals (n = 6)

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

Figure 3 shows that for average concentration of AST in the blood serum of the animals, all the experimental groups showed higher levels of AST when compared with the standard and control groups. The standard and control groups showed results that differed statistically. But the results for the experimental groups showed no statistical difference.

3.1.5 Concentration of alanine aminotransferase in the animal's blood serum

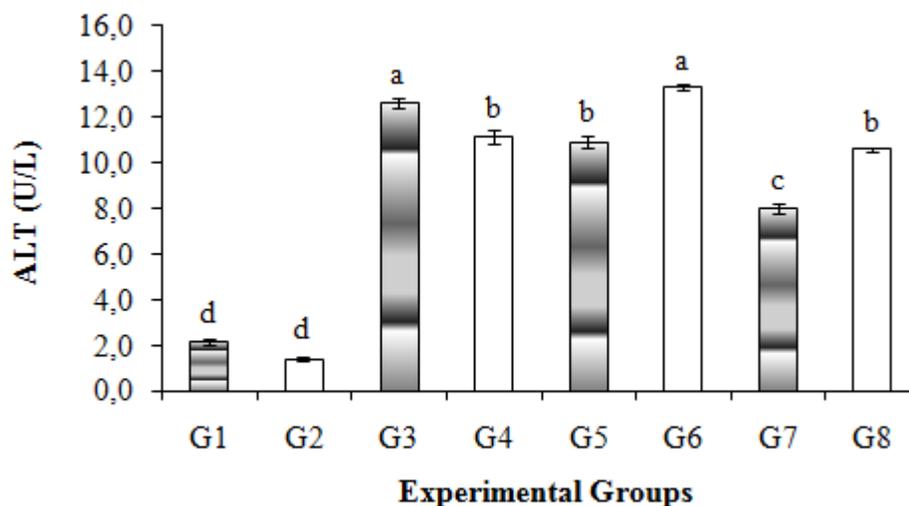


Figure 4. Average concentration of ALT (U/L) in the blood serum of the experimental animals (n = 6)

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

In Figure 4, it appears that for the levels of ALT found in the blood serum of the animals, the standard and control groups did not differ statistically among themselves. The experimental groups that received different proportions of the nut defatted cake in their diet had levels of ALT greater than the standard and control groups mentioned above.

3.1.6 Thyroxine (T4)

Figure 5 shows the concentrations of total thyroxine (T4) in the blood from the animals after the experimental period.

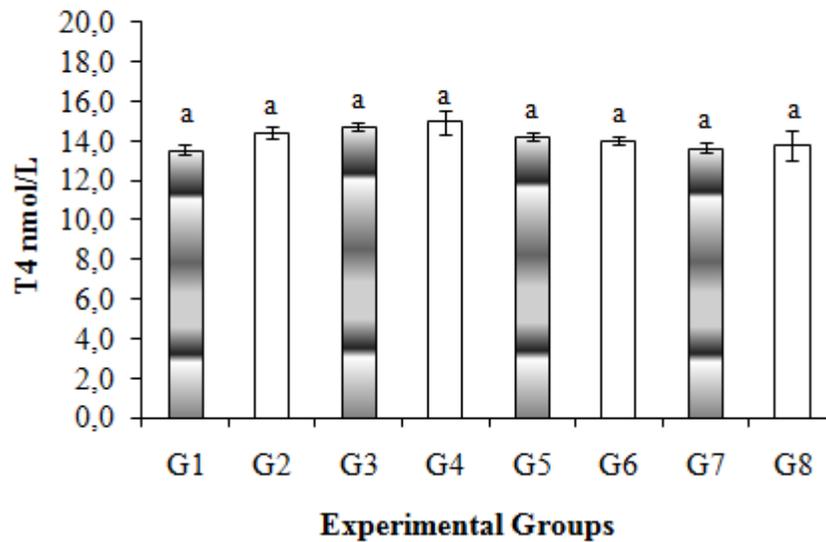


Figure 5. Average concentration of total thyroxine (T4) in the blood serum of experimental animals (n = 6).

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

Analyzing the data above, it is possible to verify that the groups did not differ statistically with respect to concentrations of thyroxine (T4), showing similar concentrations ranging from 13,57 to 14,94 nmol/L (Figure 3).

3.1.7 Triiodothyronine (T3)

Figure 6 shows the concentration of the total hormone triiodothyronine (T3) in the blood of animals after the experimental period.

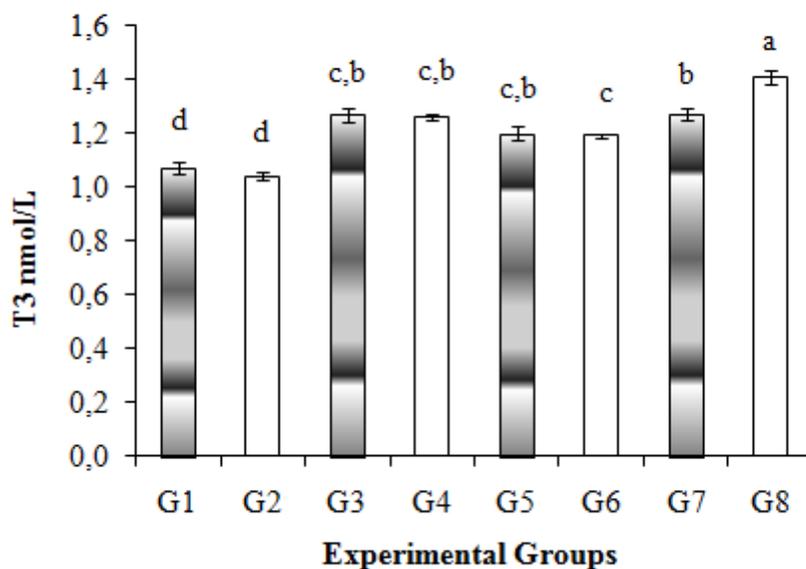


Figure 6. Average concentration of total triiodothyronine (T3) in the blood serum of animals (n = 6).

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) to Tukey test.

Diet 1 Experimental standard group AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control group AIN mineral mix without selenium, Diet 3 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 4 experimental group 35% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium, Diet 5 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 6 experimental group 25% Brazil nut defatted cake mineral mix selenium, Diet 7 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% Brazil nut defatted cake mineral mix with selenium.

Regarding the statistical analysis, it can be observed that the standard and control groups did not differ statistically among themselves. However, they differed from other groups, with the lower concentration of triiodothyronine in blood serum (1,07 and 1,04 nmol/L, respectively). The experimental groups G3, G5 and G7, even having consumed

smaller quantities of selenium in relation to groups G4, G6 and G8 did not show lower levels of T3 to these.

3.2 Discussion

Considering that the diets used in this experiment exceeded the recommendations for daily intake of selenium in rodents (500µg/kg diet), according to the NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995), ALT and AST were determined to check the normal functions of the liver and kidney of animals under experimentation.

The average values of AST (n=6) found for the experimental groups, between 73,60 and 76,49 U/L (Figure 3), show that these animals did not suffer any type of kidney or liver damage, because the concentration of AST in the experimental groups was found within the parameters cited in the literature, ranging from 41,4 to 99U/L, according to FOX et al. (2002).

Regarding the values found for ALT (n=6), between 8,00 and 13,30 U/L (Figure 4), experimental groups that received different proportions of the nut defatted cake in their diet had ALT levels that differed statistically from the standard and control groups. These values are in accordance to the ones reported in the literature. According to THRALL (2006), concentrations of blood ALT may vary from 26 to 37U/L. Yet according to FOX et al. (2002), these concentrations vary from 41,4 to 99U/L.

The AST enzyme is available in large quantities in the myocardium, liver, skeletal muscle, brain and kidneys, so when injuries occur with cellular destruction, a considerable increase of this enzyme takes place in the blood. While 80% of AST is present in the mitochondria, the ALT is found mainly in the cytoplasm of the hepatocyte (LIMA et al., 2001, GELLA, 1994). This difference has aided in the diagnosis and prognosis of liver

disease, because in slightly damaged liver cells a most common form in serum is the cytoplasmic form, while in serious injury the mitochondrial enzyme is released improving the relationship between AST/ALT.

Another factor associated with elevation of the AST/ALT ratio is that in serious injuries the values of ALT may decline more rapidly as they were first launched into blood circulation, therefore the values of AST remained high much longer, which ends up increasing the ratio (DANTAS et al., 2006).

Thus, low levels of ALT found could indicate the existence of some type of damage in the liver and/or kidney of the animals, as mentioned above. However, we can not say that diets with different proportions of nuts offered to the animals have caused liver damage. Moreover, the fact that the concentrations of AST in the experimental groups are found within the metabolic parameters mentioned in the literature indicates that, possibly, the experimental animals did not suffer any liver or kidney damage.

Regarding the concentration of thyroid hormones, the results of this experiment show that all groups presented levels of T4 and T3 considered in the ideal range for rodents. The groups, even the standard and control, showed levels of T4 within the ideal range since according to THRALL (2006) and FOX et al (2002), the ideal blood concentrations of the hormone T4 for rodents ranges from 8,61 to 20,09 nmol/L. As for T4, all groups, both the standard and control, as well as the experimental groups (G3, G4, G5, G6, G7 and G8), showed levels of triiodothyronine considered ideal (1,04 to 1,41 nmol/L), since according to the authors cited above, the blood concentrations of T3 for rodents ranged from 0.4608 to 1,536 nmol/L of blood.

The plasma concentrations of T4 did not present a statistical difference among the experimental groups. Contrary to what was observed in this study, other studies involving

consumption of selenium and thyroid hormones have observed a significant decrease of T4, an effect attributed to higher deiodation of the hormone, but no significant changes in the concentration of T3 (WICHTEL et al., 1996). However, the present experiment, the groups that were fed diets containing Brazil nut defatted cake, showed higher levels of T3 than those fed in the standard and control groups, which have not had the nut as a component/ingredient of the diet. Group G8 was the group showing the highest concentration of T3 (1,41 nmol/L), being the group that consumed the highest amount of selenium and diet in relation to the others (Figure 1 and 2).

Taking into account that the standard group (G1) showed lower T3 concentration than groups G3, G4, G5, G6, G7 and G8, but similar to the concentration of group control (G2), and from the fact that the experimental groups G3, G5 and G7 did not present T3 concentrations lower than the above, it may be concluded that selenium was not the only factor influencing the concentration of T3 found in the blood serum of the animals.

According to several authors, the biosynthetic pathway of thyroid hormones may also be affected by other factors such as the content of iodine in the diet, protein, fat, other hormones, the physiological status of the animal, among others, not only for the content of selenium in diet (EDER; STANGL, 2000, CONTRERAS et al., 2002, MATAMOROS et al., 2008). Therefore, the concentration of TH depends on multiple factors and not only of the selenium consumption. Therefore, it is also explained the fact that the concentrations of T3 in the groups standard and control were statistically similar.

Considering the results shown in this investigation, it can be said that the Brazil nut defatted cake generally contributes in a positive way to the levels of thyroid hormones, particularly in relation to the concentrations of T3 found in the blood serum of the experimental animals. However, it is not possible to only highlight the selenium in Brazil

nut residue as responsible for increasing the level of T3 in the blood or blood serum. To make this statement acceptable, further studies are needed, for example, to study directly the behavior/activity of the DI type linked against the consumption of defatted cake.

It is therefore concluded that all the nutritional characteristics conferred to the Brazil nut defatted cake, such as protein and lipid content, may have influenced the metabolism of thyroid hormones.

4 Conclusion

The results of this study show that the Brazil nut defatted cake has positively influenced the metabolism of thyroid hormones, particularly with respect to the triiodothyronine hormone (T3). However, more targeted studies are needed to understand more effectively the role of selenium coming from the Brazil nut defatted cake to the hormonal cycle in question.

5 References

1. AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 16. ed., v. 1, edited by Patricia Cunniff. Virginia: AOAC International, 1995.
2. AZEREDO, D. M. **Transtornos relacionados aos Hormônios da Tireóide**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no primeiro semestre de 2004. p. 1-16. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/transtornos_tireoide.pdf>. Acesso: 06 de ago. de 2008.
3. BEHR, C. S. **Efeito de uma dieta enriquecida com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, L.) no estado nutricional relativo ao selênio de idosos não institucionalizados**.

2004. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

4. BRATAKOS, M. S. et al. The nutritional selenium status of healthy greeks. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 91, p.161-176, feb. 1990.

5. CANALI, E. S.; KRUEL, L. F. M. Respostas Hormonais ao Exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 141-153, jul./dez. 2001.

6. CONTRERAS, P.A. et al. Effect of a selenium-Deficient diet on blood values of T3 and T4 in cows. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 65-70, apr. 2002.

7. COUTINHO, V. F. **Efeitos da suplementação com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao selênio**. 2003. 176 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

8. DANTAS, J. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos. **Acta Scientiarum Health Science**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 165-170, dez. 2006. Disponível em:<<http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaciHealthSci/article/view/1099/550>>. Acesso: 28 mar. 2009.

9. EDER, K., STANGL, G. I. Plasma Thyroxine and Cholesterol Concentrations of Miniature Pigs are influenced by Thermally Oxidized Dietary Lipids. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 6, p. 116–121, 2000. Disponível em:<jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/130/1/116>. Acesso: 8 ago. 2008.

10. EDER, K., E. et. al. Thermally oxidized dietary fats increase plasma thyroxine concentrations in rats irrespective of the vitamin E and selenium supply. **The Journal of nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 6, p. 1275-1281, 2002. Disponível em:<<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/132/6/1275>>. Acesso: 28 jan. 2009.

11. FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of selenium. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, n. 51, p. 20-23, jan., 1997. Supplement 1.
12. FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, Washington, DC, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rpsp/v11n3/9395.pdf>>. Acesso: 12 mar. 2008
13. FOX et al. **Laboratory Animal Medicine (American College of Laboratory Animal medicine)**. 2. ed. USA: Academic Press, 2002. 1325 p.
14. FREITAS, S. C. et al. Selênio em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Comunicado Técnico**, n. 71, ISSN 01035231, Rio de Janeiro, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/ct71-004.pdf>>. Acesso: 20 maio 2007.
15. FREITAS, S. C. et al. Meta-análise do teor de selênio em castanha do Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 54-62, jan./mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/>>. Acesso: 03 fev. 2009.
16. GELLA, J. **Enzimologia clinica**. In: Sastre, F.G. Bioquímica clinica. Barcelona: 1994, p. 113-124.
17. GOENA, M. et al.. Effect of the raw legume Vicia ervilha on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiologia**, Pamplona, v.45, n.1, p.55-60, apr. 1989.
18. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1264 p.
19. HOWIE A. F. et al. Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: A potential regulator of thyroid-hormone synthesis. **Biochemistry Journal**, v. 308 (Pt 3), p. 713-717,

jun. 1995. Disponível em: <

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1136783&blobtype=pdf>>. Acesso: 15 mar. 2009.

20. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. I 47N. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ª ed. v.1. São Paulo: O Instituto, 1985.

21. KECK, A. S.; FINLEY, J. W. Database values do not reflect selenium contents of grain, cereals, and other foods grown or purchased in the upper Midwest of the United States. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.26, n.1, p. 17-22, jan. 2006.

22. LIMA, A. O. et al. **Métodos de laboratório aplicados a clínica**. 8ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 664 p.

23. MALLMANN, G. M. **Métodos de dosagem de hormônios**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do tecido Animal (VET 00036) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2003, p. 15. Disponível em: <www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/hormonios.pdf>. Acesso: 04 maio 2009.

24. MATAMOROS, R.; et al. Concentraciones séricas de triyodotironina, tiroxina y perfil lipídico en bovinos lecheros alimentados con una ración con bajo contenido de selenio. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 40, n. 1, p. 23-29, 2008.

25. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances (RDA)**. 10. ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

26. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**. 4 th rev. edn. Washington, DC: National Academy Press, 1995, p. 80-102.

27. NUNES, M. T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 6, dez., 2003.

28. PAREKH, P.P. et al. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 332-335, june. 2008.
29. REEVES, P.G. et al. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/123/11/1939>>. Acesso: 30 jul. 2007.
30. REGHELIN, A. L. S. **Diagnóstico de Enfermidades Endócrinas**. Monografia apresentada para conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná (Curitiba). 2007, p. 36. Disponível em: <www.ccmv.ufpr.br/monografia/Relatorios%20Estagios%202007/.../Angela%20Louise%20Suhr%20Reghelin%202007.pdf>. Acesso: 04 maio 2009.
31. REILLY, C. **Metal contamination of food**. 2. ed. London: Elsevier, 1991. 284 p.
32. REILLY, C. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 114-118, 1998.
33. SAS Institute. **SAS user's guide: statistics** (software). Version 8.0. Cary: SAS, 1999.
34. SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 120-128, jan./mar. 2004.
35. 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, feb. 2008. Disponível em: <http://nutrition.otago.ac.nz/__data/assets/file/0017/3563/DTP_Nuts.pdf>. Acesso: 05 mar. 2008.
36. THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Rocca, 2006, 582p.

37. WICHTEL, J. J. et al. Effects of selenium and iodine supplementation on growth rate and on thyroid and somatotropic function in dairy calves at pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 10, p.1865-1872, 1996. Disponível em: <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/79/10/1865>>. Acesso: 28 jan. 2009.

Acknowledgments

To the Department of Food and Nutrition for financial assistance to the project, to Laboratory of Hormonal Dosages, Department of Animal Reproduction (VRA), Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnia / USP by partnership and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarship.

CAPITULO III

**Effects of selenium from the Brazil nut residue on
the concentration of reduced glutathione (GSH)
in Wistar rat blood serum**

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre a concentração sanguínea de glutathiona reduzida (GSH) em ratos Wistar.

Determinou-se a concentração sanguínea de GSH segundo metodologia de Beutler et al. (1986) e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os grupos apresentaram concentrações sanguíneas de GSH que variaram de 88,49 a 94,70 mg/dl, não diferindo estatisticamente. No entanto, analisando os resultados obtidos para os grupos padrão, controle e para os grupos experimentais, concluiu-se que o selênio não foi o único fator a influenciar a concentração GSH sanguínea dos animais.

Palavras Chaves: castanha do Brasil, torta, selênio, glutathiona reduzida.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of selenium of the residual defatted cake from Brazil nut on the blood concentration of reduced glutathione (GSH) in rats.

The blood concentration of GSH according to method of Beutler et al. (1986) was determined and results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p \leq 0.05$). The groups had blood concentrations of GSH ranging from 88.49 to 94.70 mg/dl, and were not statistically different. However, analyzing the results for the standard groups, control and experimental groups, it was concluded that selenium was not the only factor influencing the concentration of blood GSH animals.

Key Words: Brazil nut, cake, selenium, reduced glutathione.

1 Introduction

The glutathione is a tripeptide L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine which is present in most cells. The reduced form of glutathione (GSH) maintains stable thiol protein groups, reduces disulfide linkage induced by oxidative stress, neutralizes free radicals, and presents other functions. Therefore, the concentration of intracellular GSH is an indicator of the capacity of the cell to maintain its homeostasis through the neutralization of oxidizing agents (SCHOTT et al, 2007). This capacity is determined by the -SH group present in cysteine. Thus, the GSH can be considered one of the most important reagents of the antioxidant cell defense system that are found in most mammals and in many prokaryotic cells (FERRERIRA; MATUSBARA, 1997; ANDERSON, 1998).

Glutathione is also essential in maintaining the intracellular redox balance and the sulphhydryl group of proteins (HWANG; SINSKEY; LODISH, 1992). The balance of disulfur connection with the cell is known as a regulator of various metabolic processes also related to the functions of glutathione, and enzyme activity and transport activity of amino acids (DELEVE; KAPLOWITZ, 1991; KAPLOWITIZ et. al, 1996; GREENE; HUTTER; TILL, 1997).

For cellular defense against oxidative stress, it is important to balance the concentrations of reduced glutathione (GSH) and the disulfuride form of glutathione (GSH:GSSG). There are two main mechanisms involved in maintaining the ideal levels of GSH concentration: the reduction of GSSG to GSH reduced active form via selenium-dependent enzyme, glutathione peroxidase, and the reduced GSH synthesis using γ -glutamylcystein-synthase and glutathione synthetase (SEN, 1997; ANDERSON, 1998; GRIFFITH, 1999; LU, 1999).

One of the main functions of GSH in erythrocytes is the reductive elimination of the hydrogen peroxide and organic hydroperoxides, which are reactive oxygen metabolites that can irreversibly damage the hemoglobin and cleave in some of the carbon-carbon phospholipids links present in cell membranes, thus acting against disturbances caused by free radicals and lipid peroxidation (HARDY; HARDY; 2004; VOET; VOET; PRATT, 2000). Free radicals are formed during normal and pathological biological processes, and may cause damage to cells and tissues and are related to various diseases including cancer, liver disease, atherosclerosis and aging.

As described by Junior et al. (2001), glutathione peroxidase (a selenium-dependent enzyme), uses the glutathione (GSH) as reducing agent in the cycle of interconversion of glutathione in its reduced form (GSH) and oxidized (GSSG).

Several studies, such as that of Angstwurm; Gaertner (2006) and Thomson et al. (2008) showed that variations in the concentration of selenium may directly influence the activity of the enzyme GSH Px, interfering with the cycle illustrated above.

Selenium is an essential mineral for the organism and its best known function are associated to the antioxidant system. However, its mechanism of action is unclear and is still an object to study. It is believed that its action occurs via the reductive covalent binding to proteins, forming selenoproteins such as peroxidase and glutathione reductase, thioredoxin, which have similar antioxidant properties (PONTUAL, 2007).

Thus, selenium assumes the role of an important reduction center, mainly in the neutralization of free radicals. Therefore, it offers protection against cardiovascular diseases, cellular protection in relation to cancer and enhancement of the immune system by maintaining the integrity of immuno-competent cells (DELILBASI; DEMIRALP, 2002, RAFFERTY et al., 2003).

The main source of selenium for humans is food. The mineral is found in different concentrations in different types of soil, which directly influences the concentration of Se in food (BRATAKOS et al., 1990; REILLY, 1991; KECK; FINLEY, 2006).

The presence or combination of some factors can influence the bioavailability of this mineral, such as the concentration of protein in the diet, especially methionine; the concentration of vitamin E; the high content of vitamin A; the presence of inhibitors such as heavy metals (cadmium, mercury and sulfur); selenium concentration and chemical form in the diet. Other factors such as the interactions caused by ingestion of these compounds in the diet, as the content of phytates, total pectin and fiber, may reduce the bioavailability of selenium (COUTINHO, 2003).

Fairweather-Tait (1997) cites meat, especially innards and fish, cereals, eggs, garlic, mushrooms and Brazil nuts as sources of selenium.

It is important to highlight the wide range of concentrations of selenium found in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). Several authors, Reilly (1998); Chunhieng et al. (2004); Souza; Menezes (2004), Dumont et al (2006) and Thomson et al. (2008), found values of Se ranging from 0,03 to 51,2 mg/100g in the kernel of Brazil nut, which indicates that this food is a rich source of the mineral.

According to Souza; Menezes (2004), the residue derived from the production and commercialization of Brazil nuts, the defatted cake, and containing on average 25,13% fat, 40,23% protein and 3,37% carbohydrates is also an excellent source of selenium. These authors found 0,713 mg Se/100g of defatted cake, a quantity 3,56 times higher than the level found in the nut kernel (0,204 mg/100g) by these same authors. This can be explained by the large quantity of nuts (almonds) with a skin that is usually used to obtain the defatted

cake and its lowest lipid percentage suggests that the skin of almonds may possibly contain high concentrations of selenium.

Experiments with humans showed that Brazil nut is an excellent source of Se and has high bioavailability of the mineral (THOMSON et al., 2008).

Although the values of Se in the almond/pie can exceed the value of recommended daily intake for adults (50 to 200 µg/day) according to the National Research Council (1989), there are no reports of toxicity problems to humans, so the nut is one of the basic food of the people who inhabit the Amazon forest, which consume the most varied forms, both pure and mixed with other foods such as fish, meats, coffee, cassava (FREITAS et. al., 2004; SOUZA; MENEZES 2004).

Considering the issues related to Brazil nut represents as a food that has high protein value and high levels of Se, a diet that includes these nuts or Brazil nut residue could influence the blood concentration of reduced glutathione.

The aim of this study was to evaluate the effects of selenium of the defatted cake from Brazil nut in the blood concentration of reduced glutathione (GSH) in rat blood serum.

2 Materials and Methods

For this research, Brazil nuts were provided by Jute and Castanha located in São Paulo, SP, Brazil.

2.1 Obtaining Brazil nut residue

The residue of Brazil nut was obtained by pressing. First, the nuts are placed in the SMR 600-E Scott Tech® kitchen and heated to approximately 60°C for 30 min. Then the oil was extracted using the ERT-60-II, Scott Tech® extractor by grinding.

2.2 Brazil nut residue and casein aminogram

The analysis of amino acids present in casein, Brazil nut residue and diets consumed by animals in this experiment were done using a methods adapted from White; Hart; Fry (1986) and Hagen; Frost; Augustin (1989), as described below.

The protein of casein, defatted cake and diets animals were hydrolyzed with hydrochloric acid 6 mol/L for 24 hours. The amino acids released during acid hydrolysis were reacted with phenylisotylcyanate (PITC), separated by quantified reverse-phase HPLC at 254 nm (UV). Quantification was performed by multilevel internal calibration with the aid of acid α -aminobutyric (AAAB) as internal standard.

Samples preparation by the process of quartering (homogenization, division, separation of the two symmetrical parts and sample reduction). Samples were crushed using an analytical mill coupled to a cooling bath. After that, to determination of aminoacids, the samples were weighed, and transferred to a hydrolysis tube. After that, the samples remained for 24 hours at 110°C in hydrochloric acid (HCl) 6N, with phenol. After 24 hours, they returned to room temperature, and were introduced to the standard samples (AAAB + 0.01 M HCl). Subsequently, the samples were homogenized and the volume adjusted in volumetric flask using ultrapure water. The resulting solution was filtered through a Millipore filter 0.45 of Millex μ m and then measured up 1,0 μ L of the filtered samples by transferring them to a glass tube of 6 x 50 mm, in order to carry out derivatization (PITC). After these procedures, the samples were dried twice in the vacuum station, with a re-drying solution (solution of sodium acetate 0,2N, methanol 99,7 - 100%, triethylamine to 99 to 100%). The dried samples were derivatized in ultrasound for 5 minutes, and then injected. The amino acids (Aspartate, Glutamic Acid, Serine, Glycine,

Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Methionine, Cysteine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine and Lysine) were quantified in liquid chromatograph equipped with a previously conditioned column Luna C18 100 Å 5u, 250x4.6mm 00G-4252-EQ (PHENOMENEX - USA Torrance, CA.) injection valve Rheodyne Oven THERMASPHERE TS-130 HPLC (PHENOMENEX- USA Torrance, CA), UV detection module SPECTRA SYSTEM UV 2000 (Thermo Separation Products) using UV detection at 254 nm.

2.3 Biological tests

The experimental conditions and biological assessment were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Campinas. Protocol number 1679-1 as of November 1st, 2008.

2.3.1 Experimental conditions of biological tests

The biological tests were performed at the Laboratory of Biological Trials, Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, UNICAMP. The animals were placed in individual stainless steel cages, the 24°C with a cycle of 12 hours day: night with free access to food and water.

