

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Suplementação de minerais por meio da castanha-do-brasil
pode modular a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis**

LEILA LEIKO HASHIMOTO

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Titular Silvia M. F. Cozzolino

Co-orientador: Prof. Dr. Christian Hoffmann

SÃO PAULO

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Suplementação de minerais por meio da castanha-do-brasil
pode modular a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis**

LEILA LEIKO HASHIMOTO

Versão corrigida

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Titular Silvia M. F. Cozzolino

Co-orientador: Prof. Dr. Christian Hoffmann

SÃO PAULO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

H344s Hashimoto, Leila Leiko
Suplementação de minerais por meio da castanha-do-brasil pode modular a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis / Leila Leiko Hashimoto. - São Paulo, 2019.
135 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato. Coorientador: Hoffmann, Christian

1. Castanha-do-brasil. 2. Microbiota. 3. Minerais. 4. Selênio. 5. Estado nutricional. I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador. III. Hoffmann, Christian, coorientador.

LEILA LEIKO HASHIMOTO

**Suplementação de minerais por meio da castanha-do-brasil
pode modular a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis**

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Tit. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, 16 de dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Aos que me deram a vida:

Deus, meu guia e zelador;

Meus pais, Carlos e Cleide, meus exemplos de força, resiliência e amor.

Aos **voluntários deste estudo**
por participarem e apoiarem a ciência.

AGRADECIMENTOS

À **minha mãe, Cleide**, que continua a cuidar de mim independente da distância e do Plano, que não media esforços em nos dar o melhor independente de tudo, que me ensinou o valor da fé e de cada respirar, que me motiva a seguir seu exemplo de força, amor, bondade, resiliência e empatia a cada dia. Tenho certeza que a cada passo meu te terei ao meu lado. **Ao meu pai, Carlos**, que sempre batalhou para nos proporcionar o melhor, que nos incentiva a olhar detalhadamente para as coisas e sermos críticos, que sempre nos ensinou os valores de cuidado, disciplina, responsabilidade e esmero. Eu agradeço imensamente! Amo muito vocês!

Às **minhas irmãs, Lilian e Larissa**, minhas companheiras eternas de vida, com quem compartilho tantas memórias, que vivenciaram comigo que tudo tem um propósito, por quem eu quero ser melhor e estar sempre forte. Muito obrigada! Amo muito vocês!

À **Prof. Silvia Maria Franciscato Cozzolino**, por me acolher como sua menininha em 2010 na minha iniciação e me apoiar até o fim do meu doutorado, em quem me espelho como nutricionista e mulher, que luta incansavelmente pela pesquisa e nutrição do nosso país, que me orgulha em ter como orientadora, que nos trata e se preocupa conosco como filhos, que é extremamente sensível e humana, um exemplo de professora, que tem o abraço mais carinhoso do bloco 14. Muito obrigada por tudo que proporcionou a minha vida e pelo apoio que me deu quando mais precisei!

Ao **Prof. Christian Hoffmann**, que me recebeu como sua aluna e fez a diferença neste trabalho, que ajudou científica e financeiramente quando mais precisamos, que sempre acrescentava visões diferentes e reflexões nas nossas longas reuniões, que eu admiro demais pelo pensamento crítico, meticuloso e tão rápido que é até difícil de acompanhar. Agradeço imensamente sua ajuda, sua paciência e seus ensinamentos sobre microbioma, bioinformática e ciência de qualidade!

À **Luciane Luca de Alencar**, minha melhor amiga e dupla de trabalho, que entrou de cabeça comigo nesse desafio, que topa até minhas ideias (e disciplinas) mais malucas, que esteve sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida, da meia noite às 6h da manhã, das 6h à meia noite, que sempre busca um jeitinho de nos animar e fazer rir, que acredita mais em mim que eu mesma, que me deu o prazer de ser dinda, que me inspira como mulher, mãe, cristã e profissional, que é testemunha de que Deus tudo prepara e cuida nas nossas vidas. Muito obrigada por tudo, minha amiga! Você é parte e sempre será da minha vida! Te amo tanto! Da iniciação para a vida toda.

À **Giovana Pereira Martucelli**, minha versão brasileira, que Deus escolheu a dedo para ser nossa parceira de análises e de vida, a mais animada e que entende minhas loucuras. Obrigada por tudo que fez pelo nosso projeto, todos os recordatórios digitados, análises mal ou bem sucedidas, por seguir comigo nessa caminhada de muitos desafios e também alegrias! Te amo muito!

À **Margarete de Sá Soares**, uma grande amiga que ganhei da pós-graduação, que me ajudou demais nas coletas e análises, que sempre me incentivou e torceu por mim, um exemplo de perseverança, força e fé em Deus, que por trás da aparência de durona tem coração gigante. Muito obrigada! Amo muito você!

À **Liliane Viana Pires**, um encontro de almas que nem a distância de mais de 2 mil km (logo 8 mil na Espanha) será capaz de separar, que me ensinou a ciência na bancada, da pipetagem à biologia molecular, passando pela desmineralização de vidrarias, que acreditou em mim muito mais que eu acreditava e me incentivou a fazer o doutorado, que sempre nos ajuda nas questões científicas e pessoais, que é exemplo de força, dedicação, fé e amor ao próximo, que tem um coração gigante, que me ensinou o que é amizade verdadeira. Li, agradeço tanto a Deus por ter a sua amizade! Obrigada por tudo que fez por mim e pela minha família! Te amo para sempre!

À **Verônica da Silva Bandeira**, a florzinha rosa mais linda, uma grande amiga presenteada por Deus, com quem tive o prazer de compartilhar a iniciação científica, mestrado, casamento) e o resto da vida, que mesmo de longe se

preocupa comigo, com quem amava ter longas conversas, que nos enche de orgulho pela forma correta, exigente, amorosa, dedicada e batalhadora de ser. Obrigada pela sua amizade! Te amo muito!

À **téc. Fabiana da Silva Lima**, que se tornou em tão pouco tempo uma amiga querida, companheira indispensável das análises de microbiota, que se desdobrou para me ajudar mesmo com um barrigão, que eu admiro demais pelo esforço e primor em tudo que faz, por quem tenho carinho enorme e merece um futuro brilhante. Agradeço demais por tudo!

À **Débora Preceliano Oliveira**, amiga que emana amor, alegria e fofura por onde passa, que admiro demais pela coragem, persistência, paciência e seriedade em seu trabalho, quem já vejo em uma trajetória de muito sucesso e reconhecimento! Obrigada pela sua amizade!

À **Fabiana Hoffmann Sardá**, que me ensinou pacientemente do bê-á-bá da bioinformática às análises no R, que sempre estava disposta a ajudar a todos, que sempre fazia sugestões e comentários muito pertinentes em nossas reuniões e análises. Obrigada!

À **Marlene Valença**, minha grande amiga, personificação do amor e caridade, dona das palavras mais confortantes e positivas do universo, que ajuda o próximo sem pedir nada em troca, que me motiva a ser forte, correta e perseverante assim como ela, que Deus me presenteou e não largarei nunca mais. Muito obrigada por ser da minha vida e me fazer uma pessoa melhor! Te amo muito!

A **minha família e amigos**, obrigada a cada um de vocês por estarem comigo nessa caminhada;

Ao **Fábio Kovach Hayashida**, acima de tudo, companheiro dos momentos mais importantes da minha vida, que sempre procura o melhor e mais sensato jeito de ajudar em qualquer situação, com quem posso ter longas e profundas

conversas ou curtas e mais banais. Muito obrigada por tudo, menino! Meu amor e minha gratidão são eternos por você.

Ao **Prof. Fernando Barbosa**, pela parceria das análises de minerais e generosidade sempre;

À **Marina Padilha e Prof. Suzana Saad**, que foram extremamente generosas em nos ceder os materiais para coleta de fezes e extração de DNA, agradeço imensamente!

Ao **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental**, pela oportunidade de realizar o doutorado em um dos melhores programas de Ciência dos Alimentos do Brasil;

A **todos os colegas do Laboratório de Nutrição-Minerais e Laboratório de Nutrição, Metabolismo e Microbioma** com quem convivi e aprendi muito durante esses 9 anos;

Ao téc. **José Alexandre Pimentel** e a téc. **Ivanir Pires**, pela ajuda nas análises e prestatividade sempre;

À **Prof. Sandra Vivolo e Prof. Dirce Maria Marchiori**, pelas contribuições no exame de qualificação.

Ao **CEFAP** pela realização do sequenciamento de nova geração das amostras;

Ao **CNPq** pelo auxílio financeiro na execução do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

HASHIMOTO, L.L. Suplementação de minerais por meio da castanha-do-brasil pode modular a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis [Tese de Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

A castanha-do-brasil é um alimento de alta complexidade nutricional, devido ao alto teor de selênio, micronutriente com ação antioxidante e anti-inflamatória, e de outros importantes componentes, como fibras, ácidos graxos insaturados, compostos fenólicos e diversos minerais, como zinco, cobre e magnésio. Essa noz é amplamente consumida pela população brasileira e mundial e seus efeitos à saúde devem ser compreendidos em todas as vertentes. Até o momento, não eram conhecidos os efeitos da ingestão dessa castanha na constituição de bactérias intestinais, cuja relevância vem sendo exponencialmente comprovada na literatura nacional e mundial devido sua participação em importantes processos no contexto saúde e doença. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição da microbiota intestinal e o perfil de minerais (metaloma) no organismo após a ingestão de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Este estudo prospectivo foi composto por 97 indivíduos sem doenças crônicas não transmissíveis, de ambos os gêneros, com idade média de $28,7 \pm 8,5$ anos. Os participantes foram avaliados antes e após a suplementação de uma unidade de castanha-do-brasil (~370 µg de selênio) por dia, durante 60 dias, quanto ao *status* de minerais (plasma, eritrócitos e fezes), atividade da enzima glutathione peroxidase (GPX), concentração de selenoproteína P (SEPP), avaliação da ingestão alimentar (recordatório alimentar de 24 horas) e caracterização do microbioma intestinal. Os dados brutos do microbioma foram analisados por meio do software *Quantitative Insight into Microbial Ecology* (v1.9.0) e a estatística foi realizada utilizando o pacote R (v1.1.463). Nossos resultados indicaram que a castanha-do-brasil melhorou significativamente o *status* de selênio da população, de acordo com o aumento expressivo das concentrações no organismo (plasma, eritrócitos e fezes) e de seus marcadores funcionais (selenoproteína P e atividade da GPX) ($p < 0,0001$). A intervenção também alterou a concentração de outros elementos químicos (cobalto, arsênio, manganês, bário, chumbo, cobre, zinco, alumínio, ferro e magnésio) no plasma, eritrócitos e fezes ($p < 0,001$). Esse estudo foi inédito em reportar os efeitos da intervenção com castanha-do-brasil na comunidade bacteriana intestinal. Apesar da composição global do microbioma intestinal não ter sido alterada após a ingestão de castanha, a abundância de gêneros importantes à saúde humana, como *Faecalibacterium*, *Bilophila* e *Bulleidia*, foi aumentada. Além disso, o perfil metalômico nas fezes também influenciou a constituição e distribuição de grupos bacterianos, após o consumo da noz. Observamos também correlações significativas entre os minerais avaliados e as bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, como *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Oscillospira* e *Coprococcus*. Portanto, pode-se concluir que a intervenção com castanha-do-brasil beneficiou a constituição e distribuição da microbiota intestinal e evidenciou a influência do perfil metalômico nas fezes sobre grupos bacterianos importantes à saúde humana.

Palavras chave: Castanha-do-brasil, microbiota, minerais, selênio, estado nutricional.

HASHIMOTO, L.L. Mineral supplementation through Brazil nuts can modulate the intestinal microbiota of healthy individuals [Doctoral Thesis]. Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo. Sao Paulo, 2019.

Brazil nut is a food of high nutritional complexity, due to the high selenium content, micronutrient with antioxidant and anti-inflammatory action, and other important components such as fibers, unsaturated fatty acids, phenolic compounds and various minerals, like zinc, copper and magnesium. This nut is widely consumed by the Brazilian and world population and its health effects must be understood in all aspects. To date, the effects of ingestion of this nut on the constitution of intestinal bacteria were unknown, whose relevance has been exponentially proven in the national and world literature due to its participation in important processes of health and disease. In this sense, the objective of this work was to evaluate the composition of the intestinal microbiota and the mineral profile (metalloma) in the organism after ingestion of Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). This prospective study consisted of 97 subjects without chronic noncommunicable diseases of both genders, with a mean age of 28.7 ± 8.5 years. Participants were evaluated before and after supplementation with one unit of Brazil nut ($\sim 370 \mu\text{g}$ selenium) per day for 60 days for mineral status (plasma, erythrocytes and feces), glutathione peroxidase (GPX), selenoprotein P (SEPP) concentration, assessment of food intake (24-hour dietary recall) and characterization of the intestinal microbiome. Raw microbiome data were analyzed using Quantitative Insight into Microbial Ecology software (v1.9.0) and statistics were performed using the R package (v1.1.463). Our results indicated that Brazil nuts significantly improved the selenium status of the population, according to the significant increase in concentrations in the body (plasma, erythrocytes and feces) and its functional markers (selenoprotein P and GPX activity) ($p < 0.0001$). The intervention also altered the concentration of other chemical elements (cobalt, arsenic, manganese, barium, lead, copper, zinc, aluminum, iron and magnesium) in plasma, erythrocytes and feces ($p < 0.001$). This study was unprecedented in reporting the effects of Brazil nut intervention on the intestinal bacterial community. Although the overall composition of the intestinal microbiome did not change after ingestion of nuts, the abundance of genera important to human health, such as *Faecalibacterium*, *Bilophila* and *Bulleidia*, was increased. In addition, the metallomic profile in faeces also influenced the constitution and distribution of bacterial groups after nut consumption. We also observed significant correlations between the evaluated minerals and short chain fatty acid producing bacteria, such as *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Oscillospira* and *Coprococcus*. Therefore, it can be concluded that the intervention with Brazil nuts benefited the constitution and distribution of the intestinal microbiota and evidenced the influence of the fecal metallomic profile on bacterial groups important to human health.

Keywords: Brazil nuts, microbiota, minerals, selenium, nutritional status.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	CASTANHA-DO-BRASIL	24
2.1.1	SELÊNIO.....	25
2.1.2	OUTROS MINERAIS.....	31
2.2.1	MICROBIOMA INTESTINAL.....	34
2.3	O PAPEL DOS MINERAIS NO MICROBIOMA.....	39
3	HIPÓTESE.....	48
4	OBJETIVOS.....	50
	Geral.....	51
	Específicos	51
5	CASUÍSTICA	52
5.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	53
5.2	ASPECTOS ÉTICOS E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	53
5.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	54
6	MÉTODOS.....	54
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL	54
6.2	AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	55
6.2.1	Peso	55
6.2.2	Estatura	55
6.2.3	Índice de Massa Corpórea	56
6.3	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	56
4.9.1	Sangue	56
4.9.2	Fezes	56
6.4	CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO	57
6.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	57
6.5.1	Concentração de minerais no plasma, nos eritrócitos e nas fezes..	57
6.5.2	Atividade enzimática da GPX.....	57
6.5.3	Concentração plasmática de SEPP	57
6.5.4	Concentração sérica de LBP.....	58
6.6	AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	58
6.7	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	58
6.8	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	59
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
7	RESULTADOS	62

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL	63
7.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	64
7.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	66
7.4 INGESTÃO ALIMENTAR	70
7.5 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	71
7.5.1 Dados descritivos do microbioma	71
7.5.2 Influência da castanha-do-brasil e dos marcadores bioquímicos na composição global da microbiota	71
7.5.3 Enterótipos	76
7.5.4 Alfa diversidade	78
7.5.5 Associação entre gêneros e parâmetros bioquímicos	80
7.5.6 OTUs que mudaram	83
8 DISCUSSÃO	88
8.1 A CASTANHA-DO-BRASIL	88
8.2 INFLUÊNCIA DA CASTANHA-DO-BRASIL NOS MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	90
8.3 EFEITOS DA INGESTÃO DE CASTANHA-DO-BRASIL NO MICROBIOMA INTESTINAL.....	96
9 CONCLUSÕES	107
10 REFERÊNCIAS	110
APÊNDICES.....	121
ANEXOS.....	122
ANEXO 1. Questionário de caracterização da população.	123
ANEXO 2. Orientações para participação da pesquisa.....	125
ANEXO 3. Parecer Consubstanciado – CEP/FCF/USP.....	126
ANEXO 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	130
ANEXO 5. Ficha de recordatório alimentar de 24 horas.....	132
ANEXO 6. Ficha do aluno	133

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vias metabólicas de selênio dietético em humanos. São Paulo, 2019.	28
Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo de selênio no organismo humano. São Paulo, 2019.	28
Figura 3. Distribuição de formas conhecidas de selênio em bactérias. São Paulo, 2019.	45
Figura 4. Ocorrência e composição de selenoproteoma em bactérias. São Paulo, 2019.	44
Figura 5. Modelo proposto da homeostase de selênio em bactérias (Adaptado de LIN, 2015). São Paulo, 2017.	46
Figura 6. Distribuição percentual dos participantes segundo marcadores do <i>status</i> de selênio. São Paulo, 2019.	67
Figura 7. Distribuição das amostras de acordo com o tempo, utilizando as matrizes de distância UniFrac unweighted (a) e weighted (b). São Paulo, 2019.	72
Figura 8. Gráfico de coordenada principal segundo concentração de selênio nas fezes no T0 e T1, construído com as distâncias UniFrac weighted (a) e unweighted (b). São Paulo, 2019.	74
Figura 9. Gráfico de coordenada principal segundo concentração de minerais nas fezes, construído com as distâncias UniFrac weighted (a) e unweighted (b) de ambos os tempos (n=194). São Paulo, 2019.	75
Figura 10. Análise de coordenada principal dos enterótipos identificados. São Paulo, 2019.	76
Figura 11. Correlações entre métricas de alfa diversidade e marcadores bioquímicos em ambos os tempos. São Paulo, 2019.	81

Figura 12.	Correlação entre a variação (delta) da abundância de gêneros e biomarcadores avaliados entre os tempos. São Paulo, 2019.	83
Figura 13.	Regressão linear entre minerais nas fezes e os gêneros modificados com a suplementação de castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.	85

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Estudos nacionais sobre o estado nutricional de populações saudáveis. São Paulo, 2019.	30
Tabela 2	Características de importantes minerais da castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.	32
Tabela 3.	Composição centesimal e concentração de minerais das castanhas-do-brasil utilizadas na intervenção do estudo. São Paulo, 2019.	63
Tabela 4.	Perfil de ácidos graxos da castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.	64
Tabela 5.	Dados descritivos dos participantes do estudo. São Paulo, 2019.	65
Tabela 6.	Marcadores de selênio na população de estudo. São Paulo, 2019.	67
Tabela 7.	Concentração dos minerais avaliados no plasma, nos eritrócitos e nas fezes. São Paulo, 2019.	68
Tabela 8.	Ingestão alimentar habitual dos indivíduos antes e após a suplementação. São Paulo, 2019.	70

Tabela 9.	Resultados da PERMANOVA em relação a microbiota e marcadores bioquímicos. São Paulo, 2019.	72
Tabela 10.	Comparações das variáveis bioquímicas entre os enterótipos. São Paulo, 2019.	77
Tabela 11.	Abundância relativa da microbiota em diferentes níveis antes e após da suplementação de castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.	78
Tabela 12.	Índices de alfa diversidade das amostras antes (T0) e após (T1) a intervenção. São Paulo, 2019.	80
Tabela 13.	Estudos com suplementação de castanha-do-brasil e status de selênio realizados no Brasil. São Paulo, 2019.	92
Tabela 14.	Estudos de intervenção com oleaginosas na composição do microbioma. São Paulo, 2019.	102

LISTA DE ABREVIATURAS

(CH ₃) ₂ Se	Dimetilselenido
(CH ₃) ₃ Se ⁺	Íon trimetilselênio
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
Al	Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
As	Arsênio
Ba	Bário
Cd	Cádmio
CH ₃ Sec	Metilselenocisteína
CH ₃ SeH	Metilselenol
Co	Cobalto
CTR1	Transportador de cobre
Cu	Cobre
DMT1	Transportador de metais bivalente 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
EER	<i>Estimated energy requeriment</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
EFSec	Fator de alongação específico da selenocisteína
Fe	Ferro
GPX	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSeSG	Selenodiglutathiona
H ₂ Se	Selenido
Hb	Hemoglobina
HCP1	Proteína carreadora de heme
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HGAAS	Espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo
HSePO ₂ ³⁻	Selenofosfato
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
IMC (BMI)	Índice de Massa Corpórea
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
K ⁺	Íon potássio
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LG	Livre de germes
LBP	Lipopolissacarídeo
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
nm ⁵ s ² U	5-metilaminometil-2-tiouridina
Mo	Molibdênio
MsrB1	Metionina-R-sulfóxido redutase
Na ⁺	Íon sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde

Pb	Chumbo
PCR	Reações de polimerase em cadeia
RDA	Ingestão diária recomendada
RNAr	RNA ribossomal
RNAm	RNA mensageiro
RO	Rondônia
SBP2	<i>Substrate-binding protein</i>
Se	Selênio
Sec	Selenocisteína
Sec-tRNA ^{[ser]sec} :	RNA transportador de selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção de selenocisteína
SelA	Selenocisteína sintase
SelB	Fator de alongamento específico para selenocisteína em bactérias
SelD	Selenofosfato sintetase
SelU	5-metilaminometil-2-selenouridina
SELK	Selenoproteína K
SeMet	Selenometionina
SeO ₂	Dióxido de selênio
SEP15	Selenoproteína 15
SEPP	Selenoproteína P
SM	Salário mínimo
Sr	Estrôncio
T0	Tempo 0
T1	Tempo 1
YbbD	2-selenouridina sintase
YqeB	Proteína não caracterizada
YqeC	Proteína não caracterizada
γ-glutamil-CH ₃ Sec	γ -glutamilmetilselenocisteína
ZIP	Proteína de transporte e importação de zinco
Zn	Zinco
Znt	Transportador de zinco

== INTRODUÇÃO ==

1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é um alimento nacional de grande importância socioeconômica e nutricional. Além de ser fonte geradora de empregos e renda na região amazônica, essa castanha é notável por seu consumo disseminado pela população brasileira e mundial. Nutricionalmente, a castanha-do-brasil se destaca pelo alto conteúdo de selênio e tem sido adotada como uma alternativa alimentar de suplementação desse micronutriente. A composição da castanha também apresenta compostos fenólicos, ácidos graxos insaturados, fibras e outros minerais, como zinco, ferro, bário e cobre (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2016; CARDOSO *et al.*, 2017).

A relevância do selênio para saúde humana se dá por sua incorporação no aminoácido selenocisteína, presente nas 25 selenoproteínas identificadas atualmente no genoma humano. Entre elas, a classe das glutatona peroxidases (GPX) desempenha ação fisiológica mais importante, responsável por catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos em água e os correspondentes álcoois (GLADYSHEV *et al.*, 2016).

Apesar de estarem presentes em pequenas concentrações, a ampla variedade de elementos traço adiciona outras propriedades à castanha-do-brasil, tais como participações em eritropoese, regulação da ATP, metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, formação óssea e de vasos sanguíneos, modulação do sistema imune, entre outras. Devido a essas características, a castanha pode ser utilizada para enriquecer nutricionalmente a dieta e auxiliar na manutenção da saúde, na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis e/ou complementar o tratamento de doenças já existentes (RAYMAN, 2008).

Além disso, os componentes de nozes foram considerados substratos prebióticos para o microbioma intestinal (LAMUEL-RAVENTOS e ONGE, 2017). A microbiota intestinal exerce ações fundamentais nos processos de digestão e absorção de nutrientes, síntese de vitaminas, metabolização de xenobióticos, proteção contra bactérias patogênicas, homeostase do epitélio intestinal, entre outras (JANDHYALA *et al.*, 2015). Em troca, o organismo fornece nutrientes utilizados pelas bactérias para respiração celular, produção de energia,

transferência e armazenamento de elétrons, garantindo seu crescimento e sobrevivência (LOPEZ e SKAAR, 2018). A relação microbiota-hospedeiro em homeostase é nomeada simbiose e tem sido associada com a promoção ou reestabelecimento da saúde intestinal, possivelmente reduzindo o risco de desenvolvimento e/ou auxiliando no tratamento de doenças (OTTMAN *et al.*, 2012; AZIZ *et al.*, 2013; CANFORA *et al.*, 2019; FRANZOSA *et al.*, 2019).

Por tais aplicações, estratégias nutricionais têm sido investigadas com o intuito de modular o ecossistema bacteriano. Alterações na composição de macronutrientes ou da dieta já foram descritas como eficazes na alteração da constituição e atividade metabólica da microbiota e isto, por sua vez, tem efeitos nas respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro (WU *et al.*, 2011; SCOTT *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2014). A disponibilidade de micronutrientes no cólon é também um fator determinante para replicação de bactérias e sua atividade metabólica e/ou virulência (LOPEZ e SKAAR, 2018). Nos últimos anos, estudos metagenômicos forneceram esclarecimentos significativos sobre o metabolismo e a homeostase de metais em bactérias, como selênio, zinco, cobre, ferro, níquel, cobalto e molibdênio (ZHANG *et al.*, 2006, 2008, 2009; ZHANG e GLADYSHEV, 2008a, 2009, 2010; ZHANG, YING e XU, 2019).

Nesse contexto, a investigação dos efeitos do consumo de castanha-do-brasil na microbiota intestinal é de extrema relevância, visto o potencial modulador de seus nutrientes na composição de bactérias do intestino, beneficiando a saúde intestinal e global do indivíduo.

REVISÃO DA
LITERATURA



2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) tem sido foco de estudos que avaliam desde sua composição química até os efeitos de sua ingestão em condições de saúde e doença, sendo associada a efeitos antioxidantes, anti-proliferativos e anti-inflamatórios (CARDOSO *et al.*, 2017). Somado-se a isso, essa noz é um alimento nacional de alto impacto socioeconômico, pelo grande volume de produção no Brasil, além de ser amplamente consumida pela população brasileira e mundial.

Integrante da família *Lecythidaceae*, a castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma planta acumuladora de minerais, cujas principais características são alta taxa de absorção de metais pesados, rápida translocação da raiz para as partes aéreas da planta e maior capacidade de desintoxicar e sequestrar metais pesados nas folhas. Tais processos são determinados pela superexpressão de genes que codificam transportadores transmembranares (RASCIO e NAVARI-IZZO, 2011).

Em sua composição, a castanha-do-brasil contém alto conteúdo de lipídeos (60 a 70%), sendo que cerca de 75% dos ácidos graxos presentes são mono e polinsaturados, os quais contribuem para efeitos benéficos, como redução da colesterolemia total e resistência da LDL à oxidação (PIRES, 2012; COLPO *et al.*, 2013; COLPO *et al.*, 2014). Contudo, a quantidade de gordura ingerida em uma castanha corresponde a aproximadamente 3 g, o que se torna irrelevante frente ao total adquirido pela dieta.

Estudos recentes também reportaram a presença de compostos bioativos na castanha-do-brasil, como os compostos fenólicos, porém os dados quantitativos ainda são escassos (PIRES, 2012; YANG, 2009). Pires (2012) verificou a presença de 3,98 mg de fenólicos por grama de castanha-do-brasil, o que corresponde a cerca de 19,9 mg por noz. Esses compostos contribuem para a capacidade antioxidante desse alimento, assim como promovem benefícios relacionados à função cardiovascular, modulando parâmetros vasculares, perfil lipídico, estresse oxidativo, inflamação e função endotelial (KEMPERMAN *et al.*, 2013).

Essa noz apresenta quantidades relativamente pequenas de fibras e minerais, como manganês, cobre e ferro (FREITAS e NAVES, 2010; PIRES, 2012; COLPO *et al.*, 2013; COLPO *et al.*, 2014). No entanto, em comparação a outros tipos de nozes, a castanha-do-brasil se destaca pela maior capacidade de assimilar e acumular selênio em sua matriz alimentar, sendo a melhor fonte desse mineral na natureza (WHITE, 2016). Em vista disto, tem sido utilizada como uma alternativa de suplementação alimentar desse elemento (RAYMAN, 2008; YANG *et al.*, 2009).

2.1.1 SELÊNIO

O selênio é um micronutriente essencial para diversas funções na saúde humana, por meio de sua incorporação no aminoácido selenocisteína (Sec), presente nas 25 selenoproteínas identificadas atualmente no genoma humano. Atribuem-se a elas as funções de regulação do metabolismo de hormônios tireoidianos, participação na síntese de DNA, modulação da resposta imune e da fertilidade, remoção de peróxidos que promovem danos às células, regulação da sinalização *redox*, transporte e armazenamento de selênio, entre outras (WEEKS *et al.*, 2012; GLADYSHEV *et al.*, 2016).

Destaca-se como a ação fisiológica mais importante do selênio sua participação em processos do sistema de defesa antioxidante, sendo principalmente desempenhada por meio das glutathionas peroxidases (GPX). Esta classe de selenoproteínas é responsável por catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos em água e os correspondentes álcoois, tipicamente utilizando a glutathiona (GSH) como redutor. Em humanos, foram identificadas 5 isoformas de GPX, dentre as quais a glutathiona peroxidase-1 (GPX1) é a principal mediadora dos efeitos protetivos do selênio contra o estresse oxidativo (GLADYSHEV *et al.*, 2016).

Para garantir o funcionamento ótimo das selenoproteínas, é necessário que haja o suprimento adequado de selênio pela dieta. O estabelecimento de recomendações de ingestão para este mineral foi baseado na maximização da atividade da GPX, uma vez que esta atinge um platô no plasma. A recomendação de ingestão diária atualmente utilizada é de 55 µg/dia para adultos (IOM, 2000). Entretanto, estudos mais recentes indicaram que a selenoproteína P pode ser um melhor biomarcador para a avaliação da ingestão

alimentar de selênio e de seu *status* no organismo (HURST *et al.*, 2013; KIPP *et al.*, 2015). Recentemente, a *European Food Safety Authority* (EFSA) revisou as recomendações dietéticas para esse mineral e concluiu que o valor proposto pelo *Institute of Medicine* (2000) não seria suficiente para atingir o platô de selenoproteína P. Assim, propuseram que 70 µg/dia seria um valor mais adequado de acordo com esse parâmetro (EFSA, 2014).

O selênio entra na cadeia alimentar por meio das formas inorgânicas, como selenito e selenato, e orgânicas, como selenometionina (SeMet), selenocisteína (Sec) e outros análogos de aminoácidos sulfurados. A SeMet é o principal composto presente nos alimentos, sendo sintetizado apenas por plantas e incorporado inespecificamente como mimético do aminoácido metionina. De acordo com estudos de especiação, esta é forma de selênio predominante na castanha-do-brasil (SILVA *et al.*, 2013). A selenocisteína pode ser sintetizada por animais e alguns microrganismos e incorporada a selenoproteínas. As formas inorgânicas são encontradas em alimentos fortificados e suplementos alimentares (COMBS, 2015). As fontes alimentares com maior teor de selênio são os alimentos de origem animal e alguns de origem vegetal, como brócolis, grãos integrais e castanha-do-brasil, a qual é considerada sua melhor fonte devido ao alto teor e ótima biodisponibilidade desse mineral (SILVA *et al.*, 2013).

O teor de selênio nos alimentos é dependente da sua concentração no solo de cultivo, que varia de acordo com as características geológicas e geográficas, fatores climáticos, capacidade da planta de assimilar e acumular selênio e atividade microbiana no solo (RAYMAN, 2008). A concentração de selênio presente no solo de diferentes regiões, até de um mesmo país, pode ocorrer de forma heterogênea, como exemplificado no estudo de Shaltout *et al.* (2011). Estes autores observaram que feijões cultivados no estado de São Paulo apresentavam concentrações de selênio inferiores às variedades cultivadas no estado do Ceará, onde os solos apresentam maiores concentrações de selênio.

Mesmo avaliando uma única região do país, observam-se diferenças no teor de selênio dos alimentos produzidos. Castanhas-do-brasil cultivadas no estado do Amazonas variam sua concentração de 25 a 115 µg selênio/g, devido às diferentes condições ambientais em safras distintas (ROCHA, 2009; COMINETTI *et al.*, 2012; PIRES, 2012). Um estudo recente realizado em nosso

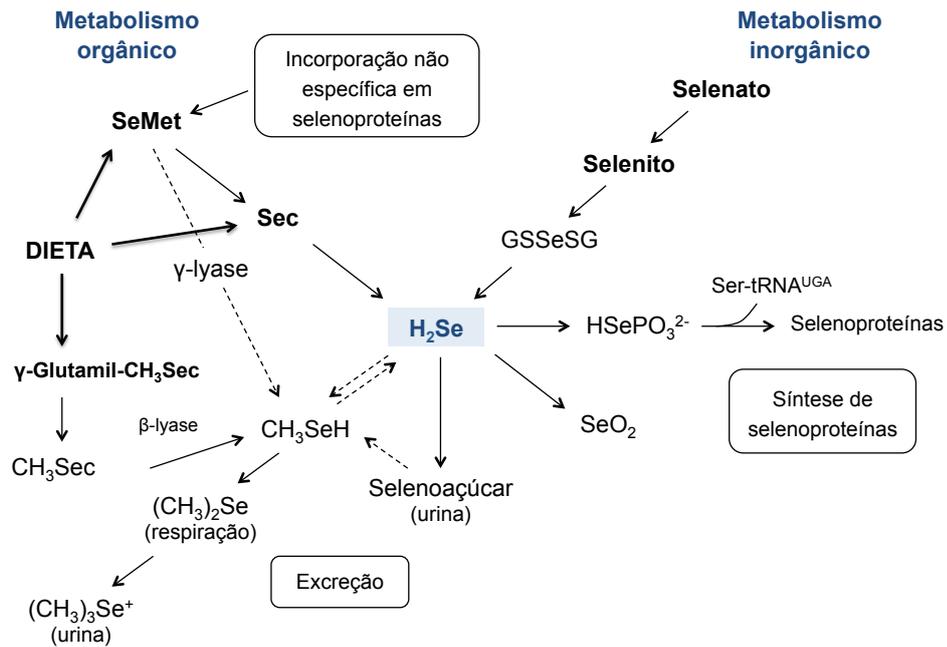
laboratório avaliou as concentrações de selênio de castanhas-do-brasil comercializadas em diferentes localidades do país. No estado de São Paulo, as castanhas variaram de 29,0 a 241,9 µg por noz, o que implica na quantidade a ser ingerida pela população.

