

NADJA SANTOS DE SALES

BIODISPONIBILIDADE DE SELÊNIO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E  
CASTANHA-DO-PARÁ (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) E SEU POTENCIAL  
ANTICARCINOGENICO NA MUCOSA DO CÓLON DE RATOS

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

613.28  
2007

Sales, Nadja Santos de, 1970-  
Biodisponibilidade de selênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K) e seu potencial anticarcinogênico na mucosa do cólon de ratos / Nadja Santos de Sales. – Viçosa, MG, 2007.  
xvii, 116f. : il.(algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Neuza Maria Brunoro Costa.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Alimentos funcionais. 2. Selênio - Bioviabilidade.  
3. Nutrologia. 4. Feijão - Aspectos da saúde.  
5. Castanha-do-pará - Aspectos da saúde. 6. Cólon (Anatomia) - Câncer. 7. Rato como animal de laboratório.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 613.28

NADJA SANTOS DE SALES

BIODISPONIBILIDADE DE SELÊNIO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E  
CASTANHA-DO-PARÁ (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) E SEU POTENCIAL  
ANTICARCINOGENICO NA MUCOSA DO CÓLON DE RATOS

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

APROVADA: 21 de março de 2007.

---

Profa. Nilda de Fátima Ferreira  
Soares  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Paulo Roberto Cecon  
(Co-Orientador)

---

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

---

Profa. Renata Nascimento de  
Freitas

---

Profa. Neuza Maria Brunoro Costa  
(Orientadora)

Aos meus pais, Valdira e Raimundo  
Aos meus irmãos, Robson, Ramon e Morgana  
Ao meu esposo, Claudivan  
Aos meus filhos, Marina, Gabriela, Luiza e  
Claudivan Júnior

**DEDICO**

A quem iremos nós, Senhor?  
Só Tu tens palavras de vida eterna!

**Simão Pedro**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus Cristo, fonte de toda a vida, por seu amor incondicional;

À Escola Federal de Satuba-AL, pela liberação para realização do curso de doutorado;

À Universidade Federal de Viçosa, que por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos e do Departamento de Nutrição e Saúde propiciou as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa;

À Universidad de Murcia (UM), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Nutrición y Bromatología, em Murcia, Espanha, pela disponibilização de sua estrutura e recursos para realização de parte desta pesquisa;

À CAPES, pela concessão de bolsa de estágio de dourando fornecida pelo Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE.

À EMBRAPA - Arroz e Feijão, pela conceção de parte do material experimental empregado na pesquisa;

À FAMINAS na pessoa da Prof. Eliane, pela conceção de material para análise enzimática;

À minha orientadora, Prof. Neuza Maria Brunoro Costa, por sua disposição em orientar-me e pela paciência e compreensão neste longo caminho que me ajudou a trilhar;

Aos meus co-orientadores, Prof. Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela colaboração e amizade sempre constantes, e Prof. Paulo Cecon, pela disponibilidade e valiosa ajuda na co-orientação;

Ao meu amigo Prof. Sérgio da Matta, pelos ensinamentos e doce convívio durante a minha passagem pela Biologia Estrutural;

À Prof. Renata de Freitas da UFOP, por aceitar o convite para fazer parte da banca e pela valiosa contribuição no aprimoramento da tese;

Ao Prof. Jorge Delena da UFOP, pela prestatividade na realização das análises de selênio;

Ao Prof. Antônio Bellato, pela conceção do equipamento de microondas para digestão de amostras;

A todos os professores do doutorado, em especial ao Prof. Nélio, pela prestatividade e empenho no envio do material experimental necessário a realização da pesquisa na Espanha;

A todos os funcionários do DTA e DNS, em especial aos laboratoristas Cassiano e Ricardo, e as valorosas secretárias Geralda e Mimorina;

Às minhas cunhadas Cláudia e Claudete, pela dedicação e auxílio de todas as horas;

Aos meus amigos de doutorado Lucía, Penha e Paulo, pelo companheirismo e solidariedade durante a caminhada;

Aos meus compadres Dona Maninha e Seu Barbosa, pelo carinho e atenção com a nossa família;

A todos do Departamento de Tecnología, Nutrición y Bromatología da UM em especial a:

Prof. Gaspar Ros Berruezo, pela valiosa e indispensável orientação e disponibilização de recursos para realização do segundo experimento desta tese, mas principalmente pela confiança, amizade e consideração;

Prof. Carmem Martinez, pela delicadeza e trato maternal com que tecia tanto as suas considerações científicas quanto a nossa amizade;

Prof. Maria Jesús, por sua atenção e disponibilidade constantes;

Ana Belém, Carmem, Dolo, Jorge, Patricia e Maitê, pela amizade e acolhida;

Javier e Juanfran, pelo despreendimento com que sempre me auxiliaram tanto nas atividades práticas quanto nas orientações científicas durante a execução do segundo experimento;

Tony, por tornar os meus dias de Espanha mais coloridos com seu sorriso e olhar acolhedor;

À Dra. Dolores Garcia Olmo e sua equipe de investigação do Hospital Universitario de Albacete, pelo treinamento e orientações no trabalho com os animais e a sua constante disponibilidade em ajudar-me;

À Prof. José Cerón da Facultad de Veterinaria (UM), por sua valiosa ajuda nas análises dos parâmetros bioquímicos sanguíneos e disponibilização do equipamento necessário à realização das análises enzimáticas;

À Maria José (SACE-UM), pela paciência, disponibilidade e profissionalismo na realização das análises de selênio;

À Assunción Roig, pela delicadeza e cuidado com que acolheu minha família, em especial nossa Marina, e pela disponibilidade e prestatividade quando da solicitação de seu auxílio;

À Fuensanta e sua linda família, pela acolhida e pelo carinho com que sempre nos presentearam;

À Margarida e sua família, pela amizade e pelas dicas de sobrevivência;

À Ester e seus preciosos filhos, pelos domingos ensolarados de missa;

Ao Padre Alfonso e a Marisol, pelo apoio espiritual e amor fraternal;

A todos os meus irmãos da Comunidade Presbiteriana de Viçosa (CPV) em particular às famílias de Dilcimar e Henrique, Edna e Edgard, Beatriz e Almir, pelo amor fraterno e preciosa amizade e comunhão;

À Tatiana, Ricardo e seus filhos, pela amizade, carinho e apoio que com que sempre nos bribdaram;

Aos meus pais e irmãos pela ausência conveniente e presença sempre marcante, eu os amo muito;

Ao meu companheiro Claudivan, por ter feito em mim morada e por fortalecer-me com sua paciência regada de coragem e determinação;

Aos nossos filhos Marina, Gabriela, Luiza e Claudivan Júnior por encantarem a minha vida;

E por fim, a todos os que em algum momento fracassaram, porque não há alicerce mais forte do que a própria ruína.

## BIOGRAFIA

NADJA SANTOS DE SALES, filha de Raimundo Eleutério Sales e Valdira Santos de Sales, nasceu em Campina Grande, PB, em 08 de fevereiro de 1970.

Em março de 1993, concluiu o curso de Agronomia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, na cidade de Areia, PB.

Iniciou em agosto do mesmo ano o Curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em fevereiro de 1996.

Foi professora visitante da Universidade Estadual da Paraíba de maio de 1996 a setembro de 1998. Desde outubro de 1998 é professora da Escola Agrotécnica Federal de Satuba, em Alagoas, onde ingressou mediante concurso público.

Ingressou no Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos em abril de 2002. Durante este curso desenvolveu parte da tese de doutorado junto ao Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos da Facultad de Veterinária da Universidad de Murcia, Espanha, no período de outubro de 2004 a novembro de 2005.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi

### **CAPÍTULO 1 SELÊNIO NA NUTRIÇÃO HUMANA**

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	3
2. Funções e fontes de selênio	5
2.1. Funções	5
2.2. Fontes	9
3. Biodisponibilidade	11
4. Interação com outros nutrientes	14
5. Sinais e sintomas de deficiência	15
6. Indicadores do estado nutricional	16
7. Bases para recomendação nutricional de selênio	19
8. Prevalência da deficiência em nível populacional	22
9. Estratégias para elevar a ingestão de selênio	24
9.1 Aumento no consumo de alimentos ricos em Se por meio da educação nutricional	25
9.2. Suplementação individual	25
9.3. Suplementação de animais	26
9.4. Adubação de culturas	27
9.5. Melhoramento de plantas para favorecer a acumulação de Se (biofortificação)	28
10. Considerações finais	29
11. Referências Bibliográficas	29

## **CAPÍTULO 2**

### **BIODISPONIBILIDADE DE SELÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO COMUM E EM FEIJÃO SUBMETIDO À ADUBAÇÃO FOLIAR COM SELENITO DE SÓDIO**

	Página
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1. Introdução	42
2. Material e Métodos	44
2.1. Obtenção e preparo do material experimental	44
2.2. Determinação da concentração de Se	45
2.3. Determinação da composição centesimal	46
2.4. Determinação do perfil de aminoácidos	46
2.5. Ensaio biológico	46
2.5.1. Constituição das Dietas Experimentais	47
2.5.2. Sacrifício dos animais e coleta de material para análise	48
2.5.3. Análise da atividade de GPx em plasma e fígado	48
2.5.4. Determinação da concentração de Se em eritrócitos	50
2.6. Delineamento Experimental e Análise Estatística	51
3. Resultados e Discussão	52
3.1. Composição centesimal e concentração de Se dos cultivares de feijão	52
3.2. Concentração de Se	52
3.3. Perfil de aminoácidos	54
3.4. Biodisponibilidade	55
4. Conclusões	61
5. Referências Bibliográficas	61
ANEXOS	65

**CAPÍTULO 3  
POTENCIAL ANTICARCINOGENÉTICO DE FEIJÃO E CASTANHA-DO-PARÁ  
SOBRE O RISCO DE CÂNCER DE CÓLON INDUZIDO POR 1,2-  
DIMETILHIDRAZINA EM RATOS F344**

	Página
RESUMO	66
ABSTRACT	68
1. Introdução	70
2. Material e Métodos	72
2.1. Animais	73
2.2. Dietas experimentais	73
2.3. Preparo do material experimental	74
2.4. Composição centesimal do material experimental e das dietas	75
2.5. Determinação de Se	75
2.6. Desenho experimental	76
2.7. Sacrifício dos animais e coleta de material para análise	78
2.8. Análise enzimática	78
2.8.1. Preparo das amostras	78
2.8.2. Análise da atividade de glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST)	79
2.9. Análise da concentração de Se em plasma sanguíneo	79
2.10. Análises histológicas do cólon	80
2.11. Análise estatística	81
3. Resultados e Discussão	81
3.1. Composição centesimal e concentração de Se	81
3.2. Ensaio Biológico	82
3.2.1. Consumo, ganho de peso e CEA	82
3.2.2. Atividade enzimática de GPx e GST e concentração plasmática de Se	84
3.2.4. Análises histoquímicas e morfométricas	93
3.2.4.1. Diferenciação celular: determinação de sulfomocinas e sialomucinas	94
3.2.4.2. Morfologia da mucosa colônica	101
4. Conclusões	106
5. Referências Bibliográficas	106
ANEXOS	115

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 1

	Página
1. Dietary Reference Intakes (DRIs): requerimentos médios estimados por grupos. <i>Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies</i> (2000)	20
2. Comparação de níveis médios de Se no soro entre adultos de diferentes países/região	24

### CAPÍTULO 2

1. Programa de digestão dos materiais experimentais em microondas marca Milestone, modelo Ethos Plus	45
2. Composição das dietas experimentais ( $\text{g kg}^{-1}$ )	50
3. Programa de aquecimento em bloco digestor para mineralização de amostras de eritrócitos submetidas à determinação da concentração de Se	51
4. Composição centesimal em base úmida e concentração de Se em base úmida e base seca dos cultivares de feijão	52
5. Composição aminoacídica dos cultivares de feijão em base úmida	55
6. Consumo alimentar (CA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais em função das dietas experimentais	57
7. Atividade enzimática de glutathiona peroxidase plasmática (GPx3), glutathiona peroxidase hepática (GPx1) e concentração eritrocitária de Se (Se eritrocitário) em ratos alimentados com diferentes dietas experimentais	59

### CAPÍTULO 3

1. Formulação das dietas experimentais com base na Dieta Padrão AIN-93G ( $\text{g kg}^{-1}$ )	74
2. Programa de digestão do material experimental e de dietas em microondas marca Milestone, modelo Ethos sel	76
3. Programa de digestão de amostras de plasma sanguíneo em Microondas Marca Milestone modelo Ethos sel	79
4. Composição centesimal e concentração de Se de feijão e castanha-do-Pará e das dietas experimentais em base úmida	82
5. Consumo alimentar (CA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais em função das dietas experimentais	83

	Página
6. Atividade de glutathiona peroxidase plasmática (GPx plasmática) e glutathiona peroxidase eritrocitária (GPx eritrocitária) nos animais em função das dietas experimentais	85
7. Resumo da análise de variância para atividade de glutathiona peroxidase plasmática (GPx plasmática) e glutathiona peroxidase eritrocitária (GPx eritrocitária) de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução química de câncer com DMH	86
8. Atividade de glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST) em homogenato de fígado de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução de câncer de cólon com DMH	87
9. Concentração plasmática de Se nos animais em função das dietas experimentais e da aplicação de DMH	91
10. Percentual de células secretoras de sulfomucinas (SUM), células secretoras de sialomucinas (SIM), células de secreção mista (SUM+SIM) e coeficiente entre sialomucinas e sulfomucinas (SIM:SUM) em mucosa colônica de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução de câncer com DMH	97
11. Altura de cripta em número de células de mucosa colônica de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução de câncer com DMH	102
12. Altura, diâmetro da base e diâmetro do ápice de criptas em $\mu\text{m}$ e densidade de criptas de cólon de ratos alimentados com dietas experimentais	104