2.3.2 Experimental protocol

Sixty-four male rats of Wistar strain SPF were used, recently weaned (21 days, 55 ± 5g) from the Center of Multidisciplinary Investigation in Biology (CEMIB) of UNICAMP and distributed into 8 experimental groups, which received AIN 93 G diet (Reeves et al., 1993) prepared from different protein sources. All diets were made to contain 12% protein (Goena et al., 1989). The descriptions of the experimental groups are shown below:

GROUP 1 (Standard): AIN 93G diet (protein source: casein, with mineral-mix as described in Reeves et al, 1993), **GROUP 2 (Control):** AIN 93G diet (protein source:

casein; with mineral-mix AIN-93G prepared excluding Se), **GROUP 3:** AIN 93 diet (protein sources: 65% of casein /35% of Brazil nut defatted cake; with mineral-mix AIN 93G prepared excluding Se), **GROUP 4:** AIN 93G diet (protein sources: 65% of casein/35% of Brazil nut defatted cake; with mineral-mix AIN 93G), **GROUP 5:** AIN 93G diet (protein sources: 75% of casein /25% of Brazil nut defatted cake; with mineral-mix AIN 93G prepared excluding Se), **GROUP 6:** AIN 93G diet (protein sources: 75% of casein/25% of Brazil nut defatted cake; with mineral-mix AIN 93G), **GROUP 7:** AIN 93G diet (protein sources: 87,5% casein/12,5% of Brazil nut defatted cake, with mineral-mix AIN 93G prepared excluding Se), **GROUP 8:** AIN 93G diet (protein sources: 87,5% casein/12,5% of Brazil nut defatted cake, with mineral-mix AIN 93G).

All diets used were isocaloric. The experiment lasted 35 days, 7 of which were used to divide animals into groups and adapt them to new food.

2.4 Analysis of samples from biochemical assay

2.4.1 Blood collection

For the biochemical analysis of reduced glutathione, the animals' blood was collected by retro-ocular puncture, two days before their deaths, using recipients with EDTA kept in ice so that the blood would not clot.

2.4.2 Determination of glutathione in the rat blood

Samples of blood (collected in tubes with EDTA) were hemolyzed with cold water, precipitated with metaphosphoric acid, homogenized and filtered. Then, sodium phosphate was added, the first reading was held in spectrophotometer at 412 nm. Later, DTNB acid was added (5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) to the samples and a second reading was performed as mentioned above, the above procedure was Beutler (1986).

3 Statistics

The data were submitted to analysis of variance (ANOVA). Tukey test (T-Test of minimal statistical difference) was used to compare the means of treatment ($p \leq 0.05$). The software SAS INSTITUTE (1999) was used.

4 Results and Discussion

4.1 Results

4.1.1 Total consumption of selenium

Figure 1 shows the average total consumption of selenium (mg) for the animals of control groups (1), free of selenium (2) and experimental (3, 4, 5, 6, 7 and 8) at the end of 28 days of experimentation.

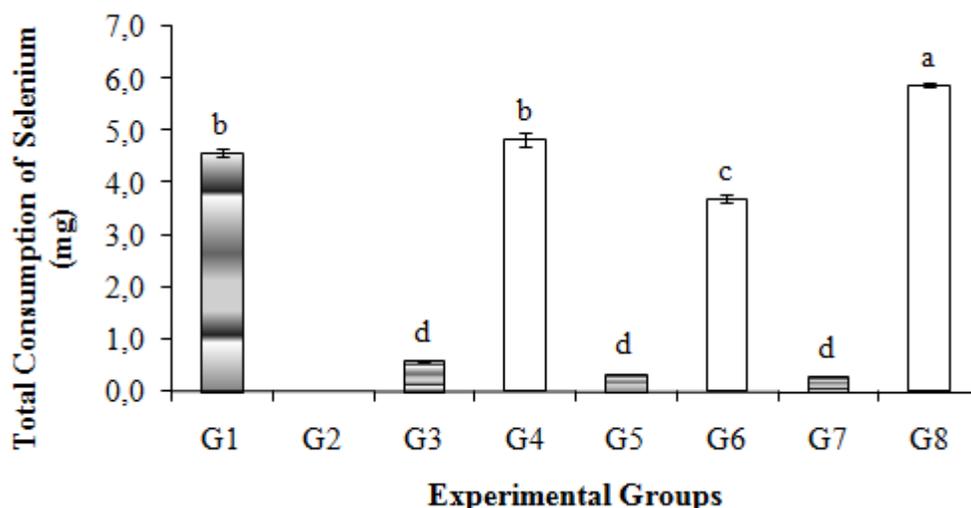


Figure 1. Average total consumption of selenium by the experimental animals (n = 8)

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) by Tukey test.

Experimental Groups: G1 standard AIN mineral mix with selenium, G2 experimental group control AIN mineral mix without selenium, G3 experimental group 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, G4 experimental group 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, G5 experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, G6 experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, G7 experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, G8 experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium.

In Figure 1, it is observed that selenium consumption was lower in animals of the groups that received Brazil nut defatted cake as the only source of selenium, as the group receiving selenium from the AIN mineral mix and the groups that received both selenium in the defatted cake and in the mix consumed larger quantities of this mineral.

4.1.2 Aminogram

Tables 1 and 2 show the quantities and the consumption of amino acids involved in glutathione cycle in the casein, Brazil nut defatted cake and diets used in this experiment.

Table 1. Amino acids related to GSH cycle (g of aa/100g sample) in the casein, in the defatted cake and in the diets.

Samples/Aminoacids	Glutamic Acid (g/100g)	Cysteine (g/100g)	Methionine (g/100g)
Casein	18,74 ^a ± 0,31	1,66 ^a ± 0,15	2,20 ^a ± 0,08
Defatted cake	5,53 ^b ± 0,01	0,49 ^b ± 0,02	1,95 ^b ± 0,04
Diet 1	2,73 ^{dc} ± 0,03	0,20 ^{fed} ± 0,01	0,36 ^d ± 0,01
Diet 2	2,20 ^e ± 0,05	0,15 ^f ± 0,02	0,22 ^e ± 0,05
Diet 3	2,76 ^{dc} ± 0,02	0,15 ^f ± 0,00	0,45 ^{dc} ± 0,01
Diet 4	2,89 ^c ± 0,09	0,18 ^{fc} ± 0,02	0,47 ^c ± 0,00
Diet 5	2,54 ^d ± 0,03	0,35 ^{cbd} ± 0,03	0,42 ^{dc} ± 0,02
Diet 6	2,67 ^{dc} ± 0,04	0,39 ^{cb} ± 0,02	0,44 ^{dc} ± 0,03
Diet 7	2,97 ^c ± 0,10	0,40 ^{cb} ± 0,02	0,41 ^{dc} ± 0,01
Diet 8	2,81 ^{dc} ± 0,06	0,32 ^{ced} ± 0,05	0,35 ^d ± 0,03

Experimental diets: Diet 1 - standard diet AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control AIN mineral mix without selenium, Diet 3 - experimental group 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, Diet 4 - 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, Diet 5 - experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, Diet 6 - experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, Diet 7 - experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium.

Table 2. Consumption (g) of amino acids important for glutathione cycle in experimental animals (n = 8) at the end of 28 days of experimentation.

Consumption	Glutamic acid	Cysteine	Methionine
Animals	(g)	(g)	(g)
G1	50,25 ^c ± 0,01	3,68 ^e ± 0,02	6,63 ^d ± 0,01
G2	45,88 ^d ± 0,03	3,13 ^f ± 0,02	4,59 ^g ± 0,01
G3	30,51 ^f ± 0,02	1,61 ^h ± 0,03	4,93 ^e ± 0,02
G4	45,37 ^e ± 0,03	2,75 ^g ± 0,02	7,31 ^c ± 0,02
G5	29,38 ^g ± 0,02	4,00 ^c ± 0,02	4,81 ^f ± 0,02
G6	26,38 ^h ± 0,03	3,85 ^d ± 0,02	4,35 ^h ± 0,03
G7	70,19 ^b ± 0,03	9,35 ^b ± 0,01	9,71 ^b ± 0,02
G8	84,65 ^a ± 0,02	9,64 ^a ± 0,02	10,54 ^a ± 0,03

Experimental diets: Diet 1 - standard diet AIN mineral mix with selenium, Diet 2 experimental control AIN mineral mix without selenium, Diet 3 - experimental group 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, Diet 4 - 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, Diet 5 - experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, Diet 6 - experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, Diet 7 - experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, Diet 8 experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium.

A table 1 show that the quantity of amino acids found in the diet was quite variable. This is because of diets containing different proportions of Brazil nut, which has significant amount of sulfur amino acids methionine and cysteine found in the form of selenomethionine and selenocysteine.

Selenium has the property of replacing the sulfur content of sulfur amino acids by means of covalent bonds, resulting in selenoaminoacids (FREITAS et al., 2007).

Regarding the consumption of amino acids, the variation between the groups was clear, as can be seen in Table 2.

4.1.3 Concentration of GSH in the animals blood

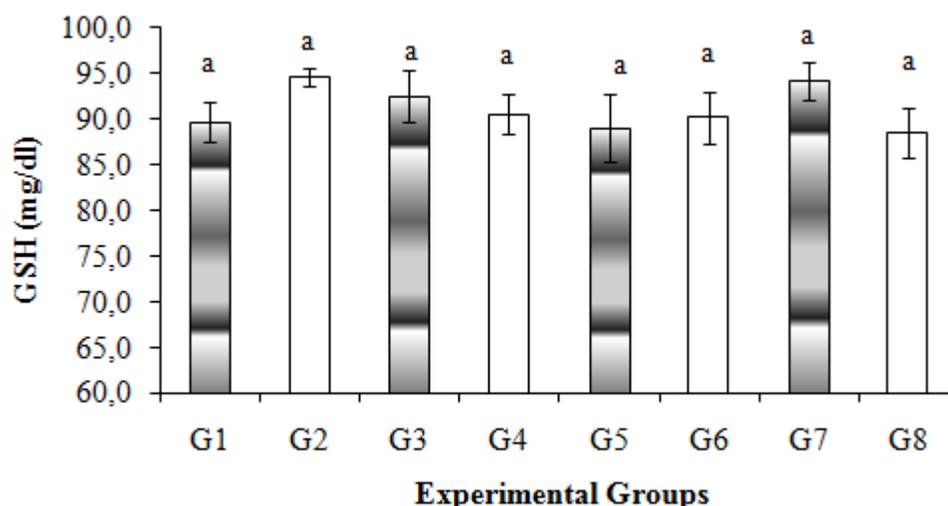


Figure 2. Concentration of GSH in the animals blood (n = 6)

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0,05$) by Tukey test. Experimental Groups: G1 standard AIN mineral mix with selenium, G2 experimental group control AIN mineral mix without selenium, G3 experimental group 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, G4 experimental group 35% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, G5 experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, G6 experimental group 25% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium, G7 experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix without selenium, G8 experimental group 12,5% of Brazil nut defatted cake with mineral mix with selenium.

By analyzing the concentrations of reduced glutathione (GSH) from the groups of Figure 2, it appears that the values found for the experimental groups, which ranged from 88,49 to 94,70 mg/dl, did not differ among themselves or from the G1 (89,68 mg/dl).

5 Discussion

Considering that the glutathione peroxidase (GSH px), which is one of the main enzymes of glutathione cycle, is seleno-dependent, several studies such as Angstwurm; Gaertner (2006) and Thomson et al. (2008) show that variations in the concentration of selenium may directly influence the activity of the enzyme GSH Px, interfering with the cycle of the antioxidant glutathione. In the presence of peroxide, the glutathione peroxidase converts hydrogen peroxide to water and oxidized it to their corresponding disulfur GSH (GSSG); i.e., reduced glutathione (GSH) serves as substrate for the action of glutathione peroxidase in the removal of H₂O₂ (SANTOS, 2006; SCHOTT et al, 2007). Thus, it was expected that changes in activity of GSH Px, because of different concentrations of selenium present in the diets in this experiment could interfere with the concentration of reduced glutathione.

Since all animals were under the same conditions, the results were noted for G1 as a parameter for evaluating the results of the blood concentration of reduced glutathione (GSH).

Analyzing the results, it appears that all experimental groups, including group 2 which received the AIN-93G diet with selenium-free mineral mix, blood concentrations of GSH were statistically equal (Figure 2).

These results demonstrate that the difference in the selenium concentration consumed by the animals in this experiment was not influence on the blood levels of GSH, since the results of all groups were statistically equal.

Thus, due to the fact that group 2, 3, 5 and 7, which did not consume selenium throughout the experiment or consume the lowest amounts of this mineral (Figure 1), did not show serum concentrations of GSH different from the concentrations present of the groups that consumed the highest amounts of selenium (groups 4, 6 and 8). It is suggested that dietary Se did not influenced serum glutathione levels. Additionally, all experimental groups (2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8) have presented statistically equals blood concentrations of GSH compared with the group which did not receive any Se. It is suggested that other factors may influence the amount of GSH produced, in addition to selenium. Furthermore, one can infer that the concentrations of Se required to produce the necessary levels of GSH are very small, and possibly, all diets provided sufficient quantities of Se for the production of GSH by the rodents used in our experiments, resulting in a lack statistical difference in GSH in all groups.

Taking into account that glutathione is a tripeptide synthesized from amino acids, glutamine, cysteine and glycine, by sequential action of γ -glutamylcysteine and glutathione synthetase, changes in consumption of these amino acids could play a direct role in the concentration of this tripeptide, influencing the management of the glutathione cycle. However, the proper administration of these amino acids in the diet may influence the production of glutathione, since cysteine and glutamine play a critical role in the synthesis of GSH acting as precursors of the tripeptide (ROWE et al, 1994; ANTUNES; BIANCHI, 2004).

The consumption of methionine should also be taken into account, since this amino acid can be converted into cysteine. Homocysteine is an intermediary in the conversion of methionine into cysteine and it can be metabolized by pathways of remethylation and transulfuration. In the remethylation pathway, this compound receives a methyl group of

betaine or 5-methyltetrahydrofolate forming methionine. In transulfuration the homocysteine, in a reaction catalyzed by the enzyme cystathionine β -synthase, is converted to cystathionine. This, subsequently, is hydrolyzed to cysteine by cystathionine γ -lyase, which, as mentioned above can participate in the formation of reduced glutathione (BAKER, 2006; STEFANELLO, 2008).