O selênio proveniente da dieta geralmente é bem absorvido pelo organismo, porém este processo depende da forma em que o mineral se encontra. Considera-se que as formas orgânicas possuem maior biodisponibilidade e retenção no organismo. A absorção de selenito depende de um gradiente Na^+/K^+ e ATPase, já para o selenato ocorre principalmente no duodeno por difusão simples. Por sua vez, a SeMet é absorvida no intestino delgado mediada por um transporte duplo ativo de Na^+ e aminoácidos neutros. Além disto, a SeMet pode ser incorporada diretamente em proteínas por meio de substituição da metionina. Quanto a Sec, sua absorção está diretamente relacionada à sua incorporação nas selenoproteínas (SUZUKI *et al.*, 2005).

Após a absorção, as diferentes formas de selênio seguem por vias metabólicas distintas, que convergem em um metabólito central, o selenido de hidrogênio (H_2Se), formando um *pool* de selênio no fígado (Figuras 1 e 2). A partir desse local, o selênio é direcionado a três possíveis destinos: transporte, síntese de selenoproteínas ou excreção (Figura 2). O selênio circulante está presente predominantemente sob a forma de selenoproteína P e é transferido como resíduos de selenocisteína para a síntese de outras selenoproteínas nos tecidos.

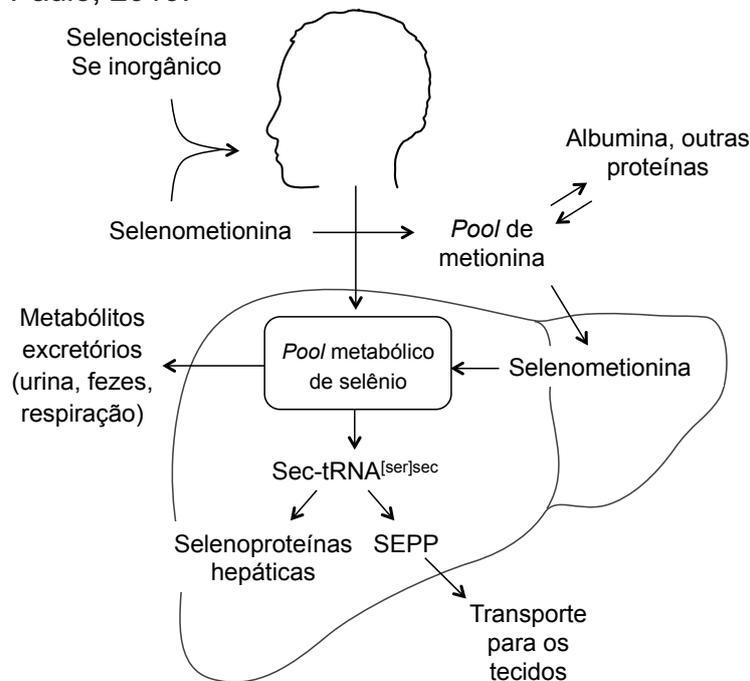
O processo de síntese de selenoproteínas apresenta um recurso especial na fase de tradução, a qual é caracterizada pela recodificação do *stop codon* UGA para ser lido como um códon *sense*, a fim de incorporar a selenocisteína nas proteínas. Para isto, é necessário um conjunto de estruturas secundárias específicas nas regiões 3' não traduzidas, denominadas elementos de sequência de inserção de selenocisteína (SECIS), as quais recrutam uma proteína ligadora de SECIS denominada SBP2 (*Substrate-Binding Protein*), que age na captação do fator de alongação específico da selenocisteína (EFSec) e de seu tRNA cognato (tRNA^{Sec}). A maioria dos RNAm das selenoproteínas, exceto a SEPP, contém um único resíduo de selenocisteína por cadeia peptídica (REEVES e HOFFMANN, 2009; KOSSINOVA *et al.*, 2013).

Figura 1. Vias metabólicas de selênio dietético em humanos. São Paulo, 2019.



Legenda: SeMet: selenometionina; Sec: selenocisteína; GSSeSG: selenodiglutationa; γ-glutamil-CH₃Sec: γ-glutamilmethylselenocisteína; H₂Se: selenido de hidrogênio; HSePO₃²⁻: selenofosfato; CH₃Sec: metilselenocisteína; CH₃SeH: metilselenol; (CH₃)₂Se: dimetilselenido; SeO₂: dióxido de selênio; (CH₃)₃Se⁺: íon trimetilselênio. Fonte: Adaptado de RAYMAN *et al.* (2008) e COMBS (2015).

Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo de selênio no organismo humano. São Paulo, 2019.



Legenda: SEPP: selenoproteína P; Sec-tRNA^{[ser]sec}: RNA transportador de selenocisteína. Fonte: Adaptado de COUSINS *et al.* (2016) e BURK e HILL (2015).

O *status* de selênio no sangue pode ser avaliado por meio de biomarcadores diretos e indiretos. Na categoria de parâmetros diretos, Combs (2015) classifica os que fornecem informações diretas sobre a função fisiológica do mineral no organismo, como GPX1, GPX3 e SEPP. A GPX1 pode ser avaliada nos eritrócitos, linfócitos e células bucais e a GPX3 e SEPP são as principais selenoproteínas encontradas no plasma. A atividade dessas enzimas e a concentração de selênio no sangue podem ser utilizadas para identificar o risco nutricional e são diretamente influenciadas pela ingestão alimentar desse micronutriente. Os biomarcadores indiretos de selênio fornecem informações por meio de inferências baseadas na ingestão alimentar do mineral e nas concentrações nos tecidos, urina e fezes (COMBS, 2015).

Estudos nacionais avaliaram o estado nutricional relativo ao selênio de populações de diferentes regiões (DONADIO, 2011; COLPO *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2015). Em um trabalho realizado em São Paulo com 124 indivíduos adultos sem doenças crônicas não transmissíveis, observou-se que a maior parte dos participantes estavam deficientes em selênio, como indicado pelas concentrações médias do mineral no plasma, abaixo dos valores de referência propostos para essa população (THOMPSON, 2004) (Tabela 1). Estes dados refletiram a ingestão dietética deficiente em selênio, presente em 57% dos indivíduos do estudo (DONADIO, 2011). Em contrapartida, Santos (2013) retratou que indivíduos adultos residentes em Fortaleza (CE), onde o solo possui maior teor de selênio, apresentaram ingestão média de 76,9 µg selênio/dia, sendo inadequada em apenas 15,1% da amostra, o que resultou em concentrações médias plasmáticas e eritrocitárias dentro dos valores de referência para a maioria dos participantes. O fato do solo de São Paulo apresentar baixa concentração de selênio pode explicar parcialmente tal diferença entre a população.

Contudo, sabe-se que as escolhas alimentares também são determinantes para o *status* de selênio, o que pode justificar a diferença nos biomarcadores desse elemento entre as populações de São Paulo (**Tabela 1**). Da mesma forma, foi observada diferença significativa na ingestão alimentar e nos parâmetros bioquímicos de selênio entre crianças de duas regiões de Rondônia (ROCHA *et al.*, 2014).

Tabela 1. Estudos brasileiros sobre o estado nutricional de populações saudáveis. São Paulo, 2019.

Estudo	População	Se plasma (µg/L)	Se eritrócitos (µg/L)	Atividade da GPX (U/g Hb)	Ingestão alimentar (µg/dia)
DONADIO <i>et al.</i> , 2011	124 adultos (SP)	54,1 ± 22,5	56,1 ± 44,4	40,2 ± 17,6	41,2 ± 49,2*
DONADIO, 2016	116 adultos (SP)	96,7 ± 29,6	184,3 ± 87,4	64,5 ± 18,3	-
SANTOS, 2013	176 adultos (CE)	62,6 ± 11,5	101,5 ± 21,1	38,6 ± 13,7	76,9 ± 47,5*
ROCHA <i>et al.</i> , 2014	11 crianças (RO)	189,1 ± 58,7	235,0 ± 105,6	-	179,0 ± 207,0 [‡]
	31 crianças (RO)	41,9 ± 18,7	97,6 ± 26,3	-	41,8 ± 33,4 [‡]
ROCHA <i>et al.</i> , 2016	149 mulheres (RO)	49,8 ± 19,3	77,4 ± 30,5	45,2 ± 20,5	48,8 ± 20,4*
Valores de referências		78,9 – 94,7 ¹	90 - 190 ²	27,5 – 73,6 ³	23 [‡] / 55*

Legenda: ¹THOMPSON, 2004; ²ORTUÑO, 1997; ³Referência do kit comercial utilizado. [‡]Ingestão dietética recomendada para crianças (IOM, 2000). *Ingestão dietética recomendada para adultos (IOM, 2000). Se: selênio; GPX: glutathione peroxidase.

Estudos epidemiológicos e clínicos têm relacionado a deficiência de selênio com o risco de desenvolvimento e/ou progressão de doenças, como câncer, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças neurológicas, cardiovasculares, infecções, entre outras (BROWN e ARTHUR, 2001; PETERS *et al.*, 2007; RAYMAN, 2008). Estudos brasileiros observaram deficiência de selênio em diferentes populações, incluindo pacientes renais crônicos em hemodiálise, com doença de Alzheimer, obesidade, leucemia linfocítica aguda, diabetes *mellitus* tipo 1, síndrome de Turner e em choque séptico (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2016; COMINETTI *et al.*, 2012; ALMONDES *et al.*, 2014; PIRES, 2012; PIRES *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2014).

Em vista da prevalência de deficiência de selênio na população e do consequente aumento do risco de desenvolver doenças, a suplementação de selênio é uma boa estratégia para melhorar o estado nutricional relativo a este mineral. Pragmantidis *et al.* (2008) avaliaram o efeito da suplementação com 100 µg Se/dia por 6 semanas em 39 participantes ingleses sem doença e observaram aumento de 18,5% (93,9 ± 1,7 para 111,3 ± 2,0 µg/L) na concentração de selênio no plasma (p<0,001) e mudanças na expressão de algumas selenoproteínas,

como selenoproteína 15 (SEP15) e K (SELK). Concluiu-se que a suplementação de selênio pode levar ao aumento da regulação de vários genes envolvidos na biossíntese de proteínas, o que reflete em maior síntese de selenoproteínas com aumento de sua atividade em linfócitos.

No estudo de Cominetti *et al.* (2012), após a suplementação de selênio com castanha-do-brasil (290 µg) por oito semanas em mulheres obesas, observou-se aumento das concentrações plasmáticas ($55,7 \pm 13,3$ para $132,5 \pm 34,9$ µg/L) e eritrocitárias ($60,5 \pm 22,6$ para $205,9 \pm 42,0$ µg/L) do mineral ($p < 0,0001$), bem como da atividade eritrocitária da GPX ($36,6 \pm 17,1$ para $53,6 \pm 20,4$ µg/g Hb) ($p < 0,0001$). Da mesma forma, a suplementação com uma noz de castanha-do-brasil, cuja concentração média de selênio era de 290,5 µg, por 3 meses, promoveu aumento significativo da concentração de selênio no plasma, de $17,0 \pm 15,1$ para $158,1 \pm 87,2$ µg/L ($p < 0,0001$), e da atividade da GPX, de $33,6 \pm 5,1$ para $40,0 \pm 8,5$ nmol/mL/min ($p < 0,0001$) em 40 pacientes em hemodiálise (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2014). Observa-se, portanto, aumento da atividade de enzimas selenodependentes após a suplementação de selênio por meio da castanha-do-brasil, indicando que o *status* funcional de selênio pode ser melhorado por meios nutricionais.

O estado nutricional relativo ao selênio dos indivíduos é, portanto, influenciado por diversos fatores, como a eficiência dos processos biológicos de digestão, absorção e síntese de selenoproteínas, assim como pela composição da dieta, interação de selênio com outros minerais, presença de doenças, estado nutricional prévio do indivíduo relativo ao nutriente, presença de variações nos genes de selenoproteínas, competição do mineral com a microbiota intestinal, entre outros (COMBS, 2011). Entre esses fatores, a relação entre microbiota e *status* de selênio ainda é pouco explorada.

2.1.2 OUTROS MINERAIS

Apesar de estarem presentes em pequenas concentrações, a ampla variedade de elementos traço adiciona outras propriedades à castanha-do-brasil. Destacaremos nesta revisão os minerais ferro, zinco, cobre e metais como cádmio. As informações sobre o metabolismo e as funções de cada elemento estão resumidas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características de importantes minerais da castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.

Minerais	Funções/importância	Absorção	Fontes	RDA	Excreção	Deficiência	Toxicidade	Interação com nutrientes
Selênio	Integrante da enzima antioxidante glutathiona peroxidase, hormônio tireoidiano deiodinase, entre outras selenoproteínas.	Maior parte no duodeno. <u>SeMet e Sec:</u> transportadores de aminoácidos; <u>selenito:</u> processo ativo; <u>selenato:</u> difusão simples	Castanha-do-brasil, carnes, ovos, brócolis, grãos integrais, outros	55 µg	Urina e fezes	Doença de Keshan (cardiomiopatia) e de Kashin-Beck (osteoartrite endêmica)	Selenose (unhas e cabelos frágeis, alterações gastrointestinais, erupções cutâneas, odor de alho na respiração).	Associado negativamente com metais pesados
Ferro	Cofator de proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio (hemoglobina, mioglobina), síntese de DNA, produção de energia e respiração celular.	Maior parte no duodeno. <u>Ferro não heme:</u> DMT1 e lipocalina-2. <u>Ferro Heme:</u> HCP1	Carne vermelha, miúdos, frutos do mar, vegetais verdes escuro, etc	<u>Homens:</u> 8 mg; <u>Mulheres:</u> 18 (19 a 50 anos) ou 8 mg (acima de 51 anos)	Urina e fezes	Maior causa de anemia	Deposição em órgãos vitais (fígado, coração, pâncreas e glândulas endócrinas), estresse oxidativo, aumento do risco de câncer, cirrose hepática, doenças degenerativas, etc.	<u>Absorção aumentada:</u> ácido ascórbico, ácidos orgânicos, proteína da carne; <u>Absorção diminuída:</u> competição pela absorção através do DMT1 (zinco, cobre e cobalto), oxalatos, fosfatos, fibra alimentar.
Zinco	3 importantes papéis: <u>catalítico</u> (mais de 300 enzimas responsáveis pela síntese de DNA, desenvolvimento fetal, etc), <u>estrutural</u> (proteínas de replicação do DNA) e <u>regulatório</u> (regulação da atividade e estabilidade de proteínas)	Maior parte no duodeno. Transportadores de zinco são das famílias ZnT e ZIP.	Carne vermelha, frutos do mar, grãos integrais e cereais fortificados	<u>Homens:</u> 11 mg; <u>Mulheres:</u> 8 mg	Fezes, principalmente, e urina	Anorexia, disfunções imunológicas e gastrointestinais, lesões cutâneas, comprometimento de crescimento e desenvolvimento de crianças, infecções, etc	Náuseas e diarreia, até danos gastrointestinais graves e hemorragias	<u>Absorção diminuída:</u> Fitatos, fibras e cálcio (formação de complexos insolúveis); <u>Absorção aumentada:</u> Proteínas

Cobre	Constituinte de enzimas com atividade de oxidação e redução, respiração celular, oxidação e transporte de ferro, formação de pigmentos, biossíntese de neurotransmissores e formação do tecido conjuntivo	Maior parte no duodeno. Difusão facilitada pelos transportadores CTR1 e DMT1	Fígado, mexilhões, ostras, cereais integrais, castanha-de-caju, avelã, nozes e outras castanhas, sementes de girassol e abóbora	900 µg	Maior parte pela bile	Danos neurológicos (ataxia, mielopatia, marcha espástica), anemia, fragilidade anormal dos ossos, aterogênese, etc	Sintomas gastrointestinais, gosto metálico na boca, aumento do estresse oxidativo, deposição em órgãos (fígado, rins, cérebro), problemas neurológicos, etc.	<u>Absorção diminuída:</u> Excesso de zinco (competição pelo transportador DMT1 e retenção intracelular pela metalotioneínas) e cálcio (aumento do pH do duodeno, tornando os sais de cobre menos solúveis)
Cádmio	Inexistentes	Aumentada em dietas pobres em cálcio, ferro ou proteína	<u>Alimentos:</u> Vegetais folhosos, cereais, ostras, mariscos, sementes, arroz; <u>Contaminação:</u> Baterias, tintas e plásticos, soldagens, cigarro, esmalte, pigmentos, fertilizantes, queima de combustíveis fósseis, lixo urbano, sedimento de esgotos, etc.	Máximo: 25 µg/kg peso por mês	Urina e fezes (ambas lentas)	-	Dano renal com proteinúria devido ao acúmulo de cádmio nos rins, disfunção tubular renal, alterações cognitivas, velocidade motora, câncer de próstata, bronquite crônica, redução da visão. Altera metabolismo de cálcio, fósforo e vitamina D, osteoporose, doença itai-itai	Metais bivalentes (cálcio, ferro, zinco, manganês, cobre e cobalto e selênio) tem forte interação e reduzem a concentração de cádmio, assim como cádmio pode reduzir a absorção destes minerais

Legenda: RDA: Ingestão diária recomendada; DMT1: Transportador de metais bivalente 1; HCP1: Proteína carreadora de heme; Znt: Transportador de zinco; ZIP: Proteína de transporte e importação de zinco; CTR1: Transportador de cobre; SeMet: Selenometionina; Sec: Selenocisteína. Fonte: COZZOLINO, 2016.

2.2.1 MICROBIOMA INTESTINAL

O trato gastrointestinal abriga a maior e mais complexa comunidade de espécies bacterianas que coloniza o organismo humano. A composição da microbiota intestinal varia de 10^{11} a 10^{14} unidades formadoras de colônia/mL de conteúdo intestinal, sendo principalmente concentrada no cólon e ceco, de modo que o conteúdo fecal pode atingir 100 a 200 bilhões de células por grama de fezes (peso seco) (MACCAFERRI *et al.*, 2011; CANDELA *et al.*, 2014).

Apesar das flutuações temporais ocasionadas por tais fatores, o microbioma de adultos saudáveis é relativamente estável, de modo que a interrupção de uma intervenção resulta em retorno ao seu estado de equilíbrio inicial (BACKHED *et al.*, 2012). O estabelecimento do microbioma intestinal no início da vida, especialmente até os primeiros 1000 dias, é sugerido como determinante para a composição microbiana e susceptibilidade a doenças ao longo da vida, influenciando a maturação e o desenvolvimento intestinal, imune, cerebral e metabólico. O processo de desmame, introdução e diversificação da alimentação sólida e exposição a diferentes fatores ambientais promove o desenvolvimento inicial da microbiota nos primeiros anos de vida (OTTMAN *et al.*, 2012; WOPEREIS *et al.*, 2014).

A composição da microbiota intestinal é fortemente influenciada por uma ampla gama de fatores, incluindo tipo de parto e de alimentação na infância, condições sanitária e geográficas, fatores genéticos e imunológicos, idade, estresse, uso de medicamentos e probióticos e composição da dieta, sendo que os padrões dietéticos de longo prazo foram identificados como o fator primário de alteração da composição do microbioma intestinal (AZIZ *et al.*, 2013; VOREADES *et al.*, 2014; JANDHYALA *et al.*, 2015).

A investigação de uma composição central e compartilhada do microbioma entre os indivíduos (“*core microbiome*”) foi o objetivo principal do *Human Microbiome Project*, o maior consórcio de estudos da microbiota, conduzido com 250 voluntários saudáveis dos Estados Unidos (TURNBAUGH *et al.*, 2007). Os achados preliminares desta coorte confirmaram a alta variabilidade interindividual, o que raramente permite o agrupamento de indivíduos segundo composição de microrganismos. No entanto, táxons sub-representados numericamente e espécies menos abundantes também são fundamentais para funções no intestino (SHADE e HANDELSMAN, 2012; BELIZÁRIO e

NAPOLITANO, 2015). Assim, o microbioma saudável é previsto como um equilíbrio consistente da função e metabolismo, como é definida a simbiose, porém com características personalizadas pela genética do indivíduo, exposição ao ambiente, dieta, entre outros fatores (GEVERS *et al.*, 2012; SALONEN *et al.*, 2012).

Cada indivíduo possui uma assinatura única da microbiota intestinal, porém recentemente a comunidade bacteriana foi classificada de acordo com um perfil filogenético dominante, agrupado por análises de ordenação, denominado “enterótipo” (ARUMUGAN *et al.*, 2011). Neste estudo, o sequenciamento da microbiota intestinal permitiu identificar três enterótipos, dominados pelos gêneros *Bacteroides* (enterótipo 1), *Prevotella* (enterótipo 2) e *Ruminococcus* (enterótipo 3), em um padrão independente da nacionalidade, índice de massa corpórea, idade e sexo. Wu e colaboradores (2011) avaliaram a relação dessas variantes com padrões alimentares de curto e longo prazo, revelando que o enterótipo *Bacteroides* foi fortemente associado à ingestão usual de proteína animal, diferentes tipos de aminoácidos e gordura saturada, o que sugere que o consumo de carne vermelha é característico desse enterótipo. Em contraste, o enterótipo *Prevotella* foi associado a um consumo reduzido de produtos animais e alto de carboidratos e açúcares simples.

Em um estudo recentemente conduzido com 268 indivíduos brasileiros não diabéticos, foi identificada a presença dos três enterótipos na população avaliada: *Bacteroides* (n=111), *Prevotella* (n=55) e *Ruminococcaceae* (n=102). Observaram-se também correlações significativas dos enterótipos com parâmetros lipídicos, tais como *Bacteroides* com colesterol total e LDL, *Prevotella* com triglicérides, e *Faecalibacterium* com HDL-colesterol ($p < 0,05$). A significância biológica desses enterótipos ainda é inconclusiva, porém as correlações com o perfil lipídico sugerem que esses *clusters* podem contribuir na avaliação do risco cardiometabólico (MORAES, 2016).

Entretanto, o conceito de enterótipos ainda é discutível na comunidade científica, uma vez que não houve consistência na identificação dos enterótipos em outros estudos realizados em diferentes localidades (WU *et al.*, 2011; OU *et al.*, 2013; TYAKHT *et al.*, 2013; YATSUNENKO *et al.*, 2014). Nesses estudos, foi possível identificar apenas dois *clusters* (*Prevotella* e *Bacteroides*), que se caracterizavam como um gradiente contínuo entre as duas estruturas

bacterianas *Bacteroides* e *Prevotella* (JEFFREY *et al.*, 2012; KNIGHTS *et al.*, 2014). Diante disso, GORVITOVSKAIA *et al.* (2016) propuseram a classificação da comunidade dominante (*Prevotella* e *Bacteroides*) como biomarcadores de dieta, estilo de vida e estado de doença.

Além da arquitetura global do microbioma, a presença de gêneros específicos é indicadora de saúde ou doença e do perfil funcional da comunidade. As bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) se destacam nesse grupo por desempenhar importantes ações para a homeostase do intestino, metabolismo e saúde do hospedeiro (RIVIÈRE *et al.*, 2016). Esses compostos orgânicos são produtos finais da fermentação de carboidratos não digeríveis (incluindo celulose, amido resistente e inulina) por bactérias intestinais, sendo assim transformados em formas absorvíveis pelo trato gastrointestinal humano. Os AGCC podem ser quantitativamente e metabolicamente os produtos microbianos mais importantes do ser humano. As principais bactérias produtoras são *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia* spp., *Ruminococcus bromii*, *Bacteroides*, *Coprococcus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, entre outras (LEBLANC *et al.*, 2017).

A composição e diversidade da microbiota impactam significativamente as funções metabólicas do organismo, incluindo ações metabólicas (participação no processo de digestão e absorção de nutrientes, síntese de vitaminas e metabolização de xenobióticos), protetoras (proteção contra bactérias patogênicas por meio da produção de proteínas antimicrobianas e imunomodulação) e tróficas (modulação da diferenciação e proliferação de células do epitélio intestinal, influência no desenvolvimento e maturação do sistema imune da mucosa intestinal) (JANDHYALA *et al.*, 2015). Nota-se, portanto, que a microbiota expande substancialmente as capacidades metabólicas do hospedeiro (LEBLANC *et al.*, 2017). Em troca, o organismo fornece nutrientes utilizados pelas bactérias para produção de energia, garantindo sua sobrevivência. Assim, a relação entre microbiota saudável e hospedeiro tem sido designada como uma simbiose, na qual os organismos se beneficiam reciprocamente (AZIZ *et al.*, 2013).

Quando ocorre o desequilíbrio da composição da microbiota, com predomínio de microrganismos potencialmente prejudiciais em detrimento daqueles com potencial efeito benéfico à saúde, o processo é denominado

disbiose. Esse distúrbio está cada vez mais associado ao desenvolvimento de algumas desordens intestinais e doenças metabólicas, incluindo câncer colorretal, obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças inflamatórias intestinais, hipertensão arterial, entre outras (OTTMAN *et al.*, 2012; CANFORA *et al.*, 2019; FRANZOSA *et al.*, 2019).

Estratégias podem ser adotadas com o intuito de modular o ecossistema bacteriano, promovendo ou reestabelecendo a saúde intestinal, possivelmente reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças. Uma das possíveis alternativas é a intervenção nutricional, visto que a dieta tem influência considerável sobre o ambiente intestinal, como pH e tempo de trânsito no intestino, pode ser facilmente modificável e tem menor possibilidade de induzir efeitos colaterais no indivíduo (SCOTT *et al.*, 2013). Dessa maneira, a investigação dos alimentos ou nutrientes podem contribuir para o conhecimento e a aplicação de alternativas de modulação do microbioma, com o objetivo de manutenção da eubiose dos indivíduos e redução do risco de desenvolvimento de doenças.

Os exemplos clássicos de intervenção com o objetivo de modular positivamente a microbiota são os probióticos e prebióticos. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, podem melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e conferir benefícios à saúde do hospedeiro (ANVISA, 2008). Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são reconhecidos como benéficos devido à interação com o sistema imunológico, inibição competitiva de patógenos, redução da permeabilidade intestinal, participação no processo de fermentação de carboidratos não digeríveis e consequente produção de AGCC. Por sua vez, os prebióticos são ingredientes seletivamente fermentáveis, que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota intestinal (KOLIDA e GIBSON, 2011). Na prática clínica, esses produtos estão sendo utilizados no tratamento de condições relacionadas à disbiose, como diarreia e doenças inflamatórias intestinais, mesmo sem evidências concretas sobre seus efeitos (SAAD, 2006; CAMMAROTA *et al.*, 2014).

Estudos recentes indicam que a ingestão de macro e micronutrientes podem afetar a composição e atividade metabólica da microbiota e isto, por sua vez, tem efeitos nas respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro (SCOTT *et*

al., 2013). David *et al.* (2014) conduziram um estudo de intervenção com 10 indivíduos adultos recebendo dietas compostas exclusivamente por produtos de origem animal ou vegetal por 5 dias consecutivos. Indivíduos que consumiram dietas à base de produtos animais ingeriram maior teor de gordura e proteínas e menor de fibras em comparação ao grupo que recebeu apenas produtos de origem vegetal. A partir de dados obtidos por meio do sequenciamento em larga escala do RNAr 16S bacteriano, os autores observaram aumento da abundância de microrganismos tolerantes à bile (*Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides*) e diminuição de grupos de Firmicutes que metabolizam polissacarídeos de vegetais provindos da dieta (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*) no grupo que consumiu apenas alimentos de origem animal.

Além disso, após apenas um dia do início da intervenção, observou-se maior diversidade da microbiota associada à dieta baseada em produtos animais em comparação ao outro grupo. Entretanto, a microbiota fecal foi revertida ao seu estado original dois dias após o final do estudo, indicando a tendência da população bacteriana de indivíduos adultos retornar ao seu padrão inicial. Os autores concluíram que a microbiota intestinal pode responder rapidamente a alterações na dieta, pelo menos quando tal intervenção é tão drástica quanto a deste estudo, favorecendo grupos de bactérias de acordo com o padrão dietético adotado, o que representa consequências diferentes para a saúde humana (DAVID *et al.*, 2014).

2.3 O PAPEL DOS MINERAIS NO MICROBIOMA INTESTINAL

Outra possível estratégia para regulação da microbiota intestinal envolve sua modulação por elementos traços. A população bacteriana é sensível a mudanças nas concentrações de minerais, uma vez que são necessários para uma variedade de processos celulares fundamentais. Nos últimos anos, estudos metagenômicos comparativos forneceram esclarecimentos significativos sobre o metabolismo e a homeostase de metais em procariontes, como selênio, zinco, cobre, ferro, níquel, cobalto e molibdênio (ZHANG *et al.*, 2006, 2008, 2009; ZHANG e GLADYSHEV, 2008a, 2009, 2010; ZHANG, YING e XU, 2019).

A utilização dos metais é amplamente diversificada e dispersa entre as bactérias, que possuem mecanismos sofisticados de controle do metabolismo e homeostase de minerais. A começar, o sistema de captação de íons metálicos por bactérias consiste em canais iônicos não específicos ou transportadores de alta afinidade, como os transportadores de ligação de ATP (ABC) para ferro, zinco e molibdênio (ZHANG, YING e XU, 2019). Até o momento, não foi identificado um transportador específico para o selênio, cuja absorção ocorre pelo sistema de transporte de sulfato (LIN *et al.*, 2015).

Os metais participam do crescimento microbiano por 4 diferentes formas: I) como elétron para a respiração heterotrófica, II) como fonte de energia para o crescimento autotrófico, III) para transferência de elétrons entre células e IV) como material de armazenamento de elétrons (DONG *et al.*, 2016). Os metais também atuam como cofatores críticos de enzimas bacterianas responsáveis pela replicação e transcrição de DNA, ação antioxidante e respiração celular, como manganês, zinco e ferro para a superóxido dismutase bacteriana, selênio para selenoproteínas de bactérias, entre outros (LOPEZ e SKAAR, 2018).

De acordo com os achados, ferro e zinco são os metais utilizados por quase todos os organismos vivos (CAPDEVILLA, WANG e GIEDROC, 2016). O ferro é incorporado em diferentes cofatores de proteínas bacterianas que atuam no processo de transferência de elétrons, reações redox, replicação e proliferação. As bactérias participam da redução de ferro férrico extracelular em ferro ferroso e são capazes de aumentar a biodisponibilidade desse mineral pela conversão de ácido elágico (AE) em urolitina A (AU), o que impede a ligação de ferro³⁺ em AE e ambos permanecem em sua forma ativa (SKRYPNIK E SULIBURSKA, 2018; YILMAZ e LI, 2018).

A disponibilidade de micronutrientes no cólon é um fator determinante para replicação de bactérias, inclusive as patogênicas, e sua atividade metabólica e/ou virulência. Alternativas de defesa foram desenvolvidas pelo hospedeiro contra a sobrevivência e transmissão de patógenos, tanto pela limitação da disponibilidade desses metais, por meio de seu sequestro e quelação, quanto pela promoção da toxicidade do mineral, sobretudo pela indução de estresse oxidativo. Esse mecanismo denominado “imunidade nutricional” foi previamente descrito para ferro, zinco e manganês (CAPDEVILLA, WANG e GIEDROC, 2016).

Em contrapartida, os microrganismos desenvolveram diversas estratégias para neutralizar a proteção imposta pelo hospedeiro e manter suas concentrações adequadas dos minerais. Em situações de privação desse elemento, as bactérias são capazes de sintetizar carreadores de alta capacidade quelante de ferro férrico, chamados sideróforos, a fim de torná-lo mais solúvel para transporte e absorção via receptores de membrana específicos, como os transportadores de ligação de ATP (ABC). Portanto, a regulação desse mineral pelas bactérias é feita por meio da competição dos sideróforos com proteínas do hospedeiro pela ligação ao ferro, da regulação transcricional de proteínas de absorção (incluindo o regulador de absorção férrico, Fur, e o repressor da toxina da difteria, DtxR) ou sequestrando-o diretamente da estrutura de proteínas hospedeiras ligadas ao ferro (lactoferrina, hemoglobina, transferrina) (ANDREWS *et al.*, 2003; BECKER e SKAR, 2014; YILMAZ e LI, 2018).