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 3

	Página
1. Desenho experimental seguido para avaliação do efeito de distintas dietas experimentais na prevenção do câncer de cólon induzido quimicamente em ratos F344 por dimetilhidrazina (DMH).	77
2. Corte transversal de cólon distal de ratos F344 corado pela técnica histoquímica Orceína-AA mostrando cripta seccionada longitudinalmente com células caliciformes secretoras de sulfomicinas (a), de sialomucinas (b), e de secreção mista (c).	96
3. Corte transversal de cólon distal de ratos F344 corado pela técnica de coloração HE. (a) altura da cripta; (b) diâmetro da base da cripta; (c) diâmetro do ápice da cripta; (d) célula colunar.	102

## RESUMO

SALES, Nadja Santos de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2007. **Biodisponibilidade de selênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e seu potencial anticarcinogênico na mucosa do cólon de ratos.** Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa. Co-Orientadores: Nilda de Fátima Ferreira Soares e Paulo Roberto Cecon

O selênio (Se) é um elemento traço antioxidante, com importantes funções bioquímicas relacionadas à atividade de enzimas nas quais está presente como selenocisteína. O baixo estado nutricional de Se tem mostrado correlacionar-se positivamente com a incidência de doenças, entre elas o câncer. Alimentos componentes da dieta brasileira, como a castanha-do-Pará, naturalmente rica em selênio, e o feijão, com propriedades funcionais atribuídas à presença de constituintes como fibra, fitatos e taninos tem mostrado efeitos promissores na redução do risco de doenças crônicas. Este estudo teve como objetivo avaliar a biodisponibilidade de Se em 5 cultivares de feijão (Ouro Branco, Diamante Negro, BRS Radiante, Pérola e Talismã) e em feijão do cultivar Pérola submetido ao enriquecimento com Se bem como o potencial funcional do feijão e da castanha-do-Pará na redução do risco de câncer de cólon em animais. No ensaio de biodisponibilidade, feijões dos 5 cultivares e do cultivar enriquecido com Se e seu controle foram cozidos com água de maceração, secos em estufa, triturados e quantificados quanto ao teor de Se. Ratas adultas Wistar receberam, por 28 dias, dietas experimentais com o mesmo nível de Se fornecidos pelos feijões e dietas controle com e sem adição do nutriente. Foram determinados a atividade enzimática de Glutathione Peroxidase (GPx) plasmática e hepática bem como a concentração eritrocitária de Se. Os cultivares de feijão estudados e o cultivar Pérola adubado com Se e seu controle não apresentaram diferenças entre si na biodisponibilidade do nutriente medida pela atividade GPx plasmática e hepática, não estando, portanto, condicionada por fatores antinutritivos presentes no alimento. Na avaliação do potencial anticarcinogênico do feijão e da castanha-do-Pará sobre o câncer de cólon, ratos machos F344 (45) foram divididos em cinco grupos e alimentados com dietas hiperlipídicas constituindo-se nos controles AIN-93 sem adição de selênio (CN) e AIN-93 suplementada com 4 mg de Se por kg de dieta (CP), dietas contendo a mesma dose de selênio da dieta CP fornecidos pela castanha-do-Pará de forma isolada (C) ou combinada com feijão (F+C) e dieta com feijão (F) por um período de

12 semanas. O carcinógeno de cólon dimetilhidrazina (DMH) foi aplicado a seis animais de cada grupo em duas doses consecutivas na segunda e terceira semanas após a introdução das dietas experimentais. Três animais de cada grupo receberam apenas a solução veículo constituindo-se nos controles. Foram medidos a atividade das enzimas GPx plasmática, eritrocitária e hepática e Glutathione S-transferase (GST) hepática e a concentração plasmática de Se. Diferenciação celular, proliferação celular e características morfológicas da cripta e do cólon foram utilizados como biomarcadores do risco de câncer. As dietas CP, C, F e F+C promoveram o mesmo nível de expressão das enzimas GPx e GST, maior grau de diferenciação celular e menor grau de proliferação celular da mucosa colônica em relação à dieta CN, não sendo observadas alterações de padrão quando da aplicação do DMH. A administração de doses supranutricionais de Se na forma de SeMet ou fornecida pela castanha-do-Pará e a utilização de feijão de forma isolada ou em combinação com a castanha favoreceu a homeostase do desenvolvimento colônico evitando alterações na diferenciação e proliferação celular em ratos tratados com DMH, sugerindo um papel protetor destes alimentos no câncer de cólon. Os resultados indicam ainda um possível envolvimento de mecanismos múltiplos de ação.

## ABSTRACT

SALES, Nadja Santos de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March de 2007.  
**Bioavailability of selenium in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) and anticarcinogenic potential in the rats mucosa colon.** Adviser: Neuza Maria Brunoro Costa. Co-Advisers: Nilda de Fátima Ferreira Soares and Paulo Roberto Cecon.

Selenium (Se) is a trace element with antioxidant property and important enzymatic functions as selenocysteine. The low Se status is positively related with the incidence of chronic diseases, including cancer. Food components of the Brazilian diet, such as Brazil nut, naturally rich in selenium, and beans, with attributed functional properties to some of its constituents as fiber, phytate, and tannins are promising in the reduction of the risk of these chronic diseases. The objective of the current study was to evaluate the bioavailability of Se in 5 bean cultivars (Ouro Branco, Diamante Negro, BRS Radiante, Pérola, and Talismã), and in Pérola beans fertilized with Se. The study also aimed to evaluate the functional potential of black beans and Brazil nut in reducing the risk of colon cancer in rats. In the bioavailability study the bean cultivars were cooked with their soaking water; then, they were dried in oven, milled and analyzed for Se content. Female adult rats received their experimental diets containing the same levels of Se provided by the beans for 28 days. One control group with Se and another control group without Se were also included in the study. The activity of plasma and liver Glutathione Peroxidase (GPx) and the erythrocyte Se were determined. There was no difference between bean cultivars and beans fertilized with Se and its control in terms of Se bioavailability, as measured by liver and plasma GPx activity. To evaluate the anticarcinogenic effect of black beans and Brazil nut on colon cancer, 45 male F344 rats were distributed in 5 groups and fed with hyperlipidic diet for 12 weeks. One group received control AIN-93 diet without Se (CN), another group received AIN-93 diet supplemented with 4 mg Se kg<sup>-1</sup> (CP), other two groups were fed the same Se dose of CP diet, provided either by Brazil nut (C) or Brazil nut + beans (F+C) and the last group received diet with beans (F). The carcinogen DMH and its vehicle (control) were administered to the animals in two consecutive doses at weeks two and three after diet introduction. Plasma Se and the activity of liver, erythrocyte and plasma GPx and liver Glutathione S-transferase (GST) were measured. Cell differentiation, cell proliferation and morphological characteristics of crypt and colon

were biomarkers for the risk of cancer. The diets CP, C, F and F+C promoted the same expression levels of GPx and GST, higher cell differentiation and lower cell proliferation of colon mucosa, in relation to CN diet. No change was observed with DMH administration. Nutritional overdoses of Se provided by SeMet, Brazil nut or their combination with beans (C+F) and the supplied bean separately (F) promoted homeostase of colon development, and avoided changes in cell differentiation and proliferation in DMH-treated rats. This suggests a protective role of these food or its components on colon cancer. The results seem to be due to multiple mechanisms of action.

## **CAPÍTULO 1 - Selênio na nutrição humana**

### **RESUMO**

O selênio (Se) é um mineral traço, antioxidante, com importantes funções bioquímicas relacionadas à atividade de enzimas nas quais está presente na forma de selenocisteína. Sintomas de deficiência de selênio são raros exceto em situações extremas. No entanto, seu baixo estado nutricional tem mostrado correlacionar-se positivamente com a incidência de um grande número de doenças com destaque para o câncer. A recomendação dietética adequada para Se é de 55 µg por dia os quais podem ser obtidos pela ingestão de alimentos como frutos do mar, vísceras, carnes e cereais. Entretanto, devido à grande variação no conteúdo de Se em fontes vegetais e à ingestão irregular de alimentos de origem animal notadamente ricos neste nutriente, estima-se que milhões de pessoas no mundo sejam deficientes, o que aumenta o risco de doenças relacionadas principalmente com estresse oxidativo. Desta forma, tem-se tornado de importância crescente a caracterização e discussão dos aspectos relacionados ao Se como nutriente e elemento funcional envolvendo considerações sobre suas funções, fontes, biodisponibilidade, índices de avaliação do estado nutricional, sintomas e prevalência da deficiência e estratégias de combate dentre outros cuja revisão constitui-se no objetivo deste trabalho.

## **Selenium in human nutrition**

### **ABSTRACT**

Selenium (Se) is a trace mineral, antioxidant, with important biochemical functions related to the activity of enzymes in which it occurs as selenocysteine. Symptoms of selenium deficiency are rare except in extreme situations. However, the low Se status has been positively related with incidence of some diseases, with relevance for cancer. The adequate selenium requirement is 55 µg per day. This requirement of Se can be reached by the intake of seafood, organ meats, muscle meats and cereals. However, due to the high variation in the content of Se in plant foods and to the irregular ingestion of the selenium-rich animal foods, millions of people in the world are Se deficient, with increased risk of diseases related with oxidative stress. Therefore, it is of great concern the characterization and discussion of the nutritional and functional properties of the selenium considering its functions, sources, bioavailability, nutritional status, symptoms and prevalence of the deficiency and strategies to overcome it, among others, objectives of this revision.

# SELÊNIO NA NUTRIÇÃO HUMANA

## 1. Introdução

O selênio (Se), descoberto por Berzelius em 1817, foi primeiramente reconhecido como elemento tóxico para organismos animais e humanos, tendo sido considerado inicialmente, um agente carcinogênico. Somente em 1957 teve sua essencialidade comprovada para animais (SHWARZA e FOLKS, 1957) e em 1973 pesquisadores comprovaram seu papel biológico primariamente como componente da enzima glutathiona peroxidase, participante do sistema antioxidante de defesa das células (FLOHÉ *et al.*, 1973). Em 1979, um grupo de pesquisadores descobriu na região de Keshan, na China, a relação entre a ocorrência de patologia endêmica (doença de Keshan) e a baixa concentração deste elemento no solo. Desde então, o Se tem sido objeto de muitas pesquisas envolvendo tanto aspectos nutricionais quanto funcionais relacionados à saúde humana.

No organismo humano, o Se normalmente exerce sua atividade biológica por meio de sua incorporação a proteínas (selenoproteínas), dentre as quais se encontram as isoenzimas glutathiona peroxidases, as tioredoxina redutases e as deiodinases (HOLBEN e SMITH, 1999; KRYUKOV *et al.*, 2003).

Classificado como nutriente antioxidante (US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2000), o estado nutricional de Se no organismo humano tem mostrado correlacionar-se positivamente com a incidência de uma série de doenças incluindo vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, doenças transmitidas por vírus (influenza e HIV) dentre outras relacionadas, principalmente, com o estresse oxidativo. Apesar dos mecanismos envolvidos no efeito funcional do Se ainda não terem sido bem estabelecidos, tem-se indicações de que sua ação preventiva se dê pela ingestão de níveis acima da recomendação nutricional e que a forma de Se ingerida esteja relacionada com tais efeitos (GANTHER e LAWRENCE, 1997).

A forma de Se ingerida também tem sido relacionada com a biodisponibilidade do nutriente. Selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCys) são as principais formas de Se encontradas em alimentos de origem vegetal e animal, respectivamente, sendo a SeMet melhor absorvida que a SeCys (BUGEL *et al.*, 2002). Outras formas como metil-Se-cisteína podem ser encontradas em vegetais produzidos sob alto teor de Se disponíveis, as quais parecem estar

relacionadas ao efeito funcional do elemento (GANTHER e LAWRENCE, 1997). A ingestão de formas inorgânicas como selenito e selenato de sódio se dão, principalmente, na forma de suplementos, os quais são menos biodisponíveis que SeMet. Entretanto, nos últimos anos, suplementos de Se tem sido também disponibilizados sob forma orgânica como levedura rica em Se (CLARK *et al.*, 1996) e SeMet purificada (NYBERG, 1991).

Ainda que timidamente, a mais recente recomendação nutricional (DRI) para Se (US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2000) utilizou como critério, o potencial do nutriente sobre a prevenção de doenças. Entretanto, a atual Recomendação Dietética Adequada (RDA) encontra-se muito abaixo do nível de ingestão de Se no qual a expressão do seu potencial funcional tem sido observada. Ademais, evidências sugerem que há uma tendência de redução de Se na cadeia global de alimentos (FROST, 1987), e que 0,5 a 1 bilhão de pessoas no mundo são deficientes em Se aumentando o risco de câncer, doença cardiovascular, viroses e de uma série de desordens relacionadas indiretamente à baixa ingestão do nutriente (COMBS, 2001).