Moreover, the concentration of methionine in the diet also indirectly influenced the bioavailability of selenium. The body pool of methionine determines the mobilization of selenomethionine to be used as an analogue of methionine (NAVARRO-ALARCON; LOPEZ -MARTINEZ, 2000).

Souza (1963) and Chaves (1967) studied the aminogram of protein from Brazil nuts, and especially of globulins. The authors showed that the nut had significant levels of arginine, leucine, phenylalanine and methionine. For Glória; Regitano d'Arce (2000), the levels of methionine were highlighted. Already for Souza; Menezes (2004) and Cohen et al. (2006), the protein of the almond and Brazil nut defatted cake is rich in all essential amino acids, with high content of sulfur (methionine and cysteine), usually lacking in vegetable proteins. These authors suggest even a mixture of almonds and/or the nut defatted cake with other raw materials in order to enrich them in protein quality and quantity.

According Reeves et al. (1993), for animals to have an appropriate growth and satisfactorily perform all the metabolic functions, the requirements of glutamine, cysteine and methionine should be respectively of 36,3g; 3,7g and 4,6g/kg of the diet. Thus, one can reach the conclusion, through calculations based on the consumption of aminoacids by animals (Table 2), which the experimental animals consumed quantities from 3 to 4,5 times higher than those indicated as appropriate for the consumption of these amino acids. Therefore, the animals' consumption quantities of glutamic acid, cysteine and methionine

were more than sufficient to supply the intake of amino acids for GSH synthesis and may have influenced the synthesis and consequent blood concentration of reduced GSH, as well as in maintaining the redox cycle.

Therefore, it is not possible to conclude that consumption of selenium is variable and has directly influenced the results for reduced glutathione; that is, the role of the isolated selenium mineral in the blood concentration of GSH is not the only one parameter, since other factors such as the levels of amino acids in the diet may have influenced this concentration.

The activity of the enzyme glutathione peroxidase and other selenoproteins is an important biomarker that reflects the bioavailability of selenium. Therefore, according to Van Dael; Deelstra (1993); Coutinho (2003), in studies that assessed the influence of selenium in the body, determination of the various compounds derived from selenium and the activity of these enzymes in biological material after the experimental intervention is considered a method for evaluating the activity and bioavailability of the mineral studied.

The results showed that the diets with defatted cake made with Brazil nuts are efficient to maintain the cycle of reduced glutathione, because the levels of GSH were similar to those found in the standard group. The concentration of GSH found for the group 2, which consumed a diet with 0% selenium, confirms that this mineral was not the determining factor for the results of GSH found.

So the Brazil nut defatted cake has characteristics that help to maintain adequate levels of reduced GSH, since the diets prepared with her kept the blood concentration of GSH similar concentrations found in the standard and control groups.

6 Conclusion

From the results of this experiment, it is concluded that diets prepared with Brazil nut defatted cake as much as the diets prepared with casein have characteristics that maintains adequate blood concentration of reduced glutathione, which may contribute to the smooth functioning cycle of interconversion of glutathione.

In order to more accurately determine the effects of the selenium mineral coming from Brazil nut defatted cake to the glutathione system, more targeted studies are needed, such as on the activity of the enzyme glutathione peroxidase.

7 References

1. ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemio-Biological Interactions**, Memphis, v. 111-112, p.1-14, abr., 1998.
2. ANGSTWURM, M. W. A., GAERTNER, R. Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. **Current Opinion Clinical Nutrition & Metabolic Care**, London, v. 9, p. 233-238, 2006.
3. ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 89-96, jan./mar., 2004
4. BAKER, D.H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, n. 6, p. 1670S–1675S, 2006. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/136/6/1670S>>. Acesso: 18 maio 2008.
5. BEUTLER, E. (Ed). **Red Cell Metabolism**. New York: Churchill Livingstone, p. 126, 1986.
6. BRATAKOS, M.S. et al. The nutritional selenium status of healthy greeks. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 91, p.161-176, feb., 1990.

7. CHAVES, N. **Valor nutritivo da castanha-do-pará**. Universidade Federal de Pernambuco, Instituto de Nutrição, fev. 1967.
8. COHEN, K. O; CHISTE, R. C.; MATHIAS, E. A. Produção de farinha parcialmente desengordurada de castanha do Brasil. **Circular Técnico - EMBRAPA**, Belém do Pará, n. 42. p. 1-5, fev. 2006. Disponível em: <www.cpatu.embrapa.br/.../producao-de-farinha-parcialmente-desengordurada-de-castanha.../PublicacaoArquivo>. Acesso: 23 abr. 2008.
9. CHUNHIENG, T. et al. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 4318-4322, 2004.
10. COUTINHO, V. F. **Efeitos da suplementação com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao selênio**. 2003. 176 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
11. DELEVE, L.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology Therapy**, Amsterdam, v.52, n. 3, p.287-305, 1991.
12. DELILBASI, C.; DEMIRALP, S. Turan B. Effects of selenium on the structure of the mandible in experimental diabetics. **Journal of Oral Science**, v. 44, n. 2, p. 85-90, jun. 2002.
13. DUMONT E., VANHAECKE F., CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 385, p. 1304-1343, jul. 2006.
14. FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of selenium. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, n. 51, p. S20-S23, jan., 1997. Supplement 1.

15. FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n.1, jan./mar. 1997.
16. FREITAS, S. C.; ANTONIASSI, R.; FELBERG, I.; SANTOS, N. M. S. **Selênio em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 01035231, RJ, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/ct71-2004.pdf>>. Acesso: 20 maio 2007.
17. FREITAS, S. P. et al. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha do Brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27 (supl), p. 14- 17, 2007.
18. GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 1-20, 2000.
19. GREENE, J. J.; HUTTER, D.E.; TILL, B.G. Redox state changes in density dependent regulation of proliferation. **Experimental Cell Reserch**, Washigton, v. 232, n. 2, p. 435-438, may 1997.
20. GRIFFITH, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 922-935, nov. 1999.
21. GOENA, M. et. al. Effect of the raw legume Vicia ervilha on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiologia**, Pamplona, v.45, n.1, p.55-60, apr. 1989.
22. HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolum Phenylisothiocyanate Derivatization and Liquid Chromatography of Aminoacids in Food. **Journal Association of Analitical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

23. HARDY, G.; HARDY, I. Selenium: the Se-XY nutraceutical. **Nutrition**, New York, v.20, n. 6, p. 590-593, jun. 2004.
24. HWANG, C; SINSKEY, A.J.; LODISH, H.F. Oxidized Redox State of glutathione in the Endoplasmic Reticulum. **Science**, Washigton, DC, v. 257, n. 5076, p.1496-1502, set. 1992.
25. JUNIOR L. R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.
26. KAPLOWITZ, N. et al. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. **Biological Chemistry Hoppe - Seyler**, v. 377, n.5, p. 267- 273, may 1996.
27. KECK, A. S.; FINLEY, J. W. Database values do not reflect selenium contents of grain, cereals, and other foods grown or purchased in the upper Midwest of the United States. **Nutrition Research**. Tarrytown, v. 26, n.1, p. 17-22, jan. 2006.
28. LU, S. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **Faseb Journal**, v. 13, n. 10, p.1169-1183, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/reprint/13/10/1169>>. Acesso: 08 nov. 2007.
29. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances (RDA)**. 10. ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.
30. NAVARRO-ALARCON, M.; LÓPES-MARTINEZ, M. C. Essenciality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Science of the Total Environment**, Amsterdan, v. 249, p. 347-371, apr. 2000.
31. PONTUAL, M. L. A. et al. Ultra structural evaluation of the radioprotective effect of sodium selenite on submandibular glands en rats. **Journal of Applied Oral Science**, 2007, v. 15, n. 3, p. 162-168. Disponível em: < www.scielo.br/jaos>. Acesso: 15 nov. 2008.

32. RAFFERTY, T. S. et al. Selenium protects primary human keratinocytes from apoptosis induced by exposure to ultraviolet radiation. **Clinical Experimental Dermatology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 294-300, may 2003.
33. REILLY, C. **Metal contamination of food**. 2. ed. London: Elsevier, 1991. 284 p.
34. REILLY, C. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 114-118, 1998.
35. REEVES, P.G. et al. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/123/11/1939>>. Acesso: 30 jul. 2007.
36. ROWE, B. et al. Effects of whey and casein based diets on glutathione and cysteine metabolism in ICU patients. **Journal of American College of Nutrition**, v. 124, p. 323-330, 1994.
37. SANTOS, N. A. G. **Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetiluréia**. 2006, 205 p. Tese (Doutorado em toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
38. SAS Institute. **SAS user's guide: statistics** (software). Version 8.0. Cary: SAS, 1999.
39. SCHOTT, K. et al. Influência de Desproteinizantes Ácidos na Quantificação da Glutathione Reduzida Eritrocitária por Clae-Uv. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 592-596, jun. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300017&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 01 fev. 2009.
40. SEN, C. K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. **Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 12, p. 660-672, dez. 1997.

41. SOUZA, A.H. Castanha-do-pará. S.I.A. Ministério da Agricultura. **Estudos Técnicos**, Rio de Janeiro, n. 23, 1963.
42. SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.1, p. 120-128, jan./mar. 2004.
43. STEFANELLO, F. M. **Metionina altera parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos: Estudos *in vitro* e *in vivo***. 2008, 139 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
44. 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, feb. 2008. Disponível em: <http://nutrition.otago.ac.nz/__data/assets/file/0017/3563/DTP_Nuts.pdf>. Acesso: 05 mar. 2008.
45. VAN DAEL, P., DEELSTRA, H. Selenium. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research (Journal Seek)**, v. 63, n. 4, p. 312–316, 1993.
46. VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. Lipídios. In: **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.
47. WHITE, J. A.; HART, R. J.; KRY, J. C. An evaluation of the Pico - Tag system for the amino acid analysis of the food materials. **Journal Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p 170-177, oct./dez. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925132>>. Acesso: 24 nov. 2008.

CAPITULO IV

**Adição de torta de castanha do Brasil à dieta
aumenta os níveis de hormônio da tireóide
Triiodotironina (T3) em ratos Wistar**

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of the thyroid hormone triiodothyronine (T3), quantified in Chapter 2, on the metabolic parameters of glucose, and cholesterol in rats. T3 concentrations were determined with the aid of the hormone T3 radioimmunoassay kit, and data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p \leq 0,05$). All groups showed levels of T3 similar to the ones described on the literature. However, the levels of T3 found in the blood serum of animals in experimental groups that received diets with different proportions of the cake of Brazil nut were higher (1,04 to 1,41 nmol/L) than the levels of T3 found in the blood serum of animals of the other experimental groups and control group (1,07 and 1,04 nmol/L, respectively). Regarding the metabolic parameters of glucose and cholesterol, in general, the experimental groups that received diet of defatted cake had lower levels for the three parameters analyzed when compared with the standard and control groups, which received diets that contained casein as sole protein source. However, analyzing the results obtained for the standard and control groups and experimental groups, it was concluded that selenium was not the only factor influencing the concentration of T3 found in the blood serum of animals and the levels of glucose and cholesterol.

Keywords: Brazil nut, defatted cake, selenium, triiodothyronine, glucose, cholesterol.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos do hormônio da tireóide Triiodotironina (T3), quantificado no Capítulo 2, sobre os parâmetros metabólicos de glicemia e colesterol de ratos wistar. Determinou-se o hormônio T3 com auxílio do kit de radioimunoensaio e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todos os grupos apresentaram níveis de T3 dentro do considerado ideal para roedores. No entanto, os níveis de T3 encontrados no soro sanguíneo dos animais dos grupos experimentais que receberam as dietas com diferentes proporções de torta de castanha do Brasil apresentaram-se maiores (1,04 a 1,41 nmol/L) do que os níveis de T3 encontrados no soro sanguíneo dos animais dos grupos padrão e controle (1,07 e 1,04 nmol/L, respectivamente).

Com relação aos parâmetros metabólicos de glicemia e colesterol, de modo geral, os grupos experimentais que receberam na dieta torta de castanha apresentaram teores menores para os dois parâmetros analisados quando comparados com os grupos padrão e controle, os quais receberam dietas que não continham torta de castanha, e sim caseína como única fonte protéica.

No entanto, analisando-se os resultados obtidos para os grupos padrão, controle e para os grupos experimentais, concluiu-se que o selênio não foi o único fator a influenciar a concentração de T3 encontrada no soro sanguíneo dos animais, assim como os teores de glicose e colesterol.

Palavras Chaves: castanha do Brasil, torta, selênio, triiodotironina, glicose, colesterol.

1 Introdução

A glândula tireóide é responsável pela secreção de dois hormônios iodinados. São eles: 3,5, 3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3), que são de fundamental importância na regulação da expressão gênica, diferenciação celular e para o desenvolvimento de diversas funções vitais do nosso organismo, envolvendo também o controle do metabolismo energético (FERREIRA, 2000).

A transformação do T4 em T3, forma biologicamente ativa dos hormônios tireoidianos, ocorre pela ação de enzimas desiodinases específicas, que possuem selênio em sua estrutura. O selênio forma a estrutura de diferentes proteínas do organismo e sua concentração na glândula tireóide é mais alta do que em outros tecidos (HOWIE et al., 1995) pelo fato de ser constituinte de três iodotironina 5'-desiodinases (DI; EC 3.8.1.4) tipos I, II e III. As DI catalisam a desiodação do pró-hormônio 3,5,3',5'-tetraiodotironina (L-Tiroxina, T4) a sua forma metabolicamente ativa a 3,5,3'-triiodotironina (T3) (MATAMOROS et al., 2008)

De certo modo, pode-se afirmar que a função dos HT consiste em regular o metabolismo corporal. Ele atua em todos os tecidos do corpo e pode chegar a aumentar a taxa metabólica basal em até 100%. Esse hormônio também aumenta a síntese protéica (o que resulta em incremento na síntese de enzimas), aumenta o tamanho e o número de mitocôndrias na maioria das células, aumenta a atividade contrátil do coração, promove a absorção rápida de glicose pelas células e, por fim, incrementa a glicólise, a gliconeogênese e a mobilização de lipídios, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos livres para oxidação como forma de obtenção de energia. Além disso, o T3, especificamente, pode acelerar o crescimento facilitando a síntese e secreção do hormônio do crescimento (GH) (CANALI; KRUEL, 2001).