A deficiência grave de ferro levou à redução na abundância de *Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Bacteroides* spp. e na produção de AGCC, como butirato e propionato, em ratos jovens. Por outro lado, a fortificação da dieta com ferro (35 mg ferro/kg peso) por 12 semanas após dieta deficiente nesse mineral aumentou significativamente a abundância de membros do *cluster* IV de *Clostridium* e a concentração de seu produto microbiano butirato (6 vezes maior) em comparação a ratos com depleção de ferro (DOSTAL *et al.*, 2014a). Em humanos, a suplementação de sulfato ferroso (50 mg) por 2, 12 ou 38 semanas não afetou significativamente os grupos bacterianos, a concentração fecal de AGCC ou a inflamação intestinal em comparação ao controle (DOSTAL *et al.*, 2014b).

Assim como o ferro, inúmeros estudos foram produzidos sobre o metabolismo e a função do zinco em bactérias. Esse mineral é o segundo cofator de metal mais abundante e um integrante chave de uma ampla variedade de enzimas, fatores de transcrição, proteínas estruturais, entre outras. Presume-se que aproximadamente dois terços das proteínas procarióticas dependentes de zinco sejam homólogas em eucariotos, sendo a maior parte promotora da catálise enzimática (ZHANG, YING e XU, 2019). Ao contrário dos organismos mais evoluídos, é mínima a utilização de zinco em proteínas de regulação da catálise e da transcrição do DNA em bactérias, devido escassez de fatores canônicos de transcrição do tipo “*zinc finger*” em procariotos. Tal diferença pode ser efeito da pressão evolutiva do ambiente para regular processos mais complexos em eucariotos, como a diferenciação celular, enquanto a diversidade de sítios catalíticos com zinco em procariotos promova maior número de reações enzimáticas em alvos diversos (CAPDEVILLA, WANG e GIEDROC, 2016).

A homeostase do *status* adequado de zinco em bactérias é controlada pelo regulador transcricional de absorção de zinco (Zur), o qual se liga em seu DNA alvo e aumenta a expressão de vários sistemas de aquisição desse metal, como os transportadores da família ABC e ZIP, em situação de deficiência (BECKER e SKAR, 2014). A insuficiência crônica de zinco levou ao aumento da população intestinal de *Proteobacteria* e *Enterobacteriaceae* e à diminuição de *Firmicutes* e da riqueza e diversidade microbiana em aves (REED *et al.*, 2015). A análise metagenômica revelou que concentrações subótimas de zinco levam à depressão de vias preditas de produção de AGCC e de absorção bacteriana do mineral, prejudicando a funcionalidade e saúde intestinal e perpetuando a deficiência de zinco. Estima-se que seja necessário o dobro da quantidade de zinco na dieta devido à utilização pelas bactérias (SMITH *et al.*, 1972).

Por outro lado, o excesso de zinco dietético é capaz de alterar significativamente a diversidade e estrutura microbiana em camundongos (ZACKULAR *et al.*, 2017). Observou-se que uma dieta com alta exposição de zinco por 5 semanas promoveu a diminuição de OTUs afiliadas a *Turicibacter* e *Clostridium* e o aumento de gêneros *Enterococcus* e *Clostridium* XI, sem modificar significativamente a carga bacteriana. No mesmo estudo, camundongos infectados pelo patógeno *Clostridium difficile* apresentaram exacerbação da doença após dieta com alto teor de zinco, devido ao aumento

da inflamação, dano da barreira epitelial, translocação bacteriana, concentração da toxina A do patógeno nas fezes e de IL-1 β no sangue dos animais. Quando tratados com doses muito menores de antibiótico (0,01 mg/ml cefoperazona), os camundongos alimentados com zinco adequado não foram mais susceptíveis à infecção e aumento da carga de *Clostridium difficile*, ao passo que altas doses de zinco tornaram os animais mais vulneráveis à doença. Esses dados indicam que os deslocamentos induzidos pelo zinco em excesso tornam a microbiota mais susceptível à doença e diminuem o limiar de antibiótico necessário para conter o patógeno.

Outro mineral que merece destaque no metabolismo microbiano é o cobre. Componente fundamental de diversas enzimas, o cobre participa dos processos de respiração, reações redox (oxidação de substratos orgânicos e íons metálicos, dismutação de superóxido, monooxigenação), transferência de elétrons, entre outros (ZHANG e GLADYSHEV, 2009). Estima-se que 80% das bactérias sejam cobre dependentes, *versus* 96,3% em eucariotos, de acordo com estudos genômicos comparativos. As cuproproteínas mais utilizadas nos 3 domínios da vida são as subunidades citocromo c oxidase I (COX I) e II (COXII), seguidas de multicobre oxidases, superóxido dismutase, plastocianina, NADH desidrogenase 2, entre outras. Apenas metade das famílias de proteínas procariotas dependentes de cobre é detectada em eucariotos (ZHANG, YING e XU, 2019).

Em bactérias, os sistemas de transporte e exportação de cobre conhecidos até hoje são ATPase CopA tipo P, sistema Cus e algumas outras proteínas, como o sistema Pco, CopRs e CopZ (ZHANG, YING e XU, 2019). Entre os mecanismos de imunidade nutricional elaborados pelo hospedeiro, a toxicidade por cobre tem sido reportada na literatura para diminuição da sobrevivência de patógenos bacterianos (DJOKO *et al.*, 2015). A CopA é a principal proteína exportadora de cobre, que contribui para a desintoxicação desse mineral. Altas doses de cobre (5 mg cloreto de cobre/kg peso corporal) podem interromper a homeostase da microbiota e induzir lesões histopatológicas no ceco e reto de camundongos (CHENG *et al.*, 2019).

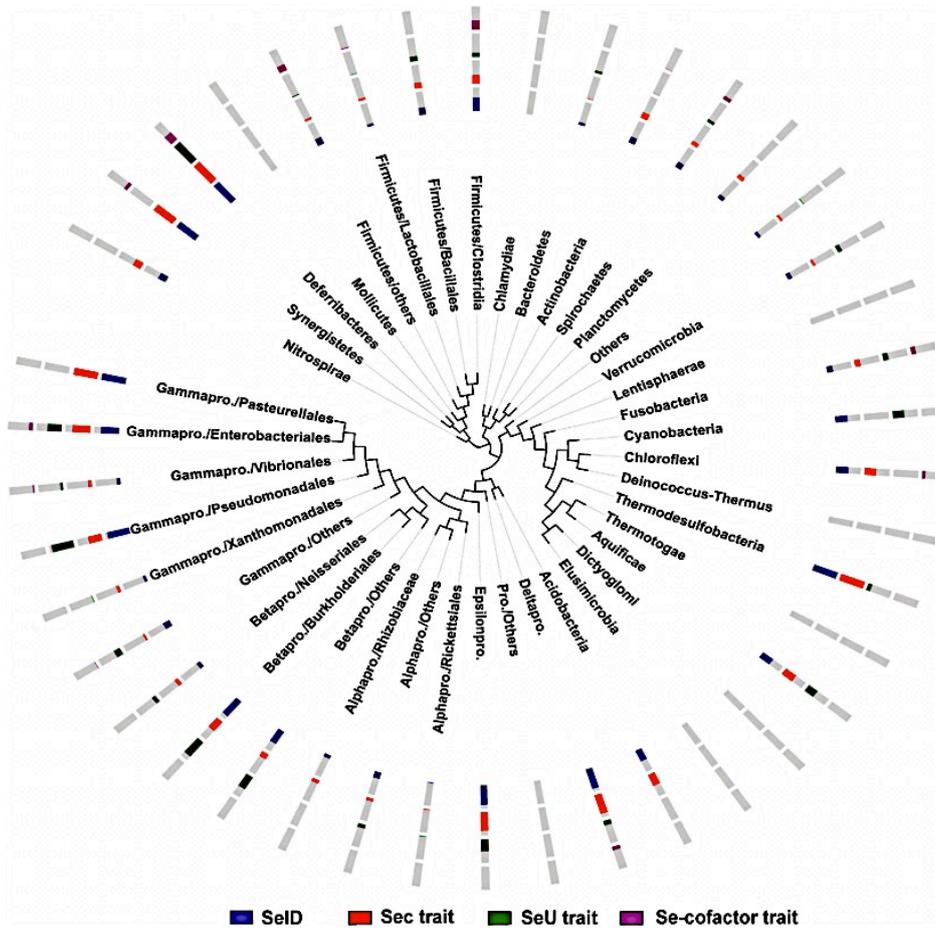
Dietas contendo alto teor de cobre (120 e 240 mg/kg) aumentaram significativamente a riqueza e diversidade microbiana nas fezes de ratos Sprague-Dawley, em comparação ao grupo controle (6 mg/kg). Além disso, os

índices de alfa diversidade ACE e Chao1 (riqueza) e Shannon (diversidade) mostraram correlação positiva com o conteúdo de cobre no íleo e ceco e as concentrações séricas de TNF- α . O estresse inflamatório induzido pela alta exposição ao cobre também foi correlacionado com o aumento da abundância de *Ruminococaceae*, *Defluviitaleaceae*, *Ruminococcaceae*, *Anaerotruncus*, *Peptococcus* e *Coprococcus* (OTU402) (ZHANG *et al.*, 2017).

Os principais efeitos biológicos do selênio em bactérias, assim como em humanos, são exercidos pela selenocisteína. O mecanismo de biossíntese de selenocisteína e incorporação a proteínas é semelhante nos três domínios da vida (*Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*). A inserção desse aminoácido em selenoproteínas envolve a recodificação do códon UGA, onde normalmente é finalizada a tradução. Esse processo demanda uma estrutura complexa, que inclui componentes similares aos de eucariotos, tais como a sequência de inserção de selenocisteína (SECIS), o fator de alongamento específico para selenocisteína (também chamado de SelB em bactérias), a proteína de ligação de SECIS, a selenocisteína sintase (SelA), o RNA transportador específico para selenocisteína (RNA^{[Ser]Sec}) e a SelD. Após sua formação, as selenoproteínas podem passar por um processo de reciclagem, no qual são degradadas pela selenocisteína liase para fornecimento de selênio, na forma de selenido, para síntese de novas proteínas (LIN *et al.*, 2015).

Em procariotos, as três formas biológicas de selênio são: selenocisteína, selenouridina (5-metilaminometil-2-selenouridina ou SelU) e como cofatores de enzimas. Cada forma possui genes específicos, porém a selenofosfato sintetase (SelD) é o componente em comum e que interliga as vias, sendo considerada a assinatura geral para a utilização de selênio. Além disso, a SelD está presente em praticamente todas as linhagens bacterianas, com exceção dos grupos *Chlamydie*, *Mollicutes*, *Deinococcus-Thermus* e *Thermotogae*, os quais são menos prevalentes no microbioma intestinal humano (LIN *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2016). A **Figura 3** mostra a distribuição das formas de selênio utilizadas por alguns grupos bacterianos.

Figura 3. Distribuição de formas conhecidas de selênio em bactérias. São Paulo, 2019.

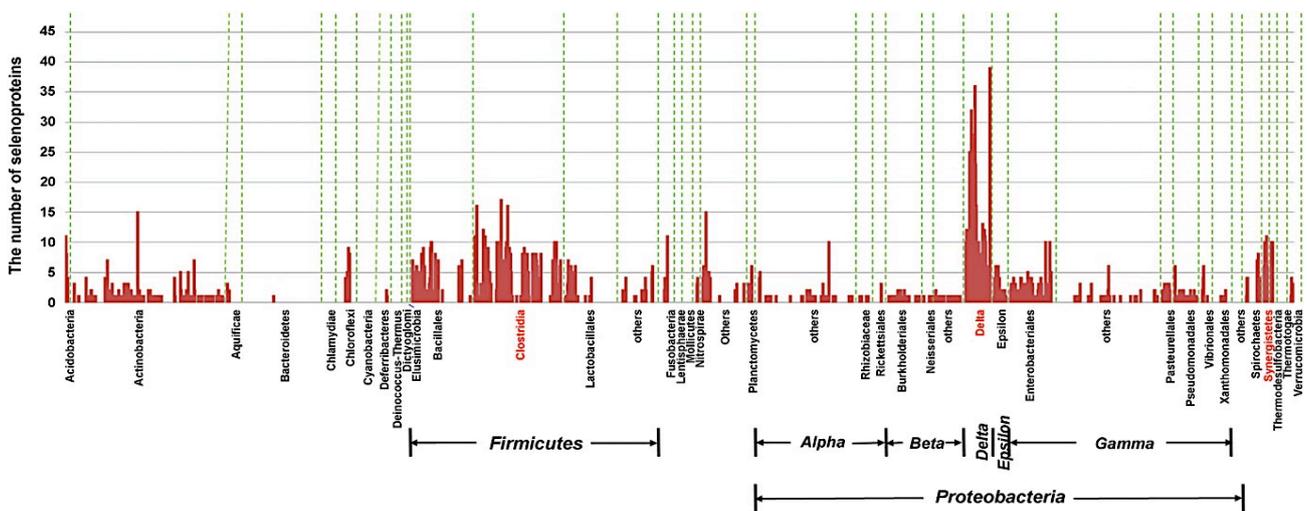


Legenda: SeID: selenofosfato sintetase; Sec trait: selenocisteína; SeU trait: selenouridina; Se-cofator trait: selênio como cofator. Fonte: PENG *et al.* (2016).

Até o momento, foram identificadas cerca de 90 famílias de selenoproteínas em bactérias, contendo entre 1 e 1276 selenoproteínas cada. A ocorrência e o tamanho do selenoproteoma em diferentes grupos bacterianos estão exibidos na **Figura 4**. As funções de cada proteína ainda não foram completamente elucidadas. Os filós que mais expressam selenoproteínas são *Deltaproteobacteria* e *Firmicutes/Clostridia*, nos quais cada espécie contém pelo menos 6 genes que codificam selenoproteínas. O maior selenoproteoma em bactérias foi registrado na *Syntrophobacter fumaroxidans*, que apresenta pelo menos 39 genes de selenoproteínas (ZHANG *et al.*, 2006; ZHANG e GLADYSHEV, 2010). A alfa formato desidrogenase, responsável por catalisar a

oxidação do formato a bicarbonato, e SelD são as selenoproteínas mais difundidas em bactérias. Baseado na identificação da ocorrência de genes em amostras de diferentes ambientes, pesquisadores observaram que as bactérias que habitam o trato gastrointestinal utilizam sobretudo a forma de selenocisteína como cofator de enzimas, basicamente por seleção pelo ambiente anaeróbio (PENG *et al.*, 2016).

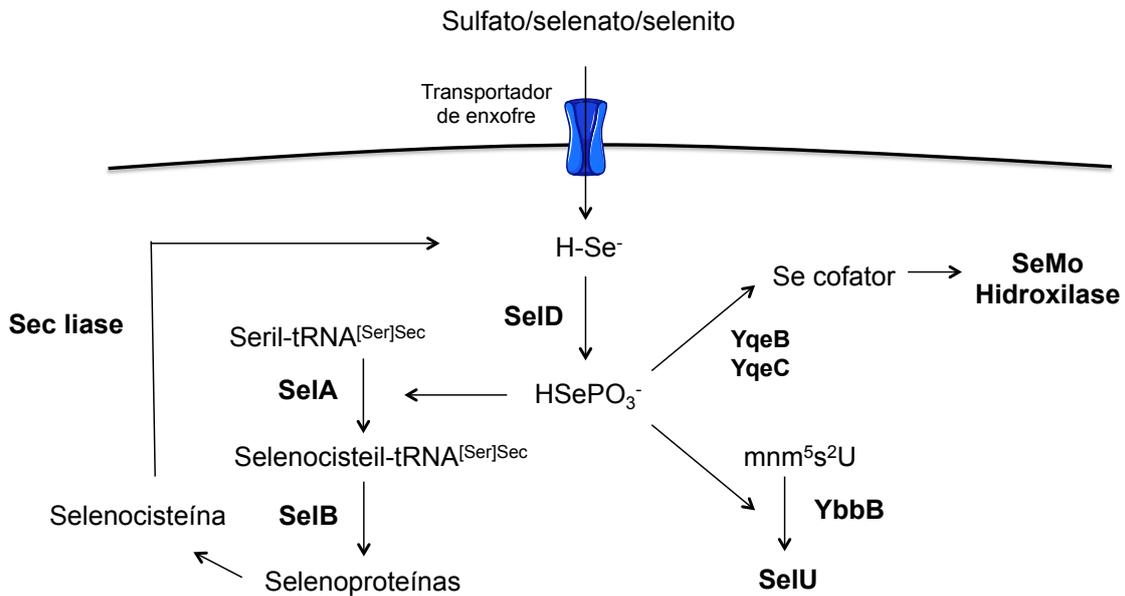
Figura 4. Ocorrência e composição de selenoproteoma em bactérias. São Paulo, 2019.



Fonte: PENG *et al.* (2016).

A SelU é um componente localizado em anticódons de alguns RNAt de procariotos e pode ajudar na discriminação de pares de bases e melhorar a eficiência da tradução. Para sua formação, o selênio transportado para o meio intracelular é convertido em selenofosfato (HSePO_3^-) pela ação da SelD. Além disso, esse processo necessita da substituição do enxofre por selênio na 5-metilaminometil-2-tiouridina ($\text{mnm}^{\text{S}}\text{s}^2\text{U}$) pela enzima 2-selenouridina sintase (YbbD), como ilustrado na **Figura 5**. Outra alternativa de utilização de selênio por bactérias é como cofator de enzimas que contém molibdênio, via dois genes com função ainda desconhecida (YqeB e YqeC) (LIN *et al.*, 2015).

Figura 5. Modelo proposto da homeostase de selênio em bactérias. São Paulo, 2019.



Legenda: Genes relacionados com metabolismo de selênio ou selenocisteína estão marcados em negrito. H-Se⁻: Selenido; HSePO₃⁻: selenofosfato; mnm⁵s²U: 5-metilaminometil-2-tiouridina; SelA: selenocisteína sintase; SelB: fator de alongamento específico para selenocisteína; SelD: selenofosfato sintetase; SelU: selenouridina; Sec liase: selenocisteína liase; SeMo Hidroxilase: hidroxilase dependente de selênio e molibdênio; YqeB: proteína não caracterizada; YqeC: proteína não caracterizada. Fonte: Adaptado de LIN *et al.* (2015).

Em consequência da necessidade de selênio, a microbiota intestinal pode ser capaz de sequestrar esse micronutriente para armazenamento e/ou expressão de suas próprias selenoproteínas, reduzindo assim a biodisponibilidade de selênio para o hospedeiro (KASAIKINA *et al.*, 2011). Entretanto, poucos estudos investigaram o impacto da intervenção com selênio na microbiota do hospedeiro.

O estudo de Kasaikina *et al.* (2011) objetivou caracterizar o impacto de dietas contendo selênio na microbiota de camundongos e a função do microbioma em influenciar o *status* de selênio do hospedeiro. Para isto, 10 camundongos livres de germes (LG) foram distribuídos em 2 grupos: um deles permaneceu em condições livre de germes e no outro foi implantada a microbiota de camundongos convencionais previamente tratados com dietas contendo selênio (CV), que serviu como controle. Ambos os grupos receberam dietas com concentrações de 0,0, 0,1, 0,4 e 2,25 µg selênio/g, sob a forma de selenito de sódio, por 8 semanas.

Após este período, observou-se que o selênio da dieta aumentou a diversidade da microbiota intestinal e a colonização do trato gastrointestinal dos camundongos implantados. O efeito mais significativo encontrado no microbioma foi a redução em *Parabacteroides* em resposta ao selênio oferecido pela dieta, sobretudo na concentração de 0,4 µg selênio/g, acompanhado pelo aumento de outros grupos de *Bacteroidetes*, incluindo *Tanerella* e *Porphyromonadaceae*. Ainda, o selênio da dieta afetou a expressão de selenoproteínas independentemente de serem animais LG ou CV. Contudo, os camundongos LG apresentaram maior expressão e atividade de GPX1 e metionina-R-sulfóxido redutase 1 (MsrB1) no fígado e nos rins em comparação aos camundongos convencionais.

De modo semelhante, Hrdina *et al.* (2009) avaliaram camundongos LG após a administração de dietas deficiente (0,086 µg selênio/g) e adequada (0,15 µg selênio/g) em selênio por 5 semanas a partir do desmame. Em condições de deficiência, os animais LG apresentaram maior atividade da GPX e tioredoxinas (Trx) no fígado e intestino, assim como maior expressão gênica e proteica dessas selenoproteínas no fígado e cólon. Além disso, o plasma, fígado e ceco desses animais continham maior concentração de selênio quando comparados aos camundongos convencionais, após serem tratados com dietas deficientes em selênio.

Esses estudos demonstraram que o selênio da dieta afeta a composição da microbiota intestinal e a colonização do trato gastrointestinal de camundongos, com conseqüente influência no *status* do mineral do hospedeiro e na expressão de seu selenoproteoma. Foi sugerido que há uma competição por selênio entre hospedeiro e microbiota, uma vez que algumas bactérias também possuem selenoproteínas e o utilizam em seu metabolismo. Assim, o sequestro de selênio pela microbiota também seria um fator limitante para a disponibilidade deste elemento ao hospedeiro, assim como a ingestão alimentar deficiente desse mineral e variações fisiológicas do indivíduo.

Poucos estudos foram desenvolvidos sobre o papel dos minerais na modulação da microbiota intestinal, sendo que os que foram realizados utilizaram modelos em animais. Até o momento, não existem estudos acerca dos efeitos da suplementação de selênio e tampouco de castanha-do-brasil, uma excelente fonte desse mineral, sobre a microbiota intestinal de humanos, motivo pelo qual realizamos este trabalho.

== HIPÓTESE ==

3. HIPÓTESE

- A composição da microbiota fecal pode ser alterada por meio da suplementação com castanha-do-brasil após 2 meses.

== OBJETIVOS ==

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL:

Avaliar a composição da microbiota intestinal e o perfil de minerais (metaloma) no organismo após a ingestão de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) por 2 meses.

4.2 ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a castanha-do-brasil utilizada quanto a quantidade de macronutrientes, minerais e perfil de ácidos graxos;
- Avaliar a composição corporal e a ingestão alimentar dos participantes antes e após a suplementação com castanha-do-brasil;
- Analisar os marcadores do estado nutricional relativo aos minerais antes e após a intervenção;
- Examinar comparativamente a composição da microbiota intestinal antes e após a ingestão de castanha-do-brasil;
- Verificar a existência da interação entre o metaloma e a microbiota intestinal após a suplementação com castanha-do-brasil.

CASUÍSTICA E
MÉTODOS



5. CASUÍSTICA

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Este é um ensaio clínico prospectivo de intervenção, composto por 2 fases: antes (Tempo 0, T0) e após (Tempo 1, T1) a suplementação de uma unidade de castanha-do-brasil por dia durante 60 dias. Para caracterização dos participantes, aplicou-se um questionário sobre informações socioeconômicas, nível de atividade física, antecedentes familiares para doenças crônicas não transmissíveis, uso de medicamentos, presença de doenças, hábito intestinal, entre outras informações (**ANEXO 1**).

Em ambos os tempos, os participantes foram submetidos a uma coleta de sangue e de fezes, avaliação antropométrica e da ingestão alimentar. Após as coletas do Tempo 0, a pesquisadora forneceu as embalagens de castanhas-do-brasil refrigeradas e à vácuo, suficientes para o período de suplementação, com informações nutricionais e instruções para seu armazenamento e consumo (**ANEXO 2**). Para melhor controle de sua ingestão, foi fornecido um calendário onde o participante registrou os dias em que tal alimento não foi consumido e o motivo. Após o período de 2 meses, os voluntários retornaram para a segunda avaliação (T1).

5.2 ASPECTOS ÉTICOS E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (PARECER nº1.000.931/2015) (**ANEXO 3**).

Todos os participantes foram informados sobre os procedimentos aos quais foram submetidos e o destino do material biológico coletado. Foram esclarecidos também quanto ao direito de desistência no decorrer da pesquisa, sem constrangimentos. Ao concordar participar desta pesquisa, os participantes receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO 4**), de acordo com a Resolução CNS nº 510/2016, que trata da proteção dos participantes e orientam sobre os procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos.

Para a população do estudo, foram selecionados 97 indivíduos sem doenças crônicas não transmissíveis, voluntários, de ambos os sexos, eutróficos e com idade média de 28,7 anos. Os participantes do estudo foram recrutados por meio de cartazes convite fixados nas imediações da Cidade Universitária, de e-mails institucionais e de indicação dos próprios voluntários do estudo.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A seleção dos participantes foi realizada a partir dos seguintes critérios de inclusão: indivíduos de ambos os sexos; com classificação de Índice de Massa Corpórea (IMC) dentro da normalidade (18,5 a 24,9 kg/m²); com idade entre 18 e 50 anos; que não apresentassem doenças crônicas não transmissíveis; que não estivessem em uso ou tivessem utilizado no mês anterior ao início da pesquisa inibidores de bomba de prótons, antagonistas do receptor H₂, antidepressivos, antiácidos, laxativos e outros medicamentos que influenciam na composição da microbiota; que não utilizassem suplementos vitamínico-mineral; que não fossem tabagistas e/ou fizessem uso de bebidas alcoólicas regularmente; que não fossem atletas de elite; que não apresentassem alergia a oleaginosas e que não consumissem castanha-do-brasil regularmente; que não estivessem em uso ou tivessem utilizado antibióticos nos 4 meses precedentes ao estudo e que não tivessem consumido prebióticos industrializados e/ou probióticos durante o último mês que precedeu a triagem dos participantes.

6. MÉTODOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL

As castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) utilizadas neste estudo foram cultivadas na região amazônica brasileira e doadas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A (Itacoatiara - AM), safra de 2015. As castanhas recebidas estavam em embalagens à vácuo e protegidas da luz e foram imediatamente acondicionadas a -20°C.

Para análise da composição nutricional da castanha-do-brasil, foi retirada uma amostra aleatória de cada um dos 3 lotes de castanhas utilizados. Em seguida, as castanhas foram trituradas e submetidas ao processo de liofilização para determinação da umidade da amostra. As amostras liofilizadas foram utilizadas para determinação de cinzas, lipídeos, proteínas, minerais e perfil de ácidos graxos. O carboidrato foi estimado por diferença.

As análises de composição centesimal foram conduzidas de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (cinzas e lipídeos) e da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (proteínas). A concentração de minerais foi determinada pelo método de espectrofotometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Perkin Elmer DRC II), previamente padronizado pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (BATISTA *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos presentes na castanha foram extraídos segundo o método descrito por Folch, Lee e Stanley (1957). Em seguida, os lipídios foram transformados em ésteres metílicos para a identificação e quantificação por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2002).

6.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

6.2.1 Peso

A aferição de peso foi realizada por meio de uma balança antropométrica devidamente calibrada, com graduação de 100 g, onde o indivíduo foi posicionado ao centro, descalço, utilizando a menor quantidade de roupa possível, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo.

6.2.2 Estatura

A estatura foi aferida com auxílio de um estadiômetro, com altura máxima de 2 metros, com participante de pé, com os pés juntos, descalços e braços estendidos ao longo do corpo, olhando para a linha do horizonte com a cabeça formando um ângulo de 90°.

6.2.3 Índice de Massa Corpórea (IMC)

O índice de massa corpórea foi calculado dividindo o peso (em quilogramas) pela estatura (em metro) ao quadrado. O resultado foi analisado de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000).

6.3 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

6.3.1 Sangue

Amostras de 20 mL de sangue foram colhidas com seringas estéreis e descartáveis, no período da manhã e com os participantes em jejum de 12 horas. Este procedimento foi realizado por um profissional habilitado (técnico em enfermagem) no Laboratório de Nutrição - Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. As amostras de sangue foram destinadas às análises do *status* de minerais (plasma e eritrócitos), atividade da enzima glutathione peroxidase (GPX), concentração de selenoproteína P (SEPP) e proteína ligadora de lipopolissacarídeos (LBP).

Após a coleta em tubos com EDTA, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, acondicionados em tubos de polipropileno e armazenados a -80°C para posterior análise. Em seguida, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada, e a massa de eritrócitos foi cuidadosamente extraída com micropipeta, colocada em tubos de polipropileno e armazenada a -80°C até o momento da análise.

6.3.2 Fezes

As amostras de fezes dos participantes foram coletadas em recipientes plásticos, que foram mantidos em gelo descartável durante o transporte até a entrega ao pesquisador. O período entre a coleta das fezes e o armazenamento a -80 °C não excedeu o prazo de 24 horas. As amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a -80° C, para posterior avaliação da composição da microbiota intestinal e das concentrações de minerais.

6.4 CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO

Todo o material utilizado (vidrarias, plásticos, ponteiras, tubos, etc.) para análises de selênio foi desmineralizado em banho de ácido nítrico a 20%, por no mínimo 12 horas, e enxaguado 10 vezes com água nanopura. Os materiais utilizados para as demais determinações foram adquiridos como DNA e RNA *free* ou submetidos à esterilização em autoclave.

6.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.5.1 Concentrações de minerais no plasma, nos eritrócitos e nas fezes

As concentrações de minerais no plasma, nos eritrócitos e nas fezes foram determinadas pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS Perkin Elmer DRC II). Para isso, 100 µg/L de amostra foram diluídos na proporção de 1:50 em um tubo de polipropileno desmineralizado, contendo solução de Triton X-100 a 0,01% e ácido nítrico a 0,5% (v/v), conforme descrito por Batista e colaboradores (2009). As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo (Ribeirão Preto - SP).

6.5.2 Atividade enzimática da GPX

A atividade da enzima GPX foi determinada nos eritrócitos, conforme a metodologia proposta por Paglia & Valentine (1967), em um analisador bioquímico (Labmax 240; Lagoa Santa, MG, Brasil), utilizando um kit disponível comercialmente (Ransel[®]; Randox Laboratories, UK). Também foi determinada a concentração de hemoglobina, uma vez que a atividade da enzima é expressa em U/g de hemoglobina.

6.5.3 Concentração plasmática de SEPP

A determinação da concentração de SEPP foi realizada por ensaio imunoenzimático indireto (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (*Cloud-Clone Corp.*[®]; Texas, EUA).

6.5.4 Concentração sérica de LBP

Para avaliação indireta da permeabilidade intestinal, foi dosada a concentração sérica de LBP por ELISA, de acordo com o protocolo proposto no kit comercializado por *Cloud-Clone Corp.*[®] (Texas, EUA).

6.6 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Para avaliação da ingestão alimentar, foi utilizado o método do recordatório alimentar de 24 horas, com registro detalhado de todos os alimentos e bebidas consumidos em dois dias alternados durante a semana e um dia do final de semana (**ANEXO 5**). Para auxiliar no processo de detalhamento do tamanho e volume das porções, foram utilizadas fotografias de porções e medidas caseiras. O primeiro recordatório foi registrado pessoalmente e os demais foram por meio de ligação telefônica. Esta avaliação foi realizada antes e após a suplementação com castanha-do-brasil.

A análise dos alimentos consumidos pelos participantes foi feita utilizando prioritariamente a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA, 2018) e a Tabela da *United States Department of Agriculture* (USDA), para aqueles alimentos não encontrados na TBCA. Utilizou-se o programa *Microsoft Excel* para tabulação das dietas e o R versão 1.1.463 para quantificação dos nutrientes e análises estatísticas.

Os valores da ingestão dos nutrientes foram ajustados pela energia quando os resultados apresentaram distribuição normal segundo o método residual proposto por Willet (1998). A adequação das dietas foi realizada por meio das *Dietary Reference Intakes* (DRIs), considerando os macro e micronutrientes.

6.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

O DNA bacteriano foi extraído das amostras de fezes utilizando o PSP[®] *Spin Stool DNA kit* (Stratec[®], Berlim, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante e com as seguintes modificações: 220 mg de fezes foram adicionadas em um tubo *Lysing matrix E* (MP Biomedicals[®]) com 1 mL do tampão *stool stabilizer*. O tubo foi fortemente homogeneizado por 1 minuto e 20 segundos, incubado a 95°C por 15 minutos e centrifugado a 13.400 g por 1 minuto. O

sobrenadante lisado foi purificado como descrito no protocolo do fabricante. P DNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*®, Massachusetts, EUA). As amostras foram armazenadas a -80°C até sua análise.

O DNA isolado foi utilizado como molde para amplificação do gene codificador de RNA ribossomal 16S (RNAr 16S) na região V1-V2 por reações de polimerase em cadeia (PCR), adicionando-se *primers* específicos para bactérias (27F e 338R), como descrito por Caporaso *et al.* (2012). Após o PCR, todas as amostras foram purificadas usando AGENCOURT AMPure XP Beads (*Beckman Coulter*®, Brea, CA, EUA) e testadas por gel de eletroforese para averiguar a qualidade e tamanho do DNA.

A biblioteca de DNA foi preparada com alíquotas de todas as amostras e purificada por meio do kit *silica-membrane based NucleoSpin clean-up* (*Machery-Nagel GmbH & Co.*, Duren, Alemanha). Finalmente, a biblioteca foi sequenciada na plataforma *Illumina MiSeq*® System (*Illumina* INC, San Diego, CA, EUA) pelo Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo (CEFAP-USP/GENIAL), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

6.8 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Os dados do sequenciamento foram processados bioinformaticamente utilizando o *pipeline Quantitative Insight into Microbial Ecology* (QIIME, versão 1.9.0), usando os parâmetros padrões do programa (CAPORASO *et al.*, 2010). A quantidade de leituras foi normalizada e rarefeita em 9800 sequências para excluir a profundidade diferente de sequenciamento entre as amostras. Após o pré-processamento, as sequências *paired-end* foram unidas baseadas nas regiões sobrepostas (*join_paired_ends.py*). As sequências representativas foram filtradas por qualidade e clusterizadas em OTUs (*operational taxonomic units*) pelo método UCLUST (*open reference*) com 97% de similaridade (*pick_otus.py* e *pick_rep_set.py*) e o banco de referência SILVA (*release 132*) (QUAST *et al.*, 2013) foi utilizado para atribuir taxonomia (*assign_taxonomy.py*).