Como estratégias para elevação do nível de ingestão de Se, estão sendo estudados e desenvolvidos em muitos países programas que incluem suplementação individual, educação nutricional, suplementação de animais e enriquecimento de alimentos por meio da adubação de culturas ou pelo emprego de técnicas de melhoramento de plantas visando à obtenção de alimentos biofortificados. Neste sentido, deve-se ressaltar que a utilização conjunta e adequada das medidas disponíveis e seu constante monitoramento são imprescindíveis para segurança e efetividade das ações interventivas relacionadas ao Se.

Diante do exposto, tem-se tornado indispensável a caracterização e discussão dos aspectos nutricionais do Se não só à luz de sua essencialidade como também do seu potencial funcional. Estas abordagens, aliadas ao conhecimento da prevalência da deficiência em nível populacional e de suas causas, bem como da efetividade e adequação de estratégias de elevação da ingestão do nutriente, podem constituir-se em subsídios na formação de conceitos mais amplos sobre a importância dos nutrientes, e em particular do Se, na saúde e qualidade de vida da população e no direcionamento das pesquisas sobre o tema, objetivos para os quais este trabalho propõe uma contribuição.

## 2. Funções e fontes de selênio

### 2.1. Funções

O Se no organismo humano encontra-se normalmente incorporado a proteínas denominadas de selenoproteínas por meio das quais exerce suas funções biológicas. Segundo KRYUKOV *et al.* (2003), cerca de vinte e cinco selenoproteínas foram identificadas em mamíferos, muitas das quais ainda não possuem funções definidas.

A primeira função reconhecida do Se foi como componente da enzima glutathione peroxidase (ROTRUCK *et al.*, 1973), identificada hoje como quatro isoenzimas (GPx<sub>1</sub>, GPx<sub>2</sub>, GPx<sub>3</sub> e GPx<sub>4</sub>) de localizações específicas, mas com funções similares. O Se, como SeCys, é parte integrante do sítio ativo destas enzimas, cuja função é proteger o organismo contra o estresse oxidativo catalizando a destruição de peróxidos de hidrogênio e a decomposição de hidroperóxidos lipídicos, interrompendo a reação peroxidativa em cadeia dos radicais livres. De acordo com alguns estudos (ARTEEL *et al.*, 1998; SAITO *et al.*, 1999), postula-se que a selenoproteína P, maior selenoproteína presente no plasma, também desempenhe função antioxidante, atuando ainda no transporte de Se do fígado para outros tecidos.

Outro grupo de selenoenzimas, as tioredoxina redutases, estão envolvidas na redução de nucleotídeos no processo de síntese do DNA, na regeneração do sistema antioxidante envolvendo, inclusive, a redução dos metabólitos oxidados de vitamina C, e na manutenção do estado redox intracelular (MAY *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 1999; ALLAN *et al.*, 1999).

Dentre os órgãos do corpo humano, a glândula tireóide é a que apresenta mais alta concentração de Se (KOHRLER, 1999). Neste órgão, o Se está envolvido no metabolismo hormonal pela ação catalizadora da selenoenzima iodotironina deiodinase na conversão do hormônio da tireóide (tiroxina – T<sub>4</sub>) para a sua forma ativa (triiodotironina – T<sub>3</sub>) (BERRY e LARSEN, 1992; ARTHUR *et al.*, 1993). A selenofosfato sintetase sintetiza selenofosfato que é precursor da síntese de selenocisteína – forma de Se presente nos sítios ativos das selenoenzimas.

Além das já conhecidas funções do Se como nutriente essencial, uma série de evidências tem apontado para a sua ação preventiva sobre importantes doenças relacionadas principalmente com o estresse oxidativo. Câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e doenças transmitidas por vírus como

influenza e HIV são alguns exemplos de estados patológicos influenciados pelo baixo nível de ingestão de Se e cujos mecanismos envolvidos podem ou não estar associados a sua função nutritiva (GANTHER e LAWRENCE, 1997).

O Se parece agir na modulação do sistema imunológico. Deficiência de Se reduz a imunocompetência, envolvendo comprometimento da atividade das células de defesa do organismo (BOYNE e ARTHUR, 1986). A suplementação com Se, de indivíduos ainda que supostamente repletos no nutriente, é imunoestimulatória e envolve o favorecimento da atividade das células de defesa tanto quanto da proliferação das células de defesa ativadas (KIREMIDJIAN-SCHUMACHER *et al.*, 1994).

A deficiência de Se pode predizer significativamente a mortalidade relacionada à AIDS (BAUM e SHOR-POSNER, 1998; CAMPA *et al.*, 1999) bem como a carga viral dos indivíduos soropositivos (BAETEN *et al.*, 2001). BAUM *et al.* (1997), relatam que o estado nutricional de Se em pacientes HIV se correlacionou positivamente com a sua expectativa de vida; pacientes HIV deficientes em Se apresentam probabilidade vinte vezes maior de morrer em relação àqueles com níveis adequados do nutriente.

Outros estudos documentados por RYMAN (2000) indicam associação entre o baixo nível de Se com o comprometimento cognitivo, depressão, ansiedade e hostilidade. Estas condições podem ser aliviadas pela suplementação com Se de indivíduos com baixos níveis basais do nutriente. Estudos mais recentes sugerem que a selenoproteína P (WHANGER, 2002), selenoproteína W (JEONG *et al.*, 2002) e a mais recentemente descoberta selenoproteína M (KOROTKOV *et al.*, 2002) têm importantes papéis no cérebro.

O Se ainda protege o organismo contra a intoxicação por metais pesados em virtude de sua complexação com Hg, Cd, Pb, Ag, Ti e As (WHANGER, 1992).

Dentre as doenças correlacionadas com o estado nutricional de Se no organismo humano, o câncer é a que tem apresentado maior corpo de evidências para o potencial preventivo do referido nutriente.

Neste sentido, muitos estudos epidemiológicos foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos em diversas regiões do mundo enfocando a correlação positiva entre o estado nutricional de Se em humanos e a incidência de vários tipos de câncer. Uma abordagem completa destes estudos e de ensaios conduzidos com

animais e humanos avaliando o efeito da elevação do nível de ingestão de Se sobre a incidência do câncer e o desenvolvimento de tumores estão disponíveis em um abrangente artigo de revisão publicado por WHANGER (2004). Considerável número dos estudos apresentados pelo autor indica efeito positivo da aplicação ou ingestão de Se sobre a redução da incidência de câncer (YU *et al.*, 1991; BURKE *et al.*, 1992; YU *et al.*, 1997; COMBS e GRAY, 1998; DUFFIELD-LILLICO *et al.*, 2002). Com relação à supressão de tumores, os estudos com animais indicam que o Se é mais eficaz em prevení-los do que em revertê-los (IP, 1998). Entretanto, em ambos os casos, fatores como estado nutricional inicial de Se, forma de Se utilizada, tipos de câncer e biomarcadores analisados parecem influenciar os resultados obtidos.

Apesar de não se conhecer ao certo o mecanismo de ação anticarcinogênica do Se, algumas hipóteses têm sido discutidas em muitos trabalhos incluindo, mais recentemente, aqueles produzidos por COMBS e GRAY (1998), IP (1998), GANTHER (1999), SCRAUZER (2000), EL-BAYOUMY (2001) e FLEMING *et al.* (2001), WHANGER (2004). Os mecanismos sugeridos para prevenção do câncer pelo Se incluem seu papel nas selenoenzimas (particularmente a GPx e a tioredoxina redutase) (PENCE *et al.*, 1994; PERCHELLET *et al.*, 1987; GANTHER, 1999), seus efeitos sobre a morte programada da célula (SINHA *et al.*, 1999; IP e DONG, 2001; WANG *et al.*, 2001), o efeito sobre o reparo do DNA (SEO *et al.*, 2002a e 2002b) e no metabolismo de carcinógenos (OLSSON *et al.*, 1984; CHOW e GAIROLA, 1984). Atuam também no sistema imune (KIREMIDJIAN-SCHUMACHER *et al.*, 1994; TAYLOR, 1995), como agente antiangiogênico (LU e JIANG, 2001) e na inibição específica no crescimento de tumores por certos metabólitos de Se antitumorigênicos (HARRISSON *et al.*, 1996; GANTHER e LAWRENCE, 1997). Uma descrição detalhada de alguns dos mecanismos anticarcinogênicos acima citados pode ser obtida em um artigo publicado por COMBS e GRAY (1998).

Em virtude da ação das GPx sobre a conversão de peróxidos a compostos menos prejudiciais e devido à associação entre danos peroxidativos e câncer, tem-se assumido que estas peroxidases poderiam estar envolvidas na redução de tumores. Todavia, as informações obtidas têm dado pouca sustentação a esta hipótese. Considerando-se que a maior proteção do Se contra tumores ocorre em níveis elevados de ingestão e que a atividade das GPx alcança um platô em níveis nutricionais, nenhum aumento na atividade da enzima seria observado em

níveis mais elevados de Se em muitos tecidos (HORVATH e IP, 1983; LANE e MEDINA, 1985).

GANTHER (1999) levantou a hipótese de que a selenoenzima tioredoxina redutase poderia estar envolvida na redução de tumores, mas subseqüentes resultados experimentais obtidos por GANTHER e IP (2001) não confirmaram esta possibilidade. Segundo constatação dos autores, a atividade da tioredoxina redutase não foi alterada pelo alto nível dietético de metil-Se-cisteína (SeMCys) ou ácido metilselenínico, precursores de metilselenol em fígado de rato.

KUMARASWAMY *et al.* (2000) relatam a existência de uma selenoproteína de 15 kDa (sep 15) localizada no cromossomo 1p31, um locus genético normalmente mutado ou deletado em cânceres humanos e manifestada em mais altos níveis na próstata, fígado, rim, testículos e cérebro de humanos e camundongos tem sido envolvida na redução de tumores. Segundo os autores, tem-se observado que em linhagens de células malignas de próstata e em hepatocarcinomas os níveis desta selenoproteína decrescem consideravelmente sugerindo que ela pode estar envolvida tanto no risco quanto no desenvolvimento do câncer.

Apesar dos resultados variáveis obtidos nos estudos sobre o metabolismo de carcinógenos tem-se observado que a suplementação de ratos com Se reduz a produção hepática microsomal de metabólitos mutagênicos de alguns carcinógenos, incluindo *N,N*-dimetilanina (OLSSON *et al.*, 1984), dimetilbenz(a)antraceno (MARTIN e SCHILLACI, 1984), 2-acetilaminofluoreno (CHOW e GAIROLA, 1984) e benzo(a)pireno (TEEL e KAIN, 1984). Neste mecanismo, o efeito da suplementação com altos níveis de Se pode afetar o metabolismo de tais carcinógenos por vias que se espera inibir o estágio inicial do processo carcinogênico. Entretanto, tais efeitos podem variar tanto em relação ao carcinógeno quanto ao hospedeiro.

O câncer de mama tem-se figurado como a primeira causa de morte em mulheres no Brasil e a segunda neoplasia maligna mais incidente no mundo (BRASIL, 2003). Neste sentido, estudos com humanos e animais indicam que a ingestão adicional de Se, ou seja, acima do requerimento nutricional, é necessária porque uma forma metilada do elemento (metilselenol), ativa sobre a redução deste tipo de câncer, só está presente em mais altos níveis com a ingestão elevada do nutriente (WHANGER, 2004). Alguns estudos sugerem (CAI *et al.*, 1995; IP e LISK,

1995) que o metabolismo desta forma de Se seria mais eficientemente alcançado quando da ingestão de compostos específicos do nutriente como SeMCys, a qual se constitui na forma primária de Se presente em vegetais enriquecidos no nutriente como brócolis e alho. Evidências sobre a ação desta forma de Se sobre outros tipos de câncer ainda estão sem estudo.

De modo geral, os estudos têm demonstrado, independentemente dos mecanismos envolvidos, que a dose necessária de Se para promover sua ação anticarcinogênica está acima (2 a 5 vezes) da dose nutricional recomendada (45 a 70 µg por dia) (COMBS, 2001; DUFFIELD-LILLICO *et al.*, 2002; WHANGER, 2004) e que formas específicas do nutriente apresentam ação potencializada sobre determinados tipos de câncer (GANTHER e LAWRENCE, 1997).

Pode-se concluir, portanto, que os mecanismos relacionados ao efeito anticarcinogênico do Se vão além de sua ação como nutriente dentro das selenoenzimas e que outras selenoproteínas de funções ainda não definidas, bem como a formação de metabólitos específicos do elemento podem estar envolvidos, havendo a necessidade de estudos mais detalhados e aprofundados sobre a ação do Se como nutriente e elemento funcional para o organismo humano.

## **2.2. Fontes**

Tanto os animais quanto o homem são primariamente dependentes das plantas para seu requerimento nutricional de Se. Desta forma, a quantidade deste nutriente em alimentos de origem vegetal é um fator determinante da sua disponibilidade na cadeia alimentar.

O conteúdo de Se em plantas depende da região de cultivo (TERRY *et al.*, 2000), ou seja, do nível de Se disponível nos solos. No entanto, observa-se variação entre espécies de plantas quanto à sua capacidade de acumulação.

O trigo, cereal básico amplamente consumido na dieta humana, é uma boa fonte de Se apesar de apresentar uma ampla faixa de concentração em função do local de cultivo (0,04 - 21,4 mg kg<sup>-1</sup>). Devido à sua capacidade natural de acumulação do nutriente no grão e por seu amplo consumo em várias partes do mundo, o trigo tem sido bastante estudado como veículo para o Se por meio do enriquecimento via adubação da cultura (LYONS *et al.*, 2003). Outros cereais como arroz e milho também têm sido enriquecidos objetivando elevar o nível de ingestão dietética de Se (BEILSLEIN *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 2002; WHANGER, 2002).