Segundo Berne; Levy (2006), o efeito metabólico geral do hormônio tireoidiano é descrito como o de acelerar a resposta ao jejum, ou seja, aumentar a taxa metabólica celular.

Em particular sobre o metabolismo lipídico, a atividade da tireóide é inversa à concentração sérica de colesterol, o que poderia, possivelmente, indicar que uma hipercolesterolemia poderia se associar com alterações da função tireoidiana; porém, uma hipocolesterolemia tem pouco valor como indicador de hipertireoidismo (MATAMOROS et al., 2008).

Efeitos sobre a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas são os responsáveis pelas alterações metabólicas detectadas nas disfunções tireoidianas. Essas ações metabólicas têm também o importante papel de gerar calor, mecanismo pelo qual a temperatura corporal é mantida a 37°C. Dessa maneira, as ações que o T3 desencadeia nas suas células alvo repercutem em efeitos biológicos marcantes na atividade dos vários tecidos e sistemas, os quais, em geral, têm sua atividade bastante elevada quando estão sob a ação deste hormônio, o qual eleva a expressão e a atividade de várias enzimas do metabolismo oxidativo, ATPases, transportadores iônicos e proteínas importantes para o desenvolvimento de várias funções específicas dos mesmos. E, embora esteja muito bem definido que o mecanismo de ação deste hormônio envolva modificações na expressão de genes específicos (ação transcricional), não se pode desprezar o crescente número de relatos na literatura sobre ações do T3 consideradas não genômicas, ainda que o mecanismo envolvido no estabelecimento desses efeitos não esteja completamente esclarecido (NUNES, 2003).

A síntese protéica também é estimulada pelos HT. Porém, em quantidades excessivas os HT podem inibi-la provocando aumento do catabolismo protéico e aumento da excreção de nitrogênio na urina (AZEREDO, 2004).

As secreções tireoidianas também têm influência tanto sobre os processos de biossíntese como de modificação e degradação de lipídeos. Um aumento nos HT aumenta a degradação lipídica, diminuindo os depósitos graxos e os níveis plasmáticos de TAG, fosfolipídios e colesterol. Ocorre um aumento na secreção e perda de colesterol pelas fezes, assim como uma maior concentração de ácidos graxos livres na circulação (AZEREDO, 2004; MATAMOROS et al., 2008).

Em relação ao metabolismo dos carboidratos, os hormônios da tireóide estimulam a captação de glicose, além de aumentarem a taxa de utilização celular deste açúcar, que pode ser observada pelo aumento da concentração dos intermediários da via glicolítica.

Os HT incrementam a utilização de glicose pelas células, melhorando a absorção de glicose desde o lúmen intestinal e aumentando a glicemia. No hipertireoidismo, a hiperglicemia decorrente provoca hipersecreção de insulina, levando a um esgotamento das células beta do pâncreas e posterior diabetes. Na diabetes, os HT agravam a situação, não somente por elevar a absorção de glicose, mas porque incrementam a glicogenólise no fígado e a glicólise (AZEREDO, 2004).

1.1 Selênio e castanha do Brasil

Dado ao agradável sabor e reconhecido valor nutricional (em torno de 67,3% de lipídeos, 14,2% de proteínas e 3,42% de carboidratos (Ribeiro, 1992; Souza; Menezes, 2004)), a castanha do Brasil pode alcançar consumo considerável e mesmo se incorporar ao cotidiano alimentar da população brasileira, assim como seu resíduo gerado pela indústria

(torta), o qual pode ser utilizado no preparo de alimentos, sendo uma forma de aumentar as opções econômicas da região Amazônica.

A castanha, além de possuir elevado valor energético e ser rica em proteínas de alto valor biológico, é reconhecida também como fonte de selênio (Se), o qual substituí o enxofre dos aminoácidos sulfurados, por meio de ligações covalentes, formando os selenoaminoácidos (THOMSON et al., 2008).

Diversos autores, como Dumont et al (2006) e Thomson et al (2008), encontraram valores significativos de Se presentes na amêndoa da castanha do Brasil.

Segundo Souza e Menezes (2004), a torta (desengordurada) da castanha, além de conter, em média, 25,13% de lipídios, 40,23% de proteínas e 3,37% de carboidratos, também é uma excelente fonte de selênio. Esses mesmo autores encontraram 0,713 mg de Se/100g de torta, quantidade 3,56 vezes maior que o teor encontrado na amêndoa (0,204 mg/100g) por esses mesmos autores.

Experimentos com humanos evidenciaram que a castanha do Brasil, além de ser uma excelente fonte de Se, é também um alimento com alta biodisponibilidade de Se, por produzir significativo aumento na concentração de Se dos tecidos corporais (THOMSON et al., 2008).

Diversos fatores podem influenciar a biodisponibilidade do mineral estudado, como por exemplo: a concentração de proteína da dieta, principalmente metionina, a concentração de vitamina E, o teor elevado de vitamina A, a presença de inibidores como metais pesados (cádmio e mercúrio), forma química do selênio presente na dieta, as interações ocasionadas pela ingestão de compostos presentes na dieta, tais como o conteúdo de fitatos, pectina e fibras totais (COUTINHO, 2003).

Embora os valores de Se na amêndoa/torta possam ultrapassar o valor de ingestão diária recomendada para adultos (50 a 200 µg/dia) segundo a NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1989), não se tem relatos de problemas de toxidez ao homem, de modo que a castanha é um dos alimentos básicos das populações que habitam a floresta amazônica, que as consomem das mais variadas formas, tanto pura como misturada com outros alimentos como peixes, carnes, café, mandioca (FREITAS et al., 2004; SOUZA; MENEZES 2004).

Considerando os aspectos relacionados à castanha do Brasil e ao selênio o objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos do selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre o hormônio da tireóide Triiodotironina (T3), apresentado no capítulo 2, sobre os parâmetros metabólicos de glicemia, colesterol e triglicerídeos de ratos wistar.

2 Material e Métodos

Para realização desse trabalho, as castanhas do Brasil foram fornecidas pela empresa Juta e Castanha, localizada na cidade de São Paulo-SP.

2.1 Caracterização das fontes protéicas a serem adicionadas às rações dos animais

Foram utilizadas duas fontes protéicas: a caseína, proteína padrão geralmente utilizada em rações animais e torta de castanha do Brasil em diferentes proporções, substituindo parcialmente a caseína nos grupos experimentais. As fontes protéicas foram caracterizadas segundo a composição centesimal realizando-se ainda a determinação da quantidade de selênio presente na torta da castanha.

2.1.1 Obtenção da torta de castanha do Brasil

A torta de castanha do Brasil foi obtida por meio de prensagem. Primeiramente, as castanhas foram colocadas em cozinhador SMR 600-E da Scott Tech® e aquecidas a

aproximadamente 60°C por meia hora. Em seguida foi extraído seu óleo utilizando-se a Extratora ERT-60-II da Scott Tech® por moagem de aproximadamente 5 kg de castanhas por vez.

2.1.2 Análise da composição centesimal

A determinação da composição centesimal foi realizada tanto nas fontes protéicas a serem utilizadas (caseína e torta de castanha), como nas rações oferecidas aos animais.

As análises de umidade, proteínas e cinzas foram realizadas segundo o método descrito no manual da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Determinou-se o teor de lipídeos segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

O teor de carboidratos totais foi estimado por meio do cálculo de diferença entre os percentuais de úmida, cinzas, proteínas e lipídeos.

2.1.3 Determinação do teor de selênio

A análise do teor de selênio foi realizada pelo laboratório Biominerais, localizado na cidade de Campinas, São Paulo. Utilizou-se a metodologia de Espectrometria de Emissão Atômica por plasma Indutivamente Acoplado (IRIS – AP – Thermo Jarrell Ash), onde a amostra primeiramente é digerida em ácido nítrico em frasco fechado pressurizado, com aquecimento por microondas.

2.2 Determinação da composição em ácidos graxos do óleo da torta de castanha

A determinação da composição de ácidos graxos do óleo extraído da torta da castanha do Brasil foi realizada pelo laboratório de óleo e Gorduras do Departamento de

Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Foi utilizado o método recomendado pela American Oil Chemists Society (Ce 1f-96) (AOCS, 2001), o qual foi executado nas seguintes condições: cromatógrafo gasoso capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, dotado de coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane), dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo na coluna = 1,00 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura do detector: 280 °C; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do forno: 110 °C – 5 min, 110 – 215 °C (5 °C/min), 215 °C – 24 minutos; utilizando-se gás hélio como gás de arraste, e o volume injetado igual a 1,0 µL.

2.3 Descrição dos ensaios biológicos

As condições experimentais e o ensaio biológico receberam aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, número do protocolo 1679-1.

2.3.1 Condições experimentais dos ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Ensaios Biológicos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Os animais foram acomodados individualmente em gaiolas de aço inox, a 24°C com um ciclo de 12 horas dia:noite com livre acesso ao alimento e água.

2.3.2 Protocolo experimental

Foram utilizados 64 ratos machos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados (com 21 dias de idade e peso de 55g ± 5g) procedentes do Centro Multidisciplinar para

Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP e distribuídos em 8 grupos experimentais, os quais receberam dietas AIN 93 G (Reeves et al., 1993) elaboradas a partir de diferentes fontes protéicas. Todas as dietas foram ajustadas para que o teor de 12% de proteína (Goena et al., 1993). A descrição dos grupos experimentais segue abaixo:

GRUPO 1 (Padrão): Dieta AIN 93G (fonte protéica: caseína; com mix-mineral conforme descrito em Reeves et al., 1993), **GRUPO 2 (Controle):** Dieta AIN 93G (fonte protéica: caseína; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se), **GRUPO 3:** Dieta AIN 93 (fontes protéicas: 65% caseína/35% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se), **GRUPO 4:** Dieta AIN 93G (fontes protéicas: 65% caseína/35% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G), **GRUPO 5:** Dieta AIN 93G (fontes protéicas: 75% caseína/25% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se), **GRUPO 6:** Dieta AIN 93G (fontes protéicas: 75% caseína/25% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G), **GRUPO 7:** Dieta AIN 93G (fontes protéicas: 87,5% caseína/12,5% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G elaborado com exclusão de Se), **GRUPO 8:** Dieta AIN 93G (fontes protéicas: 87,5% caseína/12,5% torta de castanha do Brasil; com mix-mineral AIN 93G).

Todas as dietas utilizadas foram isocalóricas. O experimento teve duração de aproximadamente 35 dias, sendo 7 dias utilizados para a divisão dos animais em grupos e adaptação à nova alimentação.

2.3.3 Análises bioquímicas das amostras obtidas no ensaio biológico

2.3.3.1 Coleta do sangue dos animais experimentais

O sangue dos animais foi coletado em tubos enumerados. Para as análises do teor de glicose, colesterol total e triiodotironina (T3) total, os animais ficaram sob jejum durante 12 horas e o sangue foi coletado no momento da morte, em frasco sem EDTA e mantido em temperatura ambiente para posterior separação do soro em centrífuga por 25 minutos a 2500 rpm.

2.2.3.2 Determinação da Glicemia

Realizou-se a determinação da glicemia dos animais utilizando o kit advindo de fabricante específico, da Laborlab S/A produtos para laboratório (Guarulhos, SP), Kit GLICOSE método enzimático (02200).

Nas amostras (20µl) foram acrescentados 2 mL do Reativo de Trabalho, o qual contém 4-aminofenazona e tampão TRIS, água desionizada, fenol e reativo enzimático (glicose oxidase e peroxidase). Em seguida foram submetidas a banho-maria a 37°C por 10 minutos para que a reação ocorresse. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 505 nm.

2.2.3.3 Determinação do colesterol total

A determinação de colesterol total foi feita utilizando o kit advindo de fabricante específico, da Laborlab S/A produtos para laboratório (Guarulhos, SP), Kit-COLESTEROL método enzimático (01400).

Nas amostras (20 µl) acrescentou-se 2 mL do Reativo de Trabalho, que contém 4-aminofenazona, água desionizada, fenol e reativo enzimático (lipase, COD e POD). Em

seguida elas ficaram em banho-maria a 37°C por 10 minutos para que a reação ocorresse. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 505 nm.

2.3.5 Determinação do hormônio triiodotironina total (T3)

Tendo em vista que a atividade da enzima iodotironina 5' desiodinase (5'IDI) pode ser influenciada por variações na concentração de selênio ingerida, foi realizada a determinação de T3, com o objetivo de verificar o efeito das diferentes dietas sobre o referido sistema hormonal.

A determinação do hormônio T3 total foi realizada com o auxílio do kit T3 Total Coat-a-Count da DPC-SIEMENS pelo método de radioensaio de fase sólida marcado com ^{125}I designado para o doseamento quantitativo da triiodotironina total circulante (T3) em soro ou plasma.

Inicialmente, são numerados os tubos para determinação das curvas padrão, controles e amostras em duplicata. Em seguida são pipetados 100 μL dos reagentes de cada curva (padrão, controle e amostras de soro sanguíneo) nos tubos correspondentes. Imediatamente, pipetou-se 1 mL do reagente radioativo T3 total ^{125}I em todos os tubos, que foram então homogeneizados (vórtex) e incubados por 2 horas a 37°C em banho-maria. Após esse procedimento, os mesmos foram decantados vigorosamente, procurando remover todo líquido remanescente garantindo maior precisão para contagem. Contaram-se os tubos durante 1 minuto em contador gama automático de poço (modelo Packard, calibrado automaticamente para ^{125}I), utilizando-se uma curva de calibração.

3. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para verificar quais tratamentos diferiram, foi aplicado o teste de Tukey (Teste T-Teste de mínima

diferença estatística) para realizar comparações pareadas das médias dos tratamentos estabelecendo-se o nível mínimo de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o software SAS INSTITUTE (1999).