Os dados do microbioma foram analisados utilizando o *software* R versão 1.1.463 (<http://www.r-project.org>). Todas as análises estatísticas pareadas para comparar o T0 e T1 foram realizadas com o teste *Wilcoxon*. O nível de

significância adotado foi de 5%. A alfa diversidade foi calculada pelos índices: Shannon, número de OTUs observadas, Chao1 e diversidade filogenética de Faith, com comando `core_diversity.py` no QIIME. A partir desse comando, determinou-se também a abundância das bactérias nos níveis taxonômicos filo, classe, ordem, família e gênero.

A beta diversidade das amostras foi medida pelas matrizes de distâncias UniFrac baseadas em dados de abundância relativa (*weighted*) e presença-ausência (*unweighted*) de espécies. A análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA) foi utilizada para avaliar os efeitos globais da intervenção com castanha-do-brasil, bem como a relação com as covariáveis de interesse, avaliadas, sobre a composição do microbioma dos indivíduos (LOZUPONE *et al.*, 2010). A análise de coordenada principal (PCoA) com as métricas de distâncias UniFrac foi realizada para visualizar a variação e separação das amostras.

Os enterótipos foram identificados seguindo o protocolo descrito por (ARUMUGAM *et al.*, 2011) e disponível em <http://enterotype.embl.de/enterotypes.html>. As amostras foram clusterizadas de acordo com as distâncias UniFrac. O número ótimo de *clusters* foi estimado pelo método de *Partition around the medoids* (PAM) e avaliado pela técnica de validação *silhouette* quanto sua robustez.

Os gêneros identificados nas amostras também foram avaliados quanto a variação de sua abundância entre os tempos ($\Delta = T1 - T0$). A relação entre o Δ das variáveis bioquímicas e dos gêneros foi avaliada pelo teste de correlação Spearman com a biblioteca *reshape2* no R. Para visualização dos dados, construiu-se um mapa de calor (*heatmap*) com os valores de coeficiente de correlação (R) e com marcações das correlações significativas ($p < 0,05$).

Por fim, as abundâncias das OTUs foram comparadas entre os tempos pelo teste *Wilcoxon* e aquelas que sofreram alteração significativa ($p < 0,05$) com a intervenção foram exploradas na análise de regressão linear. O modelo de regressão linear foi utilizado para tentar explicar o efeito dos minerais na microbiota e o efeito da microbiota nos parâmetros bioquímicos mensurados, com os pacotes *lme4* e *lmerTest* no R, ajustada pelos efeitos aleatórios (variação interpessoal).

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção e tabulação dos dados, os resultados foram analisados e apresentados em média ou mediana e desvio-padrão, frequência absoluta (n) e relativa (%). Utilizou-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 23.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), e o ambiente R versão 1.1.463 para a análise dos dados. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram correlacionados com os dados da microbiota usando correlação de *Spearman*, para determinar efeitos locais no microbioma, enquanto que efeitos globais foram analisados por PERMANOVA. Os efeitos da intervenção sobre os parâmetros bioquímicos e sobre as espécies bacterianas intestinais foram analisados pelo teste *Wilcoxon* para amostras pareadas. Espécies consideradas moduladas foram exploradas por análise de regressão linear. A regressão linear foi construída para tentar explicar o efeito dos minerais na microbiota e o efeito da microbiota nos parâmetros bioquímicos mensurados.

Considerou-se p-valor menor que 0,05 para discriminação de médias estatisticamente diferentes. Além disso, quando apropriado, o valor de p foi corrigido de acordo com o método de controle de *False Discovery Rate* (FDR) proposto por Benjamini & Hochberg (1995), que reduz a proporção de falsos positivos.

== RESULTADOS ==

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL

As castanhas-do-brasil foram avaliadas anteriormente ao início do estudo quanto a sua composição de macro e micronutrientes e perfil de ácidos graxos. Os dados foram calculados por 100 g de amostra integral de castanha-do-brasil e por unidade de castanha (5 g) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Composição centesimal e concentração de minerais das castanhas-do-brasil utilizadas na intervenção do estudo. São Paulo, 2019.

Variável	100 g*	1 noz (5 g)
Energia (kcal)	700,5 ± 26,3	35,0 ± 1,3
Umidade (%)	1,1 ± 0,2	0,1 ± 0,0
Proteína (g)	15,5 ± 1,5	0,8 ± 0,1
Lipídios (g)	63,3 ± 5,5	3,2 ± 0,3
Carboidrato (g)	17,2 ± 4,3	0,9 ± 0,2
Cinzas (g)	2,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0
Selênio (µg)	7398,5 ± 589,5	369,9 ± 29,5
Bário (µg)	4369,0 ± 1139,0	218,5 ± 56,9
Cádmio (µg)	< LOD	< LOD
Cobalto (µg)	20,0 ± 6,0	1,0 ± 0,3
Manganês (µg)	2120,0 ± 469,0	105,1 ± 23,5
Chumbo (µg)	< LOD	< LOD
Cromo (µg)	495,0 ± 52,0	24,7 ± 2,6
Cobre (µg)	2143,0 ± 231,0	107,1 ± 11,5
Zinco (mg)	113,7 ± 15,9	5,7 ± 0,8
Magnésio (mg)	421,3 ± 26,2	21,1 ± 1,3

Legenda: Dados apresentados em média ± desvio padrão. *Amostra integral; LOD: Limite de detecção do equipamento.

As sementes oleagionas são alimentos de alta complexidade nutricional. A castanha-do-brasil utilizada neste estudo era constituída majoritariamente por lipídeos (63,3%), proteínas (15,5%) e carboidratos (17,2%), além de quantidades significantes de alguns minerais, como bário, manganês, cromo, cobre, zinco, magnésio e, em maior concentração, selênio. O teor de selênio ofertado na intervenção foi de 369,9 µg/dia.

Apesar de ter a gordura em maior proporção entre os macronutrientes, seu consumo por meio de 1 unidade de castanha (3,2 g/dia) foi pouco significativo frente ao total ingerido pela dieta. Devido à alta concentração de lipídeos na castanha, investigou-se o perfil de ácidos graxos em sua composição, cujos resultados estão na **Tabela 4**. Os ácidos insaturados estavam em maior concentração: linoleico (39,1%) e oleico (32,8%) e saturados palmítico (15,5%) e esteárico (11,3%).

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos da castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.

Ácidos graxos	Composto	Concentração (%)
Linoléico	C 18:2c	39,07 ± 0,72
Oleico	C 18:1c	32,82 ± 0,54
Palmítico	C 16:0	15,52 ± 0,11
Esteárico	C 18:0	11,34 ± 0,14
Palmitoléico	C 16:1	0,35 ± 0,02
Eicosatrienóico	C 20:3 n-3	0,27 ± 0,01
Araquídico	C 20:0	0,24 ± 0,01
Não identificado	-	0,1 ± 0,01
Margárico	C 17:0	0,06 ± 0,0
Mirístico	C 14:0	0,06 ± 0,0
Linolênico	C 18:3	0,05 ± 0,0
Behenico	C 22:0	0,05 ± 0,0
Gadoléico	C 20:1	0,04 ± 0,0
Heptadecenóico	C 17:1	0,02 ± 0,0

Legenda: Resultados em média ± desvio padrão.

7.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Após a seleção inicial dos participantes (T0), foram excluídos do estudo os participantes que iniciaram o uso de antibióticos (n=2), apresentaram hipercolesterolemia (n=2) ou bulimia (n=2), não entregaram a amostra de fezes (n=1), desistiram do estudo (n=6) ou tiveram erro no sequenciamento de sua amostra (n=4). Portanto, permaneceram no estudo 97 dos 114 indivíduos recrutados inicialmente. Os participantes tinham idade média de 28,7 ± 8,5 anos. As características socioeconômicas e de hábitos de vida estão descritas na **Tabela 5**.

De acordo com os dados obtidos pelo questionário socioeconômico aplicado, a amostra apresenta proporção semelhante entre homens e mulheres, sendo que a maioria se declarou de etnia branca (63,4%), possui renda familiar acima de 3 salários mínimos (62,3%) e ensino superior completo e incompleto (94,1%). Entre as doenças mais prevalentes no histórico familiar dos participantes, estão hipertensão arterial (50,5%), diabetes *mellitus* (44,6%) e câncer (40,6%).

Além disso, a maioria dos participantes adotava hábitos de vida saudáveis. Observou-se que 96% da amostra nunca fumou, 77,2% não fazia uso frequente de bebida alcóolica e 82,2% era praticante de atividade física. Em relação à avaliação antropométrica, todos os indivíduos foram classificados como eutróficos e não foi observada alteração significativa em relação ao índice de massa corpórea entre os tempos ($22,1 \pm 3,2$ para $22,4 \pm 2,3$ kg/m²).

Tabela 5. Dados descritivos dos participantes do estudo. São Paulo, 2019.

Variável	N	%
Gênero		
Feminino	49	50,5
Masculino	48	49,5
Etnia		
Branco	65	67,0
Pardo	12	12,4
Amarelo	8	8,2
Negro	8	8,2
Mulato	2	3,0
Indígena	2	2,0
Renda familiar		
< 1 SM	6	6,2
1 - 2 SM	11	11,3
2 - 3 SM	21	21,6
3 - 5 SM	16	16,5
5 - 10 SM	37	38,1
> 10 SM	10	10,3
Grau de escolaridade		
Ensino médio completo	6	5,9
Ensino superior incompleto	42	42,6
Ensino superior completo	49	51,5

Histórico familiar		
Hipertensão arterial	51	50,5
Diabetes <i>mellitus</i>	45	44,6
Câncer	41	40,6
Doenças da tireoide	15	14,9
Obesidade	14	13,9
Insuficiência renal	6	5,9
Doenças inflamatórias intestinais	2	2,0
Tabagismo		
Nunca fumou	97	100,0
Ex-fumante	0	0,0
Uso de bebida alcoólica		
Não faz	34	35,1
2 ou 3 vezes por semana	8	8,2
1 vez por semana	11	11,3
1 a 2 vezes por mês	38	39,2
Prática de atividade física		
Sim	81	83,5
Não	16	16,5

Legenda: SM: salário mínimo vigente durante o estudo (R\$788,00). Dados apresentados em frequência absoluta (n) e relativa (%).

7.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A castanha-do-brasil é quantitativa e qualitativamente a melhor fonte de selênio na natureza. Este alimento se mostrou eficaz em melhorar o *status* de selênio da população do estudo, comprovado pelo aumento significativo das concentrações do mineral no organismo (plasma, eritrócitos e fezes) e de seus marcadores funcionais (selenoproteína P e atividade da GPX) (**Tabela 6**).

Ao avaliar os indivíduos de acordo com os valores de referência, observou-se que apenas uma pequena parcela apresentou deficiência em selênio, de acordo com a concentração de selênio no plasma (8,2%) e eritrócitos (2,1%) e pela atividade da GPX (2,1%) no T0 (**Figura 6**).

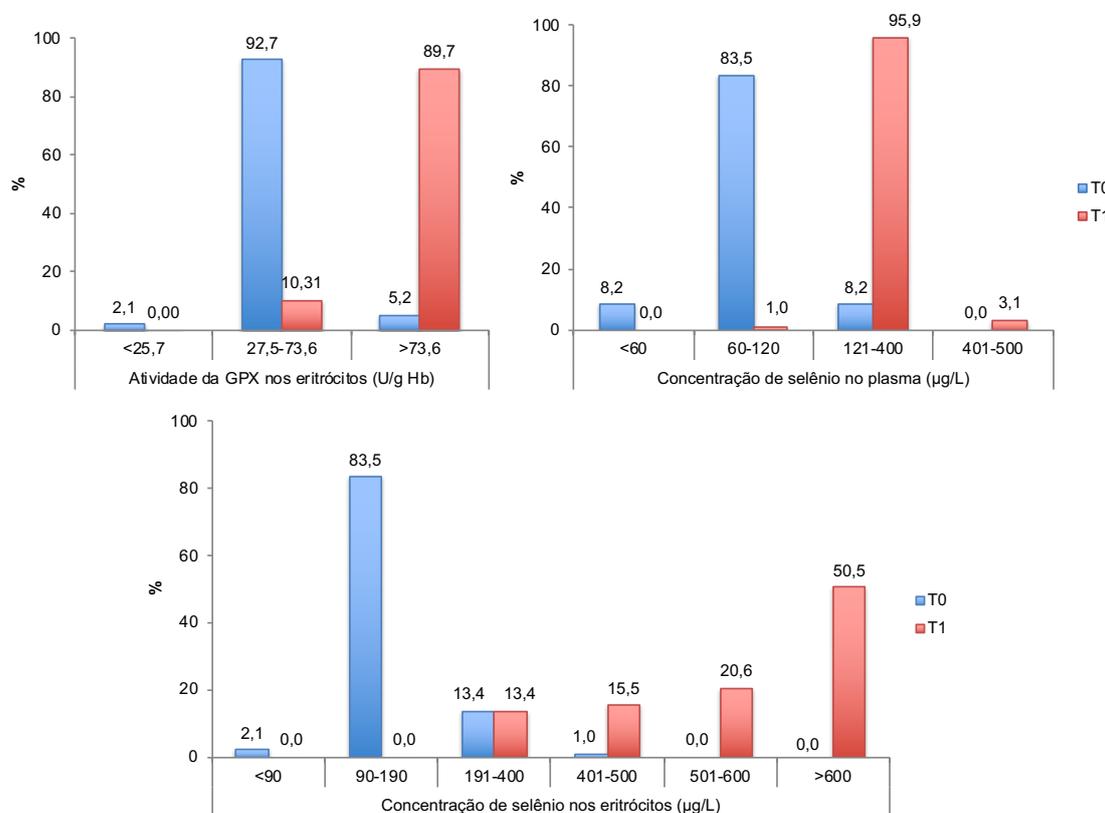
Após a intervenção, a maioria dos participantes foi classificada acima do intervalo de normalidade para esses marcadores. Na literatura, ainda não foi estabelecido uma faixa de referência para selênio nas fezes e selenoproteína P.

Tabela 6. Marcadores de selênio na população de estudo. São Paulo, 2019.

Marcadores	T0	T1	Delta (%)	P-valor	Referência*
Selênio no plasma ¹	73,7 (64,4 – 84,9)	235,0 (187,6 – 268,8)	218,9	< 0,0001	60 - 120
Selênio nos eritrócitos ¹	146,3 (129,0 – 180,2)	602,4 (462,4 – 760,7)	311,8	< 0,0001	90 - 190
Selênio nas fezes ²	0,17 (0,14 – 0,24)	0,39 (0,25 – 0,64)	134,8	< 0,0001	-
Atividade da GPX ^{3a}	48,4 (40,3 – 59,8)	113,4 (90,5 – 146,0)	134,3	< 0,0001	27,5 - 73,6
Selenoproteína P ⁴	5236,0 (446,8 – 879,1)	6136 (4657,5 – 7754,5)	17,2	0,001	-

Legenda: Resultados em mediana (intervalo interquartil Q1 – Q3). ¹ µg/L; ² ppm; ³ U/g hemoglobina; ⁴ ng/mL; *p-valor calculado por teste Wilcoxon para amostras dependentes e considerado significativo quando p<0,05. ^aReferência proposta pelo kit disponível comercialmente (Ransel[®], Randox Laboratories, UK). GPX: glutathiona peroxidase; T0: Tempo 0; T1: Tempo 1. Delta: diferença entre T1 e T0.

Figura 6. Distribuição percentual dos participantes segundo marcadores do status de selênio. São Paulo, 2019.



Além do selênio, é necessário considerar que a castanha-do-brasil possui um conjunto complexo de minerais. Os efeitos da intervenção na concentração desses micronutrientes foram avaliados nos eritrócitos, no plasma e nas fezes (Tabela 7). Não foi possível obter dados dos mesmos minerais para os 3 compartimentos, devido problemas técnicos na análise.

Tabela 7. Concentração dos minerais avaliados no plasma, nos eritrócitos e nas fezes. São Paulo, 2019.

Marcadores	T0	T1	Delta (%)	P-valor
Eritrócitos¹				
Cobalto	0,7 (0,6 – 0,8)	0,2 (0,2 – 0,3)	- 69,1	< 0,001
Cobre	629,7 (573,0 – 666,7)	1067,4 (990,3 – 1153,9)	69,5	< 0,001
Zinco	1133,3 (986,1 – 1302,5)	2112,0 (1857,6 – 2292,9)	81,4	< 0,001
Arsênio	10,8 (9,5 – 11,9)	8,6 (7,7 – 9,5)	- 20,8	< 0,001
Cádmio	0,12 (0,06 – 0,23)	0,48 (0,41 – 0,6)	300,0	< 0,001
Bário	6,1 (4,0 – 7,9)	2,4 (2,2 – 2,7)	- 59,7	< 0,001
Chumbo	16,8 (8,7 – 25,8)	31,0 (25,4 – 39,4)	85,0	< 0,001
Plasma¹				
Cobalto	0,93 (0,9 – 1,1)	1,1 (1,0 – 1,3)	19,4	< 0,001
Manganês	2,2 (1,8 – 2,6)	2,0 (1,9 – 2,3)	-6,7	0,38
Zinco	1201,4 (994,0 – 1318,6)	1121,0 (741,4 – 1221,9)	-6,7	< 0,001
Cobre	988,3 (884,9 – 1230,2)	903,2 (816,8 – 1108,3)	-8,4	0,01
Arsênio	6,9 (6,0 – 7,8)	16,9 ± 2,1 (15,9 – 17,6)	144,6	< 0,001
Cádmio	0,04 (0,03 – 0,04)	0,04 (0,03 – 0,06)	0,0	0,31
Bário	6,9 (6,3 – 7,6)	9,0 (8,0 – 10,2)	31,3	< 0,001
Chumbo	0,6 (0,5 – 0,8)	0,9 (0,8 – 1,2)	48,2	< 0,001
Fezes				

Alumínio ²	2,4 (2,0 – 2,8)	3,8 (3,0 – 4,9)	62,9	< 0,001
Manganês ²	7,0 (5,8 – 8,8)	4,9 (4,2 – 6,6)	- 30,0	< 0,001
Zinco ²	94,5 (69,2 – 123,7)	51,7 (40,5 – 65,7)	- 45,4	< 0,001
Cobre ²	37,3 (29,7 – 45,9)	17,0 (12,7 – 20,8)	- 54,7	< 0,001
Bário ²	2,9 (1,8 – 4,1)	2,4 (1,8 – 3,2)	- 16,7	< 0,001
Ferro ²	109,8 (83,0 – 136,4)	49,5 (36,5 – 61,7)	- 55,0	< 0,001
Magnésio ²	1006,4 (796,9 – 1301,8)	405,1 (310,0 – 527,8)	- 59,7	< 0,001
Molibdênio ³	587,2 (446,8 – 879,1)	613,2 (415,4 – 864,5)	4,4	0,93

Legenda: Resultados em mediana (intervalo interquartil Q1 – Q3). ¹ µg/L; ² ppm; ³ ppb; *p-valor calculado por teste Wilcoxon para amostras dependentes e considerado significativo quando p<0,05. T0: Tempo 0; T1: Tempo 1. Delta: diferença entre T1 e T0.

O aumento significativo na concentração eritrocitária foi observado para cobre e chumbo e redução para cobalto, zinco, arsênio e bário (p<0,001). No plasma, os minerais cobalto, arsênio, bário e chumbo aumentaram após a suplementação, já o zinco e cobre reduziram significativamente. Esses dois compartimentos refletem a eficiência dos processos de absorção e disponibilidade para aproveitamento dos nutrientes pelo organismo. Os valores de referência não estão estabelecidos para todos os minerais no Brasil e nos demais países. A interpretação dos dados foi feita pela comparação com estudos de biomonitorização em populações semelhantes ao deste trabalho, na seção de discussão.

Nas fezes, os minerais presentes são o remanescente da absorção e utilização, ou seja, eliminados pelo organismo. A diminuição significativa das concentrações de manganês, zinco, cobre, bário, ferro e magnésio indicam maior aproveitamento pelo organismo (p<0,001). O alumínio foi o único mineral avaliado a aumentar nas fezes de modo significativo.

A permeabilidade intestinal foi avaliada indiretamente pela proteína ligadora de lipopolissacarídeo. O valor mediano encontrado no plasma foi de 11816,5 ng/L no T0 e 13103,5 ng/L no T1 (p = 0,101).

7.4 INGESTÃO ALIMENTAR

O consumo habitual de nutrientes pelos indivíduos está caracterizado na **Tabela 8**. Os participantes foram orientados a não mudarem seus hábitos alimentares durante o período do estudo. Sem considerar o consumo da castanha-do-brasil, não foi observada diferença estatística na ingestão de energia e macronutrientes entre os tempos. Em relação aos minerais, a ingestão permaneceu semelhante, exceto para cobre e magnésio, cujo consumo foi diminuído no Tempo 1.

A suplementação de castanha-do-brasil aumentou significativamente a ingestão de selênio, sem alterar o consumo dos outros nutrientes (dados não apresentados). Segundo as diretrizes do Instituto de Medicina Americano (*Institute of Medicine*) para ingestão alimentar, os voluntários atingiram os valores de normalidade para os nutrientes avaliados, exceto fibras e magnésio.

Tabela 8. Ingestão alimentar habitual dos indivíduos antes e após a suplementação. São Paulo, 2019.

Nutriente	T0	T1*	p-valor ^Ω	Referência
Energia (kcal)	2167,8 ± 668,3	2073,6 ± 534,2	0,16	-
Carboidratos (g)	281,0 ± 91,4	270,6 ± 78,1	0,51	45 – 65% ²
Proteínas (g)	94,2 ± 43,9	88,5 ± 34,3	0,61	10 – 35% ²
Lipídeos (g)	78,2 ± 29,9	74,0 ± 27,2	0,80	20 – 35% ²
Colesterol (mg)	375,1 ± 212,1	353,0 ± 203,3	0,62	< 300
G. Monoinsaturadas (g)	23,4 ± 9,6	22,4 ± 9,6	0,83	Por diferença ³
G. Poliinsaturadas (g)	14,1 ± 6,6	16,7 ± 29,8	0,52	6 – 10% ^{2,3}
G. Saturadas (g)	28,2 ± 11,5	27,3 ± 12,0	0,78	< 10% ^{2,3}
G. <i>Trans</i> (g)	2,1 ± 1,9	1,7 ± 2,0	0,19	< 1% ^{2,3}
Fibras (g)	22,1 ± 9,1	20,7 ± 9,5	0,20	38 / 25 ^{1,4}
Selênio (μg)	103,3 ± 113,9	83,6 ± 121,1	0,28	45 ¹
Cálcio (mg)	906,2 ± 558,4	862,0 ± 460,7	0,48	800 ¹
Cobre (mg)	1,4 ± 0,9	1,2 ± 0,6	0,02	0,7 ¹
Ferro (mg)	13,1 ± 5,1	12,4 ± 4,9	0,46	6 / 8,1 ^{1,4}
Fósforo (mg)	1323,9 ± 494,4	1404,9 ± 563,1	0,78	580 ¹
Magnésio (mg)	287,6 ± 93,7	269,0 ± 87,9	0,03	420 / 320 ^{1,4}

Manganês (mg)	24,7 ± 63,0	15,4 ± 23,6	0,36	2,8 / 1,8 ^{1,4}
Potássio (mg)	2755,5 ± 898,4	2608,2 ± 842,9	0,23	4,7 ⁵
Zinco (mg)	14,3 ± 16,6	11,4 ± 5,3	0,70	9,4 / 6,8 ^{1,4}

Legenda: Resultados em média ± desvio padrão. *Não se considerou a castanha-do-brasil; ^ΩTeste wilcoxon para amostras pareadas com os valores residuais de cada nutriente; ¹Necessidade Média Estimada (EAR/DRI/2014); ²Faixa de distribuição de macronutrientes aceitável (AMDR/DRI); ³Calculado sobre a quantidade total de gorduras; ⁴Homens / Mulheres; ⁵Ingestão Adequada (AI/IOM/2004); T0: Tempo 0; T1: Tempo 1.

7.5 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

7.5.1 Dados descritivos do microbioma

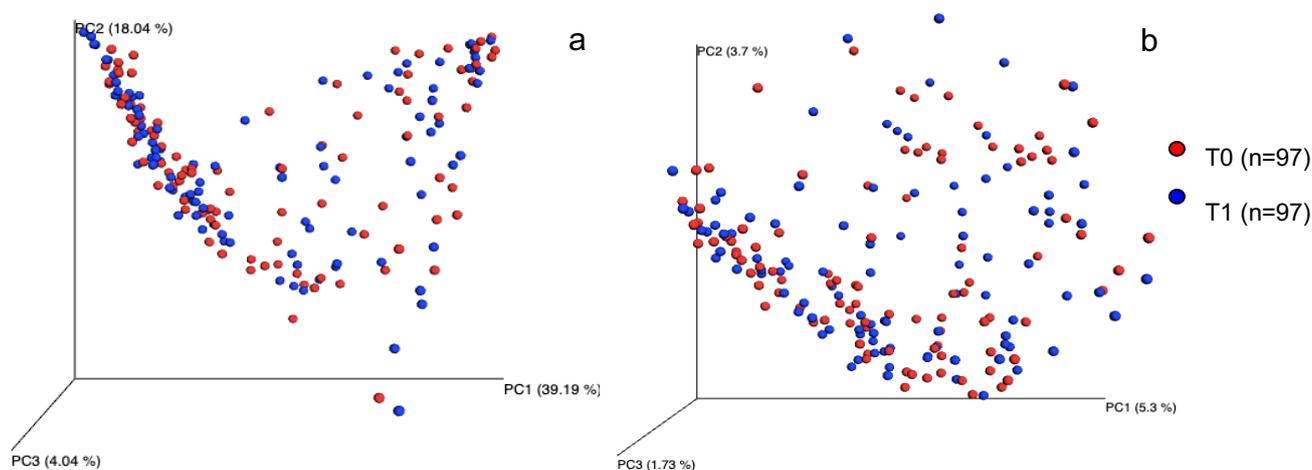
O sequenciamento da microbiota intestinal conduzido na plataforma *Illumina Miseq*[®] gerou 5.229.248 sequências para o gene 16S DNA ribossomal, sendo identificadas 94.924 OTUs diferentes, mapeadas de acordo com o banco de dados SILVA (QUAST *et al.*, 2013). Em média, foram obtidas 26.955 ± 9.045 sequências por amostra. Estas sequências foram utilizadas para a identificação das unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Units* – OTUs), construção da árvore filogenética, cálculo de abundância relativa, das distâncias UniFrac e dos índices de alfa diversidade.

7.5.2 Influência da castanha-do-brasil e dos marcadores bioquímicos na composição global da microbiota

Os efeitos da suplementação com castanha-do-brasil na composição da microbiota intestinal foram investigados em diferentes vertentes. Primeiramente, a análise PERMANOVA foi conduzida para definir se cada variável de interesse estava relacionada significativamente com a beta diversidade das amostras, utilizando as matrizes de distância UniFrac *unweighted* (presença/ausência de gêneros) e *weighted* (abundância de gêneros).

Esse teste revelou que a intervenção não foi capaz de impactar significativamente a composição global do microbioma (FDR = 1,0) (**Figura 7**). Como esperado, a variação interpessoal da microbiota foi mais forte que a variação induzida pela intervenção com castanha-do-brasil.

Figura 7. Distribuição das amostras de acordo com o tempo, utilizando as matrizes de distância UniFrac *unweighted* (a) e *weighted* (b). São Paulo, 2019.



Subsequentemente, testou-se a relação de cada variável bioquímica separadamente nas diferenças de beta diversidade das amostras em 3 circunstâncias: ambos os tempos (n=194), no início (n=97) e fim (n=97) do estudo. Os resultados estão apresentados na **Tabela 9** e ilustrados pelos gráficos de coordenada principal (PCoA) a seguir (**Figura 8 e 9**).

No modelo em que se considerou o indivíduo nos dois tempos (n=194), assumiu-se as variações intraindividuais e foi possível averiguar se a suplementação exerceu alguma influência na relação entre a microbiota e o parâmetro avaliado. Nas fezes, a intervenção da castanha permitiu que os minerais bário, zinco, cobre e ferro evidenciassem sua influência na composição e/ou distribuição de grupos bacterianos (FDR<0,05). O cádmio foi o único elemento nos eritrócitos a influenciar a abundância de bactérias após ingestão de castanha-do-brasil.

Tabela 9. Resultados da PERMANOVA em relação a microbiota e marcadores bioquímicos. São Paulo, 2019.

	Todos (n=194)		T0 (n=97)		T1 (n=97)	
	<i>unweighted</i>	<i>weighted</i>	<i>unweighted</i>	<i>weighted</i>	<i>unweighted</i>	<i>weighted</i>
Marcadores do status de selênio e de permeabilidade intestinal						
GPX	0,97	0,93	0,21	0,24	0,72	1,00
Se plasma	1,00	0,56	0,65	0,55	0,31	0,26
Se eritrócitos	1,00	1,00	0,51	0,57	0,56	1,00
Se fezes	0,77	0,35	0,77	0,38	0,06	0,14
SEPP	1,00	1,00	0,76	0,93	0,44	1,00

LBP	1,00	1,00	0,76	0,82	1,00	0,99
Eritrócitos						
Cobalto	1,00	0,86	0,41	0,56	1,00	0,59
Cobre	1,00	1,00	0,50	0,68	0,99	0,82
Zinco	1,00	1,00	0,56	0,81	1,00	1,00
Arsênio	1,00	1,00	0,76	0,57	0,72	0,97
Cádmio	0,82	0,11	0,24	0,26	0,18	0,03*
Bário	1,00	1,00	0,73	0,56	0,99	0,98
Chumbo	0,65	0,99	0,11	0,55	0,28	0,49
Plasma						
Cobalto	1,00	0,98	0,72	0,39	0,97	0,91
Arsênio	1,00	1,00	1,00	0,97	0,35	0,61
Bário	1,00	0,75	0,76	0,75	0,28	0,28
Cádmio	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,97
Manganês	1,00	1,00	0,81	0,77	1,00	1,00
Chumbo	1,00	1,00	0,28	0,52	0,59	0,81
Zinco	1,00	1,00	0,65	0,78	0,90	0,82
Cobre	0,91	0,72	0,30	0,55	0,28	0,28
Fezes						
Bário	0,013*	0,10	0,013*	0,022*	0,025*	0,28
Manganês	0,20	0,06	0,022*	0,06	0,12	0,05*
Alumínio	1,00	0,52	0,44	0,44	0,51	0,24
Zinco	0,01*	0,025*	0,014*	0,013*	0,10	0,39
Cobre	0,021*	0,013*	0,013*	0,013*	0,013*	0,025*
Ferro	0,013*	0,013*	0,013*	0,013*	0,025*	0,12
Magnésio	0,76	0,28	0,037*	0,025*	0,99	0,76
Molibidênio	0,44	0,25	0,11	0,12	0,12	0,09

Legenda: Tabela construída com valores de FDR (p corrigido). * FDR<0,05; T0: Tempo 0; T1: Tempo 1; SEPP: selenoproteína P; LBP: proteína ligadora de lipopolissacarídeos.

No tempo 0, a interpretação dos resultados aponta a interação circunstancial das variáveis, refletindo principalmente os hábitos de vida de cada indivíduo. A concentração de minerais nas fezes reflete a quantidade ingerida habitualmente pelos participantes, absorvida, utilizada pelo organismo e remanescente no cólon para influenciar a composição da microbiota. As concentrações de bário, manganês, zinco, cobre, ferro e magnésio nas fezes foram significativamente associadas à composição bacteriana inicial. Entretanto, esta relação não foi mantida para zinco e magnésio após a intervenção. No período pós suplementação, o efeito sobre a microbiota pode ser atrelado ao fornecimento suplementar de micronutrientes pela castanha, permitindo maior

disponibilidade para utilização pelas bactérias. Entretanto, não observamos efeito adicional aos vistos no Tempo 0.

Os gráficos de coordenada principal a seguir ilustram a distribuição das amostras segundo concentração de minerais nas fezes (**Figuras 8 e 9**). Nota-se a tendência de disposição dos indivíduos com maior teor de selênio nas fezes em regiões diferentes da PCoA para as distâncias *unweighted* (FDR=0,06) e *weighted* (FDR=0,11) no T1. No início do estudo, não foi possível observar claramente esta divisão, visto que não há uma ampla variação das concentrações de selênio entre os indivíduos.

Figura 8. Gráfico de coordenada principal segundo concentração de selênio nas fezes no T0 e T1, construído com as distâncias UniFrac *weighted* (a) e *unweighted* (b). São Paulo, 2019.