Frutas, leguminosas e hortaliças apresentam baixos teores de Se (< 0,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso úmido) mesmo quando cultivados em solos considerados seleníferos (máximo de 6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (TERRY *et al.*, 2000). Todavia, os mesmos autores acrescentam que vegetais como alho e aspargo podem acumular teores do nutriente acima de 17  $\mu\text{g g}^{-1}$  quando cultivados nestes solos.

Os cereais, de modo geral, apresentam níveis relativamente altos de Se (< 0,1 - > 0,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso úmido) apesar da variação observada em função do local de cultivo. Entretanto, grãos beneficiados e seus produtos derivados podem apresentar redução no conteúdo de Se em relação ao alimento integral (MORRIS e LEVANDER, 1970; FERRETTI e LEVANDER, 1974) a exemplo do que ocorre para outros minerais traços.

Alimentos de origem animal como frutos do mar, fígado, rim (0,4 – 1,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso úmido), carne (0,1 – 0,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso úmido) e derivados do leite (< 0,1 – 0,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso úmido), apresentam geralmente alto conteúdo de Se em relação aos produtos de origem vegetal sendo considerados, em termos quantitativos, boas fontes do nutriente (FERRETTI e LEVANDER, 1974; SAKURAI e TSUCHIYA, 1975; BIERI e AHMAD, 1976; OLSON *et al.*, 1978).

No Brasil, apesar da escassez de estudos sobre a concentração de Se nos alimentos, tem-se constatado que os peixes podem contribuir com razoável quantidade do micronutriente na dieta seguindo-se das carnes, das vísceras e do trigo (FERREIRA, 2002). A castanha-do-Pará, alimento típico da região norte do país, tem despertado o interesse dos pesquisadores em virtude de seus altos níveis de Se, sendo considerada a maior fonte natural de Se orgânico já identificada (IP e LISK, 1994). Todavia, como observado por FERREIRA (1999), o consumo regular tanto de peixe quanto de castanha-do-Pará não faz parte do hábito alimentar de grande parte da população brasileira. Além disso, o trigo utilizado no Brasil, devido a sua procedência diversa, apresenta variáveis quantidades de Se. Desta forma, estes alimentos não podem ser considerados como uma real fonte dietética do nutriente para a população brasileira.

Apesar do nível de Se nos alimentos representar um importante indicador do seu estado nutricional na população, deve-se ressaltar que a determinação da quantidade ingerida do nutriente não prediz, por si só, a contribuição do elemento na manutenção das funções vitais do organismo. É a

determinação da biodisponibilidade do nutriente no alimento ou na dieta que indicará a eficiência do suprimento de Se ao organismo humano.

### **3. Biodisponibilidade**

A biodisponibilidade é definida como a proporção de um nutriente ingerido e que é utilizado para as funções normais ou armazenado. A biodisponibilidade de Se depende da conversão do Se absorvido dentro de uma forma biologicamente ativa a qual é retida pelos tecidos (TAPIERO *et al.*, 2003).

A absorção de Se pelo organismo parece não sofrer regulação homeostática, mostrando-se normalmente elevada, não se constituindo, portanto, em um fator limitante da biodisponibilidade do micronutriente. A homeostase do Se em condições fisiológicas normais é obtida principalmente pela regulação da excreção urinária (GROFF *et al.*, 1995).

O determinante primário da absorção e subsequente utilização do Se pelo organismo é sua forma química a qual tem sido envolvida também nos efeitos funcionais do nutriente.

O Se nos alimentos é encontrado na forma orgânica (ex. selenometionina e selenocisteína) e na forma inorgânica (Ex. selenito e selenato). Em plantas, o Se está presente principalmente na forma de SeMet incorporado não especificamente a proteínas no lugar da metionina (Met) podendo representar mais de 50 % do total de Se (TAPIERO *et al.*, 2003). A SeMet é também a principal forma de Se em leveduras enriquecidas a qual se constitui na maior fonte de Se disponível comercialmente. As demais formas presentes em plantas como SeCys, SeMCys e  $\gamma$ -glutamil-Se-metil-cisteína não são significativamente incorporadas nas proteínas (TAPIERO *et al.*, 2003). Todavia, alguns estudos têm atribuído os efeitos funcionais do Se na prevenção do câncer à presença de SeMCys em algumas plantas cultivadas sob elevada disponibilidade do elemento (IP *et al.*, 2000; FINLEY *et al.*, 2001; WHANGER, 2002). Em mamíferos, a SeMet é absorvida no intestino delgado pelo mesmo mecanismo de transporte da metionina (VENDELAND *et al.*, 1992).

Em animais, a maior parte do Se se encontra na forma de SeCys que é provavelmente absorvida por um mecanismo comum de transporte ativo com aminoácidos básicos e incorporada de forma específica a proteínas (VENDELAND *et al.*, 1992).

O Se inorgânico (selenito e selenato de sódio) está presente nos alimentos em baixíssima concentração. Sua significância em relação ao suprimento de Se está relacionada à sua utilização como suplemento alimentar, isoladamente ou em complexos de nutrientes (SCRAUZER, 2001).

Estudos em humanos e animais têm mostrado que SeMet é absorvida e retida mais eficientemente que o selenato (BUTLER *et al.*, 1991) ou selenito (GRIFFITHS *et al.*, 1976; RAGHIB *et al.*, 1986; MOSER-VEILLON *et al.*, 1992), e que o selenato é absorvido mais eficientemente que o selenito (LEVANDER *et al.*, 1983; MOSER-VEILLON *et al.*, 1992), mas não é tão efetivo em manter o estado nutricional de Se (determinado pela atividade da GPx em plaquetas) como ocorre com o Se presente no trigo e na levedura enriquecidos (LEVANDER *et al.*, 1983).

Os ensaios de biodisponibilidade de Se têm mostrado ainda que o Se presente em alimentos de origem animal é geralmente menos biodisponível do que as formas presentes em vegetais (BUGEL *et al.*, 2002).

Peixes e mariscos são considerados boas fontes de Se. Entretanto, DOUGLASS *et al.* (1981), utilizando modelo com ratos, observaram que o Se contido em atum enlatado foi apenas 57 % tão efetivo quanto o selenito em restaurar a atividade da GPx no fígado dos animais previamente deficientes, enquanto que o Se no fígado bovino cozido e no trigo enriquecido tiveram, respectivamente, 96 e 83 % da atividade do selenito. A baixa biodisponibilidade do Se em peixes em relação a alimentos vegetais também foi verificada por MELTZER *et al.* (1993) em humanos. Uma das explicações para este fato tem se baseado em uma possível inibição da absorção do nutriente pela formação de complexos com metais pesados, como o Hg. Entretanto, foi verificado que mesmo em casos onde a concentração de metal pesado no alimento foi considerada irrelevante a baixa biodisponibilidade se manteve (GROFF *et al.*, 1995).

Além da forma química, alguns fatores dietéticos têm mostrado afetar a biodisponibilidade de Se em animais, normalmente pelo seu efeito sobre a absorção do nutriente. Como favorecedores da absorção inclui-se a relação metionina/proteína e a presença de nutriente antioxidante como o ácido ascórbico. Como inibidores, pode-se incluir metais pesados e altos níveis de enxofre dietético (FAIRWEATHER-TAIT, 1997; GREGER e MARCUS, 1981).

CHOE e KIES (1989) encontraram que a dose de ácido ascórbico de 200 mg não teve efeito sobre o metabolismo do Se (selenato de sódio na dose de 5

µg), mas parece melhorar a biodisponibilidade do nutriente, avaliada pela mudança da concentração de Se no plasma e pela atividade de GPx, proveniente de uma mistura de alimentos servidos na dieta (MUTANEN e MYKKANEN, 1985).

Não obstante a sua relevância, informações obtidas nos ensaios de biodisponibilidade de Se devem ser avaliadas à luz de algumas importantes considerações sobre a abrangência e o significado dos parâmetros utilizados. De modo geral, o Se proveniente de diversas fontes é bem absorvido. Mais de 90 % da SeMet, a maior forma dietética do elemento, é absorvida pelo mesmo mecanismo da metionina (Swanson *et al.*, 1991). Desta forma, o principal parâmetro de avaliação da biodisponibilidade do nutriente é a sua incorporação em uma forma biologicamente ativa, ou seja, a sua eficiência de utilização pelo organismo, a qual é medida pela atividade de selenoenzimas, principalmente a GPx em tecidos ou fluidos biológicos. Todavia, este parâmetro não considera o Se retido não especificamente à proteína, o qual, por ocasião do *turnover* normal da célula, poderia ser liberado e aproveitado biologicamente. Por outro lado, a retenção por si só não se constitui um bom parâmetro de avaliação da biodisponibilidade, pois a incorporação não específica de SeMet em proteínas no lugar de Met (WASCHULEWSKI e SUNDE, 1988) confere a esta forma de Se uma óbvia vantagem sobre as demais formas orgânicas e inorgânicas mencionadas.

De acordo com FAIRWEATHER-TAIT (1997) não há, até o momento, uma metodologia que possa ser considerada ideal. O autor acrescenta ainda que, um caminho aparentemente mais fácil de pesquisar a biodisponibilidade de Se nos diversos alimentos envolveria a caracterização, em detalhes, da utilização pelo organismo das diferentes formas químicas do nutriente (usando mudança do estado nutricional e cinética de modelagem). Estes dados, quando combinadas com informações sobre a concentração e especificação de tais formas no alimento, possibilitariam prever a biodisponibilidade de Se proveniente das diferentes fontes alimentares.

Além disso, deve-se considerar ainda a hipótese de que a determinação da biodisponibilidade de Se por meio dos indicadores utilizados pode não ser eficiente em prever o efeito funcional do Se no organismo humano visto que os mecanismos envolvidos podem não estar relacionados às suas já reconhecidas funções como nutriente, como é o caso dos efeitos anticarcinogênicos

de compostos metilados de Se formados durante metabolismo do elemento observados por IP e LISK, 1993.

#### **4. Interação com outros nutrientes**

Poucas são as pesquisas enfocando interações entre Se e demais nutrientes ou componentes do alimento. Alguns metais como chumbo, ferro, cobre e mercúrio tem mostrado interagir com o nutriente reduzindo significativamente sua concentração nos tecidos (no caso do chumbo) ou complexando-se com ele inibindo sua absorção no intestino (Fe, Cu e Hg) (WHANGER, 1976; REILLY, 1996).

Outras interações estão relacionadas com a ação antioxidante complementar entre o Se e demais nutrientes como a vitamina E, e na manutenção das condições fisiológicas normais como na interação entre Se e iodo.

Estudos demostram que a vitamina E e o Se são interdependentes podendo, inclusive, agir sinergisticamente na prevenção de alguns tipos de câncer (HORVATH e IP, 1983; IP e WHITE, 1987; KLEIN *et al.*, 2000).

O Se é importante para o estado nutricional da vitamina E por preservar a integridade pancreática, mantendo a digestão normal de gordura, formação de micelas e absorção da vitamina. O Se, como parte da GPx, destrói peróxidos prevenindo o seu ataque aos ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas das células, o que reduz a quantidade de vitamina E que é requerida para manter a integridade das membranas. Finalmente, o Se ajuda a reter a vitamina E no plasma sanguíneo. A vitamina E, por sua vez, ajuda a prevenir a perda de Se pelo organismo em virtude de sua própria atividade antioxidante, por limitar a cadeia de reações de destruição dos lipídios de membrana reduzindo a produção de hidroperóxidos, os quais poderiam requerer a ação da GPx para neutralizá-los.

Esta interação entre o Se e a vitamina E tem sido bem caracterizada por meio da diastese exudativa, cuja ocorrência em animais só tem sido observada com a deficiência simultânea destes micronutrientes.

A interação entre Se e iodo no metabolismo da tireóide, em situações de deficiência de um destes nutrientes ou de ambos, tem sido objeto de vários estudos relacionados à etiologia do cretinismo mixoedematoso e do cretinismo neurológico (CORVILAIN *et al.*, 1993; BECKETT *et al.*, 1993; ARTHUR *et al.*, 1993; BEHNE e KYRIAKOPOULOS, 1993; VANDERPAS *et al.*, 1993).

Os estudos demonstram que, pelo decréscimo da atividade de GPx intracelular, a deficiência de Se pode aumentar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em condições adequadas de suprimento de iodo promovendo, em algumas semanas, a atrofia da tireóide observada no cretinismo mixedematoso. Já em mulheres deficientes em iodo, a elevação no nível de ingestão de Se promoveria aumento na deiodinação de T<sub>4</sub> e produção de T<sub>3</sub> reduzindo o suprimento de T<sub>4</sub> para o feto e seu cérebro com efeitos deletérios da deficiência de iodo caracterizada no cretinismo neurológico (CORVILAIN *et al.*, 1993). Desta forma, tanto a deficiência de Se em condições adequadas de suprimento de iodo quanto à situação contrária pode promover efeitos nocivos ao organismo humano, devendo-se atentar para o estado nutricional de um e de outro nutriente quando da suplementação para correção de deficiências.