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados

4.1.1 Composição centesimal das rações e da torta de castanha do Brasil

Na Tabela 1 abaixo, verificam-se os resultados obtidos na análise da composição centesimal da caseína, da torta e das dietas oferecidas aos animais.

Tabela 1. Valores médios referentes à Composição Centesimal da caseína, torta de castanha do Brasil obtida após prensagem e dietas, expressos em (g/100g).

Amostras	Umidade	Cinzas	Proteína (%N x 5,46)	Lipídeos totais	Carboidratos
Caseína	9,97 ± 0,20	3,14 ± 0,13	77,8 ± 0,58	0,29 ± 0,07	8,80
Torta	3,84 ± 0,06	14,26 ± 0,13	27,79 ± 1,07	32,9 ± 0,35	21,21
Dieta 1	10,24 ^{ba} ± 0,49	2,50 ^{fe} ± 0,10	12,75 ^{bc} ± 0,21	7,17 ^{de} ± 0,18	67,34
Dieta 2	9,99 ^{ba} ± 0,93	2,34 ^f ± 0,03	11,59 ^d ± 0,39	7,38 ^{de} ± 0,08	68,70
Dieta 3	10,84 ^{ba} ± 0,93	2,91 ^{ba} ± 0,09	12,35 ^{bcd} ± 0,29	7,05 ^e ± 0,34	66,85
Dieta 4	9,37 ^b ± 0,35	3,09 ^a ± 0,07	12,94 ^{bcd} ± 0,29	7,25 ^{de} ± 0,11	67,35
Dieta 5	9,35 ^b ± 0,02	3,01 ^{ba} ± 0,12	11,85 ^{cd} ± 0,04	8,07 ^{bc} ± 0,02	67,72
Dieta 6	10,46 ^{ba} ± 0,12	2,84 ^{bc} ± 0,03	12,96 ^b ± 0,27	8,58 ^a ± 0,09	65,16
Dieta 7	11,24 ^a ± 0,05	2,55 ^{de} ± 0,01	14,04 ^{ba} ± 0,79	7,59 ^{dc} ± 0,23	64,58
Dieta 8	11,38 ^a ± 0,25	2,70 ^{dc} ± 0,01	14,12 ^a ± 0,19	8,36 ^{ba} ± 0,10	63,44

Dieta 1 grupo experimental padrão AIN mix mineral com selênio, Dieta 2 grupo experimental controle AIN mix mineral sem selênio, Dieta 3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix mineral sem selênio, Dieta 4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix mineral com selênio, Dieta 5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix mineral sem selênio, Dieta 6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix mineral com selênio, Dieta 7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix mineral sem selênio, Dieta 8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix mineral com selênio.

Conforme era esperado, as dietas apresentaram percentual protéico em torno de 12%, com exceção das dietas 7 e 8. E o teor de lipídeos das dietas variou entre 7,05 e 8,58%.

A variação na concentração protéica verificada nas dietas 7 e 8 pode ser justificada por diferenças no momento da pesagem dos ingredientes, já que as dietas foram elaboradas em laboratório, sendo os ingredientes pesados manualmente em balança analítica e misturados da mesma forma para homogeneização. Outros fatores que podem ter contribuído para tal diferença são possíveis variações no momento da análise da composição centesimal das dietas.

4.1.2 Teor de selênio na torta de castanha do Brasil

O teor de selênio encontrado na torta de castanha do Brasil foi de 35 mg/kg, resultado bastante superior aos teores de selênio encontrados na torta de castanha do Brasil por Souza; Menezes (2004).

4.1.3 Composição em ácidos graxos do óleo oriundo da torta de castanha do

Brasil

Tabela 2 – Composição em ácidos graxos (%m/m) do óleo retirado da torta de Castanha do Brasil.

Ácido Graxo		(%)
C12:0	Láurico	0,04
C14:0	Mirístico	0,11
C16:0	Palmítico	15,27
C16:1	Palmitoléico	0,39
C17:0	Margárico	0,08
C17:1	Margaroléico	0,03
C18:0	Esteárico	10,13
C18:1 Trans	Elaídico	0,46
C18:1	Oléico	45,30
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,14
C18:2	Linoléico	27,40
C18:3	Linolênico	0,17
C20:0	Araquídico	0,28
C20:1	Gadoléico	0,07
C22:0	Behênico	0,08
C24:0	Lignocérico	0,05

Conforme se observa na Tabela 2 acima, verifica-se que o óleo oriundo da torta de castanha do Brasil utilizada neste experimento apresenta um teor elevado de ácidos graxos essenciais, contendo 45,30% de ácido oléico e 27,40% de ácido linoléico.

4.1.4 Ganho de peso e consumo total

A Figura 1 mostra o ganho de peso dos animais e a Figura 2, o consumo total médio de dieta (g) pelos animais dos grupos padrão (G1), controle (G2) e experimentais (G3, G4, G5, G6, G7 e G8). A Figura 3 representa o consumo total médio de selênio desses mesmos animais ao término dos 28 dias de experimentação.

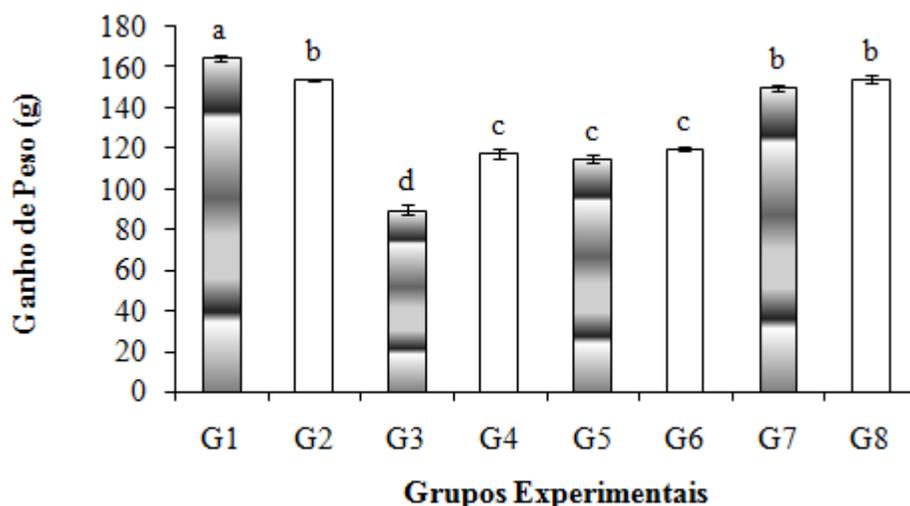


Figura 1. Ganho de peso (g) dos animais experimentais (n = 8)

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de tukey

G1 grupo experimental padrão AIN com selênio, G2 grupo experimental controle AIN sem selênio, G3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix com selênio.

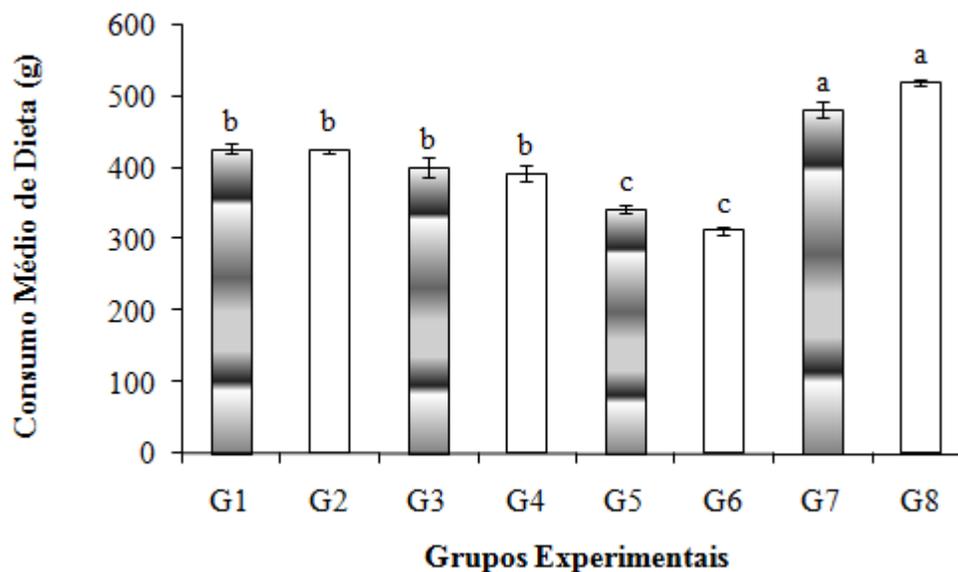


Figura 2. Consumo total médio de dieta (g) pelos animais experimentais (n = 8)

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de tukey

G1 grupo experimental padrão AIN com selênio, G2 grupo experimental controle AIN sem selênio, G3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix com selênio.

Analisando-se as Figuras 1 e 2, de um modo geral, os grupos que receberam as dietas com diferentes proporções de torta de castanha do Brasil apresentaram menor ganho de peso. Os grupos experimentais G7 e G8 foram os grupos que consumiram maior quantidade de dieta, apresentando maior ganho de peso. No entanto, o ganho de peso desses grupos não foi proporcional ao consumo de dieta, já os mesmos foram os grupos que consumiram maiores quantidade de dieta, conforme é possível verificar na Figura 2. No entanto, os grupos G1, G2, G3 e G4 que consumiram quantidades semelhantes de dietas apresentaram ganhos de peso diferentes. Os grupos G3 e G4, que foram alimentados com uma dieta composta com 35% de torta de castanha do Brasil, consumiram quantidades

semelhantes de dieta em relação aos grupos padrão e controle, ganhando, porém, menos peso. Já os grupos padrão (G1) e controle (G2), mesmo consumindo uma menor quantidade de dieta em comparação com os grupos G7 e G8, apresentaram, respectivamente, ganho de peso maior e semelhante (Figura 1), a estes últimos grupos mencionados. Isto pode ser explicado pelas diferenças nas composições das dietas oferecidas aos animais.

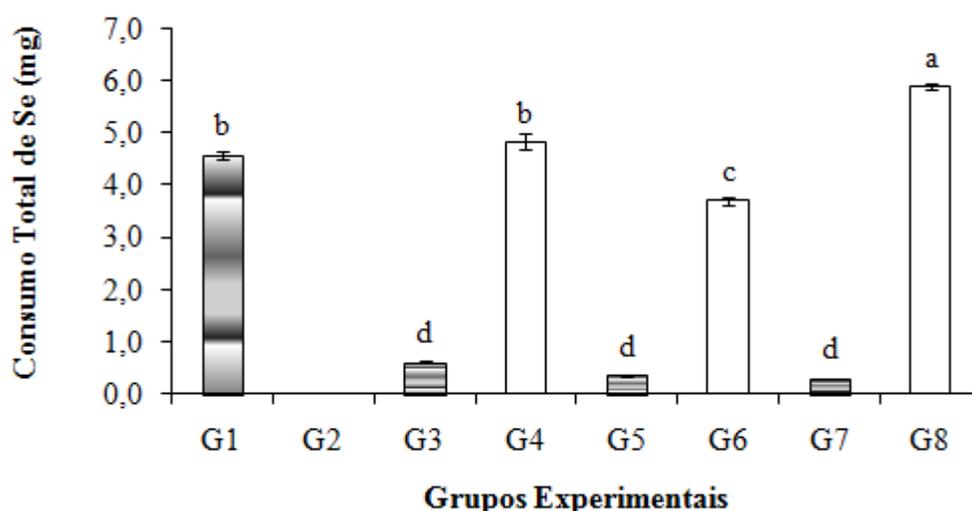


Figura 3. Consumo total médio de selênio pelos animais experimentais (n = 8)

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de tukey

G1 grupo experimental padrão AIN com selênio, G2 grupo experimental controle AIN sem selênio, G3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix com selênio.

Na Figura 3 acima, observa-se que os animais dos grupos que receberam a torta de castanha do Brasil como única fonte de selênio consumiram quantidades menores de selênio em relação ao grupo padrão e em relação aos grupos experimentais que receberam selênio oriundo tanto da torta quanto do mix mineral AIN 93G.

4.1.5 Hormônio tireoidiano - Triiodotironina (T3)

Conforme descrito na literatura clássica de fisiologia humana, os hormônios da tireóide, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), atuam produzindo elevação geral do metabolismo basal do organismo humano (GONÇALVES et al., 2006).

Neste experimento avaliou-se somente a relação de T3, principal hormônio ativo, frente alguns parâmetros metabólicos, devido a este hormônio ter apresentado variações expressivas nos grupos experimentais. Já para T4 os resultados apresentaram-se menos expressivos.

A Figura 4 mostra a concentração do hormônio triiodotironina (T3) total no sangue dos animais após o período experimental.

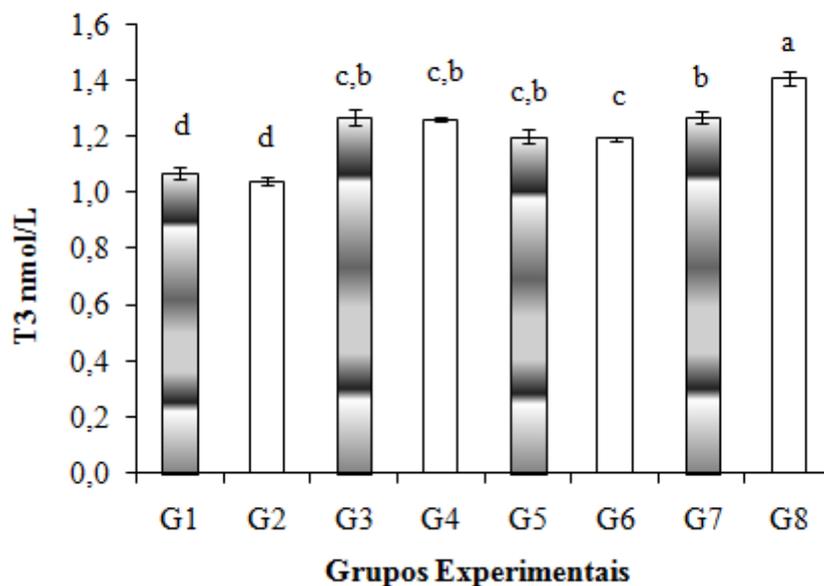


Figura 4. Concentração média de Triiodotironina (T3) total presente no soro sanguíneo dos animais (n = 6).