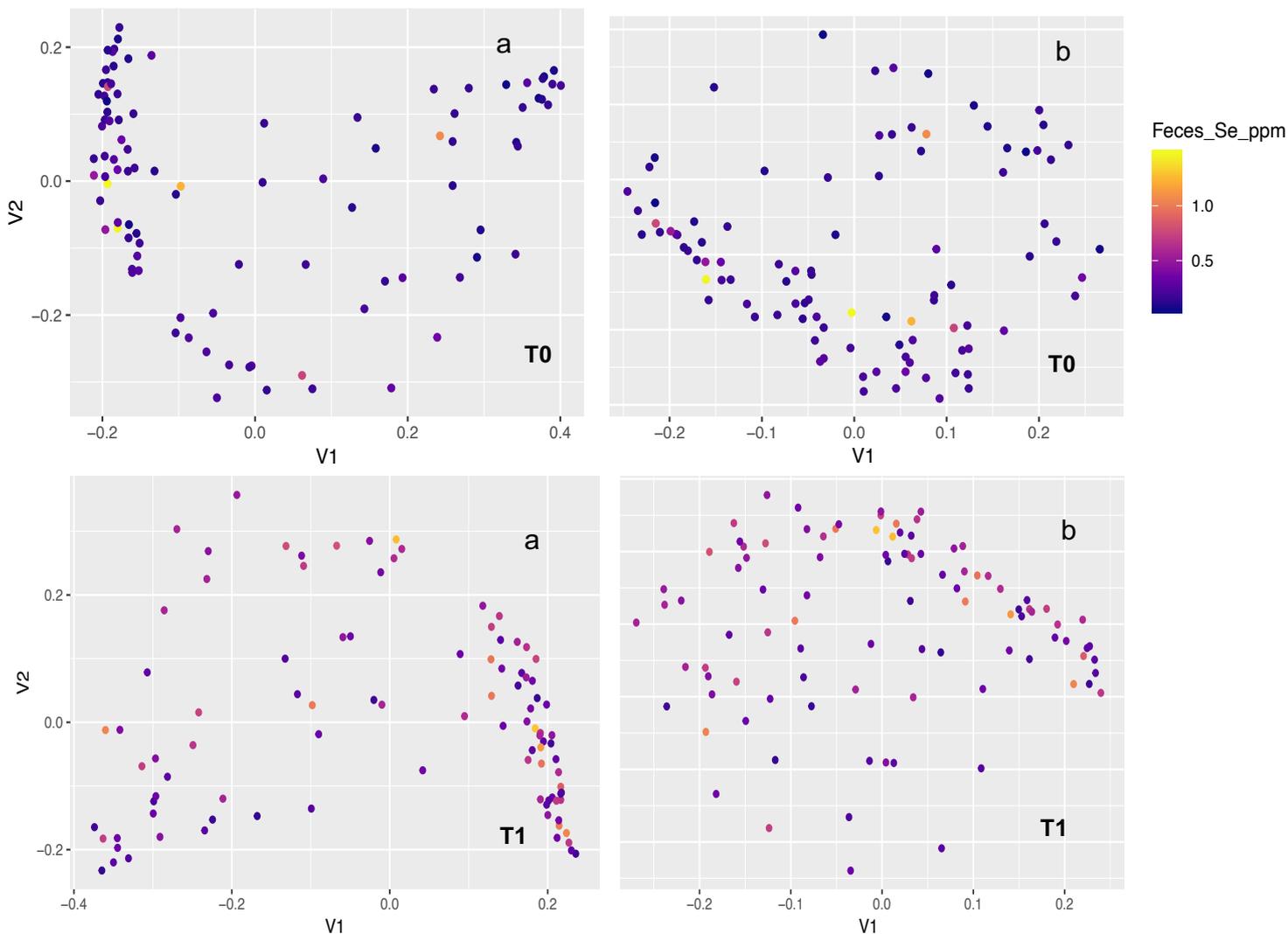
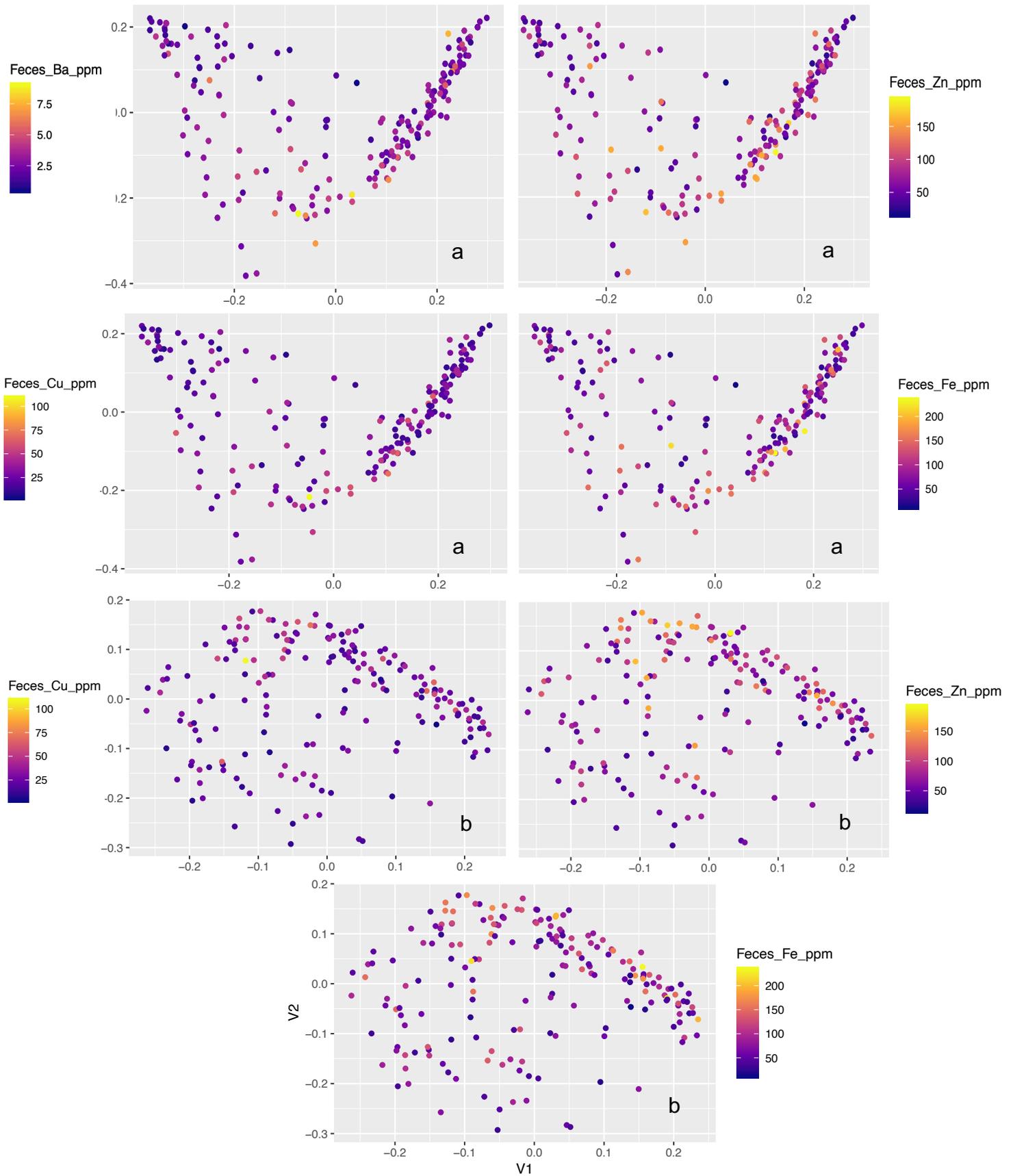


Figura 9. Gráfico de coordenada principal segundo concentração de minerais nas fezes, construído com as distâncias UniFrac *weighted* (a) e *unweighted* (b) de ambos os tempos (n=194). São Paulo, 2019.



O agrupamento de amostras de acordo com a concentração dos minerais nas fezes também foi observado para bário, zinco, cobre e ferro (**Figura 9**). Em vista disto, os enterótipos foram investigados como um possível fator de segregação das amostras. Este estudo foi pioneiro em apresentar a relação entre concentração de minerais e composição do microbioma, com ou sem intervenção.

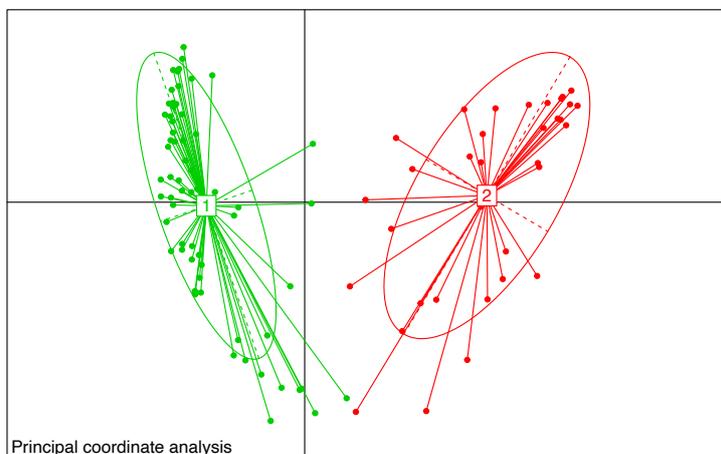
7.5.3 Enterótipos

A presença de um perfil bacteriano predominante foi investigada nas amostras. Os enterótipos foram identificados de acordo com o método descrito por Arumugam *et al.* (2011), utilizando a tabela de gêneros e a matriz de distância *weighted* gerada na análise de beta diversidade das amostras. Para esta análise, considerou-se apenas os dados do início do estudo (T0).

Apenas os enterótipos *Bacteroides* e *Prevotella* foram identificados como predominantes nas amostras (**Figura 10**). O *cluster Bacteroides* foi atribuído a 63 indivíduos e o *Prevotella* agrupou 34 participantes.

O escore *Silhouette* foi calculado para avaliar o grau de similaridade entre os 2 *clusters*, sendo que valores próximos a 1 sugerem que a segregação foi significativa e legítima. O suporte estatístico para a divisão de enterótipos proposta neste estudo foi fraco (*silhouette* = 0,33), possivelmente pelo tamanho da amostra.

Figura 10. Análise de coordenada principal dos enterótipos identificados. São Paulo, 2019.



Legenda: Verde- *Bacteroides*; Vermelho- *Prevotella*.

Apesar disto, observamos diferenças estatísticas entre marcadores bioquímicos segundo esta divisão de *clusters*, apresentadas na **Tabela 10**. O enterótipo *Bacteroides* apresentou maiores concentrações de bário, alumínio, cobre, ferro e molibdênio nas fezes em comparação ao *Prevotella* ($p < 0,05$). Portanto, é possível afirmar que os *clusters* já apresentavam efeitos diferenciais no início do estudo.

Dentre os minerais dosados nos eritrócitos e no plasma, apenas cádmio e zinco tiveram diferença significativa entre os *clusters*. Os indivíduos em cada enterótipo não diferiram quanto às concentrações dos marcadores de selênio.

Tabela 10. Comparações das variáveis bioquímicas entre os enterótipos. São Paulo, 2019.

	<i>Bacteroides</i> (n=63)	<i>Prevotella</i> (n=34)	p-valor*
Marcadores do status de selênio e permeabilidade intestinal			
Selênio eritrócitos ¹	160,4 ± 55,3	164,6 ± 58,6	0,65
Selênio plasma ¹	78,7 ± 25,3	81,2 ± 22,6	0,25
Selênio fezes ²	274,5 ± 302,0	173,8 ± 78,8	0,26
Atividade GPX ⁴	50,2 ± 13,8	50,2 ± 14,1	0,62
SEPP ⁵	5865,5 ± 2321,6	5424,2 ± 1473,2	0,51
LBP ⁵	13396,1 ± 6609,7	12044,0 ± 4877,6	0,65
Eritrócitos¹			
Cobalto	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,63
Cobre	616,8 ± 72,6	623,1 ± 68,8	0,90
Zinco	11346,6 ± 2240,7	11676,1 ± 2036,4	0,34
Arsênio	10,9 ± 1,8	10,8 ± 1,9	0,44
Cádmio	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,02
Bário	6,5 ± 3,5	7,9 ± 6,0	0,40
Chumbo	20,3 ± 15,4	18,3 ± 10,6	0,98
Plasma¹			
Cobalto	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,2	0,36
Arsênio	7,6 ± 4,5	6,8 ± 1,4	0,43
Bário	7,2 ± 1,5	7,2 ± 1,5	0,79
Cádmio	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02
Manganês	2,3 ± 0,8	2,3 ± 0,6	0,48

Chumbo	0,7 ± 0,41	0,7 ± 0,2	0,71
Zinco	1109,8 ± 238,52	1235,3 ± 202,6	0,02
Cobre	1137,0 ± 386,2	1086,3 ± 381,6	0,45
Fezes			
Bário²	3,4 ± 1,7	2,8 ± 1,7	0,05
Manganês ²	8,2 ± 3,0	7,4 ± 3,1	0,08
Alumínio²	2,6 ± 0,7	2,1 ± 0,6	0,001
Zinco ²	98,5 ± 34,9	97,3 ± 35,3	0,95
Cobre²	40,1 ± 12,4	35,9 ± 16,8	0,05
Ferro²	121,0 ± 42,1	100,9 ± 35,2	0,03
Magnésio ²	1121,5 ± 395,2	1052,0 ± 450,7	0,22
Molibdênio³	768,0 ± 390,5	645,9 ± 489,5	0,03

Legenda: Resultados em média ± desvio padrão. ¹ µg/L; ² ppm; ³ ppb; ⁴U/g hemoglobina; ⁵ng/mL. *Teste Mann-Whitney para amostras independentes. SEPP: selenoproteína P; LBP: proteína ligadora de lipopolissacarídeos.

Após a suplementação, as características de cada enterótipo não são mais observadas, exceto para cádmio e arsênio no plasma (p=0,037; p=0,015) (dados não apresentados). Visto que não houve suporte estatístico suficiente, os enterótipos não foram explorados por outras análises.

7.5.4 Alfa diversidade

O microbioma foi caracterizado inicialmente de acordo com sua composição antes e após a intervenção com castanha-do-brasil. A análise taxonômica revelou o total de 15 filos, 31 classes, 60 ordens, 114 famílias e 239 gêneros entre as amostras. A microbiota predominante em ambos os tempos está apresentada na **Tabela 11**.

Tabela 11. Abundância relativa da microbiota em diferentes níveis antes e após da suplementação de castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.

Níveis	T0 (%)	T1 (%)	p-valor*
Filos			
<i>p__Bacteroidetes</i>	58,38	58,43	0,71
<i>p__Firmicutes</i>	37,03	36,94	0,84
<i>p__Proteobacteria</i>	2,66	2,93	0,20
<i>p__Tenericutes</i>	0,45	0,55	0,50

<i>p__Cyanobacteria</i>	0,14	0,20	0,39
Classes			
<i>c__Bacteroidia</i>	58,38	58,43	0,71
<i>c__Clostridia</i>	35,61	35,20	1,00
<i>c__Betaproteobacteria</i>	1,99	1,97	0,74
<i>c__Erysipelotrichi</i>	1,28	1,52	0,28
<i>c__Gammaproteobacteria</i>	0,40	0,61	0,03
Ordens			
<i>o__Actinomycetales</i>	1,99	1,97	0,81
<i>o__Bifidobacteriales</i>	1,28	1,52	0,77
<i>o__Coriobacteriales</i>	1,00	0,62	0,57
<i>o__Rubrobacterales</i>	0,34	0,38	-
Famílias			
<i>f__Bacteroidaceae</i>	32,67	34,07	0,25
<i>f__Prevotellaceae</i>	17,72	16,51	1,00
<i>f__Ruminococcaceae</i>	13,77	14,38	1,00
<i>f__Lachnospiraceae</i>	9,89	10,15	1,00
<i>o__Clostridiales;f__</i>	6,12	5,48	0,82
<i>f__Veillonellaceae</i>	4,02	3,61	1,00
<i>f__Rikenellaceae</i>	3,02	2,86	-
Gêneros			
<i>g__Bacteroides</i>	32,67	34,07	0,30
<i>g__Prevotella</i>	17,72	16,51	0,74
<i>g__Ruminococcus</i>	2,39	2,21	0,58
<i>g__Dialister</i>	2,02	1,63	0,12
<i>g__Suterella</i>	1,83	1,72	0,94
<i>g__Phascolarctobacterium</i>	1,58	1,60	0,52

Legenda: *Teste *Wilcoxon* para amostras pareadas. T0: Tempo 0; T1: Tempo 1.

Os filos mais abundantes foram *Bacteroidetes* (58%) e *Firmicutes* (37%). *Bacterodia* (58%) e *Clostridia* (35%) foram as classes mais prevalentes e *Actinomycetales* (~1,9%) e grupos não identificados (35%) estavam entre as ordens predominantes. As famílias mais abundantes foram *Bacteroidaceae* (~33%) e *Prevotellaceae* (17%), dos mesmos grupos que os gêneros *Bacteroides* (~33%) e *Prevotella* (17%).

De maneira geral, não houve grandes mudanças na abundância relativa das bactérias em quaisquer níveis taxonômicos. Registrou-se o aumento

significativo da classe *Gammaproteobacteria* ($p=0,03$) e dos gêneros *Faecalibacterium* ($p=0,005$), *Bulleidia* ($p=0,017$) e *Bilophila* ($p=0,048$) após a intervenção. Por outro lado, a abundância de *Parabacteroides* ($p=0,002$) foi reduzida com a ingestão da castanha.

Os índices de alfa diversidade foram calculados para avaliar a abundância e diversidade de bactérias intraindividualmente. Não houve mudança significativa na abundância relativa (índice *Shannon*) e absoluta (Espécies observadas), diversidade estimada (*Chao1*) e filogenética (Diversidade filogenética) entre os tempos, como observado na **Tabela 12**.

Tabela 12. Índices de alfa diversidade das amostras antes (T0) e após (T1) a intervenção. São Paulo, 2019.

índices	T0	T1	P-valor*
Chao1	4389,48 ± 964,75	4539,86 ± 963,89	0,25
Espécies observadas	1317,18 ± 277,87	1363,73 ± 277,38	0,21
Diversidade filogenética	56,85 ± 13,27	58,21 ± 13,30	0,39
Shannon	6,02 ± 0,92	6,16 ± 0,88	0,32

Legenda: Resultados em média ± desvio padrão. *Teste *Wilcoxon* para amostras pareadas.

7.5.5 Associação entre gêneros e parâmetros bioquímicos

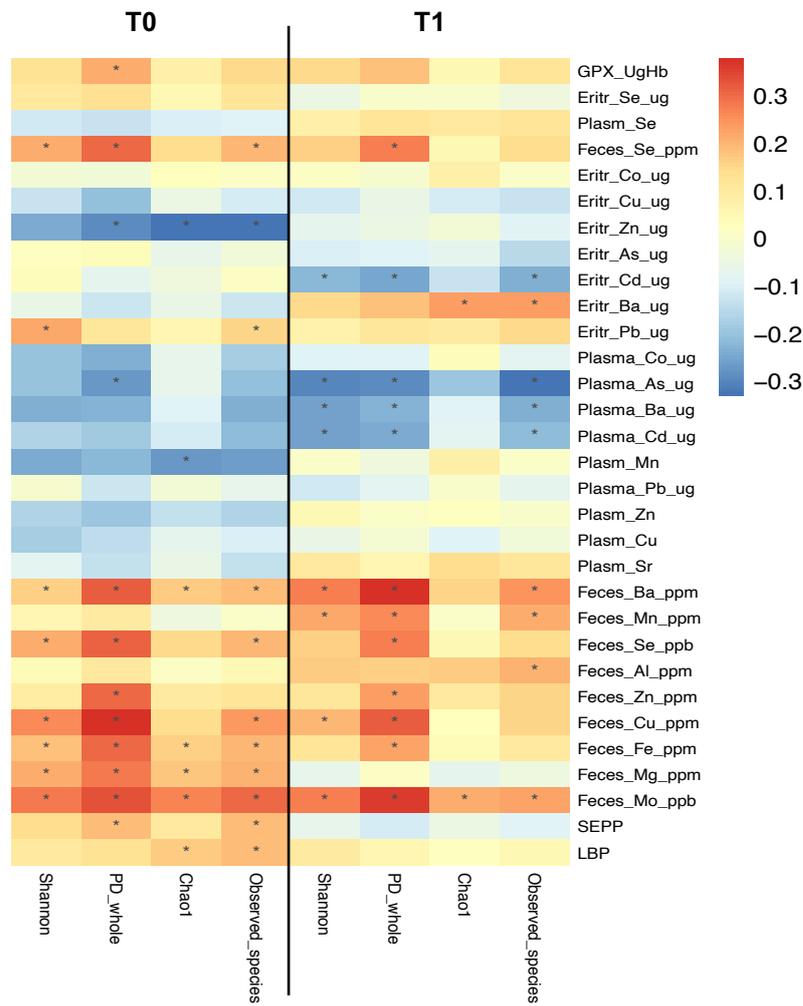
A fim de analisar detalhadamente a interrelação entre microbiota e as variáveis bioquímicas, conduzimos as análises de correlação e regressão linear.

Como mencionado anteriormente, a intervenção com castanha-do-brasil não foi capaz de alterar a alfa diversidade das amostras; entretanto, a análise de correlação mostrou resultados interessantes entre esses índices e os minerais avaliados, apresentados no mapa de calor da **Figura 11**. Ao comparar os resultados em cada tempo, foram observadas correlações significativas entre minerais no plasma e as métricas de alfa diversidade tanto antes quanto após a suplementação (T1).

Em ambos os tempos, os minerais nas fezes se correlacionaram positivamente com índices de alfa diversidade, indicando que quanto maior a disponibilidade nas fezes, maior abundância e diversidade de espécies

bacterianas. Por outro lado, os minerais arsênio, bário e cádmio no plasma foram negativamente correlacionados com os índices *Shannon*, diversidade filogenética e espécies observadas, sobretudo após a suplementação. Entre os marcadores de selênio avaliados, apenas a dosagem nas fezes foi fortemente correlacionada com a abundância e diversidade filogenética.

Figura 11. Correlações entre métricas de alfa diversidade e marcadores bioquímicos em ambos os tempos. São Paulo, 2019.



Legenda: *p<0,05. *Heatmap* construído com o coeficiente da correlação (R).

A análise específica dos grupos taxonômicos foi primeiramente realizada utilizando a variação (delta) da abundância de gêneros e dos marcadores bioquímicos entre os tempos. Assim, possibilitou-se estipular quais relações gêneros-bioquímicos ocorreram no período do estudo. Para isso, a análise foi

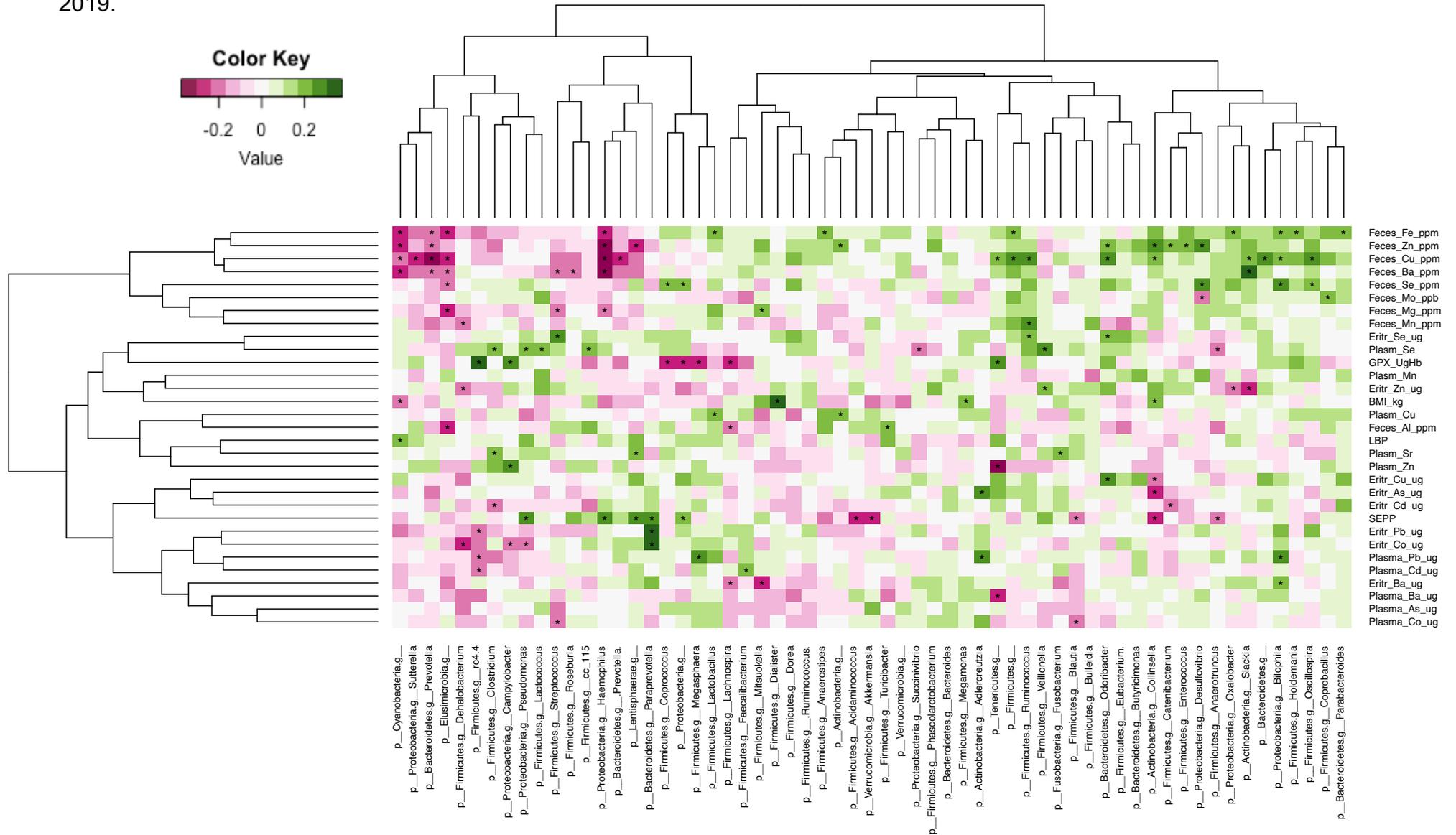
restrita somente às sequências classificadas em gêneros conhecidos, excluindo os grupos de abundância relativa nula, resultando em 129 gêneros a serem avaliados.

Observou-se correlação inversamente proporcional entre atividade da GPX e os gêneros *Lachnospira* ($r=-0,25$; $p=0,014$) e *Megasphaera* ($r=-0,25$; $p=0,014$) e diretamente proporcional com *Campylobacter* ($r=0,27$; $p=0,007$). A concentração de selênio nos eritrócitos foi correlacionada positivamente com *Odoribacter* ($r=0,20$; $p=0,047$), *Ruminococcus* ($r=0,22$; $p=0,033$) e *Streptococcus* ($r=0,25$; $p=0,012$). O selênio plasmático se correlacionou com *Veillonella* ($r=0,29$; $p=0,005$), *Anaerotruncus* ($r=-0,26$; $p=0,026$), *Clostridium* ($r=0,21$; $p=0,040$), *Lactococcus* ($r=0,21$; $p=0,036$), *Pseudomonas* ($r=0,20$; $p=0,05$) e *Succinivibrio* ($r=-0,21$; $p=0,036$). Nas fezes, este mineral teve correlação positiva com *Bilophila* ($r=0,30$; $p=0,003$), *Coprococcus* ($r=0,23$; $p=0,026$), *Oscillospira* ($r=0,23$; $p=0,025$) e *Desulfovibrio* ($r=0,25$; $p=0,015$).

As fezes são o compartimento onde é possível estudar com maior precisão a interação entre microbioma e minerais, sendo observado um grande número de correlações significativas entre essas medidas no *heatmap* da **Figura 12**. *Haemophilus* foi o gênero com maior número de correlações significativas entre os marcadores fecais bário ($r=-0,37$; $p<0,001$), cobre ($r=-0,34$; $p<0,0001$), zinco ($r=-0,32$; $p=0,001$), ferro ($r=-0,27$; $p=0,01$) e magnésio ($r=-0,21$; $p=0,043$) e SEPP no plasma ($r=0,26$; $p=0,01$). Neste mesmo cluster de correlações negativas com minerais nas fezes, estão *Sutterella*, *Prevotella*, *Paraprevotella*, *Streptococcus*, *Roseburia* e um gênero não identificado do filo *Elusimicrobia*.

Em contrapartida, os minerais nas fezes apresentaram correlação positiva com *Collinsella*, *Enterococcus*, *Desulfovibrio*, *Anaerotruncus*, *Oxalobacter*, *Slackia*, *Anaerostipes*, *Acidaminococcus*, *Parabacteroides*, *Odoribacter*, *Holdemania*, *Oscillospira* e *Bilophila*. Nota-se, ainda, que *Bacteroides* e *Prevotella* foram agrupados em *clusters* diferentes.

Figura 12. Correlação entre a variação (delta) da abundância de gêneros e biomarcadores avaliados entre os tempos. São Paulo, 2019.



Legenda: *Heatmap* construído com o coeficiente da correlação (R). * $p < 0,05$.

7.5.6 OTUs que mudaram

Ao total, 670 unidades taxonômicas foram modificadas durante o período de suplementação com castanha-do-brasil, de acordo com o teste t não paramétrico. A partir da tabela de OTUs, construiu-se uma tabela de gêneros a fim de detalhar os efeitos da intervenção no microbioma.

Dos 129 gêneros identificados no estudo, 38 mudaram com a intervenção. Entre eles estão *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Collinsella*, *Prevotella*, *Enterococcus*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Rumonococcus*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Dialister*, *Sutterella*, *Bilophila*, *Desulfovibrio* e *Campylobacter*.

Em seguida, a análise de regressão linear foi realizada para determinar quais os gêneros possivelmente influenciam as concentrações dos outros marcadores bioquímicos avaliados, considerando as amostras antes e após a suplementação (n=194). Além disso, avaliamos quais mudanças no microbioma são explicadas pela concentração dos minerais nas fezes durante o período de estudo. No *heatmap* construído com os valores de p, os fatores das linhas explicam os das colunas (**Figura 13**).

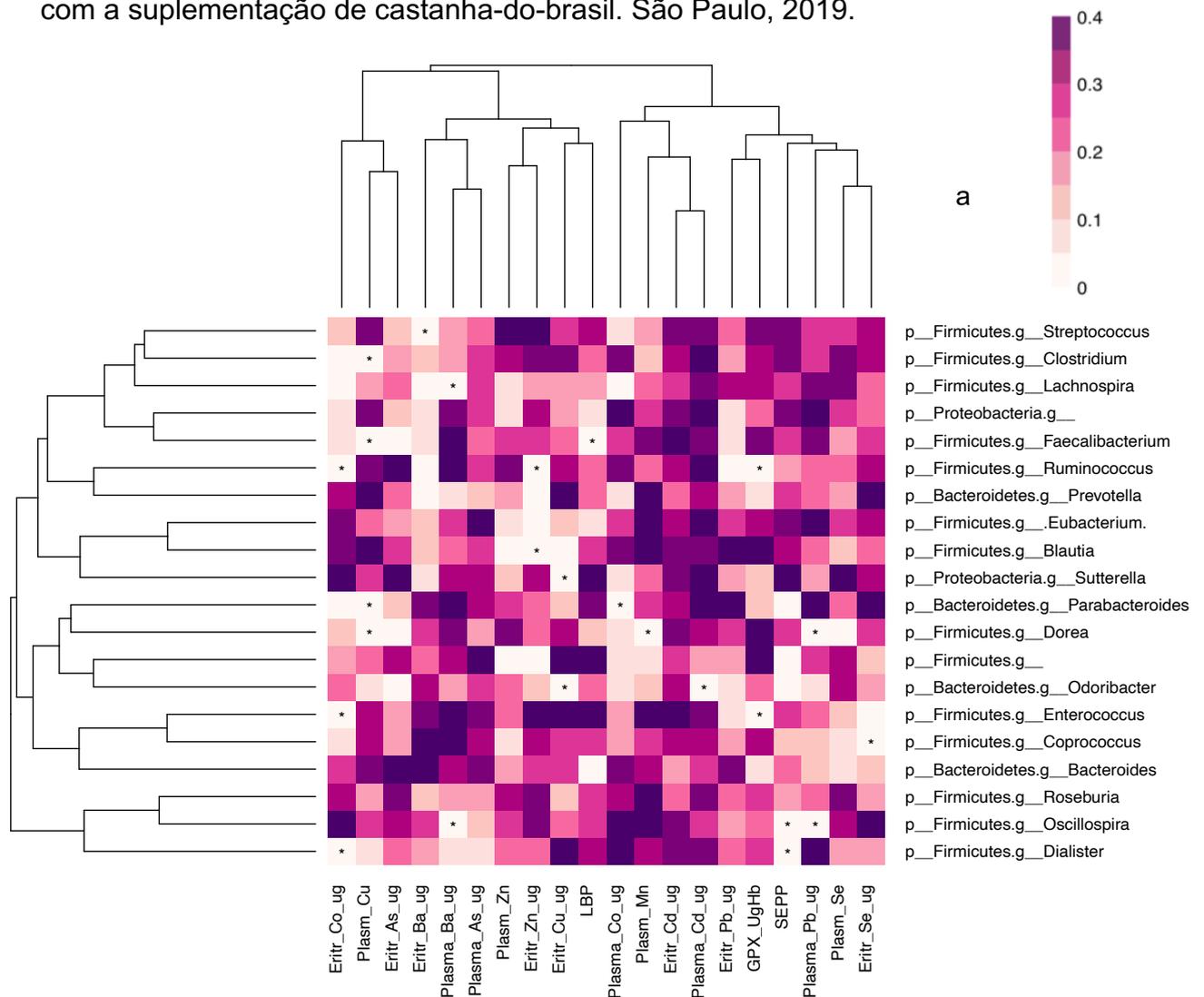
Na primeira abordagem da análise de regressão, os marcadores bioquímicos no plasma e eritrócitos foram explicados pela abundância de grupos bacterianos (**Figura 13a**). Entre os marcadores de selênio, a atividade da GPX pode ser explicada pelos gêneros *Enterococcus* (p=0,023) e *Ruminococcus* (p=0,034) e a concentração do mineral nos eritrócitos pela abundância de *Coprococcus* (p=0,002). A concentração de SEPP, por sua vez, pode ser predita por *Dialister* (p=0,02) e *Oscillospira* (p=0,02). Os minerais cobalto e cobre foram os que apresentaram maior número de gêneros preditores.