## **5. Sinais e sintomas da deficiência**

A identificação de alguma doença humana devido à baixa ingestão de Se é difícil porque a deficiência deste nutriente em animais é caracterizada por grande variedade de sinais envolvendo diferentes sistemas e órgãos. Este é talvez o motivo pelo qual evidências de deficiência em humanos sejam relativamente raras e populações com baixo nível de ingestão do nutriente não demonstrem, normalmente, sintomas aparentes (DANIELS, 1996).

Entretanto, casos de deficiência severa de Se em humanos resultam em uma cardiomiopatia denominada doença de Keshan, prevalente em crianças na idade pré-escolar e mulheres em fase reprodutiva, com média de ingestão de Se de 10 µg por dia (YANG *et al.*, 1988; GE e YANG, 1993). Indivíduos com caso agudo da doença sofrem de insuficiência cardíaca repentina e em casos crônicos há o alargamento do coração com graus variáveis de insuficiência.

A deficiência de Se também tem sido mencionada como um dos fatores contribuintes para uma desordem nas articulações conhecida como doença de Kashin-Beck que se manifesta durante a adolescência (CHENG e QUIAN, 1990). A doença é freqüentemente caracterizada por degeneração de nervos e células cartilaginosas do corpo, o que resulta em nanismo e deformações das articulações (GE e YANG, 1993). A incidência desta doença foi observada em áreas da China com baixo conteúdo de Se no solo, o qual refletia sobre os alimentos e, por conseguinte, sobre o nível de ingestão do nutriente pela população.

BECK *et al.* (1995) afirmam que experimentos com animais têm demonstrado que a deficiência em Se promove a redução da atividade das selenoenzimas, mas se os animais são adequadamente nutridos, a deficiência causa relativamente poucos sintomas clínicos. Entretanto, quando da presença de certos tipos de estresses químico, nutricional e infeccioso, a deficiência de Se pode levar a ocorrência de sérias doenças. É o caso, por exemplo, da indução de deficiência de vitamina E em animais deficientes em Se que tem demonstrado causar peroxidação lipídica e necrose do fígado em ratos e porcos e injúrias cardíacas em porcos, ovelhas e bovino (VAN VLEET, 1980).

Uma exceção ao postulado no parágrafo anterior, diz respeito à interação entre iodo e Se. Neste caso, como explicado anteriormente no item 2, a deficiência de Se pode proteger contra a deficiência de iodo pelo decréscimo no metabolismo de T<sub>4</sub>, com conseqüente redução na perda deste nutriente pelo organismo (CORVILAIN *et al.*, 1993).

Pessoas submetidas à nutrição parenteral total geralmente apresentam deficiência de Se, apresentando sintomas que incluem dor muscular, debilidade e perda da pigmentação do cabelo e da pele e o branqueamento do fundo da unha (GROFF *et al.*, 1995).

## **6. Indicadores do estado nutricional**

O índice utilizado na avaliação do estado nutricional de Se tem sido a determinação da atividade de GPx em fluidos biológicos, cuja expressão máxima no plasma é empregada como parâmetro de determinação do nível de ingestão adequado de Se por humanos. Entretanto, a falta de uniformidade nas condições de avaliação e as diferentes unidades utilizadas para expressar os resultados têm tornado muito difícil à comparação interlaboratorial. Apesar disso, a medição da atividade de GPx no sangue ou em um componente sangüíneo pode ser uma medida prática do estado nutricional de Se.

Dentre as vantagens de utilização da medição da atividade de GPx incluem-se a mais fácil execução e o fato de não estar sujeita à contaminação. Todavia, a GPx representa apenas o Se “funcional” nos tecidos, não o Se que tem sido incorporado não especificamente dentro de proteínas ou que tem formado complexos biologicamente inativos com metais pesados. Finalmente, pelo menos em alguns tecidos, a atividade da enzima parece diminuir quando o nível dietético

de Se se aproxima do requerimento nutricional do animal (HORVATH e IP, 1983; LANE e MEDINA, 1985).

Em células vermelhas sangüíneas, um material biológico que é altamente conveniente para o propósito de amostragem, o “efeito platô” da atividade de GPx parece não ocorrer (HOEKSTRA, 1975). Assim, segundo o autor, a ausência de platô pode limitar a utilização de GPX nos eritrócitos para o estabelecimento do requerimento de Se, mas não diminui a utilidade desta fonte da enzima como índice geral do estado nutricional de Se. Entretanto, devido a meia vida das células vermelhas do sangue ser relativamente longa (120 dias), a medição da atividade de GPx em eritrócitos pode não refletir adequadamente o estado nutricional imediato de Se e, assim, de acordo com SIMONOFF *et al.* (1992), o plasma poderia ser um melhor indicador a curto prazo enquanto que os eritrócitos poderiam ser utilizados como indicadores a longo prazo.

Como a atividade da enzima é influenciada por variáveis fisiológicas como idade, sexo, estado nutricional geral, exposição a certos estressores, intoxicantes ou metais pesados e também pela deficiência de Fe e vitamina B<sub>12</sub> (GANTHER *et al.*, 1976), estas devem ser controladas e, ou compensadas se a GPx for utilizada como índice nutricional.

Outros índices de avaliação do estado nutricional de Se têm sido utilizados e mencionados em alguns trabalhos reportados na literatura. Dentre eles, estão às medições da concentração do elemento traço no sangue total, no soro ou no plasma, nos eritrócitos, na urina, no cabelo e nas unhas (CHEN *et al.*, 1980; LEVANDER *et al.*, 1983; WASOWICZ *et al.*, 2001; WASOWICZ *et al.*, 2003). Resta a questão, todavia, se há ou não boa correlação entre estas medições e o verdadeiro estado de Se no indivíduo definido pelo Se funcional em uma enzima.

Neste sentido, alguns trabalhos foram realizados correlacionando a concentração de Se em um fluido biológico e a atividade de GPx no mesmo fluido ou em outro. Os estudos indicam que há boa correlação entre estas variáveis. No entanto, em concentrações muito elevadas de Se no sangue, a correlação não se verifica (THOMSON *et al.*, 1977; LANE *et al.*, 1981; LANE *et al.*, 1983). REA *et al.* (1979) encontraram boa correlação entre a concentração de Se no plasma e nos eritrócitos, em indivíduos com estado moderado de Se, bem como entre a concentração de Se no plasma e a atividade GPX nos eritrócitos.

De acordo com tais estudos é possível assumir, com alguma segurança, que em concentrações de Se no sangue abaixo de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  há uma boa correlação entre a concentração do elemento no plasma ou no sangue e a atividade GPx em eritrócitos e que, portanto, a concentração de Se no plasma pode ser utilizada como um bom índice do seu estado nutricional em humanos. Em concentrações de Se no sangue, acima de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , a correlação torna-se progressivamente mais fraca, devido provavelmente à ausência de síntese da enzima (a enzima chega à sua atividade máxima) nestas concentrações (DIPLOCK, 1993).

A medição da GPx em plaquetas vem sendo utilizada em alguns trabalhos. LEVANDER *et al.* (1983), em um ensaio de biodisponibilidade de Se com homens finlandeses, observaram que a concentração de GPx em plaquetas duplicou dentro de duas a três semanas em seguida à suplementação com  $200 \mu\text{g}$  de Se por dia, enquanto que a concentração da enzima no plasma aumentou apenas 20 %. Neste caso, a atividade GPx em plaquetas poderia ser utilizada como índice de relativa eficiência quando respostas rápidas a mudanças no estado nutricional de Se são necessárias. RAYMAN (2000), referindo-se ao estudo de NEVE (2000), afirmou que se a saturação de GPx em plaquetas for utilizada na medição da repleção de Se, em substituição à máxima atividade da enzima no plasma, uma ingestão mais elevada de Se, na faixa de  $80 - 100 \mu\text{g}$  por dia, é requerida.

A avaliação do estado nutricional de Se pela medição da concentração do elemento no cabelo ou nas unhas apresenta como vantagem o fato de ser uma técnica não invasiva, que não requer habilidades específicas na obtenção da amostra, e não necessita de sistema de refrigeração para estocar o material a ser analisado, sendo esta última vantagem de especial importância quando da avaliação do estado nutricional em populações de partes remotas do mundo. Além disso, foi observada uma excelente correlação entre a concentração de Se no cabelo e no sangue total (CHEN *et al.*, 1980).

A medição de Se na urina apresenta uma série de dificuldades não representando um método prático de avaliação do estado nutricional.

## 7. Bases para recomendação nutricional de selênio

O estabelecimento dos níveis de Se requeridos para se obter os benefícios nutritivos, tanto quanto os níveis de segurança para proteger o organismo humano de possíveis efeitos tóxicos, tem se baseado quase que exclusivamente em resultados chineses (YANG *et al.*, 1989b; YANG e ZHOU, 1994).

Nestes estudos, observou-se que a ingestão de aproximadamente 5 mg por dia resultou em clara ocorrência de selenose, caracterizada pela perda de unhas e de cabelo. No entanto, a tolerância dos indivíduos a tão altos níveis de Se só ocorreu devido ao consumo de dietas com elevado teor de fibras. O nível mais baixo de Se dietético promotor de efeitos tóxicos foi estimado em aproximadamente 1600 µg por dia. Todavia, alguns efeitos foram observados em indivíduos com ingestão de 900 µg por dia. A ingestão dietética máxima de Se considerada segura foi calculada em 800 µg por dia, mas em alguns indivíduos a quantidade de 600 µg por dia apresentou-se como a ingestão máxima segura. Assim, para obter-se um fator de segurança, a máxima ingestão dietética para o Se foi sugerida como 400 µg por dia. Um nível de cerca de 40 µg de Se diários foi sugerido como requerimento mínimo, enquanto que uma ingestão menor que 11 µg diários certamente resultaria em problemas de deficiência.

As mais recentes *Dietary Reference Intakes* (DRIs), ou Ingestão Alimentar de Referência para Se são apresentadas no Quadro 1.

A *Food and Nutrition Board* da US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (2000) recomenda a ingestão diária de 55 µg tanto para homens quanto para mulheres. Este valor foi baseado na quantidade de Se necessária para maximizar a atividade da enzima GPx no plasma (GPx plasmática).

As estimativas destes novos valores de referência tiveram por base um número diversificado de informações químicas, nutricionais e toxicológicas acumuladas por mais de meio século sobre a ingestão alimentar de Se. A avaliação conjunta destes fatores permitiu chegar a algumas importantes conclusões e determinações tais como: a não variação das recomendações RDA (Recommended Dietary Allowances) para o Se em função do gênero ou idade depois dos 14 anos; o estabelecimento do UL (Tolerable Upper Intake Level) para o nutriente e; a recomendação de pesquisas de intervenção em grande escala sobre os potenciais efeitos preventivos de doenças pelo Se dentre outros nutrientes considerados antioxidantes (AMAYA-FARFAN *et al.*, 2001).

**Quadro 1.** Dietary Reference Intakes (DRIs): requerimentos médios estimados por grupos. *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies (2000)*

Grupos/Estágio de vida	AI <sup>1</sup>	EAR <sup>2</sup>	RDA <sup>3</sup>	UL <sup>4</sup>
	µg por dia			
<b>Lactentes</b>				
0 – 6 meses	15			45
7 – 12 meses	20			60
<b>Crianças</b>				
1 – 3 anos		17	20	90
4 – 8 anos		23	30	150
9 – 13 anos		35	40	280
<b>Adolescentes</b>				
14 – 18 anos		45	55	400
<b>Adultos</b>				
19 – 30 anos		45	55	400
31 – 50 anos		45	55	400
51 – 70 anos		45	55	400
> 70 anos		45	55	400
<b>Gestação</b>				
≤ 18 anos		49	60	400
19 – 30 anos		49	60	400
31 50 anos		49	60	400
<b>Lactação</b>				
≤ 18 anos		59	70	400
19 – 30 anos		59	70	400
31 – 50 anos		59	70	400

<sup>1</sup>AI: Adequate Intake; <sup>2</sup>EAR: Estimated Average Requirement; <sup>3</sup>RDA: Recommended Dietary Allowances; <sup>4</sup>UL: Tolerable Upper Intake Level

Como nenhum critério do estado nutricional de Se tem demonstrado refletir a resposta à ingestão alimentar em lactentes, as recomendações de Se para este grupo foram baseadas na Ingestão AI que reflete a ingestão média de Se por lactentes alimentados principalmente com leite humano.

Para crianças e adolescentes, a falta de dados se repete e assim, EAR e as RDAs para estes grupos têm sido obtidos pela extrapolação dos valores para adultos.

Dada a mais elevada suscetibilidade das mulheres para desenvolver a doença de Keshan, os requerimentos para as várias idades nos grupos são baseados no mais alto peso de referência dos homens não havendo, portanto, distinção de gêneros.

Como nenhuma condição patológica relacionada à insuficiência de Se foi reportada em indivíduos com mais idade (grupo acima de 50 anos) e como os marcadores do estado nutricional de Se no sangue não diferem com a idade ou gênero (HILL *et al.*, 1996), as mesmas necessidades estabelecidas para adultos jovens foram utilizadas para este grupo.

Para gestantes, a necessidade média de Se foi baseada na deposição fetal de 4 µg por dia durante todo período de gestação totalizando EAR de 49 µg por dia. Uma vez que a maior parte do Se é altamente biodisponível, nenhum ajuste é feito para absorção, o mesmo ocorrendo com relação à idade da mulher.