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de tukey

G1 grupo experimental padrão AIN com selênio, G2 grupo experimental controle AIN sem selênio, G3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix com selênio.

Com relação à análise estatística, pode-se observar que os grupos padrão e controle não diferiram estatisticamente entre si. Porém, diferiram dos demais grupos, apresentando as menores concentrações de triiodotironina no soro sanguíneo (1,07 e 1,04 nmol/L, respectivamente). Os grupos experimentais G3, G5 e G7, mesmo tendo consumido menores quantidades de selênio em relação aos grupos G4, G6 e G8 não apresentaram teores de T3 inferiores a esses. Todos os grupos do experimento apresentaram níveis de triiodotironina

(1,04 a 1,41 nmol/L) dentro do considerado ideal para roedores, já que segundo Thrall (2006) e Fox et al. (2002), as concentrações sanguíneas de T3 consideradas como ideais para os mesmos variam de 0,4608 a 1,536 nmol/L de sangue.

4.1.6 Parâmetros bioquímicos

4.1.6.1 Concentração sanguínea de glicose

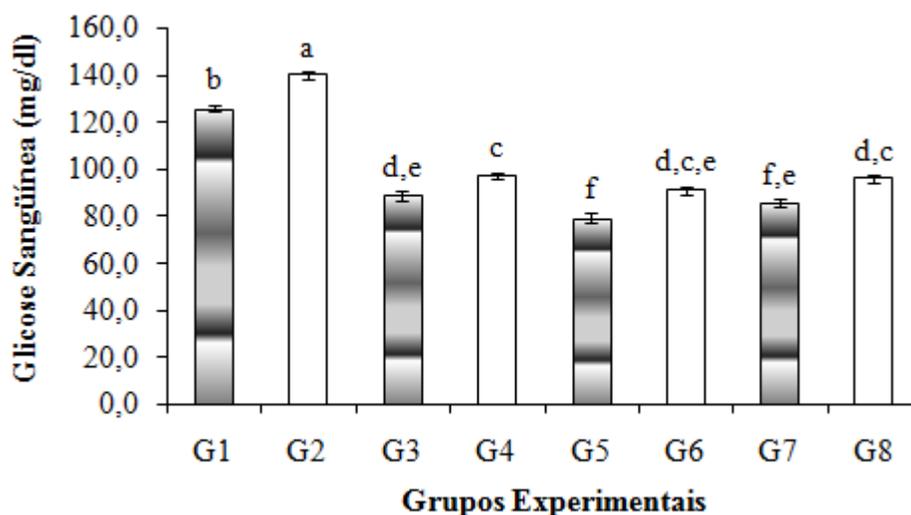


Figura 5. Concentração média de Glicose (mg/dL) presente no soro sanguíneo dos animais (n = 6).

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de tukey

G1 grupo experimental padrão AIN com selênio, G2 grupo experimental controle AIN sem selênio, G3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix com selênio.

Com relação à concentração de glicose no soro sanguíneo dos animais, os grupos padrão e controle apresentaram os maiores valores de glicose no soro sanguíneo, sendo o grupo controle (2) o que apresentou a maior concentração de glicose. Os grupos experimentais apresentaram teores de glicose menores que os grupos padrão e o grupo

controle, apresentando concentrações glicêmicas bastante próximas (Figura 5). Os grupos que receberam maiores doses de selênio (Figura 3) apresentaram resultados semelhantes e maiores do que os grupos que receberam menores teores de selênio. Os menores valores foram apresentados pelos grupos G5 e G7.

Segundo Thrall (2006), o teor de glicose sanguíneo para ratos machos adultos pode variar de 114 a 143 mg/dL de sangue. Assim, os grupos experimentais apresentaram teores de glicose menores que os parâmetros adotados em literatura. Já o grupo padrão (1) e o grupo controle (2) apresentaram teores de glicose sanguíneos dentro dos valores de referência.

4.1.6.2 Colesterol

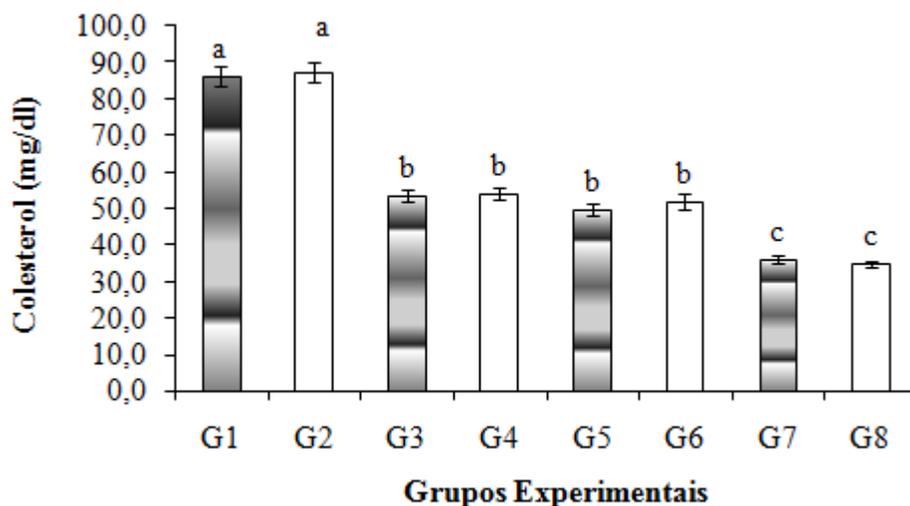


Figura 6. Concentração média de colesterol total (mg/dL) presente no soro sanguíneo dos animais (n = 6).

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de tukey

G1 grupo experimental padrão AIN com selênio, G2 grupo experimental controle AIN sem selênio, G3 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G4 grupo experimental 35% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G5 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G6 grupo experimental 25% torta de castanha do Brasil mix com selênio, G7 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix sem selênio, G8 grupo experimental 12,5% torta de castanha do Brasil mix com selênio.

Todos os grupos experimentais apresentaram menor concentração de colesterol total, no soro sanguíneo em relação ao grupo padrão (G1) e o grupo controle (G2). Os grupos experimentais apresentaram teores de colesterol total bem menores que os teores dos grupos G1 e G2, indicando que as dietas à base de torta de castanha do Brasil podem ter contribuído para diminuição do colesterol sanguíneo dos animais. Os grupos G7 e G8 apresentaram os menores teores de colesterol total (36,00 e 34,73 mg/dL, respectivamente),

indicando mais uma vez que as características das dietas oferecidas a estes grupos podem ter contribuído para a diminuição do teor de colesterol total.

Com relação aos parâmetros colesterolêmicos encontrados como referência na literatura para ratos machos adultos, todos os grupos apresentaram concentração de colesterol dentro dos parâmetros adotados por Thrall (2006), os quais variam de 36 a 100 mg/dL.

4.2 Discussão

Com relação à composição centesimal da castanha do Brasil, comparando-se os resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 1) com os resultados encontrados na literatura, verifica-se que os mesmos variam bastante, devido aos diferentes métodos de extração do óleo da castanha do Brasil. Extrações mais eficientes resultam numa torta com teor protéico e percentual de cinzas e carboidratos maiores.

Glória e Regitano d'Arce (2000) encontraram, para torta de castanha do Brasil, teores de proteínas, lipídeos e cinzas, 47,6, 1,2 e 13,1 g/100g, respectivamente. Já para Souza e Menezes (2004), os teores de proteína, lipídeos e cinzas encontrados na torta de castanha do Brasil foram 40,23, 25,13 e 8,85 g/100g, respectivamente. Os resultados obtidos nesse trabalho para os mesmos compostos foram 27,79, 32,9 e 14,26 g/100g para proteínas, lipídeos e cinzas, respectivamente.

Analisando-se os resultados da literatura com os resultados desse trabalho, é possível explicar os diferentes valores encontrados na composição centesimal da torta de castanha do Brasil por meio dos diferentes métodos de extração do óleo da castanha, os quais têm distintos graus de eficiência. Assim, quanto maior for a eficiência do processo de extração, menor o teor lipídico da torta e maior será a concentração dos outros compostos

químicos da mesma. Logo, a concentração de lipídeo encontrada na torta dependerá do tipo de uso e/ou aplicabilidade para qual a mesma será designada.

Para o hormônio da tireóide, triiodotironina, os grupos que foram alimentados com as dietas que continham torta de castanha do Brasil, tanto como única fonte de selênio quanto os que receberam selênio da torta e do mix mineral, apresentaram níveis de T3 maiores que os encontrados nos grupos padrão e controle, os quais não tiveram a castanha como componente/ingrediente da dieta. O grupo 8 foi o grupo que apresentou a maior concentração de T3 (1,41 nmol/L), sendo o grupo que consumiu a maior quantidade de dieta e de selênio em relação aos demais (Figura 2 e 3).

Pelo fato dos grupos G3, G5 e G7, que consumiram menores quantidades de selênio em relação aos demais grupos (Figura 3), apresentarem concentrações muito semelhantes de T3 em relação aos demais grupos, chegou-se à conclusão de que o selênio não foi o fator/elemento limitante para as concentrações de T3 encontradas no soro sanguíneo dos animais. Segundo Grum et al. (1996), Tiirats (1997), Arthur et al. (1999), Contreras et al. (2002), Matamoros et al. (2008), as concentrações dos hormônios da tireóide (HT) também podem ser afetadas por outros fatores e não somente pelo conteúdo de selênio na dieta, como o conteúdo de iodo na ração, o consumo de gordura e o estado fisiológico do animal entre outros. É possível, então, concluir que a concentração dos HT obedece ao resultado de múltiplos fatores e não só ao consumo de selênio.

No entanto, as concentrações mais elevadas de T3 encontradas no soro sanguíneo dos animais experimentais podem possivelmente justificar os resultados encontrados para alguns parâmetros bioquímicos analisados, como glicemia, colesterol e triglicerídeos, já que os HT exercem ação sobre diversos processos biológicos, tais como o metabolismo dos lipídeos, glicídios e proteínas.

4.2.1 Triiodotironina (T3) e glicemia

Os resultados de glicemia encontrados para os grupos experimentais (que consumiram torta de castanha do Brasil na dieta) foram menores do que os resultados encontrados para os grupos padrão e controle, os quais não consumiram torta de castanha (Figura 5). Como já mencionado, os grupos experimentais apresentaram teores de glicose menores que os parâmetros adotados em literatura, já que segundo Thrall (2006) a concentração de glicose para ratos machos adultos pode variar de 114 a 143 mg/dL de sangue. Já o grupo padrão (G1) e o grupo controle (G2) apresentaram teores de glicose de acordo com os valores de referência.

Levando-se em consideração os níveis de T3 encontrados no soro sanguíneo dos animais experimentais e sabendo-se da influência que os hormônios da tireóide desempenham sobre o metabolismo dos glicídios, é possível justificar os níveis glicêmicos encontrados para os grupos experimentais. O hormônio da tireóide promove a absorção rápida de glicose pelas células e, por fim, incrementa a glicólise e a gliconeogênese. Eles estimulam a captação de glicose, melhorando a absorção de glicose desde o lúmen intestinal, além de aumentarem a taxa de utilização celular deste açúcar, que pode ser observada pelo aumento da concentração dos intermediários da via glicolítica. Por outro lado, foi descrito que a expressão da PEP-carboxilase, enzima gliconeogênica, é estimulada por T3 e que o promotor desse gene contém o elemento de resposta hormonal para este mesmo hormônio (DA POIAN; CARVALHO-ALVES, 2003).

Sendo assim, o teor de T3 mais elevado encontrado no soro sanguíneo dos animais dos grupos experimentais pode ter estimulado o aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos, ou seja, maior utilização celular deste açúcar, explicando os menores índices glicêmicos encontrados no soro sanguíneo dos mesmos animais. Além disso, é

importante lembrar que os animais experimentais permaneceram sob jejum por um período de 12 horas anteriores ao momento da morte dos mesmos e, como já mencionado por Berne; Levy (2006), o efeito metabólico geral do hormônio tireoidiano é descrito como o de acelerar a resposta ao jejum, ou seja, aumentar a taxa metabólica celular.

4.2.2 Triiodotironina (T3) e colesterol

Levando-se em consideração os níveis de T3 encontrados no soro sanguíneo dos animais experimentais e sabendo-se da influência que os hormônios da tireóide desempenham sobre o metabolismo dos lipídeos, é possível justificar os menores teores de colesterol encontrados para os grupos experimentais em relação aos grupos padrão e controle.

Os hormônios da tireóide também modulam o metabolismo dos lipídeos (síntese, insaturação, alongamento e oxidação). Isto se dá basicamente por meio da indução da expressão dos genes que codificam enzimas-chaves nestas vias metabólicas, tais como ácido-graxo sintase, enzima málica, acetil-CoA carboxilase e glicose-6-fosfato desidrogenase. Um aumento nos HT aumenta a degradação lipídica, diminuindo os depósitos graxos e os níveis plasmáticos de TAG, fosfolipídios e colesterol. Ocorre um aumento na secreção e perda de colesterol pelas fezes, assim como uma maior concentração de ácidos graxos livres na circulação (LIU; LEE, 1998; AZEREDO, 2004).

Assim, os menores teores de colesterol encontrados no soro sanguíneo dos grupos experimentais (G3, G4, G5, G6, G7 e G8) podem ser explicados pela concentração de T3 mais elevada verificadas nesses grupos.

Além do hormônio T3, o perfil lipídico do óleo encontrado na torta de castanha do Brasil, também pode ter influenciado os níveis de colesterol dos animais deste experimento.