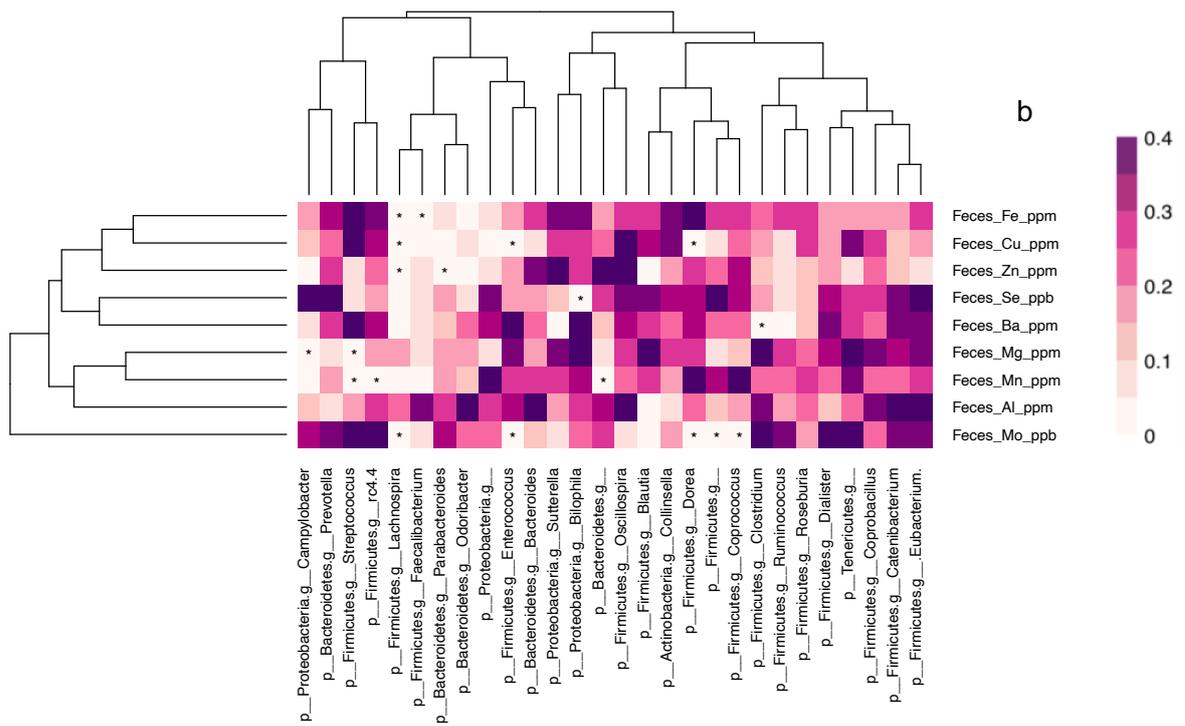
A segunda análise revelou que a concentração de selênio nas fezes pode explicar a abundância de *Bilophila* (p<0,0001) (**Figura 13b**). Zinco, um importante cofator do metabolismo de bactérias, pode ser considerado preditor de *Lachnospira* (p=0,02) e *Parabacteroides* (p=0,004). Entre os micronutrientes avaliados nas fezes, o molibdênio foi o que mais predisse os gêneros que mudaram neste estudo: *Coprococcus* (p=0,021), *Dorea* (p=0,043), *Enterococcus* (p<0,0001) e *Lachnospira* (p=0,037).

A abundância de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta se mostrou fortemente influenciada pelos minerais presentes nas fezes. Entre

elas, estão os gêneros *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Dorea*, *Blautia*, *Bacteroides* e *Prevotella*. *Faecalibacterium*, um conhecido gênero comensal da microbiota intestinal, se mostrou fortemente influenciada por ferro ($p=0,02$) nas fezes. O gênero que mais apresentou interferências significativas pela concentração de minerais foi *Lachnospira*, predita por zinco, molibdênio, cobre ($p=0,01$) e ferro ($p=0,006$).

Figura 13. Regressão linear entre minerais nas fezes e os gêneros modificados com a suplementação de castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.





Legenda: Os fatores das linhas explicam os das colunas. *Heatmap* construído com os valores de p . * $p < 0,05$.

== DISCUSSÃO ==

8. DISCUSSÃO

Este estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da intervenção com castanha-do-brasil sobre o microbioma intestinal. Os resultados revelaram que a composição global de bactérias não foi impactada pela suplementação, porém observamos influência significativa dos minerais bário, zinco, cobre e ferro nas fezes na composição e/ou distribuição de grupos bacterianos no Tempo 1. Nossos resultados reforçaram que a castanha-do-brasil é uma excelente fonte de selênio e foi eficaz em melhorar o *status* do mineral do indivíduo, comprovado pelo aumento significativo das concentrações de selênio no organismo (plasma, eritrócitos e fezes) e de seus marcadores funcionais (selenoproteína P e atividade da GPX).

8.1 A CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-brasil é um alimento de alta complexidade nutricional, rico em ácidos graxos mono e poli-insaturados, compostos fenólicos e minerais. Tal composição é característica das sementes oleaginosas e recentemente muito explorada para benefícios à saúde humana. Neste estudo, o perfil de ácidos graxos da castanha teve predominância dos ácidos poli-insaturados linoleico (39,1%) e oleico (32,8%), semelhantemente ao descrito por Colpo *et al.* (2014) e Pires (2012). Esses tipos de lipídeos estão envolvidos em prevenção do risco cardiovascular, melhora do quadro inflamatório e do perfil lipídico, sobretudo em grupos de risco, como obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2, entre outros.

Os teores dos minerais nas plantas variam conforme o conteúdo do micronutriente no solo de cultivo, bem como condições ambientais, capacidade genética da planta em acumular minerais, práticas de cultivo e possíveis interferências exógenas de contaminação do produto (RAYMAN, 2008).

A ampla variedade de elementos traço adiciona outros atributos à castanha-do-brasil. Entre os compostos inorgânicos da noz utilizada no estudo, destacam-se selênio, bário, cobre, manganês, zinco e magnésio. Em comparação com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA, 2018), nossas castanhas apresentaram maiores concentrações de selênio, magnésio, manganês e zinco. Embora os minerais estejam presentes em

quantidades pequenas, com exceção do selênio, frente às recomendações nutricionais estabelecidas, observaram-se neste estudo modificações significantes no sangue e nas fezes após a intervenção com castanha.

A castanha-do-brasil foi mapeada quanto a sua concentração de selênio em amostras comercializadas em diferentes estados brasileiros (CARDOSO *et al.*, 2017). Observou-se variação de 5,0 a 71,5 µg selênio/g castanha, sendo o estado de Amazonas com maior teor do mineral na oleaginosa. Comparativamente, a castanha utilizada no presente estudo continha 5 vezes mais selênio ($369,9 \pm 29,5$ µg/g) que a maior concentração reportada. Possivelmente, o melhoramento genético implantado na fazenda produtora desta castanha (Agropecuária Aruanã S/A, Itacoatiara – AM) pode ter aumentado a capacidade da planta de absorver e acumular selênio.

Parekh *et al.* (2008) reportaram que o conteúdo de selênio é inversamente proporcional ao de bário na castanha-do-brasil. A concentração de bário variou de 0,01 a 11,0 mg por noz de castanha-do-brasil, enquanto nossos dados equivaleram a 1,0 mg por noz. Esse elemento é incorporado aos alimentos devido à presença do minério de hollandite nos solos ($Ba_2Mn_8O_{16}$) (CARDOSO *et al.*, 2017).

O conteúdo de metais essenciais e tóxicos foi previamente caracterizado em nozes e sementes comestíveis, das quais a castanha-do-brasil apresentou maior concentração de selênio, bário, cálcio, cobalto e estrôncio. Além disto, avaliou-se a biodisponibilidade dos minerais provindos dessas nozes *in natura* por meio do método de dialisabilidade, simulando *in vitro* os processos de digestão gastrointestinal e absorção intestinal pelo organismo. Foi observada biodisponibilidade moderada para os metais essenciais (cálcio, cobalto, cromo, cobre, ferro, fósforo, potássio, manganês, magnésio, molibdênio, selênio e zinco) e baixa para os metais tóxicos (alumínio, bário, mercúrio e cádmio) das nozes e sementes, contribuindo para melhor qualidade nutricional desses alimentos (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2016).

A maioria dos metais é altamente bioacessível, sendo liberados enzimaticamente da matriz alimentar, porém com reduzida capacidade de atravessar a membrana de diálise (KAFAOGLU *et al.*, 2016; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2016). A proporção biodisponível de minerais se mostrou dependente da composição de macro e micronutrientes nas nozes. A fração biodisponível de

cálcio, manganês e zinco foi negativamente correlacionada com o conteúdo proteico da amostra, possivelmente pelo aumento da força iônica aquosa, resultando em menor solubilidade dos elementos na fase aquosa e, portanto, menor taxa de biodisponibilidade. Ainda, esses metais apresentaram correlação positiva com a fibra alimentar solúvel presente nas nozes, divergindo do conceito anterior de que o teor de fibras reduz a interação entre enzimas e alimentos (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2010).

Outro importante fator interferente na biodisponibilidade é a forma química dos minerais. Além de se destacar quantitativamente na castanha-do-brasil, o selênio está em suas formas mais bioativas, os selenoaminoácidos (selenometionina e selenocisteína), como revela o estudo de especiação química conduzido por da Silva *et al.* (2013). A selenocisteína é a forma química funcional do selênio no organismo, devido a sua incorporação nas 25 selenoproteínas humanas identificadas até o momento. Este dado é pertinente dado que as diferentes espécies de selênio têm processos absorptivos e metabólicos diferentes. No ambiente intestinal, após a digestão gastrointestinal simulada, apenas a selenometionina foi encontrada como bioacessível, o que corresponde a 74% do total de selênio presente na castanha-do-brasil (DA SILVA *et al.*, 2013).

8.2 INFLUÊNCIA DA CASTANHA-DO-BRASIL NOS MARCADORES BIOQUÍMICOS

Desta forma, a castanha-do-brasil é qualificada como uma alternativa alimentar para suplementação de selênio. A intervenção com castanha-do-brasil acrescentou 6,7 vezes o valor recomendado para selênio de 55 µg/dia, porém não ultrapassou o limite máximo tolerável (UL). Pelo contrário, os demais micronutrientes presentes na castanha pouco contribuíram para a ingestão diária frente ao total da dieta. A ingestão alimentar dos minerais foi considerada adequada segundo os valores de referência propostos pelo Instituto de Medicina Americano (IOM, 2000), exceto para fibras e magnésio.

A quantificação dos nutrientes da dieta foi realizada com base na TBCA 2018, prioritariamente, e a Tabela da *United States Department of Agriculture* (USDA), para aqueles alimentos não encontrados na TBCA. Os métodos de avaliação da ingestão alimentar possuem erros intrínsecos, que podem afetar a

precisão dos resultados, como depender da memória do entrevistado, omissão de informações, falta de detalhes sobre as porções e os alimentos consumidos, ausência ou acurácia de todos os nutrientes (em especial, metais pesados) e alimentos nas tabelas de composição, alta variabilidade de micronutrientes nos alimentos de diferentes regiões, entre outros. Assim, tais métodos devem ser empregados em associação com indicadores bioquímicos para aumentar a precisão diagnóstica (Fisberg, Marchioni e Colucci, 2009).

As castanhas utilizadas no presente estudo foram provenientes da região amazônica, cujo solo é selenífero e reflete diretamente no conteúdo do micronutriente nos alimentos e na ingestão pela população local. Em contrapartida, a região sudeste foi apontada como pobre em selênio nos solos e alimentos, favorecendo a deficiência dietética e bioquímica do mineral (LEMIRE *et al.*, 2010; SHALTOUT *et al.*, 2011; DONADIO *et al.*, 2011). A diferença primordial entre as regiões onde os estudos foram conduzidos é a concentração de selênio nos alimentos.

Ao contrário do esperado, os participantes não estavam deficientes nesse mineral no início do estudo, como fora apontado por Bortoli (2009) e Donadio (2011) em populações aparentemente saudáveis de São Paulo (**Tabela 13**). Dos estudos realizados nas últimas décadas na população brasileira sem doenças crônicas não transmissíveis, este apresenta uma das maiores concentrações de selênio no plasma e eritrócitos, atrás apenas dos trabalhos em Manaus (SOARES, 2018; BORTOLI, 2009) e São Paulo (DONADIO, 2016). Em hipótese, o fluxo de alimentos entre as regiões brasileiras e aumento do consumo de alimentos fonte de selênio, sobretudo a castanha-do-brasil, podem ter contribuído para melhora da ingestão de selênio pela população.

Nossos resultados confirmaram a eficiência da castanha-do-brasil (370 µg selênio/dia) em melhorar o *status* de selênio da população, de acordo com aumento expressivo das concentrações no plasma, eritrócitos e fezes, e das avaliações funcionais da selenoproteína P e atividade da GPX. Do mesmo modo, diversos estudos avaliaram a capacidade da castanha-do-brasil em melhorar o estado nutricional relativo ao selênio, bem como seus efeitos no contexto de saúde e doença, como obesidade e diabetes *mellitus* tipo 1 (COMINETTI *et al.*, 2012; PIRES, 2012) (**Tabela 13**).

Tabela 13. Estudos com suplementação de castanha-do-brasil e *status* de selênio realizados no Brasil. São Paulo, 2019.

Estudos	População	Suplement. (µg)	Se eritrócitos (µg/L)		Se plasma (µg/L)		Atividade GPX (U/g Hb)		SEPP (ng/dL)		Se fezes (ppm)	
			Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
HASHIMOTO <i>et al.</i> , 2019	97 adultos sem doenças (SP)	369,9	161,9 ± 56,2	635,1 ± 232,9	79,6 ± 24,3	235,5 ± 63,7	49,5 ± 13,3	123,1 ± 46,3	5,8 ± 2,4	8,6 ± 9,2	239,2 ± 251,7	463,9 ± 272,5
DONADIO, 2016	130 adultos sem doenças (SP)	300	184,3 ± 87,4	467,0 ± 176,0	96,7 ± 29,6	292,8 ± 95,4	64,5 ± 18,3	64,8 ± 19,9	-	-	-	-
COMINETTI <i>et al.</i> , 2012	37 mulheres obesas (SP)	290	60,5 ± 22,6	205,9 ± 42,0	55,7 ± 13,3	132,5 ± 34,9	36,6 ± 17,1	53,6 ± 20,4	-	-	-	-
PIRES, 2012	35 pacientes com DM1 (SP)	290	62,1 ± 14,1	148,0 ± 49,1	58,9 ± 13,4	122,4 ± 33,7	40,2 ± 10,6	40,3 ± 12,2	-	-	-	-
Faixa de referência			90 - 190		60 - 120		27,5 - 73,6		-		-	

Estudos	Local	Se eritrócitos (µg/L)	Se plasma (µg/L)	GPX (U/g Hb)	Metodologia
Soares, 2018	Manaus/AM	210,9 ± 62,4	111,4 ± 36,9	72,9 ± 21,8	ICP-MS
Bortoli, 2009	Novo Airão/AM	199,8 ± 104,4	101,8 ± 50,9	73,3 ± 16,8	HGAAS
Donadio, 2016	São Paulo/SP	184,3 ± 87,4	96,7 ± 29,6	64,5 ± 18,3	ICP-MS
Hashimoto, 2019	São Paulo/SP	161,9 ± 56,2	79,6 ± 24,3	49,5 ± 13,3	ICP-MS
Coutinho, 1999	São Paulo/SP	115,6 ± 25,6	73,5 ± 12,5	19,1 ± 5,3	HGAAS
Santos, 2013	Fortaleza/CE	101,5 ± 21,5	62,6 ± 11,5	38,6 ± 13,7	HGAAS
Bortoli, 2009	São Paulo/SP	86,3 ± 34,7	81,7 ± 18,8	37,1 ± 12,2	HGAAS
Bortoli, 2009	Cubatão/SP	85,9 ± 24,9	60,7 ± 19,4	38,2 ± 9,7	HGAAS
Rocha, 2015	Porto Velho/RO	75,4 ± 29,9	49,8 ± 18,6	45,1 ± 19,3	HGAAS
Almondes, 2015	Teresina/PI	70,9 ± 15,3	54,9 ± 13,2	46,1 ± 14,9	HGAAS
Donadio, 2011	São Paulo/SP	56,1 ± 44,4	54,1 ± 22,5	40,2 ± 17,6	HGAAS
Faixa de referência	-	90 - 190	60 - 120	27,5 - 73,6	-

Legenda: SEPP: selenoproteína P; GPX: glutationa peroxidase; ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado; HGAAS: Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos.

As concentrações no plasma refletem o estado nutricional à curto prazo e respondem rapidamente a alterações na ingestão pela dieta ou por suplementação. São biomarcadores que indicam os minerais disponíveis na circulação para utilização pelo organismo (HAMBIDGE, 2003). Nesse compartimento sanguíneo, houve aumento significativo de selênio (196,0%), cobalto (18,7%), arsênio (128,5%), bário (28,6%) e chumbo (60,2%) e redução de zinco (-12,6%) e cobre (-9,1%) após a intervenção com castanha-do-brasil. Portanto, é plausível considerar que os minerais provenientes da castanha levaram ao aumento de seus parâmetros plasmáticos no período pós intervenção. Apesar de significativas, as diferenças encontradas para zinco e cobre foram numericamente irrelevantes.

A importância da caracterização do *status* de minerais identificados na castanha se dá, sobretudo, pela participação como cofator de enzimas e outras proteínas, relacionadas a diversas vias metabólicas, como eritropoese, regulação da ATP, metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, formação óssea e de vasos sanguíneos, reações redox, coagulação, modulação do sistema imune, entre outras. A atividade antioxidante é característica em comum entre os micronutrientes selênio (GPX), ferro (catalase), manganês, cobre e zinco (SOD) (RAYMAN, 2008).

Os metais essenciais e tóxicos também foram avaliados no plasma de 70 adultos saudáveis de Atenas (Grécia) (ASPROULI *et al.*, 2019). Observaram-se concentrações semelhantes para cádmio ($0,04 \pm 0,0 \mu\text{g/L}$), menores para arsênio ($0,07 \pm 2,2 \mu\text{g/L}$), cobalto ($0,4 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$) e bário ($5,9 \pm 8,5 \mu\text{g/L}$) e maiores para zinco ($1354,0 \pm 654,0 \mu\text{g/L}$) e cobre ($1203,0 \pm 519,0 \mu\text{g/L}$) em comparação aos nossos resultados.

Rocha *et al.* (2016) dosaram minerais no soro de 240 adultos doadores de sangue residentes em Maringá (Paraná). As concentrações médias foram menores que as encontradas no presente estudo para todos os minerais avaliados, incluindo arsênio ($1,15 \mu\text{g/L}$), cobalto ($0,15 \mu\text{g/L}$), manganês ($0,53 \mu\text{g/L}$), zinco ($738,9 \mu\text{g/L}$) e cobre ($891,4 \mu\text{g/L}$). Entretanto, deve-se considerar que metais medidos no soro podem ser parcialmente coagulados na coleta.

De maneira geral, as concentrações plasmáticas e séricas de arsênio, cádmio, cobalto, manganês e zinco deste estudo foram maiores, independente da intervenção, que as encontradas em populações saudáveis do Canadá

(GOULLÉ *et al.*, 2005), Grécia (ASPROULI *et al.*, 2019), Marília (Brasil) (ROCHA *et al.*, 2016) e Rússia (SKALNAYA *et al.*, 2018) (**Apêndice 1**). Uma das principais formas de exposição a metais potencialmente tóxicos é a ingestão de alimentos e água contaminados. Defensivos agrícolas, fertilizantes, lixo industrial e metalúrgico, fumaça da queima de combustíveis e do tabaco são contribuintes antropogênicos comuns para o teor de metais potencialmente tóxicos no solo, como arsênio, cádmio, bário, chumbo, cobalto, zinco, mercúrio, cromo e níquel. A exposição a metais pesados é alarmante devido sua alta reatividade química e capacidade de bioacumulação no organismo, resultando em efeitos adversos a diversos órgãos (REHMAN *et al.*, 2018).

A dosagem eritrocitária é considerada um marcador do *status* deste mineral no organismo de longo prazo, uma vez que a meia-vida destas células é de 120 dias. Quando liberados para a corrente sanguínea após a absorção, os nutrientes podem estar em sua forma livre ou acoplados a proteínas para transporte e distribuição nos diferentes órgãos, tecidos e células. É possível também que esses elementos fiquem retidos por uma ligação inespecífica aos eritrócitos e assim não sejam entregues até os seus locais alvo (THOMSON, 2004).

Além deste estudo, as concentrações dos minerais no sangue total já foram avaliadas em populações saudáveis dos estados de São Paulo (TAKEDA *et al.*, 2017; KIRA *et al.*, 2016; KUNO *et al.*, 2013), Acre (FREIRE *et al.*, 2015), Paraná (ALMEIDA LOPES *et al.*, 2017) e diversos (NUNES *et al.*, 2010) (**Apêndice 1**). As concentrações médias observadas nesses estudos brasileiros foram: chumbo (22,99 µg/L), cádmio (0,15 µg/L), arsênio (3,07 µg/L) e cobre (944,5 µg/L). Como esperado, a população paulista apresentou os maiores valores de chumbo, cádmio, arsênio e manganês, uma vez que é mais exposta a contaminantes que as demais.

Em relação à população mundial, as concentrações médias dos minerais no sangue foram: selênio (152,75 µg/L), chumbo (22,35 µg/L), cádmio (0,41 µg/L), arsênio (2,77 µg/L), cobalto (0,33 µg/L), zinco (5664,29 µg/L), bário (19,99 µg/L) e cobre (791,78 µg/L). Consideraram-se 28.118 indivíduos saudáveis de estudos realizados na França (CESBRON *et al.*, 2013; NISSE *et al.*, 2017; YEDOMON *et al.*, 2017), Estados Unidos (NHANES - JAIN, CHOI, 2015), Paquistão (MEMON *et al.*, 2017), China (ZHANG *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2019),

Canadá (GOULLÉ *et al.*, 2005; HAINES *et al.*, 2017) e Itália (BOCCA *et al.*, 2011) (**Apêndice 1**). A população deste estudo apresentou maiores concentrações de selênio, arsênio (ambos os tempos), chumbo, cádmio, cobre (após a intervenção), cobalto, zinco (antes da intervenção) em comparação à média mundial.

Nosso estudo apresentou concentrações significativamente menores de cobalto (-69,1%), zinco (-81,4%), arsênio (-20,8%) e bário (-59,7,6%) e maiores de selênio (311,8%), cobre (69,5%) e chumbo (85,0%) nos eritrócitos após a intervenção, apesar de estarem presentes na castanha-do-brasil e não terem sua ingestão alimentar alterada. Presume-se, assim, que os minerais reduzidos possam ter sido direcionados, incorporados aos seus locais alvos e diminuídos da massa eritrocitária. A ingestão de selênio foi suficientemente elevada para ser distribuído aos tecidos alvo e incorporado aos eritrócitos.

Interações entre nutrientes também podem explicar as diferentes respostas dos minerais à suplementação com castanha-do-brasil. As interações podem alterar a biodisponibilidade de micronutrientes por competição pelo mesmo sítio de absorção, propriedades físicas e químicas semelhantes, metabolismos codependentes, participação simultânea no sítio ativo de enzimas, reação química entre os elementos, entre outros (COZZOLINO, 1997).

Em nível de absorção, zinco e cobre competem pelo mesmo sítio de ligação das metalotioneínas, uma família de proteínas cujas funções são de se ligarem a elementos traço livres e impedir sua absorção, transporte de íons metálicos para outras proteínas, agente de detoxificação e proteção contra metais pesados. A afinidade por esta proteína segue a ordem mercúrio, prata, cobre, cádmio e zinco (BREMNER e BEATTIE, 1990). Portanto, a ação das metalotioneínas pode ter sido um fator chave para as respostas antagônicas de cobre e zinco nos eritrócitos após a intervenção com castanha.

O selênio tem sido adotado como um importante agente contra a toxicidade induzida por metais pesados, como arsênio, chumbo, cádmio e mercúrio. A ação do selênio se baseia em sua capacidade de sequestrar e transformar esses minerais em complexos biologicamente inertes. Além disso, novas evidências apontam para o papel na ativação de vias de sinalização de estresse mediadas por arsênio e cádmio, como o fator nuclear Nrf2 e estresse do retículo endoplasmático, reduzindo a imunotoxicidade, inflamação, apoptose

e injúria do tecido (ZWOLAK, 2019). Assim, o aumento da concentração de selênio pode ter contribuído para a redução de arsênio e cádmio nos eritrócitos.

Nas fezes, a concentração do mineral reflete a quantidade ingerida, absorvida, utilizada pelo organismo e remanescente no cólon para influenciar a composição da microbiota. Esta fração é então disponibilizada às bactérias presentes no ambiente intestinal para utilização em seu metabolismo. Nesse estudo, a concentração dos minerais avaliados foi significativamente reduzida no conteúdo fecal, com exceção do alumínio, o que indica maior utilização pelo organismo humano e pela microbiota intestinal. Esse foi o primeiro estudo a avaliar a influência da presença de minerais nas fezes de humanos na microbiota e, por isso, não existem estudos suficientes para estabelecer valores de referência para esse compartimento.

Portanto, é notório que o estado nutricional relativo a minerais é influenciado por fatores diversos, como capacidade individual de digestão, absorção e utilização de nutrientes, interações com outros minerais, presença de polimorfismos em enzimas chave do metabolismo, ingestão alimentar e, neste estudo, enfatizamos a relação do microbioma com a disponibilidade de minerais.

8.3 EFEITOS DA INGESTÃO DE CASTANHA-DO-BRASIL NO MICROBIOMA INTESTINAL

O microbioma intestinal está emergindo como um dos principais fatores para compreensão e modulação dos sistemas em condições fisiológicas e patológicas. As funções atribuídas a esse conjunto de microrganismos são, sobretudo, fermentação de nutrientes não digeríveis em metabólitos absorvíveis, competição com patógenos, metabolização de xenobióticos, síntese de vitaminas, participação no sistema imune e manutenção da barreira intestinal (HEINTZ-BUSCHART e WILMES, 2018).

Devido a seu importante papel no contexto saúde-doença, estudos sobre a modulação estrutural e funcional do microbioma crescem exponencialmente na literatura, sendo considerado um alvo terapêutico versátil. Diversos fatores são capazes de influenciar o microbioma intestinal, divididos em 4 categorias: características intrínsecas (imunidade inata e adaptativa, IMC, sexo, idade, presença de doenças, ritmo circadiano) e extrínsecas (dieta, medicamentos, hábitos culturais, atividade física) ao hospedeiro, fatores ambientais (contato

com o local e pessoas que vive, tipo de parto) e próprios do microbioma (composição inicial, interação entre bactérias) (SCHMIDT *et al.*, 2018; RINNINELLA *et al.*, 2019). Dentre tais alternativas, a dieta é considerada fácil e rapidamente modificável e que provoca menos efeitos colaterais (SCOTT *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2014).

O padrão alimentar pode influenciar a composição e diversidade do microbioma. Em 2011, Wu e colaboradores propuseram que a classificação da microbiota em enterogradientes, de acordo com os gêneros predominantes, é associada a padrões alimentares de curto e longo prazo. Indivíduos com maior ingestão habitual de proteína animal, diferentes tipos de aminoácidos e gordura saturada apresentaram *Bacteroides* como o gênero dominante em sua microbiota. Por outro lado, o enterótipo *Prevotella* teve associação com maior consumo de produtos de origem vegetal, menor de produtos animais, com alto teor de açúcares simples e carboidratos totais.

Após esses estudos, outros pesquisadores exploraram a presença de enterótipos em diferentes populações (WU *et al.*, 2011; OU *et al.*, 2013; TYAKHT *et al.*, 2013; YATSUNENKO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2017). O número de *clusters* dominantes ainda não está bem estabelecido na literatura. De Moraes *et al.* (2017) identificaram 3 enterótipos dominantes em 268 indivíduos brasileiros não diabéticos: *Bacteroides* (n=111), *Prevotella* (n=55) e *Ruminococcaceae* (n=102). Entretanto, observamos apenas 2 enterogradientes na população no início do estudo: *Bacteroides* (n=63) e *Prevotella* (n=34). É possível que o número amostral do estudo tenha influenciado esse dado. Até onde se sabe, este é o segundo estudo a descrever enterótipos na população saudável brasileira.

Embora com suporte estatístico fraco, os enterótipos identificados difeririam quanto as concentrações de minerais nas fezes. Os indivíduos do *cluster Bacteroides* apresentaram concentrações de bário, alumínio, cobre, ferro e molibdênio significativamente maiores que os indivíduos do grupo *Prevotella*. Segundo os dados da literatura, é possível especular que os alimentos fonte desses minerais façam parte do padrão alimentar associado ao enterótipo *Bacteroides*, tais como carnes, ovos, vísceras, entre outros produtos de origem animal (WU *et al.*, 2011).

A abundância relativa das bactérias também foi descrita em outros níveis taxonômicos. Foram identificados 15 filos na população de estudo, sendo que os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* representaram 95% da microbiota intestinal. Em termos gerais, a microbiota intestinal saudável apresenta o predomínio dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, com menor abundância de *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*. A estrutura e diversidade da microbiota intestinal em indivíduos saudáveis também foram avaliadas por pesquisadores de diferentes países, incluindo Estados Unidos (ARUMUGAM *et al.*, 2011; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; TURPIN *et al.*, 2016), Canadá (TURPIN *et al.*, 2016). Apesar dos dados acumulados desses estudos, não há uma definição da composição da microbiota intestinal normal ou ótima, e sim um equilíbrio saudável da função e metabolismo (GEVERS *et al.*, 2012; SALONEN *et al.*, 2012).

Com o intuito de modelar a microbiota a fim de se assemelhar a uma considerada saudável, é possível aplicar diferentes abordagens de acordo com padrão alimentar, introdução de um alimento ou suplemento nutricional, tipo e quantidade de proteína, carboidrato, lipídeo ou outros nutrientes específicos, como inulina, frutooligossacarídeos e compostos fenólicos (RAJOKA *et al.*, 2017). Embora pouco estudadas no cenário do microbioma, as oleaginosas são ótimas escolhas por seus efeitos prebióticos, ou seja, capacidade de estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de gênero(s) ou espécie(s) que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (ROBERFROID *et al.*, 2010). Essa característica pode ser explicada pelo seu conteúdo de nutrientes, previamente descritos, que fornecem substratos para microbiota intestinal e formação de novos metabólitos bioativos (LAMUEL-RAVENTOS e ONGE, 2017).

Neste estudo, a suplementação de castanha-do-brasil não foi capaz de alterar a composição global da microbiota, segundo resultados da PERMANOVA. A variabilidade e resposta individuais à intervenção com castanha-do-brasil podem ter contribuído para que não observássemos efeitos consideráveis no microbioma global. Além disto, a comunidade microbiana eubiótica é considerada estável contra perturbações leves ou ao longo do tempo, já que sua função e composição são resilientes e resistentes a mudanças. Portanto, a microbiota em eubiose tende a permanecer inalterada durante um evento (resistência) e, caso seja modificada, é capaz de recuperar rapidamente

sua composição funcional e taxonômica inicial (resiliência) (SOMMER *et al.*, 2017).

Comunidades microbianas com maior diversidade de espécies mostraram ser mais resistentes a perturbações, devido à adaptação a recursos limitados e ao controle do influxo ou supracrescimento de outras espécies. Por outro lado, a diversidade diminuída está associada a condições reconhecidamente disbióticas, como obesidade, diabetes tipo 2, infecção recorrente por *Clostridium difficile*, entre outras (LOZUPONE *et al.*, 2012; SOMMER *et al.*, 2017). Em nosso estudo, não observamos alteração dos índices de alfa diversidade avaliados com a intervenção de castanha-do-brasil.

A alta variabilidade entre indivíduos, associada à estabilidade atemporal da microbiota, podem ter contribuído para a ausência de efeito significativo da intervenção com castanha-do-brasil na proporção dos filos, classes, ordens, famílias e gêneros predominantes. Excepcionalmente, observou-se aumento significativo da classe *Gammaproteobacteria* ($p=0,03$), que inclui *Escherichia coli* e patógenos bem conhecidos *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio* e *Pseudomonas* (WILLIAMS *et al.*, 2010). Do mesmo modo, deve-se destacar a alteração de gêneros menos abundantes, porém envolvidas com importantes funções metabólicas no hospedeiro. Registrou-se o aumento da abundância relativa de *Faecalibacterium* ($p=0,005$), *Bilophila* ($p=0,048$) e *Bulleidia* ($p=0,017$) e redução de *Parabacteroides* ($p=0,002$) após a ingestão da castanha por 2 meses.