No caso de mulheres em fase de lactação, a estimativa das necessidades de Se teve como base a quantidade média do nutriente excretado no leite humano e a quantidade diária de leite ingerido por lactentes dos dois aos seis meses de vida. O valor obtido foi então acrescido do estimado para mulheres não gestantes e não lactantes, sem qualquer distinção quanto à idade ou biodisponibilidade.

Apesar do ainda escasso número de informações necessárias à obtenção de uma estimativa mais precisa das necessidades de Se para alguns grupos considerados, as atuais DRIs, de acordo com AMAYA-FARFANI *et al.* (2001), apresentam alguns importantes avanços principalmente no que diz respeito aos critérios utilizados para se chegar ao que seria um consumo adequado. Desta forma, foi dado ênfase aos parâmetros de saúde como a redução do risco de doenças, que embora timidamente considerados nas RDAs anteriores podem ser tidos como inovadores, pois diminuem o peso dado ao fator crescimento.

Considerando que outros mecanismos, além da atividade antioxidante da GPx, estão envolvidos nos efeitos do Se sobre a saúde humana, observa-se a necessidade de estudos que objetivem determinar índices funcionais que correlacionem a quantidade e a forma de Se ingerida com a máxima expressão de

tais efeitos. Estes índices poderiam, assim, ser empregados na determinação da ingestão dietética adequada para se obter tanto os benefícios nutricionais quanto funcionais atribuídos ao Se.

## **8. Prevalência de deficiência em nível populacional**

A ingestão de Se por humanos foi estimada principalmente em função do nível de Se disponível no solo do qual provem, via de regra, todo o Se presente nos alimentos, pela combinação da dieta e ainda por meio da avaliação de índices do estado nutricional de Se na população.

Devido à distribuição desuniforme de Se na crosta terrestre, desordens relacionadas tanto a deficiência quanto a toxidez do elemento são conhecidas. A China, por exemplo, apresenta em seu território áreas com os mais baixos e os mais altos teores de Se em todo o mundo (YANG *et al.*, 1989a), o que explica a ocorrência de casos extremos de deficiência e toxidez por este elemento em sua população. Neste país, são encontrados os dois extremos de ingestão diária de Se por adultos que é de 7 µg, em áreas de ocorrência da doença de Keshan, e de 5000 µg, em área de incidência de selonose (YANG *et al.*, 1989b).

Níveis de ingestão menos extremos, mas largamente diversos, têm sido observados em outras partes do mundo. Algumas estimativas da ingestão diária de Se por parte da população de alguns países são apresentadas por COMBS (2001) e incluem a Inglaterra (12 – 43 µg), Bélgica (45 µg), Canadá (98 – 224 µg), USA (60 – 220 µg), Croácia (27 µg) e Nova Zelândia (19 – 80 µg). Segundo esse autor, estima-se que 0,5 a 1,0 bilhão de pessoas no mundo são deficientes em Se, apresentando a grande maioria da população mundial níveis subótimos de ingestão do nutriente, o que aumenta o risco de câncer, doenças cardiovasculares, viroses e certamente de outras condições que envolvem o aumento do estresse oxidativo. Além disso, evidências sugerem que há uma tendência de redução de Se na cadeia global de alimentos, causada pela queima de combustíveis fósseis (com conseqüente liberação de S), chuva ácida, acidificação do solo, uso de fertilizantes com alto nível de S e mais intensiva produção de culturas (FROST, 1987).

De acordo com levantamentos de distribuição de Se nos solos em nível mundial apresentados por OLDFIELD (1999) e COMBS (2001), podem-se observar grandes extensões de áreas com baixo teor de Se em vários países da Europa. Dados sobre teor de Se nos solos da Rússia, países da África e da América

do Sul são escassos. Sabe-se que, até o momento, nenhuma área com baixo teor de Se foi encontrada na Rússia, enquanto na África já foram detectadas áreas deficientes as quais estão curiosamente relacionadas com a prevalência de AIDS. Algumas informações já disponíveis indicam também a existência de áreas deficientes de Se na Argentina e áreas seleníferas na Venezuela. Dados relativos à distribuição e teor de Se nos solos brasileiros ainda não estão disponíveis na literatura. No entanto, estão em curso estudos iniciais de mapeamento de Se no Brasil, desenvolvidos por meio de parceria entre instituições públicas nacional e estrangeira (MARTENS *et al.*, 2004).

Apesar de sua importância sob vários aspectos, informações sobre o teor de Se nos solos não se constitui, na maioria dos casos, em um indicador eficiente do nível de ingestão de Se pela população. Devido à variação na disponibilidade de Se para as plantas, alimentos obtidos em áreas com alto conteúdo de Se podem apresentar baixa concentração do elemento. Além disso, mesmo que conhecida a disponibilidade de Se nos solos, o considerável intercâmbio de alimentos entre populações de muitas partes diferentes do mundo não permite estabelecer, por si só, uma relação confiável entre esta variável e o estado nutricional de Se em nível populacional (DIPLOCK, 1993).

Ainda que precárias, as estimativas do nível de ingestão dietética de Se por parte da população brasileira foram obtidas pela determinação da concentração do nutriente em alimentos regularmente consumidos em nível local ou regional, como parte da dieta dos seus habitantes, bem como por meio da avaliação de índices do estado nutricional de Se.

FERREIRA (1999), analisando o conteúdo de Se de uma variedade de alimentos, constatou haver déficit de Se na dieta da população brasileira, concluindo que a deficiência do nutriente pode atingir, inclusive, indivíduos de elevado poder aquisitivo.

Em estudos desenvolvidos por CUNHA *et al.* (2003) com indivíduos de baixa renda morando no Rio de Janeiro (Brasil), foram detectados níveis de Se no soro inferiores aos observados em habitantes de algumas cidades européias embora um pouco acima daqueles observados na Nova Zelândia e na Finlândia (Quadro 2), países onde a baixa concentração de Se nos alimentos reflete a deficiência do nutriente nos solos.

**Quadro 2.** Comparação de níveis médios de Se no soro entre adultos de diferentes países/região

País/Região	Se ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Finlândia (Helsinki)	41,71
Nova Zelândia (Dunedin)	47,24
Brasil (Rio de Janeiro)	73,18
Alemanha Ocidental (Mainz)	81,10
Suécia (Lund)	85,03
Itália (Roma)	89,76
Japão (Hiroshima)	97,63
USA (Mort. Gr.)	110,23
Inglaterra (Southampton)	115,74
Canadá (Toronto)	158,26

Fonte: NEVE (1995) *op cite*.

O valor de  $73,18 \mu\text{g L}^{-1}$  para habitantes da cidade do Rio de Janeiro, obtido neste trabalho, encontra-se um pouco acima do nível de referência da OMS de  $70 \mu\text{g L}^{-1}$ , o qual representa o nível mínimo para maximização da atividade GPx no soro (NEVE, 1995). Entretanto, RAYMAN (1997) citou estudos que mostram que o nível plasmático de Se de  $100 \mu\text{g}$  por dia é requerido para expressão ótima de GPx plasmática.

## 9. Estratégias para elevar a ingestão de selênio

Diante das evidências em relação à baixa ingestão de Se por grande parte da população mundial e considerando-se os possíveis benefícios que a ingestão deste nutriente poderia trazer à saúde humana, estratégias têm sido desenvolvidas para possibilitar o acesso ao Se em níveis considerados nutricionalmente adequados. Dentre as estratégias estão incluídas: a) o aumento no consumo de alimentos ricos em Se, por meio da educação nutricional; b) a suplementação individual; c) a suplementação animal; d) a adubação de plantas com sais de Se e; e) o melhoramento de plantas para favorecer a acumulação do nutriente no alimento. Tais estratégias serão brevemente discutidas nos itens que se seguem.

### **9.1 Aumento no consumo de alimentos ricos em Se por meio da educação nutricional**

O trigo é mundialmente considerado como uma das mais importantes fontes de Se na dieta. Mesmo na Europa, com seus baixos níveis de Se disponíveis no solo, alimentos de consumo diário como o pão e cereais, são importantes fontes do nutriente.

No Brasil, de acordo com os dados sobre o teor de Se em alimentos obtidos por FERREIRA (2002), estima-se que, a exemplo do que se tem observado em outros países, carnes, peixe e trigo estejam entre as melhores fontes do nutriente para a população. Entretanto, não é hábito da população brasileira o elevado consumo de pescados, o que faz do trigo, também no Brasil, até onde se sabe, uma das mais importantes fontes de Se, embora sujeita a oscilações na concentração de acordo com sua procedência (local de cultivo).

A castanha-do-Pará, alimento típico da região norte do Brasil, é conhecida como a fonte alimentar de maior concentração natural de Se, embora os níveis possam variar de 0,20 – 253 mg kg<sup>-1</sup> em peso fresco (SECOR e LINK, 1989 citado por CHANG, 1995). Estas variações se dão provavelmente em virtude das diferenças no conteúdo de Se disponíveis no local de origem da castanha como afirmado por CHANG *et al.* (1995). Todavia, apesar da elevada concentração de Se, a castanha-do-Pará, devido ao seu hábito regionalizado de consumo, não pode ser considerada como uma ampla fonte de Se por parte da população brasileira.

Sendo assim, medidas educativas visando à divulgação e incentivo para o consumo de alimentos ricos em Se como peixes, vísceras e castanha-do-Pará, por exemplo, poderiam contribuir consideravelmente na elevação da ingestão deste nutriente por parte das populações deficientes. Entretanto, esta medida esbarra no fato de que grande número de pessoas, em países em desenvolvimento, tem dificuldade de acesso a alimentos de origem animal e mesmo que assim não fosse, a reduzida disponibilidade destes alimentos no mercado limitaria o seu consumo regular por mais ampla faixa da população.

### **9.2. Suplementação individual**

Em países ocidentais, muitos indivíduos consomem regularmente suplementos de Se, os quais são disponíveis tanto na forma inorgânica quanto na forma orgânica. O selenito de sódio, em tabletes ou na forma fluida, é preferido ao

selenato devido à sua maior absorção e mais rápido acúmulo deste último e, portanto, maior probabilidade da ocorrência de toxidez (CHEN *et al.*, 2000; FINLEY e DAVIS, 2001). Leveduras ricas em Se apresentam alta concentração de formas orgânicas do elemento incluindo SeCys e SeMet (BIRD *et al.*, 1997), sendo esta última considerada de maior biodisponibilidade em relação às formas inorgânicas do nutriente.

Apesar de ser uma medida bastante eficiente na elevação de Se, a prática da suplementação deve ter acompanhamento especializado sendo principalmente direcionada aos indivíduos de risco, a exemplo do que ocorre para os demais nutrientes fornecidos na forma de suplementos.

Desta forma, estudos sugerem que as fontes dietéticas de Se, dentre outros antioxidantes, são preferíveis aos suplementos quando da necessidade de elevação da ingestão do nutriente por parte de populações (MOYAD, 2002). Além disso, um inconveniente muito comum da suplementação individual como estratégia para melhorar o estado nutricional da população, principalmente em países desenvolvidos, é a maior dificuldade de acesso pela camada da população que mais necessita do suplemento.

### **9.3. Suplementação de animais**

Em se tratando de nutrição animal, a prática da suplementação de rações com Se têm sido utilizada para controlar o baixo suprimento do nutriente pelas forragens. Esta medida tem se mostrado eficiente não só no combate à deficiência de Se nos rebanhos, mas também como meio de elevar a concentração do mineral nos alimentos de origem animal consumidos pelo homem, contribuindo para a maior ingestão dietética do nutriente em nível populacional.

A suplementação de animais com Se pode ser realizada diariamente pela adição de formas orgânicas ou inorgânicas às rações, ou pela administração direta de cápsulas ou suplementos líquidos injetáveis ou orais.

Estudos têm demonstrado (ALLAWAY, 1973; ULLREY *et al.*, 1977) que a suplementação de rações com Se inorgânico em níveis apropriados não altera a concentração do nutriente nos alimentos (carnes) em relação àqueles obtidos de animais alimentados com dietas naturalmente adequadas de Se, o que demonstra a segurança da prática como medida de elevação da ingestão do mineral por meio do alimento. Outros alimentos de origem animais, como peixe, vêm sendo

estudados com relação ao seu potencial para o enriquecimento por meio da suplementação com objetivos sobre a elevação do nível de ingestão, bem como sobre a produção de formas de Se com elevada capacidade anticarcinogênica tendo-se obtido resultados bastante promissores (WHANGER *et al.*, 2000).

Todavia, a prática da suplementação de animais com Se requer alguns cuidados, uma vez que, em virtude da capacidade tóxica do elemento, a aplicação inadvertida de doses mais elevadas pode levar à morte do animal. Para contornar este problema, uma forma mais segura de se obter um nível adequado de ingestão pelos animais seria a produção de forragens enriquecidas por meio da adubação com sais de Se (selenito e selenato de sódio) que será discutida a seguir também como medida de elevação do nível de ingestão de Se pelo homem.

#### **9.4. Adubação de culturas**

O uso de Se como fertilizante de culturas é praticado principalmente na Finlândia, desde 1984, onde é normalmente adicionado à mistura de NPK a uma concentração de 16 mg kg<sup>-1</sup> ou 6 mg kg<sup>-1</sup> para cereais e culturas forrageira, respectivamente (KOIVISTOINEN e HUTTUNEN, 1985; EUROLA e HIETANIEMI, 2000).