Segundo análise realizada pelo Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA/UNICAMP, esse óleo contém 45,30% de ácido oléico e 27,40% de ácido linoléico. Embora a torta de castanha do Brasil utilizada nesse trabalho tenha apresentado um alto índice de lipídeos mesmo após prensagem (32,9% conforme Tabela 1), esta (assim como a castanha) apresenta na sua composição lipídeos essenciais ao organismo, os ácidos graxos poliinsaturados, que não são produzidos pelo organismo. Sendo assim, a quantidade de ácidos graxos essenciais encontrados no óleo da castanha (45,30% de ácido oléico e 27,40% de ácido linoléico), conforme se pode observar na Tabela 2, também pode ter contribuído para diminuição dos teores de colesterol encontrados no soro sanguíneo dos animais.

Dessa forma, é possível atribuir à torta da castanha do Brasil a característica de influenciar o metabolismo lipídico, seja de maneira direta, devido seu conteúdo em ácidos graxos insaturados, seja de maneira indireta, por meio do seu efeito sobre os HT.

O perfil lipídico da torta também pode ter influenciado no ganho de peso dos animais. Como mencionado anteriormente, os grupos padrão e controle e os grupos experimentais G3 e G4 consumiram quantidades semelhantes de dieta em relação aos outros grupos experimentais. No entanto, os grupos G3 e G4 obtiveram menor ganho de peso em comparação aos demais grupos. A presença dos ácidos graxos essenciais na torta da castanha do Brasil também pode ter contribuído para que o ganho de peso dos grupos G7 e G8 fosse menor do que o ganho de peso dos grupos padrão e controle, embora esses grupos experimentais (G7 e G8) tenham consumido maior quantidade de dieta em relação aos últimos grupos mencionados. Assim, as diferenças nas composições das dietas oferecidas aos animais influenciaram o perfil bioquímico e o ganho de peso dos animais.

O menor ganho de peso dos animais dos grupos G3, G4, G5 e G6, os quais receberam dietas com maior proporção de castanha do Brasil, possivelmente se deve ao desbalanceamento de aminoácidos sulfurados, causado pelo excesso de metionina (BAKER, 1991). Segundo Smith et al. (1985), o abuso alimentar de proteínas ricas em aminoácidos essenciais, como a metionina, pode resultar em séria depressão do crescimento corporal. Tendo em vista que os aminoácidos sulfurados estão altamente presentes na castanha do Brasil (em torno de 9,1%) (SUN; LEUNG; TOMIC, 1987), tal fato também pode ter influenciado o ganho peso desses animais.

5 Conclusão

Os animais que consumiram as dietas com diferentes proporções de torta de castanha do Brasil apresentaram maior concentração do hormônio triiodotironina (T3), assim como apresentaram níveis de glicose e colesterol menores do que os animais que receberam as dietas AIN 93-G padrão e AIN 93-G com o mix mineral controle.

Logo, é possível concluir que a torta de castanha do Brasil é um alimento que pode influenciar positivamente o metabolismo da tireóide, e conseqüentemente, o metabolismo dos glicídios e lipídeos.

6 Referências

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of AOAC**. 16. ed. Virginia: International Cunnif, P. AOAC International, v. 1, 1995.
2. AOCS (American Oil Chemists Society). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 5. ed. Washington, 2001.
3. ARTHUR, J. R.; BECKETT, G. J.; MITCHELL, J. H. The interactions between selenium and iodine deficiencies in man and animals. **Nutrition Research Reviews**, New York, v. 12, p. 55-73, 1999.

4. AZEREDO, D. M. **Transtornos relacionados aos Hormônios da Tireóide.** Seminário apresentado na disciplina BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no primeiro semestre de 2004. p. 1-16. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/transtornos_tireoide.pdf>. Acesso: 06 de ago de 2008.
5. BAKER, D. H. Partitioning of nutrient for growth and other metabolic functions: efficiency and priority considerations. **Poultry Science**, Menasha, v. 70, n. 8, p. 1797-1805, aug. 1991.
6. BERNE, M. R.; LEVY, M. N. **Fundamentos de Fisiologia.** 1ª Ed. São Paulo: Elsevier, 929 p., 2006.
7. CANALI, E. S.; KRUEL, L. F. M. Respostas Hormonais ao Exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 141-153, jul./dez., 2001.
8. COUTINHO, V. F. **Efeitos da suplementação com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao selênio.** 2003. 176 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
9. CONTRERAS, P. A. et al. Effect of a selenium-deficient diet on blood values of T3 and T4 in cows. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 11, p. 65-70, 2002.
10. DA POIAN, A. T.; CARVALHO-ALVES, P. C. **Hormônios e Metabolismo: Integração e Correlações Clínicas.** Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2003. 353 p.
11. DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 385, p. 1304-1343, 2006.

12. FERREIRA, R. T. **Avaliação do consumo de lipídeos em crianças de 3 a 4 anos matriculadas em uma creche municipal de São Paulo**. 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
13. FOX, J. G. et al. **Laboratory Animal Medicine (American College of Laboratory Animal medicine)**. 2^a ed. New York: Academic Press, 2002, 1256 p.
14. FREITAS, S. C.; ANTONIASSI, R.; FELBERG, I.; SANTOS, N. M. S. **Selênio em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Rio de Janeiro, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/ct71-2004.pdf>>. Acesso: 20 maio 2007.
15. GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 1-20, 2000.
16. GOENA, M. et al. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiologia**, Pamplona, v.45, n.1, p.55-60, apr., 1989.
17. GONÇALVES, A. et al. Influência dos hormônios tireoidianos sobre o sistema cardiovascular, sistema muscular e a tolerância ao esforço: uma breve revisão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 43-45, set. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v87n3/a33v87n3.pdf>>. Acesso: 03 mar. 2009.
18. GRUM, D. E. et al. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1850-1864, 1996. Disponível em: <<http://jds.fass.org/cgi/reprint/79/10/1850>>. Acesso: 02 fev. 2009.

19. HOWIE A. F. et al. Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: A potential regulator of thyroid-hormone synthesis. **Biochemistry Journal**, v. 308, n. 3, p. 713-717, jun. 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1136783&blobtype=pdf>>. Acesso: 15 mar. 2009.
20. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. I 47N. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ªed. São Paulo: O Instituto, v. 1, 1985.
21. LIU, J. F.; LEE, Y.W. Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed oxidized frying oil. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 116–122, 1998.
22. MATAMOROSA, R. et al. Concentraciones séricas de triyodotironina, tiroxina y perfil lipídico en bovinos lecheros alimentados con una ración con bajo contenido de selenio. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Chile, n. 40, p. 23-29, 2008.
23. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances (RDA)**. 10. ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.
24. NUNES, M. T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 639-643, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v47n6/a04v47n6.pdf>>. Acesso: 06 ago. 2008.
25. REEVES, P.G.; NIELSEN, F. H.; GEORFE, C.; FAHEY, J. R. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, p. 1939-1951, 1993. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/123/11/1939>>. Acesso: 30 jul. 2007.

26. RIBEIRO, M. A. **Aproveitamento tecnológico de castanhas-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*): estudo da qualidade de conservação**. 1992. 117p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
27. SAS Institute. **SAS user’s guide: statistics** (software). Version 8.0. Cary: SAS, 1999.
28. SMITH, E. L. et al. **Bioquímica: mamíferos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985, p. 1404.
29. SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 120-128, jan/mar. 2004.
30. SUN, S. S. M.; LEUNG, F. W.; TOMIC, J. C. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) proteins: Fractionation, Composition, and Identification of a Sulfur-rich protein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Berkeley, v. 35, n. 2, p. 232-235, feb. 1987.
31. TIIRATS, T. Thyroxine, triiodothyronine and reverse-triiodothyronine concentrations in blood plasma in relation to lactational stage, milk yield, energy and dietary protein intake in Estonian dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Sweden, v. 38, n. 4, p. 339-348, 1997.
32. 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, feb. 2008. Disponível em: <http://nutrition.otago.ac.nz/__data/assets/file/0017/3563/DTP_Nuts.pdf. Acesso: 05 mar. 2008.
33. THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Rocca, 2006, 582p.

CONCLUSÃO GERAL

- O teor de selênio encontrado na torta de castanha do Brasil foi de 35 mg/kg. Resultado bastante superior aos encontrados na literatura.
- Os animais dos grupos experimentais que receberam dietas com uma menor proporção de torta de castanha do Brasil consumiram maior quantidade das mesmas.
- De modo geral, os grupos que receberam as dietas com diferentes proporções de torta de castanha do Brasil apresentaram menor ganho de peso, quando comparados aos grupos padrão e controle.
- Com relação ao consumo de selênio, os animais dos grupos experimentais que receberam a torta de castanha do Brasil como única fonte de selênio consumiram quantidades menores de selênio em relação ao grupo padrão e em relação aos grupos experimentais que receberam selênio oriundo tanto da torta quanto do mix mineral AIN 93G.
- Os valores médios de AST e ALT encontrados para os grupos experimentais demonstram que esses animais não sofreram nenhum tipo de dano hepático ou renal.
- Com relação à concentração dos hormônios da tireóide encontrada no soro sanguíneo dos animais, todos os grupos apresentaram níveis de T4 e T3 na faixa considerada ideal para roedores.
- Os resultados referentes ao hormônio T4 não se mostraram diferentes estatisticamente entre os grupos.
- Para T3, os grupos alimentados com as dietas que continham torta de castanha do Brasil apresentaram níveis de T3 aproximadamente 20% maiores do que os encontrados nos grupos padrão e controle.

- Os resultados obtidos nesse experimento evidenciam que a torta de castanha do Brasil é um alimento que influencia positivamente o metabolismo dos hormônios da tireóide, principalmente com relação ao hormônio triiodotironina (T3).
- Com relação aos níveis de glicose sanguínea dos animais, aqueles que consumiram dietas com diferentes proporções de torta de castanha apresentaram teores de glicose menores que os animais do grupo padrão e do grupo controle.
- Todos os grupos experimentais que receberam torta de castanha do Brasil na dieta apresentaram menor concentração de colesterol total no soro sanguíneo em relação ao grupo padrão e o grupo controle.
- Levando-se em consideração os níveis de T3 encontrados no soro sanguíneo dos animais que consumiram dietas com torta de castanha do Brasil é possível justificar os níveis de glicose e colesterol encontrados no soro sanguíneo dos mesmos. No entanto, as características das dietas oferecidas a estes grupos, como por exemplo, o perfil lipídico das mesmas, também podem ter influenciado os parâmetros metabólicos estudados.
- As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) encontradas no sangue dos animais dos grupos estudados não se apresentaram diferentes estatisticamente.
- A partir dos resultados obtidos neste experimento conclui-se que o mineral selênio não foi o único fator/elemento que influenciou as concentrações dos hormônios da tireóide e de glutathiona encontradas no soro e no sangue dos animais. Outros fatores, como por exemplo, as quantidades de proteínas, lipídeos, iodo, teores de aminoácidos presentes nas dietas, o estado fisiológico dos animais, dentre outros, também podem ter influenciado os resultados encontrados.

- A torta de castanha do Brasil não demonstrou ter influência negativa sobre a concentração dos hormônios da tireóide, o teor sanguíneo de glutathione reduzida e sobre os parâmetros de glicemia e colesterol estudados. Nem mesmo a quantidade de selênio consumida pelos animais neste estudo.
- Logo, é possível concluir que a torta de castanha do Brasil é um alimento que pode influenciar positivamente o metabolismo da tireóide, o ciclo antioxidante da glutathione reduzida e, conseqüentemente, o metabolismo dos glicídios e lipídeos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desse estudo evidenciam a importância de se estudar separadamente cada sistema avaliado, visando à obtenção de resultados mais específicos e detalhados.

- Dietas elaboradas somente com torta de castanha do Brasil, ou seja, a torta de castanha como única fonte de proteínas, gorduras e demais nutrientes, podem refletir de maneira mais eficiente os efeitos da torta de castanha do Brasil sobre o metabolismo do organismo.
- Para que seja possível verificar com maior precisão os efeitos do mineral selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre o metabolismo dos hormônios da tireóide são necessários estudos mais direcionados, como por exemplo, em relação à atividade da enzima selenodependente iodotironina desiodinase.
- Experimentos utilizando animais com algum tipo de distúrbio tireoidiano (hipertireoidismo ou hipotireoidismo) poderiam resultar efeitos mais expressivos e explicativos quando submetidos a alguma experimentação com torta ou selênio oriundo da mesma.

- É interessante avaliar a atividade da enzima selenodependente glutathione peroxidase em relação aos efeitos do mineral selênio oriundo da torta de castanha do Brasil sobre o ciclo da glutathione reduzida.
- Para se avaliar o papel do resíduo em questão ou do selênio oriundo do mesmo sobre o sistema/ciclo antioxidante da glutathione reduzida, seria significativo submeter os animais experimentais a algum tipo de estresse oxidativo, por exemplo, estresse físico ou mental.
- O mesmo ocorre em relação aos parâmetros metabólicos analisados neste trabalho. Submeter animais com níveis elevados seja de glicose, colesterol ou triacilgliceróis, a um tipo de tratamento com torta de castanha do Brasil poderia refletir de maneira mais eficiente o(s) efeito(s) desse resíduo sobre a diminuição sanguínea de tais parâmetros metabólicos. Assim como, a interação dos mesmos com os sistemas hormonais pertinentes.

ANEXO



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

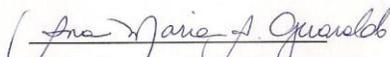
CERTIFICADO

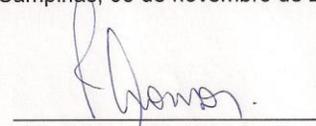
Certificamos que o Protocolo nº **1679-1**, sobre "**Estudo da ação de diferentes proporções de torta de castanha do Brasil sobre a expressão dos hormônios da tireóide, teores de glutatona reduzida e níveis de selênio em ratos Wistar**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior / Luciane Isabel Berno**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **03 de novembro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1679-1**, entitled "**Study of action of different proportions of Brazil nuts pie on the expression of thyroid hormones, levels of reduced glutathione and levels of selenium in rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 3, 2008**.

Campinas, 03 de novembro de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>