O gênero *Faecalibacterium*, sobretudo a espécie *prausnitzii*, é associado com a modulação do metabolismo humano por diferentes vias: mais importante produtor de butirato no cólon humano, propriedades anti-inflamatórias (induz a redução de NFkB, IL-12, IL-8 e TNF- γ , o aumento de IL-10 e produz ácido salicílico, outro importante modulador anti-inflamatório), melhora da barreira intestinal através da expressão de proteínas das *tight junctions*, influencia os níveis de serotonina produzida pelo trato gastrointestinal. É considerado potencial biomarcador da microbiota e saúde intestinal. A abundância dessa bactéria é correlacionada negativamente com a presença e atividade de doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa, doença de Crohn, síndrome do intestino irritável e câncer colorretal (FERREIRA-HALDER *et al.*, 2017; LOPEZ-SILES *et al.*, 2017). A suplementação de nanopartículas de selênio em concentração moderada (0,9 mg/kg ração) aumentou a abundância de bactérias

benéficas, como *Lactobacillus* e *Faecalibacterium*, e a produção de ácido butírico em aves (GANGADOO *et al.*, 2018). Isto indica que *Faecalibacterium* responde positivamente à suplementação com selênio, assim como observamos no presente estudo.

Por sua vez, *Bilophila* é classificada como bactéria sulfidogênica, isto é, produtora de sulfeto de hidrogênio (H₂S) a partir da redução de compostos sulfatados contidos nos aminoácidos cisteína e metionina. O produto final dessa reação desencadeia diretamente a inflamação, efeitos genotóxicos e citotóxicos, o que prejudica a barreira intestinal. Especulamos que essas bactérias possam ter incorporado os aminoácidos análogos a cisteína e metionina que contém resíduos de selênio (selenocisteína e selenometionina), que estavam mais disponíveis após a suplementação com castanha-do-brasil, e assim aumentado seu metabolismo e abundância. Dietas baseadas em produtos animais aumentaram a abundância de *Bilophila* e outras bactérias tolerantes a bile, como *Alistipes* e *Bacteroides* (DAVID *et al.*, 2014). Neste grupo também estão *Desulfovibrio spp.*, *Desulfobacter spp.*, *Desulfobulbus spp.*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Salmonella*, *Enterobacter*, entre outras bactérias (CARBONERO *et al.*, 2012).

Poucos estudos foram encontrados sobre o gênero *Bulleidia*. Essa bactéria do filo *Firmicutes* é mais encontrada na microbiota oral e em condições de infecção. A abundância aumentada de *Bulleidia* já foi encontrada em pacientes com pré diabetes e diabetes tipo 2 (LAMBETH *et al.*, 2015). Por outro lado, a intervenção com amido resistente foi capaz de aumentar a abundância de *Bulleidia*, *Prevotella*, *Dialister*, *Ruminococcus* e *Megasphaera* nas fezes em comparação aos animais controle (p<0,001) (UMU *et al.*, 2015).

O gênero *Parabacteroides*, reduzido após a intervenção com castanha-do-brasil, é um dos membros centrais do microbioma intestinal em humanos (FALONY *et al.*, 2016). A espécie *distasonis* foi relacionada à redução do ganho de peso, hiperglicemia e esteatose hepática via produção de succinato e ácidos biliares secundários em animais expostos à dieta hiperlipídica (WANG *et al.*, 2019).

Até o momento, a modulação do microbioma intestinal por meio da ingestão de oleaginosas (nozes, amêndoa ou pistache) foi investigada por 5 estudos, dos quais 4 eram em humanos e 1 em ratos (**Tabela 14**). Este foi o

primeiro estudo a avaliar os efeitos da ingestão de castanha-do-brasil nesse contexto. Os estudos em humanos não observaram diferença significativa nos índices de alfa diversidade com a intervenção alimentar. Entretanto, os animais alimentados com nozes (18% das calorias totais) por 10 semanas apresentaram aumento da riqueza e *evenness* (índice Shannon) e dominância de espécies (índice Simpson) na comunidade bacteriana (BYERLEY *et al.*, 2017). Apesar de não observarem efeito na composição global do microbioma, esses estudos reportaram o aumento da abundância de bactérias produtoras de butirato após a ingestão de nozes (BYERLEY *et al.*, 2017; HOLSCHER *et al.*, 2018) e pistache (UKHANOVA *et al.*, 2014), assim como o presente estudo.

Além disso, este trabalho foi inédito em mostrar a influência das concentrações de minerais na constituição de bactérias intestinais em humanos, após a intervenção com um alimento, observado por meio da PERMANOVA. O conteúdo de bário, manganês, zinco, cobre e ferro nas fezes foi significativamente associado à composição e/ou distribuição de grupos bacterianos. Esta relação foi também observada no início do estudo, o que pode ter contribuído para os resultados ao considerar a intervenção (n=194).

Assim como seu hospedeiro, as bactérias necessitam minerais para seus processos biológicos, como respiração celular, transferência e armazenamento de energia, replicação e transcrição de DNA e ação antioxidante. As bactérias possuem mecanismos sofisticados para manter a homeostase dos minerais intracelulares. Entre os elementos traço, zinco e ferro são considerados os mais abundantes e utilizados por todas as bactérias (LOPEZ e SKAAR, 2018).

Os elementos alumínio, bário, cobre, ferro, magnésio, manganês, molibdênio, selênio e zinco mostraram efeito nas bactérias, foi observada em nosso estudo, dado o grande número de correlações significativas com os gêneros avaliados. Observamos correlações positivas significativas entre os minerais avaliados e as bactérias produtoras de AGCC (*Prevotella*) e negativas (*Ruminococcus*, *Oscillospira* e *Coprococcus*). Somado a isso, a análise de regressão linear indicou que tais minerais também podem ser preditores de importantes gêneros comensais, como *Faecalibacterium*, *Coprococcus* e *Lachnospira*.

Tabela 14. Estudos de intervenção com oleaginosas na composição do microbioma. São Paulo, 2019.

Estudo	Desenho do estudo	Local	População (M/F)	Intervenção diária	Grupo controle	Duração	Principais resultados
Bamberger et al., 2018	Randomizado, controlado, prospectivo, crossover	Munique (ALE)	194 indivíduos saudáveis (60/134)	43 g de nozes	Dieta isocalórica sem nozes (período washout)	8 semanas/período, 1 de washout	* Sem diferença nos índices de alfa diversidade e abundância de filos ↑ abundância de <i>Ruminococcus</i> spp. e <i>Bifidobacterium</i> spp. (p<0,02) ↓ abundância de <i>Anaerostipes</i> e <i>Blautia</i> (p=0,04)
Holscher et al., 2018	Randomizado, controlado, prospectivo, crossover	Washington (EUA)	18 indivíduos saudáveis (10/8)	42 g de nozes	Dieta isocalórica sem nozes (período washout)	3 semanas/período, 1 semana de washout	* Sem diferença nas medidas de alfa diversidade ↑ abundância de Firmicutes (p=0,04) e diminuição de Actinobacteria (p=0,02) ↑ abundância de <i>Dialister</i> e de gêneros produtores de butirato <i>Faecalibacterium</i> , <i>Clostridium</i> e <i>Roseburia</i> (p<0,05) ↓ abundância de <i>Ruminococcus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Oscillospira</i> e <i>Bifidobacterium</i> (p<0,05) ↓ ácidos biliares secundários (deoxicólico e litocólico) (p<0,05) e de colesterol total e LDL-c (p<0,01)
Byerley et al., 2017	Randomizado, controlado, prospectivo	-	10 ratos Fischer 344 (20/0) no grupo suplementado e 10 no grupo controle	11% do peso da dieta proveniente das nozes (18% das calorias totais)	Dieta isocalórica sem nozes	10 semanas	↑ medidas de eveness (alfa diversidade) pelos índices Shannon (p=0,018) e Simpson (p=0,013) * Beta diversidade foi diferente entre os grupos de acordo com as medidas Unifrac unweighted (p=0,0003) e weighted (p=0,002) * Maior razão Firmicutes/Bacteroidetes no grupo suplementado (> 1,8 vez) em comparação ao controle * Abundância relativa 3 vezes maior da espécie <i>L. reuteri</i> no grupo suplementado ↑ abundância de Turicibacteriaceae (3 vezes), Firmicutes, Oscillospira, Moyella, Roseburia, Peptococaceae e Ruminococaceae ↓ abundância de membros de Carnobacteriaceae, Bacteroidetes (Bacteroides), Proteobacteria (Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria), Tenericutes (Anaeroplasmatales e ML615j-28) e Clostridia (Anaerotruncus, Dehalobacteriaceae, Blautia, Coprococcus e Erysipelotrichi)
Ukhanova et al., 2014	Randomizado, controlado, prospectivo, crossover	Beltsville (EUA)	18 indivíduos saudáveis no grupo amêndoa (9/9) e 16 no grupo pistache	Dividida em 3 etapas: sem noz, 42 g (1 porção) e 84 g (2 porções) de amêndoa ou pistache	Dieta típica americana sem pistache e amêndoa (período washout)	18 dias/período, 1 semana de washout	* Sem diferença na medida de alfa diversidade (chao-1) * Não houve alteração na proporção de OTUs e filos dominantes, sendo Firmicutes mais abundante em ambos os grupos ↓ abundância de bactérias ácido láticas com consumo de pistache, sem alterar o número de bifidobactérias ↓ OTUs Firmicutes bacterium DJF VP44 e <i>Clostridium</i> sp. ASF 396 com as duas intervenções * Maior impacto na composição da microbiota com a intervenção com pistache, com aumento do número de bactérias produtoras de butirato, consideradas potencialmente benéficas.
Liu et al., 2014	Caso-controle	Fuzhou (China)	48 adultos saudáveis, 16 em cada grupo	amêndoas torradas (56 g) ou pele de amêndoas (10 g)	FOS comercial (8 g)	6 semanas, 2 semanas de washout	↑ abundância de <i>Bifidobacterium</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp. com todas as intervenções após 6 semanas ↓ abundância de <i>C. perfringens</i> com as duas intervenções com amêndoas ↑ atividade da enzima bacteriana B-galactosidase fecal, decorrente da modificação do microbiota ↓ atividade das enzimas bacterianas B-glucuronidase, nitroreductase e azoreductase fecais

Os gêneros referidos são componentes habituais da microbiota intestinal saudável e desempenham importante função de degradação de celulose, carboidratos não digeríveis e glicinas (frutose, ácidos siálicos, ácido glicurônico) e consequente produção de AGCC. Esses ácidos graxos induzem mecanismos de estabelecimento e manutenção da homeostase nas células intestinais e modulam respostas imunes e inflamatórias (SIVAPRAKASAM, PRASAD e SINGH, 2016; VITAL, KARCH e PIEPER, 2017; LI *et al.*, 2018). Assim, as bactérias produtoras de AGCC têm sido correlacionadas negativamente com a presença e atividade de doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa, doença de Crohn, síndrome do intestino irritável e câncer colorretal (PROSBERG *et al.*, 2016; FERREIRA-HALDER, FARIA e ANDRADE, 2017).

Haemophilus foi destacado como o gênero com o maior número de correlações com minerais, entre eles magnésio, ferro, zinco, cobre e bário. Esta bactéria Gram-negativa é pertencente a um grupo com ampla patogenicidade, desde espécies comensais até patógenos com grande importância médica e veterinária (sobretudo *H. influenzae*). Para seu crescimento, algumas espécies desse gênero necessitam de fatores sanguíneos, como a hemina, uma porfirina contendo ferro (MUSHER, 1996; NØRSKOV-LAURITSEN, 2014). Além disso, os metais cobre e zinco são críticos para a enzima superóxido dismutase (SOD) bacteriana, que atua contra o estresse oxidativo de fagócitos do hospedeiro (PAKSI *et al.*, 2008).

Espécies reativas são produzidas pelo sistema imune do hospedeiro para eliminar patógenos invasores. Mecanismos de resistência ao estresse oxidativo já foram descritos no genoma de bactérias. As enzimas GPX, SOD e catalase são os principais agentes antioxidantes e utilizam os minerais cobre, zinco, selênio, manganês e ferro como cofatores essenciais (ATAK e JELLY, 2009). Do ponto de vista do hospedeiro, a atividade da enzima antioxidante GPX foi relacionada positivamente com a abundância de *Campylobacter* em nosso estudo, indicando que o sistema antioxidante do hospedeiro também pode ser responsivo a potenciais patógenos de origem alimentar. Além disso, a limitação da disponibilidade de minerais se tornou uma estratégia do hospedeiro para conter a proliferação de microrganismos patógenos, denominada “imunidade nutricional”.

Entretanto, algumas bactérias desenvolveram mecanismos para sequestrar metais e neutralizar essa defesa do hospedeiro. Essa competição já foi descrita para ferro, zinco, manganês e selênio (LOPEZ e SKAAR, 2018). A regulação de ferro pelas bactérias é feita por meio do controle da expressão de proteínas reguladoras da absorção de ferro ou, em situação de deficiência, sequestrando-o da estrutura de proteínas (lactoferrina, hemoglobina, transferrina) do hospedeiro (BECKER e SKAAR, 2014).

Camundongos *germ-free* expostos a cádmio ou chumbo (5, 20 e 100 ppm) por 6 semanas retiveram, em média, muito mais minerais no trato gastrointestinal, rins, fígado, baço e circulação em comparação aos animais convencionais. Assim, a microbiota poderia ser um fator de imobilização e/ou absorção de metais, limitando-os para o hospedeiro (BRETON *et al.*, 2013).

Kasaikina *et al.* (2011) observaram que a ausência de microbiota em camundongos *germ-free* levou à maior expressão de selenoproteoma e atividade de enzimas selenodependentes em comparação a animais convencionais, sugerindo o sequestro parcial de selênio pela microbiota e redução da disponibilidade ao hospedeiro. Em congruência, Hrdina *et al.* (2009) verificaram maiores concentrações de selênio no plasma, fígado e ceco de camundongos *germ-free*, assim como maior atividade, expressões gênica e proteica de GPX e tioredoxinas no fígado e intestino, em comparação a animais convencionais.

No presente estudo, a utilização de selênio pelas bactérias pode ser indicada pelas correlações significativas entre marcadores desse mineral e gêneros, incluindo produtores de AGCC e de ácido láctico, redutores de sulfato, comensais e patógenos oportunistas. Dentre as 14 bactérias com associações positivas, 10 haviam sido caracterizadas no estudo de Peng *et al.* (2016) como bactérias utilizadoras de selênio, como *Campylobacter*, *Ruminococcus*, *Anaerotruncus*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Coprococcus*, *Oscillospira*, *Clostridium*, *Bilophila*, *Desulfovibrio* e *Haemophilus*. Os gêneros não incluídos nessa lista foram *Streptococcus* (comensal e patógeno oportunista), *Lactococcus* (produtor de ácido láctico), *Odoribacter* e *Paraprevotella* (produtores de butirato).

Por meio de abordagens genômicas e filogenéticas comparativas, sabe-se que a utilização de selênio abrange quase todos os filos bacterianos. No entanto, segundo Lin *et al.* (2015), apenas 812 bactérias (38% do total

sequenciado) contém ao menos uma forma de utilização do mineral (selenocisteína, cofatores contendo selênio, selenouridina ou outros). Os autores discutem que a maioria das espécies perdeu a capacidade de utilizar esse elemento por uma pressão evolutiva no tamanho do genoma. Especula-se que o selênio possa ter se tornado desnecessário devido à reduzida disponibilidade ou dependência das vias correspondentes do hospedeiro. É necessário considerar que esse estudo analisou os dados disponíveis até 2013.

Poucos trabalhos foram dedicados à investigação das tendências gerais de utilização e interação de oligoelementos no metabolismo bacteriano. O presente estudo contribuiu nesse sentido ao verificar influência do *status* de minerais na composição do microbioma intestinal. Estudo genômico sugere a demanda múltipla de cobre, molibdênio, níquel e cobalto por mais da metade das bactérias avaliadas, sendo cobre o mineral mais utilizado pelos microrganismos (STAIKU *et al.*, 2017). Ao contrário dos eucariotos, apenas 94 bactérias (17% do total sequenciado) utilizam todos os 5 metais avaliados. Por sua vez, o selênio, na forma de selenocisteína, foi utilizado por um quarto das bactérias, sobretudo dos filos *Deltaproteobacteria* e *Epsilonroteobacteria*. Observa-se, portanto, que a utilização de minerais é extremamente variável entre as bactérias e possui padrões de ocorrência únicos, ou seja, os oligoelementos são independentes uns dos outros.

Corroborando com essa teoria, Richardson *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da exposição individual de metais pesados (arsênio, cádmio, cobalto, cromo e níquel) durante 5 dias na microbiota intestinal de ratos. As exposições com cádmio, níquel e arsênio modificaram a composição da microbiota de modo específico e dose dependente para cada metal. Além disso, observa-se que a abundância e diversidade das bactérias são responsivas às concentrações de metais.

As limitações do presente estudo incluíram a inexistência de de bancos de dados completos para identificação das bactérias sequenciadas e para a avaliação dos nutrientes ingeridos pelos participantes. O uso de um alimento para intervenção inviabiliza que seja conduzido um estudo do tipo duplo cego. Além disso, alguns minerais não possuem resultados em todos os compartimentos avaliados. Reconhece-se, ainda, que não foram avaliados todos

os fatores capazes de alterar o estado nutricional relativo aos minerais e a composição do microbioma, tais como características genéticas.

Esse estudo proporcionou um panorama geral dos efeitos da castanha-do-brasil no microbioma, porém a interação entre o *status* de minerais e a composição do microbioma intestinal ainda precisa ser melhor explorada em mais estudos intervencionais. Essas informações podem identificar quais vias metabólicas e gêneros são envolvidos, os efeitos e tipos mais eficazes da intervenção com suplementos minerais no microbioma em condições de saúde-doença, quais as consequências da ingestão insuficiente ou excessiva de um mineral, entre outros.

== CONCLUSÕES ==

9. CONCLUSÕES

A suplementação com castanha-do-brasil por 2 meses não alterou a ingestão alimentar nem a composição corporal dos participantes, porém, como esperado, foi eficaz em melhorar o *status* de selênio dos indivíduos. Apesar de não modificar a composição global do microbioma intestinal, a intervenção beneficiou a constituição e distribuição da microbiota intestinal e evidenciou a influência do perfil metalômico de bário, manganês, zinco, cobre, ferro e magnésio nas fezes sobre grupos bacterianos importantes à saúde humana.

== REFERÊNCIAS ==

10. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativos e probióticos. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno_lista_alega.html>. Acesso em: 20 de agosto de 2019.
- ALMEIDA LOPES, A.C.B. *et al.* Association of lead, cadmium and mercury with paraoxonase 1 activity and malondialdehyde in a general population in Southern Brazil. **Environ Res**, v. 156, p. 674-682, 2017.
- ALMONDES, K.G.S. Estado nutricional relativo ao selênio e sua relação com o polimorfismo pro198leu da enzima GPx1 em uma população saudável da cidade de Teresina/PI. 2015. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALMONDES, K.G.S. *et al.* Selenium inadequacy is not associated with oxidative stress in child and adolescent acute lymphocytic leukemia survivors. **Nutrition**, v. 30, p. 563-568, 2014.
- ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 2-3, p. 215-37, 2003.
- ARUMUGAM, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v.473, n.7346, p.174-80, 2011.
- ASPROULI, E. *et al.*, Evaluation of Plasma Trace Elements in Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Biol Trace Elem Res**. v. 188, n. 2, p. 326-333, 2019.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST - AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemist**, 2002-02. Washington DC, USA. 2002.
- ATAK, J.M.; KELLY, D.J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. **Future Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 677-90, 2009.
- AZIZ, J.D. *et al.* Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterol Motil**, v. 25, p. 4-15, 2013.
- BACKHED, F. *et al.* Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 5, p. 611-22, 2012.
- BATISTA, B.L. *et al.* Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, p. 23-29, 2009.
- BECKER, K.W.; SKAAR, E.P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. **FEMS Microbiol Rev**, n. 38, v. 6, p. 1235-49, 2014.
- BELIZÁRIO, J.E.; NAPOLITANO, M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. **Front Microbiol**, v. 6, n. 1050, 2015.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false Discovery rate: a practical and Power-full approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistics Society**, v. 57, p. 289-300, 1995.
- BOCCA, B. *et al.* Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. **J Trace Elem Med Biol**, v. 25, n. 1, p. 19-26, 2011.
- BREMNER, I.; BEATTIE, J.H. Metallothionein and the trace minerals. **Annu Rev Nutr**, v. 10, p. 63-83, 1990.

- BRETON, J. *et al.* Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. **Toxicol Lett**, v. 222, n. 2, p. 132-138, 2013.
- BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**, v. 4(2B), p. 593-599, 2001.
- BURK, R.F.; HILL, K.E. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. **Annu Rev Nutr**, v. 35, p.109-34, 2015.
- BYERLEY, L.O. *et al.* Changes in the gut microbial communities following addition of walnuts to the diet. **J Nutr Biochem**, v. 48, p. 94-102, 2017.
- CAMMAROTA, G. *et al.* Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? **Intern Emerg Med**, v. 9, n. 4, p. 365-373, 2014.
- CANDELA, M. *et al.* Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 4, p. 908-922, 2014.
- CANFORA, E.E.; MEEH, R.C.R.; VENEMA, K.; BLAAK, E.E. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 5, p. 261-273, 2019.
- CAPDEVILLA, D.A.; WANG, J.; GIEDROC, D.P. Bacterial Strategies to Maintain Zinc Metallostasis at the Host-Pathogen Interface. **J Biol Chem**, v. 291, n. 40, p. 20858-20868, 2016.
- CAPORASO, J.G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CAPORASO, N. *et al.* Dietary approach in the prevention and treatment of NAFLD. **Front Biosci**, v. 17, p. 2259-68, 2012.
- CARBONERO, F. *et al.* Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. **Front Physiol**, v. 3, p. 448, 2012.
- CARDOSO, B.R. *et al.* Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Res Int**, v. 100, Pt 2, p. 9-18, 2017.
- CARDOSO, B.R. *et al.* Pro198Leu polymorphism affects selenium status and GPx activity in response to Brazil nut intake. **Food & Function**, v. 7, p. 825-833, 2016.
- CESBRON, A. *et al.* Metallic profile of whole blood and plasma in a series of 106 healthy volunteers. **J Anal Toxicol**, v. 37, n. 7, p. 401-5. 2013.
- CHENG, S. *et al.* Copper Changes Intestinal Microbiota of the Cecum and Rectum in Female Mice by 16S rRNA Gene Sequencing. **Biol Trace Elem Res**, 2019.
- COLPO, E. *et al.* A Single Consumption of High Amounts of the Brazil Nuts Improves Lipid Profile of Healthy Volunteers. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p. 1-7, 2013.
- COLPO, E. *et al.* Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, p. 459-465, 2014.
- COMBS JR, G. F. Biomarkers of Selenium Status. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2209-2236, 2015.
- COMBS JR, G. F. *et al.* Determinants of selenium status in healthy adults. **Nutr J**, v. 10, n. 75, p. 1-10, 2011.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; GARRIDO, A.B.; COZZOLINO, S.M.F. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v. 32, p. 403-407, 2012.
- COSTA, N.A. *et al.* Erythrocyte selenium concentration predicts intensive care unit and hospital mortality in patients with septic shock: a prospective observational study. **Crit Care**, v. 18, n. 3, R92, 2014.

COUSINS, R.J. *et al.* **Nutrição Moderna de Shils - na Saúde e na Doença**. Selênio. 11ª Edição. Brasil: Manole, 2016.

COUTINHO, V.F. Caracterização do estado nutricional relativo ao selênio de praticantes de capoeira. 1999. Dissertação (Mestrado em Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Da SILVA, E.G.; MATAVELI, L.R.; ARRUDA, M.A. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS **Talanta**, v. 15, n. 110, p. 53-57, 2013.

DAVID, L.A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, p. 7484, p. 559-563, 2014.

DE BORTOLI, M.C.; COZZOLINO, S.M. Zinc and selenium nutritional status in vegetarians. **Biol Trace Elem Res**, v. 127, n. 3, p. 228-33, 2009.

De MORAES, A.C. *et al.* Enterotype May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, n. 47, 2017.

DONADIO, J.L.S. Influence of different genotypes in the pattern of selenoprotein expression in response to Brazil nut supplementation. 2016. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DONADIO, J.L.S. Polimorfismos nos genes da enzima glutationa peroxidase e biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio em população adulta de São Paulo. 2011. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DOSTAL, A. *et al.* Effects of iron supplementation on dominant bacterial groups in the gut, faecal SCFA and gut inflammation: a randomised, placebo-controlled intervention trial in South African children. **Br J Nutr**, v. 28, n. 112(4), p. 547-56, 2014a.

DOSTAL, A. *et al.* Iron supplementation promotes gut microbiota metabolic activity but not colitis markers in human gut microbiota-associated rats. **Br J Nutr**, v. 28, n. 111(12), p. 2135-45, 2014b.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper. **EFSA Journal**, v.13, n.10, p.4253, 2015.

FALONY, G. *et al.* Population-level analysis of gut microbiome variation. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 560-4, 2016.

FERREIRA-HALDER, C.V.; FARIA, A.V.S.; ANDRADE S.S. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 31, n. 6, p. 643-648, 2017.

FERREIRA, K.S. *et al.* Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev. Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 11, n. 3, 2002.

FISBERG, R.M.; MARCHIONI, D.M.; COLUCCI, A.C. Assessment of food consumption and nutrient intake in clinical practice. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 5, p. 617-24, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANZOSA, E.A. *et al.* Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. **Nat Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 293-305, 2019.

FREIRE, C. *et al.* Reference values of cadmium, arsenic and manganese in blood and factors associated with exposure levels among adult population of Rio Branco, Acre, Brazil. **Chemosphere**, v. 128, p. 70-8, 2015.

- FREITAS, J.B.; NAVES, M.M.V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.
- GANGADOO, S. *et al.* Selenium nanoparticles in poultry feed modify gut microbiota and increase abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, n. 3, p. 1455-1466, 2018.
- GEVERS, D. *et al.* The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome. **PLoS Biol**, v. 10, n. 8, e1001377, 2012.
- GLADYSHEV, V.N. *et al.* Selenoprotein Gene Nomenclature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 46, p. 14026-14040, 2016.
- GORVITOVSKAIA, A. *et al.* Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. **Microbiome**, v. 4, n. 15, 2016.
- GOULLÉ, J.P. *et al.* Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. **Forensic Sci Int**, v. 4, n. 153, p. 39-44, 2005.
- HAINES, D.A.; SARAVANABHAVAN, G.; WERRY, K.; KHOURY, C. An overview of human biomonitoring of environmental chemicals in the Canadian Health Measures Survey: 2007-2019. **Int J Hyg Environ Health**, v. 220, n. 2 Pt A, p. 13-28, 2017.
- HAMBIDGE, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. **J Nutr**, v. 133, n. 3, p. 948S-955S, 2003.
- HEINTZ-BUSCHART, A.; WILMES, P. Human Gut Microbiome: Function Matters. **Trends Microbiol**, v. 26, n. 7, p. 563-574, 2018.
- HOLSCHER, H.D. *et al.* Almond Consumption and Processing Affects the Composition of the Gastrointestinal Microbiota of Healthy Adult Men and Women: A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 2, 2018.
- HRDINA, J. *et al.* The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. **J Nutr Biochem**, v. 20, n. 8, p. 638-648, 2009.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, 2012.
- INSTITUTE OF MEDICINE (US). Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Washington (DC): **National Academies Press (US)**; 2000.
- INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): **National Academies Press (US)**; 2005.
- JAIN RB, CHOI YS, Normal reference ranges for and variability in the levels of blood manganese and selenium by gender, age, and race/ethnicity for general U.S. population. **J Trace Elem Med Biol**, v. 30, p. 142-52, 2015.
- JANDHYALA, S.M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 29, p.8787-8803, 2015.
- JEFFERY, I.B. *et al.* Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? **Nat Rev Micro**, v. 10, n. 9, p. 591-2, 2012.
- KAFAOGLU, B. *et al.* Determination and evaluation of element bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 58-65, 2016.
- KANG, C. *et al.* Healthy Subjects Differentially Respond to Dietary Capsaicin Correlating with Specific Gut Enterotypes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 12, p. 4681-4689, 2016.

- KASAIKINA, M.V. *et al.* Dietary selenium affects host selenoproteoma expression by influencing the gut microbiota. **FASEB J**, v. 25, n. 7, p. 2492-2499, 2011.
- KEMPERMAN, R. A. Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 659-669, 2013.
- KIRA, C.S. *et al.* Associated factors for higher lead and cadmium blood levels, and reference values derived from general population of São Paulo, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 1, n. 543 (Pt A), p.628-635, 2016.
- KNIGHTS, D. *et al.* Rethinking “Enterotypes”. **Cell Host & Microbe**, v. 16, n. 4, p. 433-7, 2014.
- KOLIDA, S.; Gibson G.R. Synbiotics in health and disease. **Ann. Rev Food Sci**, v.2, p.373–393, 2011.
- KOSSINOVA, O. *et al.* A novel insight into the mechanism of mammalian selenoprotein synthesis. **RNA**, v. 19, n. 8, p. 1147-58, 2013.
- KUNO, R. *et al.* Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil. **Int J Hyg Environ Health**, v. 216, n. 3, p. 243-9, 2013.
- LAMBETH, S.M. *et al.* Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. **J Diabetes Obes**, v. 2, n. 3, p. 1-7, 2015.
- LAMUEL-RAVENTOS, R.M.; ONGE, M.S. Prebiotic nut compounds and human microbiota. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n.14, p. 3154-3163, 2017.
- LEBLANC, J.G. *et al.* Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. **Microb Cell Fact**, v. 16, n. 1, p. 79, 2017.
- LEMIRE, M. *et al.* Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. **Sci Total Environ**, v.408, n.19, p.4076-84, 2010.
- LI, M. *et al.* Time and concentration dependent effects of short chain fatty acids on lipopolysaccharide-or tumor necrosis factor α -induced endothelial activation. **Front Pharmacol**, v. 19, n. 9, p. 233, 2018.
- LIANG, C. *et al.* Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan. **BMC Genomics**, v. 25, n. 18 (Suppl 1), p. 932, 2017.
- LIN, J. *et al.* Comparative Genomics Reveals New Candidate Genes Involved in SeleniumMetabolism in Prokaryotes. **Genome Biol Evol**, v. 7, n. 3, p. 664-76, 2015.
- LOPEZ-SILES, M. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. **ISME J**, v.11, n. 4, p. 841-852, 2017.
- LOPEZ, C.A.; SKAAR, E.P. The Impact of Dietary Transition Metals on Host-Bacterial Interactions. **Cell Host Microbe**, v. 23, n. 6, p. 737-748, 2018.
- LOZUPONE, C *et al.* UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. **ISME J**, v. 5, n. 2, p. 169–172, 2011.
- MACCAFERRI, S.; BIAGI, E.; BRIGIDI, P. Metagenomics: Key to human gut microbiota. **Dig Dis**, v.29, p.525-530, 2011.
- MEMON, Z.M. *et al.* Trace elements in blood samples of smoker and nonsmoker active pulmonary tuberculosis patients from Jamshoro, Pakistan. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 24, n. 34, p. 26513-26520, 2017.
- MORAES, A.C.F. Análise da microbiota intestinal em adultos com hábitos alimentares distintos e de associações com a inflamação e resistência à insulina. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

- MOREDA-PIÑEIRO, J. *et al.* Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds. **Food Chem**, v. 15, n. 205, p. 146-54, 2016.
- MUSHER, D.M. Haemophilus Species. In: Baron S1, editor. **Source Medical Microbiology**. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 30.
- NISSE, C. *et al.* Blood and urinary levels of metals and metalloids in the general adult population of Northern France: The IMEPOGE study, 2008-2010. **Int J Hyg Environ Health**, v. 220, n. 2 Pt B), p. 341-363, 2017.
- NØRSKOV-LAURITSEN, N. Classification, identification, and clinical significance of Haemophilus and Aggregatibacter species with host specificity for humans. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 2, p. 214-40, 2014.
- NUNES, J.A. *et al.* A Simple Method Based on ICP-MS for Estimation of Background Levels of Arsenic, Cadmium, Copper, Manganese, Nickel, Lead, and Selenium in Blood of the Brazilian Population. **J Toxicol Environ Health A**, v. 73, n. 13-14, p. 878-87, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva, 253 p., 2000.
- OTTOMAN, N. *et al.* The function of our microbiota: who is out there and what do they do? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 104, 2012.
- OU, J. *et al.* Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 111–20, 2013.
- PAGLIA, D. E., VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Invest**, v. 70, p. 158–69, 1967.
- PAGMANTIDIS, V. *et al.* Supplementation of healthy volunteers with nutritionally relevant amounts of selenium increases the expression of lymphocyte protein biosynthesis genes. **Am J Clin Nutr**, v. 87, p. 181-189, 2008.
- PAKSI, Z. *et al.* Copper and zinc binding properties of the N-terminal histidine-rich sequence of Haemophilus ducreyi Cu,Zn superoxide dismutase. **J Inorg Biochem**. v.102, n.9, p.1700-10, Set, 2008
- Parekh, P.P. *et al.* Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts (2008). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 332-335, 2008.
- PENG, T. *et al.* Comparative genomics reveals new evolutionary and ecological patterns of selenium utilization in bacteria. **ISME J**, v. 10, n. 8, p. 2048-59, 2016.
- PETERS, U. Serum selenium and risk of prostate cancer - a nested case-control study. **Am J Clin Nutr**, v.85, n.1, p.209-217, 2007.
- PIRES, L.V. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. 2012. 165 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PIRES, L.V. *et al.* Selenium Status in Patients with Turner Syndrome: a Biochemical Assessment Related with Body Composition. **Biological Trace Element Research**, p. 1-8, 2017.
- PROSBERG, M. *et al.* The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. **Scand J Gastroenterol**, v. 51, n. 12, p. 1407-1415, 2016.
- QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res**, v. 41, p. D590-6, 2013.