A experiência finlandesa tem caracterizado a fertilização de culturas com Se como uma prática segura, de baixo custo, fácil execução e muito eficaz na elevação do nível de Se na população. Segundo ARO *et al.* (1995), três anos após o início do programa, a ingestão dietética de Se triplicou e a concentração do nutriente no plasma quase duplicou. Tem-se observado também, a partir de 1985, decréscimo na taxa de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer, mas pela falta de controle para comparações, tais efeitos não podem ser atribuídos apenas ao Se (VARO *et al.*, 1994).

O enriquecimento de cereais como trigo e arroz por meio da adubação com sais de Se têm sido estudado em países como a Austrália e a China, respectivamente, como meio de elevação da ingestão de Se por indivíduos residentes em áreas onde a deficiência do elemento no solo é refletida em sua concentração nos alimentos (LYONS *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2002). Nestes alimentos enriquecidos, o Se se encontra predominantemente na forma de SeMet (OLSON *et al.*, 1970; BEILSTEIN *et al.*, 1991), cuja biodisponibilidade tem se mostrado superior às outras formas do nutriente.

Outros estudos de enriquecimento de alimentos por meio da adubação de culturas são realizados com o objetivo não apenas de elevar a ingestão de Se, mas principalmente, de obter formas do nutriente consideradas anticarcinogênicas. É o caso, por exemplo, do alho, da cebola e do brócolis (CAI *et al.*, 1995; IP *et al.*, 2000) nos quais a principal forma de Se é a SeMCys. Esta forma foi indicada como de alta eficácia na prevenção do câncer (FINLEY *et al.*, 2000) o que maximiza os benefícios oriundos de plantas enriquecidas com o referido nutriente.

#### **9.5. Melhoramento de plantas para favorecer a acumulação de Se (biofortificação)**

O melhoramento de plantas com o objetivo de elevar a absorção e, ou retenção de Se (biofortificação) pode ser, de acordo com LYONS *et al.* (2003), uma estratégia eficaz e sustentável de elevação da ingestão do nutriente a exemplo do que tem sido desenvolvido para outros micronutrientes como Fe, Zn e vitamina A.

A variabilidade observada entre plantas na sua capacidade de acumulação de Se poderia funcionar como base genética para seleção. Estudos preliminares têm encontrado uma variação na acumulação de Se entre plantas da família das brássicas de cerca de 15 vezes (COMBS, 2001) e identificado uma soja acumuladora de Se (WEI, *et al.*, 1996). O trigo é outro alimento que tem se mostrado muito promissor como alvo do melhoramento tanto pelo seu consumo abrangente como pela sua variabilidade no conteúdo de Se (LYONS *et al.*, 2003) podendo, como já visto, acumular teores elevados do nutriente.

A utilização da biofortificação não dispensa o emprego das demais estratégias vindo a complementá-las. Entretanto, como medida de elevação da ingestão de micronutrientes dentre os quais está o Se, a utilização de plantas biofortificadas apresenta algumas vantagens adicionais, destacando-se como mais importantes a ausência de necessidade de mudança de comportamento ou de hábitos por parte do consumidor, o baixo custo relativo e a elevada abrangência.

Um fator importante relacionado ao enriquecimento de alimentos com Se por meio da adubação ou melhoramento de culturas é a evidência de que a utilização de compostos puros do nutriente pode promover resultados diferentes quando comparado com a sua presença em plantas. Observa-se que a SeMet pura não é tão eficaz na redução de tumores de cólon, mas trigo enriquecido com Se, onde a maior forma de Se é SeMet, apresentou alta efetividade. O mesmo foi

observado com relação à SeMCys em brócolis enriquecido (FINLEY e DAVIS, 2001).

## 10. Considerações finais

Apesar de evidências crescentes da deficiência de Se em muitas partes do mundo e da provável relação entre incidência de doenças graves como o câncer e a baixa ingestão do nutriente, estudos ainda são necessários para se esclarecer os mecanismos pelos quais o Se promove seu efeito funcional ou terapêutico e qual a importância ou contribuição das demais selenoproteínas não funcionalmente caracterizadas, bem como das diferentes formas de Se presentes nos alimentos, na promoção da saúde humana.

Ademais, estratégias de elevação do nível de ingestão de Se, ainda que em determinadas situações se mostrem necessárias e urgentes, só devem ser implementadas mediante rigorosa caracterização da situação nutricional da população de modo a minimizar efeitos indesejáveis, como no caso da interação negativa entre iodo e Se, e potencializar os efeitos almejados, utilizando estratégias que permitam a maximização de sua ação, tanto nutricional quanto terapêutica, resguardando sempre o limite de segurança acima do qual é expressa a capacidade tóxica do nutriente.

## 11. Referências Bibliográficas

- ALLAN, C. B.; LACOURCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. Responsiveness of selenoproteins to dietary. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 19, p. 1-16, 1999.
- ALLAWAY, W. H. Selenium in the food chain. **Cornell Vet.**, v. 63, p. 151-170, 1973.
- AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A. DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 14, p. 71-78, 2001.
- ARO, A.; ALFTHAN, G.; VARO, P. Effects of supplementation of fertilizer on human selenium status in Finland. **Analyst.**, v. 120, p. 841-843, 1995.
- ARTEEL, G. E.; MOSTERT, V.; OUBRAHIM, H.; BRIVIBA, K.; ABEL, J.; SIES, H. Protection selenoprotein P human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. **Biol. Chem.**, v. 379, p. 1201-1205, 1998.
- ARTHUR, J. J.; NICOL, F.; BECKETT, G. J. Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. **Am. J. Clin. Nutr.**, Suppl., v. 57, p. S236-S239, 1993.

- BAUM, M. K.; SHOR-POSNER, G.; LAI, S. High risk of HIV – related mortality is associated with selenium deficiency. **J. Acq. Imm. Def. Sindr.**, v. 15, p. 317-374, 1997.
- BAUM, M. K.; SHOR-POSNER, G. Micronutrient status in relationship to mortality in HIV-1 disease. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 135s-139s, 1998.
- BEATEN, J. M.; MOSTAD, S. B.; HUGHES, M. P.; OVERBAUGH, J.; BANKSON, D. D.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; BWAYO, J. J.; KREISS, J. K. Selenium deficiency is associated with shedding of HIV-1-infected cells in the female genital tract. **J. Acq. Imm. Def. Sindr.**, v. 26, p. 360-364, 2001.
- BECK, M. A.; QUING, S.; MORRIS, V. C.; LEVANDER, O. A. Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. **Nature Med**, v. 1, p. 433-436, 1995.
- BECKETT, G. J.; NICOL, F.; RAE, P. W. H.; BEECH, S.; GUO, Y.; ARTHUR, J. R. Effects of combined iodine and selenium deficiency on thyroid hormone metabolism in rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. S240-S243, 1993.
- BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. S310-S312, 1993.
- BEILSTEIN, M. A.; WHANGER, P. D.; YANG, G. Q. Chemical forms of selenium in corn and rice grown in a high selenium area of China. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 4, p. 392-398, 1991.
- BERRY, M. J.; LANSEN, P. R. The role of selenium in thyroid hormone action. **Endocr. Rev.**, v. 13, p. 207-219, 1992.
- BIERI, J. G.; AHMAD, K. Selenium contents of Bangladeshi rice by chemical and biological assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 1073-1074, 1976.
- BIRD, S. M.; UDEN, P. C.; TYSON, J. F.; BLOCK, E.; DENOYER, E. Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma spectrometry. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 12, p. 785-788, 1997.
- BOYNE, R.; ARTHUR, J. The response of selenium-deficient mice to *Candida albicans* infection. **J. Nutr.**, v. 116, p. 816-822, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, INCA, 2003, 92 p. il.
- BUGEL, S.; SANDSTRON, B.; LARSEN, E. H.; SKIBSTED, L. H. Is selenium from animal sources bioavailable? In: 11<sup>th</sup> **Symposium on Trace Elements in Man and Animal**, 2-6 June 2002. BERKELEY, C. A.: Trace Elements in Man and Animal Committee.
- BURKE, K. E.; BURFORD, R. G.; COMBS, G. F.; FRENCH, I. W.; SKEFFINGTON, D. R. The effect of tropical L-selenomethionine on mineral erythema dose of ultraviolet irradiation in humans. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 9, p. 52-57, 1992.

- BUTLER, P.; NEGRETTI de BÄTTER, V. E.; JAFFER, W. G.; MENDEZ CATELLANO, H. Selenium status of children living in seleniferous areas of Venezuela. **J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.**, v. 5, p. 269-270, 1991.
- CAI, X. J.; BLOCK, E.; UDEN, P. C.; ZHANG, X.; QUIMBY, B. D.; SULLIVAN, J. J. Allium chemistry: identification of selenoamino acids in ordinary and selenium-enriched garlic, onion, and broccoli using gas chromatography with atomic emission detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1754-1757, 1995.
- CAMPA, A.; SHOR-POSNER, G.; INDACOCHEA, F. Mortality risk in selenium deficient HIV-positive children. **J. Acq. Imm. Def. Sindr.**, v. 20, p. 508-513, 1999.
- CHANG, J. C. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v. 30, p. 801-802, 1995.
- CHEN, L.; YANG, F.; XU, J.; HU, Y.; HU, Q.; ZHANG, Y.; PAN, G. Determination of selenium concentration of rice in China and effects of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5128-5130, 2002.
- CHEN, X.; MIKHAEL, S. S.; DING, Y. W.; YANG, G. Y.; BONDOE, F.; YANG, C. S. Effects of vitamin E and selenium supplementation on esophageal adenocarcinogenesis in a surgical model with rats. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1531-1536, 2000.
- CHEN, X.; YANG, G.; CHEN, J.; CHEN, X.; WEN, Z.; GE, K. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 2, p. 91-107, 1980.
- CHOE, M.; KIES, C. Selenium bioavailability: the effect of guar gum supplementation on selenium utilization by human subjects. **Nutr. Rep. Int.**, v. 38, p. 557-565, 1989.
- CHOW, C. K.; GAIROLA, G. C. Influence of dietary vitamin E and selenium on metabolic activation of chemicals to mutagens. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, p. 443-447, 1984.
- CLARK, L. C.; COMBS Jr, G. F.; TURNBULL, B. W.; SIATE, E. H.; CHALKER, D. K.; CHOW, J.; DAVIS, L. S.; GLOVER, R. A.; GRAHAN, G. F.; GROSS, E. G.; KRONGRAD, A.; LESHER, J. L.; PARK, H. K.; SANDERS Jr, B. B.; SMITH, C. L.; TAYLOR, J. R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of skin. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 276, p. 1957-1963, 1996.
- COMBS, G. F. Selenium in global food systems. **Br. J. Nutr.**, v. 85, p. 517-547, 2001.
- COMBS, G. F.; GRAY, W. P. Chemopreventive agents: selenium. **Pharmacol. Ther.**, v. 79, p. 179-192, 1998.
- CORVILAIN, B.; CONTENPRÉ, B.; LONGOMBÉ, A. O.; GOYENS, P.; GERVY-DECOSTER, C.; LAMY, F.; VANDERPAS, J. B.; DUMONT, J. E. Selenium and thyroid: how the relationship was established. **Am J. Clin. Nutr. Suppl.**, v. 57, p. S244-S248, 1993.
- CUNHA, S.; ALBANESI FILHO, F. M.; ANTELO, D. S.; SOUZA, M. M. Serum sample levels of selenium and copper in healthy volunteers living in Rio de Janeiro city. **Sci. Total Environ.**, v. 301, p. 51-54, 2003.

- DANIELS, L. A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 54, p. 185-199, 1996.
- DIPLOCK, A. T. Indexes of selenium status in human populations. **Am. J., Clin. Suppl.**, v. 57, p. S2565-S258, 1993.
- DOUGLASS, J. S.; MORRIS, V. C.; SOARES, J. H.; LEVANDER, A. O. Nutritional availability to rats of selenium in tuna, beef kidney, and wheat. **J. Nutr.**, v. 111, p. 2180-2187, 1981.
- DUFFIELD-LILLICO, A. J.; REID, M. E.; TURNBULL, B. W.; COMBS, G. F.; STATE, E. H.; FISCHBACH, L. A.; MARSHALL, J. R.; CLACK, L. C. Baseline characteristic and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the nutritional prevention of cancer trial. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v. 11, p. 630-639, 2002.
- EL-BAYOUMY, K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. **Mutat. Res.**, v. 475, p. 123-139, 2001.
- EUROLA, M.; HIETANIEMI, V. **Report on the selenium monitoring programme 1997-1999**. Publications of Agricultural Research Centre of Finland, Series B-24. Jokioines. Finland Agricultural Research Centre of Finland, 2000.
- FAIEWEATHER-TAIT, S. J. Biavailability of selenium. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 51, p. 20S-23S, 1997.
- FERREIRA, S.K. **Qualificação e avaliação dos teores de minerais em alimentos e em dietas utilizados no Brasil**. Viçosa: UFV, 1999. 137 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- FERREIRA, S. K.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002.
- FERRETTI, R. T.; LEVANDER, O. A. Effect of milling and proceeding on the selenium content of grains and cereal products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 22, p. 1049-1051, 1974.
- FINLEY, J. W.; DAVIS, C. D. Selenium from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis. **Biofactors**, v. 14, p. 191-196, 2001.
- FINLEY, J. W.; DAVIS, C. D.; FENG, Y. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2384-2389, 2000.
- FINLEY, J. W.; IP, C.; LISK, D. J.; DAVIS, C. D.; HINTZE, K.; WHANGER, P. D. Investigations on the cancer proctetive properties of high selenium broccoli. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2679-2683, 2001.
- FLEMING, J.; GHOSE, A.; HARRISON, P. R. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. **Nutr. Cancer**, v. 40, p. 42-49, 2001.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. **FEBS Lett.**, v. 32, p. 132-134, 1973.
- FROST, D. V. Selenium and vitamin E as antidotes to heavy metal toxicities. In: SPALLHOLZ, J. E., MARTIN, J. L., GANTHER, H. E. **Selenium in biology and medicine**. Westport, CT: AVI Van Nostrand, 1987.