- RAJOKA, M.S.R. *et al.* Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 121-130, 2017.
- RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Sci**, v. 180, n. 2, p. 169-81, 2011.
- RAYMAN, M.P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **Br J Nutr**, v. 100, n. 2, p. 254-268, 2008.
- REED, S. *et al.* Chronic Zinc Deficiency Alters Chick Gut Microbiota Composition and Function. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 9768-84, 2015.
- REEVES, M.A.; HOFFMANN, P.R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 15, p. 2457-2478, 2009.
- REHMAN, K. *et al.* Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. **J Cell Biochem**, v. 119, n. 1, p. 157-184, 2018.
- Richardson, J.B. *et al.* Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 6578, 2018.
- RINNINELLA, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, pii: E14, 2019.
- RIVIÈRE, A. *et al.* Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. **Front Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 979, 2016.
- ROBERFROID, M. *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br J Nutr**, v. 104, Suppl 2:S1-63, 2010.
- ROCHA, A.V. *et al.* Estado nutricional relativo ao selênio de crianças ribeirinhas do estado de Rondônia. 2009. 118p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ROCHA, A.V. Selenium Status and Hair Mercury Levels in riverine children from Rondonia - Amazonia. **Nutrition**, v. 30, p. 1318-1323, 2014.
- ROCHA, A.V. *Status de selênio de uma população residente em área de risco de contaminação por mercúrio. Influência de polimorfismos e ação sobre estresse oxidativo.* 2015. 123p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- ROCHA, A.V. *et al.* GPX1 Pro198Leu polymorphism and GSTM1 deletion do not affect selenium and mercury status in mildly exposed Amazonian women in an urban population. **Sci Total Environ**, v. 571, p. 801-8, 2016.
- S.M.F. COZZOLINO. BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS. **R. Nutr. PUCCAMP**, v. 10, n. 2, p. 87-98, 1997.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SALONEN, A. *et al.* The adult intestinal core microbiota is determined by analysis depth and health status. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, Suppl 4, p. 16-20, 2012.
- SANTOS, B.S. Estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com artrite reumatóide e sua relação com estresse oxidativo e o polimorfismo Arg213Gly no gene da SOD 3. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo
- SCHMIDT, T.S.B. *et al.* The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1198-1215, 2018.

- SCOTT, K.P. *et al.* The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacol Res**, v. 69, n.1, p. 52-60, 2013.
- SHADE, A.; HANDELSMAN, J. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. **Environ Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 4-12, 2012.
- SHALTOUT, A.A. *et al.* Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v.85, n.3, p.1350-6, Set, 2011.
- SILVA, E.G.; MATAVELI, L.R.V.; ARRUDA, M.A.Z. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, v. 110, p. 53-57, 2013.
- SIVAPRAKASAM, S.; PRASAD, P.D.; SINGH, N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. **Pharmacol Ther**, v. 164, p. 144-51, 2016.
- SKALNAYA, M.G. *et al.* ICP-DRC-MS analysis of serum essential and toxic element levels in T postmenopausal prediabetic women in relation to glycemic control markers. **J Trace Elem Med Biol**, v. 50, p. 430-434, 2018.
- SKRYPNIK, K.; SULIBURSKA, J. Association between the gut microbiota and mineral metabolism. **J Sci Food Agric**, v. 98, n. 7, p. 2449-2460, 2018.
- SMITH, J.C. *et al.* Effect of microorganisms upon zinc metabolism using germfree and conventional rats. **J Nutr**, v. 102, n. 6, p. 711-9, 1972.
- SOARES, M.S. Avaliação nutricional relativa ao selênio de indivíduos adultos da cidade de Manaus-Amazonas. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SOMMER, F. *et al.* The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 10, p. 630-638, 2017.
- STAIKU, L.C.; TOBE, R.S.O.R.; MIHARA, H. Bacteria Versus Selenium: A View from the Inside Out. **Selenium in plants**, p. 79-108, 2017.
- STOCKLER-PINTO, M.; MAFRA, D.; FARAGE, N.E.; BOAVENTURA, G.T.; COZZOLINO, S.M.F. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, p. 1065-1069, 2010.
- STOCKLER-PINTO, M.B. *et al.* Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) Improves Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in Hemodialysis Patients. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, v. 1, p. 105-112, 2014.
- SUZUKI, K.T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 2, p. 107-114, 2005.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.0. São Paulo, 2019. [Acesso em: 10 de fevereiro de 2019]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.
- TAKEDA, S.H.K. *et al.* Trace element levels in blood and associated factors in adults living in the metropolitan area of São Paulo, Brazil. **J Trace Elem Med Biol**, v. 44, p. 307-314, 2017.
- THOMSON, C.D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 3, p. 391-402, 2004.
- TURNBAUGH, P.J. *et al.* The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Sci Transl Med**, v. 1, n. 6, 6ra14, 2009.
- TURPIN, W. *et al.* Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. **Nat Genet**, v. 48, n. 11, p. 1413-1417, 2016.

- TYAKHT, A.V. *et al.* Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. **Nat Commun**, v. 4, 2013.
- UKHANOVA, M. *et al.* Effects of almond and pistachio consumption on gut microbiota composition in a randomised cross-over human feeding study. **Br J Nutr**, v. 111, n. 12, p. 2146-52, 2014.
- UMU, O.C. *et al.* Resistant starch diet induces change in the swine microbiome and a predominance of beneficial bacterial populations. **Microbiome**, v. 16, n. 3, p. 16, 2015.
- VITAL, M.; KARCH, A.; PIEPER, D.H. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. **mSystems**, v. 2, n. 6, pii: e00130-17, 2017.
- VOREADES, N.; KOZIL, A.; WEIR, T.L. Diet and the development of the human intestinal microbiome. **Front Microbiol**, v. 5, n. 494, p. 1-9, 2014.
- WANG, K. *et al.* Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. **Cell Rep**. e5. v.26, n.1, p.222-235, Jan, 2019.
- WEEKS, B.S.; HANNA, M.S.; COOPERSTEIN, D. Dietary selenium and selenoprotein function. **Med Sci Monit**, v. 18, n. 8, p. 127-132, 2012.
- WILLETT, W.C. Nutritional epidemiology. 2. ed. New York: **Oxford University Press**, 1998.
- WOPEREIS, H. *et al.* The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 25, n. 5, p. 428-38, 2014.
- WU, G.D. *et al.* Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.
- YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **Food Science and Technology (LWT)**, v. 42, p. 1573-1580, 2009.
- YATSUNENKO, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, n. 486, v. 7402, p. 222–7, 2012.
- YEDOMON, B. *et al.* Biomonitoring of 29 trace elements in whole blood from inhabitants of Cotonou (Benin) by ICP-MS. **J Trace Elem Med Biol**, v. 43, p. 38-45, 2017.
- YILMAZ, B.; LI, H. Gut Microbiota and Iron: The Crucial Actors in Health and Disease. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 11, n. 4, pii: E98, 2018.
- YIN, Y. *et al.* Investigation into the stability and culturability of Chinese enterotypes. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7947, 2017.
- YU, Y.X. *et al.* Assessment of the Bioaccessibility of Polybrominated Diphenyl Ethers in Foods and the Correlations of the Bioaccessibility with Nutrient Contents. **J Agric Food Chem**. v.58, n.1, p.301-8, 2010.
- ZACKULAR, J.P. *et al.* Dietary Zinc Alters the Microbiota and Decreases Resistance to Clostridium difficile Infection. **Nat Med**, v. 22, n. 11, p. 1330-1334, 2016.
- ZENG, H.L. *et al.* Assessment of 12 Metals and Metalloids in Blood of General Populations Living in Wuhan of China by ICP-MS. **Biol Trace Elem Res**, v. 189, n. 2, p. 344-353, 2019.
- ZHANG, B. *et al.* Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the Bifidobacterium animalis 01. **Food Chemistry**, v.115, n. 2, p. 727-234, 2009.
- ZHANG, F. *et al.* Effect of dietary copper level on the gut microbiota and its correlation with serum inflammatory cytokines in Sprague-Dawley rats. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 694–702, 2017.
- ZHANG, L.L. *et al.* Baseline Blood Levels of Manganese, Lead, Cadmium, Copper, and Zinc in Residents of Beijing Suburb. **Environ Res**, v. 140, p. 10-7, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. **Genome Biol**, v. 7, r94, 2006.

ZHANG, Y. *et al.* In silico identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait. **BMC Genomics**, v. 29, n. 9, p. 251, 2008.

ZHANG, Y.; GLADYSHEV V.N. General trends in trace element utilization revealed by comparative genomic analyses of Co, Cu, Mo, Ni, and Se. **J. Biol. Chem**, v. 285, p. 3393–3405, 2010.

ZHANG, Y.; GLADYSHEV, V.N. Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. **Chem Rev**, v. 109, n. 10, p. 4828-61, 2009.

ZHANG, Y.; GLADYSHEV, V.N. Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization. **J Mol Biol**, v. 379, n. 4, p. 881-99, 2008.

ZHANG, Y.; YING, H.; XU, Y. Comparative genomics and metagenomics of the metallomes. **Metallomics**, v. 11, n. 6, p. 1026-1043, 2019.

ZWOLAK, I. The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: an Updated Review of Scientific Literature. **Biol Trace Elem Res**, Mar, 2019.

== APÊNDICES ==

Apêndice 1. Estudos de avaliação do metaloma no sangue de indivíduos saudáveis. São Paulo, 2019.

Referência	Local	n	População	Método	Dosado em	Selênio	Chumbo	Cádmio	Arsênio	Cobalto	Manganês	Zinco	Bário	Cobre
Nosso estudo	São Paulo, Brasil	97	Adultos saudáveis	ICP-MS	Eritrócitos	161,9 ± 56,2	19,6 ± 13,8	0,18 ± 0,17	10,9 ± 1,8	0,7 ± 0,2	-	11462,1 ± 2166,4	7,0 ± 4,5	619,0 ± 71,0
Nosso estudo	São Paulo, Brasil	97	Adultos saudáveis	ICP-MS	Eritrócitos	635,06 ± 232,85	33,6 ± 12,2	0,51 ± 0,16	8,8 ± 1,5	0,2 ± 0,1	-	2107,7 ± 354,0	2,6 ± 0,8	1087,9 ± 150,2
Takeda et al., 2017	São Paulo, Brasil	374	Doadores de sangue (H240/ M134)	ICP-MS	Sangue	-	23,9	0,13	3,6	-	12,5	-	-	999
Kira et al., 2016	São Paulo, Brasil	786	Adultos 14 a 70 anos	ICP-MS	Sangue	-	18,85	0,19	-	-	-	-	-	-
Kuno et al., 2013	São Paulo, Brasil	539	Não fumantes 18-65 anos	ICP-MS	Sangue	-	23,7	0,08	-	-	-	-	-	-
Freire et al., 2015	Acre, Brasil	890	Homens	ICP-MS	Sangue	-	-	0,08	4,25	-	12,8	-	-	-
Lopes et al., 2017	Cambé, Paraná, Brasil	889	Adultos 40+	ICP-MS	Sangue	-	1,93	0,06	-	-	-	-	-	-
Nunes et al., 2010	SP, MG, GO, PA, RS	1125	Adultos 18 a 65 anos	ICP-MS	Sangue	-	65,4	0,4	1,1	-	9,6	-	-	890
Nisse et al., 2017	Norte da França	2000	Adultos 20 a 59 anos	ICP-MS	Sangue	-	18,8	0,39	1,67	0,3	7,71	5805	-	-
Yedomon et al., 2017	Benin, França	70	Homens 18 a 65 anos	ICP-MS	Sangue	163	47,39	0,32	5,81	0,67	19,7	4845	0,309	870
Jain, Choi, 2015	NHANES 2011-2012	7545	Homens e mulheres	ICP-MS	Sangue	190	-	-	-	-	9,3	-	-	-
Memon et al., 2017	Paquistão	30	Adultos saudáveis	ICP-MS	Sangue	110	-	-	1,9	0,28	53,4 ± 7,4	-	-	95,1
Zhang et al., 2015	China	648	Adultos 12 - 60 anos	ICP-MS	Sangue	-	42,6	0,68	-	-	11,4	4665	-	802,4
Cesbron et al., 2013	França	106	Adultos saudáveis	ICP-MS	Sangue	110	12,5	0,34	1,87	0,27	8,6	5617	0,66	937
Haines et al., 2017	Canadá	5319	População 6 a 79 anos	ICP-MS	Sangue	200	13	0,34	0,88	-	9,2	6400	-	910
Haines et al., 2017	Canadá	6070	População 3 a 79 anos	ICP-MS	Sangue	190	12	0,29	-	0,23	9,8	5900	-	900
Haines et al., 2017	Canadá	5538	População 3 a 79 anos	ICP-MS	Sangue	-	11	0,33	-	-	-	-	-	-
Bocca et al., 2011	Itália	215	Adultos saudáveis	ICP-MS	Sangue	140	-	-	-	-	8,91	6418	-	1036
Goullé et al., 2005	Canadá	100	Adultos saudáveis	ICP-MS	Sangue	119	26	0,31	5	0,25	7,6	-	59	-
Zeng et al., 2019	China	477	Adultos saudáveis	ICP-MS	Sangue	-	17,84	0,7	2,25	-	12,4	-	-	783,76
Média	Mundial	-	-	ICP-MS	-	152,75	22,35	0,41	2,77	0,33	-	5664,29	19,99	791,78
Nosso estudo	São Paulo, Brasil	97	Adultos saudáveis	ICP-MS	Plasma	79,6 ± 24,3	0,7 ± 0,4	0,04 ± 0,02	7,0 ± 1,4	1,0 ± 0,4	2,3 ± 0,7	1156,6 ± 232,1	7,2 ± 1,5	1108,5 ± 374,7
Nosso estudo	São Paulo, Brasil	97	Adultos saudáveis	ICP-MS	Plasma	235,5 ± 63,7	1,1 ± 0,6	0,06 ± 0,08	16,7 ± 2,1	1,2 ± 0,4	2,2 ± 0,8	1010,8 ± 246,6	9,3 ± 2,6	1007,4 ± 333,9
Rocha et al., 2016	Maringá, Brasil	240	Doadores de sangue (H175/ M65)	ICP-MS	Soro (H)	-	-	-	1,15	0,1501	0,5295	738,9	-	891,4
					Soro (M)	-	-	-	1,20	0,1584	0,5593	700,9	-	1401
Asprouli et al., 2019	Atenas, Grécia	70	Adultos saudáveis	ICP-MS	Plasma	-	-	0,04 ± 0,0	0,7 ± 2,2	0,4 ± 0,6	-	1354 ± 654	5,9 ± 8,5	1203 ± 519
Sanchez et al., 2010	Sul da Espanha	340	Adultos saudáveis	FAAS	Plasma	82,7 ± 48,3	-	-	-	-	0,65 ± 0,26	-	-	1370,0 ± 480,0
Goullé et al., 2005	Canadá	100	Adultos saudáveis	ICP-MS	Plasma	112	0,062	0,03	6,2	0,49	1,12	726	111	1075
Tekeste et al., 2015	Etiópia	87	Gestantes	ICP-MS	Soro	91,5 ± 42,1	-	-	-	-	-	765,1 ± 391,6	-	1522,0 ± 553,7
Tekeste et al., 2015	Vietnã	50	Gestantes	ICP-MS	Soro	141,1 ± 34,1	-	-	-	-	-	1114,9 ± 529,2	-	1058,6 ± 260,2
Tekeste et al., 2015	Japão	49	Gestantes	ICP-MS	Soro	83,3 ± 36,5	-	-	-	-	-	606,9 ± 97,6	-	1070,0 ± 1560,0
Skalnaya et al., 2018	Rússia	80	Mulheres saudáveis	ICP-MS	Soro	109,0 ± 11	1,4 ± 1,1	0,1 ± 0,0	6,7 ± 2,9	0,7 ± 0,3	4,7 ± 1,9	1068 ± 156	-	1101 ± 198
Média	Mundial	-	-	ICP-MS	-	103,27	0,73	0,10	3,19	0,38	1,51	884,34	58,45	1188,00

Legenda: Valores em média ± desvio padrão; Resultados em µg/L. ICP-MS: Espectrômetro de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado; FAAS: Espectrometria de absorção atômica da chama; H: homem; M: Mulher; SP: São Paulo; MG: Minas Gerais; GO: Goiás; PA: Pará; RS: Rio Grande do Sul.



ANEXOS





Efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre a composição da microbiota fecal, o estado nutricional relativo ao selênio e as expressões gênica e proteica da GPx1 em uma população adulta

9. Histórico de doenças na família:	
1.() Obesidade	5.() Câncer
2.() Diabetes	6.() Insuficiência Renal
3.() HAS	7.() Outro: _____
4.() DCV	
10. Uso de medicamentos:	1.() Não 2.() Sim Quais: _____
11. Uso de antibióticos nos últimos 4 meses:	1.() Não 2.() Sim
12. Uso de suplemento vitamínico-mineral:	1.() Não 2.() Sim
13. Ingestão de probióticos e/ou prebióticos industrializados:	1.() Não 2.() Sim
14. Hábito intestinal:	1.() Normal 2.() Constipação 3.() Diarreia Frequência: _____
15. Intercorrências nos últimos meses:	1.() Não 2.() Sim Quais: _____
16. Tipo de parto:	1.() Normal 2.() Cesária 3.() Não sabe informar
17. Tipo de alimentação infantil:	1.() Aleitamento materno 2.() Fórmulas infantis Duração: _____ 3.() Não sabe informar
18. Se mulher, teve filhos:	1.() Não 2.() Sim Quantos: _____ Quando: _____
19. Possui animal de estimação:	1.() Não 2.() Sim Qual: _____
20. Observações:	_____ _____ _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

	T0	T1
Data		
21. Peso (kg)		
22. Altura (m)		
23. IMC (kg/m²)		
24. Circunferência da cintura (cm)		
25. Percentual de gordura corporal		
26. Peso de gordura (kg)		
27. Percentual de massa magra		
28. Peso de massa magra (kg)		
29. Água		
30. Observações:	_____ _____ _____	

ANEXO 2. Orientações para participação da pesquisa.

ORIENTAÇÕES PARA A PESQUISA

DURANTE O PERÍODO DA PESQUISA:

- Não alterar seu hábito alimentar;
- Não consumir alimentos contendo probióticos (leite fermentado contendo microrganismos benéficos vivos) ou prebióticos industrializados;
- Não utilizar suplemento vitamínico-mineral;
- Não consumir castanhas-do-Pará, exceto as fornecidas pela pesquisadora.

PARA O CONSUMO DA CASTANHA-DO-PARÁ:

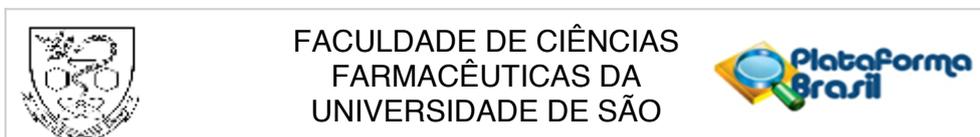
- Consumir apenas 1 unidade por dia, durante 60 dias;
- Não esquecer de consumir a castanha! Caso isto ocorra, anote os dias no calendário fornecido;
- Mantenha o pote com as castanhas em geladeira;
- Não dividir as castanhas com ninguém.

PARA A COLETA DE SANGUE:

- Jejum de 10 a 12 horas;
- Trazer a amostra de fezes no isopor, conforme orientações.

SIGA TODAS AS ORIENTAÇÕES CORRETAMENTE!

ANEXO 3. Parecer Consubstanciado – CEP/FCF/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre a composição da microbiota fecal, o estado nutricional relativo ao selênio e as expressões gênica e proteica da GPx1 em uma população adulta

Pesquisador: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42060815.3.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.000.931

Data da Relatoria: 23/03/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto é sobre o micronutriente selênio, considerado importante por estar associado a diversos processos envolvidos com a saúde humana, devido à sua ligação ao sítio ativo de seleno-proteínas, como a glutathione peroxidase 1 (GPx1). O funcionamento ótimo das seleno-proteínas é determinado pelo estado nutricional do indivíduo relativo ao selênio, o qual é influenciado pela ingestão alimentar do micronutriente e pela competição por selênio entre microbiota intestinal e hospedeiro, entre outros fatores. A população bacteriana é sensível a mudanças nas concentrações de minerais como selênio, e, por sua vez, pode influenciar no status do micronutriente e na expressão de seleno-proteínas no hospedeiro. Entretanto, poucos estudos foram desenvolvidos sobre o papel do selênio na modulação da microbiota, a qual desempenha funções fundamentais (metabólicas, tróficas e protetivas) no organismo saudável e redução do risco de doenças relacionadas à disbiose. Além disso, ainda são desconhecidos os efeitos da castanha-do-brasil na composição da microbiota. Pelo fato de a castanha-do-brasil ser o alimento com maior teor de selênio, esta tem sido utilizada como uma boa alternativa para a suplementação alimentar desse elemento, considerando também a disponibilidade dos demais nutrientes nela presentes. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho será avaliar os efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre a composição da microbiota fecal, o estado nutricional relativo ao selênio e

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



as expressões gênica e proteica da GPx1 em uma população adulta residente em São Paulo. Este estudo será de natureza longitudinal e consistirá em 4 fases (Tempos 0 a 3), distribuídas em um período de 120 dias. A primeira coleta (T0) será apenas de fezes e as demais serão de sangue e fezes. Para verificar os efeitos da intervenção nutricional, após o T0, os participantes serão avaliados novamente depois de 30 (T1), 90 (T2) e 120 dias (T3), respectivamente, sendo que a suplementação ocorrerá entre o T1 e T2. Para isso, serão selecionados 50 indivíduos sem doenças crônicas não transmissíveis, de ambos os gêneros, eutróficos, com idade entre 19 e 50 anos e residentes no estado de São Paulo, que serão suplementados com castanha-do-brasil, sendo ofertada diariamente a quantidade de noz equivalente a aproximadamente 200 g de selênio, durante 60 dias. O sangue coletado será destinado às análises relacionadas ao estado nutricional relativo ao selênio e às expressões gênica e proteica da GPx1 e as fezes serão utilizadas para caracterizar a composição da microbiota fecal. Em todos os tempos, também será realizada a avaliação da composição corporal, a qual consistirá nas medidas de peso, estatura e circunferência da cintura e realização da bioimpedância elétrica. Além disso, a avaliação da ingestão alimentar será feita mensalmente, por meio de recordatórios alimentares de 3 dias (dois dias durante a semana e um dia no final de semana). Após a obtenção e a tabulação dos dados, será realizada a análise estatística, por meio do software SPSS (versão 18.0).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre a composição da microbiota fecal, o estado nutricional relativo ao selênio e as expressões gênica e proteica da GPx1 em uma população adulta residente em São Paulo.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a composição corporal e a ingestão alimentar dos participantes antes e após a suplementação com castanha-do-brasil;
- Analisar os parâmetros bioquímicos de avaliação do estado nutricional relativo ao selênio antes e após a suplementação com castanha-do-brasil;
- Avaliar a composição da microbiota fecal antes e após a suplementação com castanha-do-brasil;
- Avaliar as expressões gênica e proteica da GPx1 e sua relação com os demais parâmetros de avaliação do estado nutricional relativo ao selênio e a composição da microbiota antes e após a suplementação com castanha-do-brasil.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: A pesquisa é considerada de risco mínimo. Na coleta do sangue, poderá ocorrer um pequeno desconforto, devido à dor da picada da agulha, e/ou surgir uma mancha arroxeadada no local, desaparecendo em poucos dias.

Benefícios: Os participantes realizarão uma avaliação nutricional, com medidas da composição corporal, avaliação da ingestão alimentar e exames bioquímicos relacionados ao estado nutricional relativo ao selênio, sem custos financeiros para o participante. Além disso, terão conhecimento da composição de sua microbiota fecal, a qual está diretamente associada aos hábitos alimentares e de vida. Ao final do estudo, será fornecida orientação nutricional individualizada e um relatório com todos os resultados das análises realizadas. Ainda, os participantes receberão 60 unidades de castanha-do-brasil para serem consumidas durante o período de suplementação do estudo (60 dias). O consumo deste alimento vem sendo relacionado com diversos efeitos benéficos à saúde humana, devido aos nutrientes que contém.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é atual, pois envolve o estudo da alteração ou não da microbiota intestinal após a ingestão de castanha-do-brasil por uma população adulta na cidade de São Paulo. A castanha-do-brasil é um alimento rico em selênio, micronutriente que apresenta importantes funções na saúde humana, por meio de sua incorporação na cisteína para síntese do 21º. aminoácido, a selenocisteína (Sec), presente nas 25 selenoproteínas identificadas atualmente no genoma humano. A regulação do metabolismo de hormônios tireoidianos, participação na síntese de DNA, modulação da resposta imune e da fertilidade, remoção de peróxidos que promovem danos às células, regulação da sinalização redox, transporte e armazenamento de selênio, estão entre as funções atribuídas a esse micronutriente. É uma pesquisa que poderá contribuir para a melhor compreensão das funções do selênio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão de acordo.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.000.931

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto pode ser aprovado.

SAO PAULO, 26 de Março de 2015

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Título do Projeto de Pesquisa

Efeitos da castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) sobre a composição da microbiota fecal, o estado nutricional relativo ao selênio e as expressões gênica e proteica da GPx1 em uma população adulta
--

3. Duração da Pesquisa

60 dias

4. Nome do Pesquisador Responsável

Silvia Maria Franciscato Cozzolino	
Cargo/ Função: Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da FCF/USP	Nº de registro do Conselho Regional: CRN3 / 0621

5. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo

Meu nome é Silvia Maria Franciscato Cozzolino e sou nutricionista e Prof^a Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Gostaria de convidar você para participar do nosso projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre a composição da microbiota fecal, o estado nutricional relativo ao selênio e as expressões gênica e proteica da GPx1 em uma população”, a ser desenvolvido com a colaboração da nutricionista e aluna de doutorado Leila Leiko Hashimoto. Esta pesquisa é considerada de risco mínimo.

A castanha-do-brasil é um alimento muito rico em selênio e em outros nutrientes, como fibras, gorduras boas, ferro, cobre, entre outros. Entre esses, destaca-se o papel do selênio no organismo humano, visto que é considerado um mineral antioxidante e pode ter relação benéfica com nossa microbiota, ou seja, o conjunto de microrganismos existentes no corpo humano. Nas últimas décadas, a microbiota vem sendo muito estudada, pois desempenha papéis fundamentais no organismo, como digestão e absorção de nutrientes, proteção contra bactérias que causam doenças, entre outros. Dessa forma, o objetivo deste pesquisa é avaliar o papel da castanha-do-brasil no organismo e na microbiota humana. Além disso, este estudo poderá trazer benefícios para a população, visto que o selênio e outros componentes da castanha podem exercer efeitos protetores no organismo e podem ter efeito na microbiota.

A pesquisa contará com 100 participantes sem doenças crônicas não transmissíveis (obesidade, diabetes, doença renal crônica, hipertensão arterial, câncer, doenças cardiovasculares), com idade entre 19 e 50 anos, de ambos os sexos. Os participantes serão suplementados com 1 noz de castanha-do-brasil por dia, fornecida pela pesquisadora, durante 60 dias. Para avaliar os efeitos da castanha-do-brasil, você realizará 2 coletas de sangue e de fezes, uma no início e outra no final da pesquisa, bem como avaliação da composição corporal e da ingestão alimentar. No início da pesquisa, será aplicado um questionário para sua caracterização quanto a dados socioeconômicos, uso de medicamentos e suplementos vitamínicos, entre outras informações.

O sangue coletado será destinado à avaliação do estado nutricional relativo ao selênio e as fezes serão utilizadas para caracterizar a composição da microbiota fecal antes e após a suplementação. A avaliação da composição corporal consistirá na medida de seu peso, sua altura e circunferência da cintura e realização da bioimpedância elétrica (exame para avaliação da quantidade de gordura e músculos do seu corpo). A avaliação de sua alimentação será realizada por meio de recordatórios alimentares de 3 dias (dois dias durante a semana e um dia no final de semana), nos quais você relatara todos os alimentos consumidos no dia anterior à entrevista.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Você receberá todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Para a coleta de sangue (20 ml), você deverá estar em jejum de 12 horas. Na coleta do sangue, poderá ocorrer um pequeno desconforto, devido à dor da picada da agulha, e/ou surgir uma mancha arroxeadada no local, desaparecendo em poucos dias. Serão utilizadas seringas e agulhas descartáveis e esterilizadas e as amostras de sangue serão colhidas por um profissional habilitado em um local adequado no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Após este procedimento, será lhe fornecido um lanche. Caso haja necessidade de atendimento médico, a colaboradora da pesquisa acompanhará você a uma unidade de saúde. As fezes serão coletadas em um pote fornecido pela pesquisadora e, após a coleta, você deverá guardar este frasco em geladeira até o momento de ser entregue para a pesquisadora.

Você receberá os resultados das análises laboratoriais e da avaliação nutricional realizadas, sem nenhum custo financeiro. Seus dados pessoais serão arquivados e mantidos em sigilo absoluto durante todas as fases da pesquisa, preservando sua privacidade, conforme ética. É seu direito recusar, desistir e/ou retirar seu consentimento de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem penalização alguma. Você não terá nenhuma recompensa ou despesa financeira, porém eventuais gastos decorrentes de sua participação no estudo serão ressarcidos. Você terá direito de pedir indenização no caso de algum dano decorrente da pesquisa. Você poderá entrar em contato conosco para esclarecimento de eventuais dúvidas sobre qualquer etapa da pesquisa.

Caso concorde em participar desta pesquisa, você deverá assinar duas vias deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo que uma delas ficará com você, e as amostras de sangue e fezes serão armazenadas em bancos de materiais biológicos no Laboratório de Nutrição e Minerais da FCF/USP, sob minha responsabilidade. No entanto, poderão ser necessárias novas pesquisas futuras relacionadas a esta. Caso isto ocorra, você autoriza o armazenamento e a análise do seu material biológico (sangue e fezes) para estas pesquisas?

() Sim () Não

Contato

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Telefone: (11) 3091-3625
Email: smfcozzo@usp.br
Laboratório de Nutrição-Minerais / USP
Endereço: Av. Lineu Prestes, 580 - Bloco 14 –
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF, Cidade
Universitária, CEP 05508-000 - São Paulo – SP

Leila Leiko Hashimoto
Telefone: (11) 3091-3625 / 98196-1464
Email: leiko.hashimoto@gmail.com
Laboratório de Nutrição-Minerais / USP
Endereço: Av. Lineu Prestes, 580 - Bloco 14 –
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF, Cidade
Universitária, CEP 05508-000 - São Paulo – SP

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepfcf@usp.br.

ANEXO 6. Ficha do aluno

06/09/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 6843231/2 - Leila Leiko Hashimoto

Email: leila.hashimoto@usp.br
Data de Nascimento: 16/05/1991
Cédula de Identidade: RG - 36.456.071-X - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado Direto
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 27/11/2014
Início da Contagem de Prazo: 27/11/2014
Data Limite para o Depósito: 23/09/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvia Maria Franciscato Cozzolino - 27/11/2014 até o presente. Email: smfcozzo@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Christian Hoffmann - 14/09/2016 até o presente. Email: c.hoffmann@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 27/11/2014
Trancamento(s): 180 dias
Período de 01/03/2019 até 27/08/2019
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 27/11/2018 até 27/03/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 16/01/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 27/11/2014
Prorrogação em 10/09/2018
Trancado em 01/03/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Trancado em 01/03/2019

Impresso em: 06/09/2019 17:55:53



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 6843231/2 - Leila Leiko Hashimoto

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMH5760-3/3	Biologia das Mucosas Gástrica e Intestinal (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo) (1)	08/04/2014	13/05/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5899-2/4	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	02/03/2015	12/04/2015	90	6	100	A	N	Concluída
HNT5759-2/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2015	06/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
BMM5803-3/2	Fundamentos de Biologia Molecular Bacteriana (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/03/2015	15/04/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
HNT5732-9/2	Métodos para Avaliação do Consumo Alimentar de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	28/07/2015	07/09/2015	60	4	83	A	N	Concluída
HNT5760-2/1	Marcadores Bioquímicos em Estudos de Nutrição e Alimentação (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	15/09/2015	19/10/2015	30	2	83	A	N	Concluída
ENO5794-13/3	Perspectivas Teórico-Metodológicas do Processo Ensino-Aprendizagem (Escola de Enfermagem - Universidade de São Paulo)	14/03/2016	15/05/2016	90	6	96	A	N	Concluída
ICB5711-3/2	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/08/2017	04/09/2017	45	3	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/3	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/10/2017	29/10/2017	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5906-2/1	Análise de Dados de Microbioma	26/02/2018	08/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/6	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2018	22/10/2018	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	41
Estágios:			
Total:	0	20	41

Créditos Atribuídos à Tese: 172

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Trancado em 01/03/2019

Impresso em: 06/09/2019 17:55:53

06/09/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 6843231/2 - Leila Leiko Hashimoto

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
28644	Silvia Maria Franciscato Cozzolino	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Trancado em 01/03/2019

Impresso em: 06/09/2019 17:55:53