- GANTHER, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1657-1666, 1999.
- GANTHER, H. E.; LAWRENCE, J. R. Chemical transformations of selenium in living organisms: improved forms of selenium for cancer prevention. **Tetrahedron**, v. 53, p. 12299-12310, 1997.
- GANTHER, H. E.; HAFEMAN, D. G.; LAWRENCE, R. A.; SERFASS, R. E.; HOEKSTRA, W. G. Selenium and glutathione peroxidase in health and disease: a review. In: PRADAD, H. H. (ed.). **Trace elements in human health and disease. II. Essential and toxic elements**, New York, Academic Press, p. 165-234, 1976.
- GANTHER, H. E., IP, C. Thioredoxin reductase activity in rat liver is not affected by supranutritional levels of monomethylated selenium in vivo and is inhibited only by high levels of selenium in vitro. **J. Nutr.**, v. 131, p. 301-304, 2001.
- GE, K., YANG, G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. **Am. J. Clin. Nutr. Suppl.**, v. 57, p. S259-S263, 1993.
- GREGER, J. L.; MARCUS, R. E. Effect of dietary protein, phosphorus, and sulphur amino acids selenium metabolism of adult males. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 25, p. 97-108, 1981.
- GRIFFITHS, N. M.; STEWART, R. D. H.; ROBINSON, M. F. The mechanism of <sup>75</sup>Se-selenomethionine in four women. **Br. J. Nutr.**, v. 35, p. 373-382, 1976.
- GROFF, J. L.; GROPPER, S. S.; HUNT, S. M. Microminerals. In: **Advanced nutrition and human metabolism**. Minneapolis: West Publishing Company, Minneapolis, 1995, p. 381-384.
- HARRISON, P. R.; LANFEAR, J.; WU, L.; FLEMING, J.; BLOWER, L. Mechanisms of chemoprevention and growth inhibition by selenium compounds. In: **Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Selenium in Biology and Medicine**, p. 74-82, New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 1996.
- HILL, K. E.; XIA, Y.; ÅKESSON, B.; BOEGLIN, M. E.; BURK, R. F. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. **J. Nutr.**, v. 126, p. 138-145, 1996.
- HOEKSTRA, W. G. Glutathione peroxidase activity of animal tissues as an index of selenium status. In: HEMPHILL, D. D. (ed.) **Trace substances in environmental health**. IX, Columbia, Missouri, University of Missouri Press, p. 331-337, 1975.
- HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 99, n. 7, p. 836-843, 1999.
- HORVATH, P. M.; IP, C. Synergistic effect of vitamin E and selenium in the chemoprevention of mammary carcinogenesis in rats. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5334-5341, 1983.
- IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **J. Nutr.**, v. 128, p. 1845-1854, 1998.
- IP, C.; BIRRINGER, M.; BLOCK, E.; KOTREBAI, M.; TYSON, J. F.; UDEN, P. C.; LISK, D. J. Chemical speciation influences comparative activity of selenium-

- enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2062-2070, 2000.
- IP, C.; DONG, Y. Methylselenocysteine modulates proliferation and apoptosis biomarkers in premalignant lesion of the rat mammary gland. **Anticancer Res.**, v. 21, p. 863-867, 2001.
- IP, C.; GANTHER, H. E. Biological activities of trimethylselenium as influenced by arsenide. **J. Inorg. Biochem.**, v. 46, p. 215-222, 1992.
- IP, C.; LISK, D. J. Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic. **Nutr. Cancer**, v. 20, p. 129-137, 1993.
- IP, C.; LISK, D. J. Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 2649-2652, 1995.
- IP, C.; LISK, D. J. Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 573-576, 1994.
- IP, C.; WHITE, G. Mammary cancer chemoprevention by inorganic and organic selenium: single agent treatment on in combination with vitamin E and their effects on *in vitro* immune functions. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1763-1766, 1987.
- JEONG, D.; KIM, T. S.; CHUNG, Y. W.; LEE, B. J.; KIM, I. Y. Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. **Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.**, v. 517, p. 225-228, 2002.
- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L.; ROY, M.; WISHE, H. I.; COHEN, M. W.; STOTZKY, G. Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cell. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 41, p. 115-127, 1994.
- KLEIN, E. A.; THOMPSON, I. M.; LIPPMAN, S. M.; GOODMAN, P. J.; ALBANES, D.; TAYLOR, P. R.; COLTMAN, C. Select: the selenium and vitamin E cancer prevention trial: rationale and design. **Prost. Cancer Prost. Dis.**, v. 3, p. 145-151, 2000.
- KOHRLE, J. The trace element selenium and the thyroid gland. **Biochimien.**, v. 81, p. 527-533, 1999.
- KOIVISTOINEN, P.; HUTTUNEN, J. K. Selenium deficiency in Finnish food and nutrition: research strategy and measures. In: MILLS, C. F.; BREMMER, I.; CHESTERS, J. K. (ed.). **Trace elements in man and animals – TEMA 5**, Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux, p. 925-928. 1985.
- KOROTKOV, K. V.; NOVOSELOV, S. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, p. 1402-1411, 2002.
- KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. U.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R.; GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteins. **Science**, v. 300, p. 1439-1443, 2003.
- KUMARASWAMY, E.; MALYHK, A.; KOROTHOV, K. V.; KOZYAVKIN, S.; HU, Y.; KWON, S. Y.; MOUSTAFA, M. E.; CARLSON, B. A.; BERRY, M. J.; LEE, B. J.; HATFIELD, D. L.; DIAMOND, A. M.; GLADYSHEV, V. N. Structure-expression

- relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 35540-35547, 2000.
- LANE, H. W.; DUDRICK, S.; WARREN, D. C. Blood selenium levels and glutathione peroxidase activities in university staff and chronic hyperalimentation subjects. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 167, p. 383-388, 1981.
- LANE, H. W.; WARREN, D. C.; MARTIN, E.; McCOWAN, J. Selenium status of industrial workers. **Nutr. Res.**, v. 3, p. 805-809, 1983.
- LANE, H. W.; MEDINA, D. Mode of action of selenium inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mouse mammary tumorigenesis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 75, n. 4, p. 675-679.
- LEVANDER, O. A.; ALFTHAN, G.; ARVILOMMI, H.; GREF, C. G.; HUTTUNEN, J. K.; KATAJA, M.; KOIVISTOINEN, P.; PIKKARAINEN, J. Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by platelet glutathione peroxidase activity and other blood parameters. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 7, p. 887-897, 1983.
- LU, J.; JIANG, C. Antiangiogenic activity of selenium in cancer chemoprevention: metabolite-specific effects. **Nutr. Cancer**, v. 40, p. 64-73, 2001.
- LYONS, G.; SANTANGOULIS, J.; GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. **Nutr. Res. Rev.**, v. 16, p. 45-60, 2003.
- MARTENS A., GONZAGA MARTENS I. B., FRANCISCATO COZZOLINO S. M. The geographical variation in the selenium content of beans as indicator of its natural distribution in Brazil. In: **8<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine**, Budapest – Hungria, 2004.
- MARTIN, S. E.; SCHILLACI, M. Inhibitory effects of selenium on mutagenicity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, p. 426-433, 1984.
- MAY, J. M.; COBB, C. E.; MENDIRATTA, S.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 23039-23045, 1998.
- MELTZER, H. M.; BIBOW, K.; PAULSEN, I. T.; MUNDAL, H. H.; NORHEIM, G.; HOLM, H. Different bioavailability in humans of wheat and fish selenium as measured by blood platelet response to increased dietary Se. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 36, p. 229-241, 1993.
- MORRIS, V. C.; LEVANDER, O. A. Selenium content of foods. **J. Nutr.**, v. 100, p. 1383-1388, 1970.
- MOSER-VEILLON, P. B.; MANGELS, A. R.; PATTERSON, K. Y.; VEILLON, C. Utilization of two different chemical forms of selenium during lactation using stable isotope tracers: an example of speciation in nutrition. **Analyst.**, v. 117, p. 559-562, 1992.
- MOYAD, M. Selenium and vitamin E supplements for prostate cancer: evidence or embellishment? **Urology**, v. 59, p. Suppl. 4A-9-19, 2002.
- MUTANEN, M.; MYKKANEN, H. M. Effects of ascorbic acid supplementation on selenium bioavailability in humans. **Hum. Nutr. Clin. Nutr.**, v. 39C, p. 221-226, 1985.

- NEVE, J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 9, p. 65-73, 1995.
- NEVE, J. New indices for assessment of trace element status and requirement with a special focus on selenium. In: ROUSSELA, A. M., FAVIER, A., ANDERSON, R. A. (eds.). **Trace elements in man and animals 10: Proceedings of the tenth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals**, New York: Plenum Press. p. 327-322, 2000.
- NYBERG, S. Multiple use of plants: studies on incorporation in some agricultural species for the production of organic selenium compounds. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 41, p. 69-88, 1991.
- OLDFIELD, J. E. **Selenium World Atlas**. Selenium-Tellurium Development Association, Grimbergen, Belgium, 1999. 83 p.
- OLSON, O. E.; NOVACEK, E. J.; WHITEHEAD, E. I.; PALMER, I. S. Investigation of selenium in wheat. **Phytochemistry**, v. 9, p. 1181-1188, 1970.
- OLSON, O. E.; PALMER, I. S.; HOWE, M. Selenium in foods consumed by South Dakotans. **Proc. S. D. Acad. Sci.**, v. 57, p. 113-121, 1978.
- OLSSON, U.; ONFELT, A.; BEIJE, B. Dietary selenium deficiency causes decreased N-oxygenation of N,N-dimethyl-aniline and increased mutagenicity of dimethylnitrosamine in the isolated rat liver/cell culture system. **Mutat. Res.**, v. 126, p. 73-80, 1984.
- PENCE, B. C.; PELIER, E.; DUNN, C. G. Effects of dietary selenium on UVB-induced skin carcinogenesis and epidermal antioxidant status. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, p. 759-761, 1994.
- PERCHELLET, J. P.; ABNEY, N. L.; THOMAS, R. M.; GUISLAN, Y. L.; PERCHELLET, E. M. Effects of combined treatments with selenium, glutathione and vitamin E on glutathione descarboxilase induction and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. **Cancer Res.**, v. 47, p. 477-485, 1987.
- RAGHIB, M. H.; CHAN, W. Y.; RENNET, O. M. Comparative studies of selenium-75 (selenite and selenomethionine) absorption from various milk diets in suckling rats. **J. Nutr.**, v. 116, p. 1456-1463, 1986.
- RAYMAN, M. P. Dietary selenium: time to act-lowbioavailability in Britain and Europe could be contributing to cancers, cardiovascular disease, and subfertility. **Br. Med. J.**, v. 314, p. 387-388, 1997.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet.**, v. 356, p. 233-241, 2000.
- REA, H. M.; THOMSON, C. D.; CAMBELL, D. R.; ROBINSON, M. F. Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) activities of New Zealand residents and visitors to New Zealand. **Br. J. Nutr.**, v. 42, p. 201-208, 1979.
- REILLY, C. **Selenium in food and health**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 338 p.

- RETRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G. Selenium: biochemistry role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 176, p. 588-590, 1973.
- SAITO, Y.; HAYASHI, T.; TANAKA, A.; WATANABE, Y.; SUZUKI, M.; SAITO, E.; TAKAHASHI, K. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 2866-2871, 1999.
- SAKURAI, H.; TSUCHIYA, K. A tentative recommendation for the maximum daily intake of selenium. **Environ. Physiol. Biochem.**, v. 5, p. 107-118, 1975.
- SCHRAUZER, G. N. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 20, p. 1-4, 2001.
- SCHRAUZER, G. N. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1653-1656, 2000.
- SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 3292-3293, 1957.
- SEO, Y. R.; KELLER, M. R.; SMITH, M. L. Selenomethionine regulation of p53 by a reft-dependent redox mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 14548-14553, 2002a.
- SEO, Y. R.; KELLER, M. R.; SMITH, M. L. Induction of DNA repair response in human fibroblast. **Oncogene**, v. 21, p. 3663-3669, 2002b.
- SIMONOFF, M.; SERGEANT, C.; GARNIER, N.; MORETTO, P.; LLABADOR, Y.; SIMONOFF, G.; CONRI, C. Antioxidant status (selenium, vitamin A and E) and again. **EXS**, v. 62, p. 368-397, 1992.
- SINHA, R.; KILEY, S. C.; LU, J. X.; THOMPSON, H. J.; MORAES, R.; JAKEN, S.; MEDINA, D. Effects of methylselenocysteine on PKC activity, cdk2 phosphorylation and *gadd* gene expression in synchronizer mouse mammary epithelial tumor cells. **Cancer Lett.**, v. 146, p. 135-145, 1999.
- SWANSON, C. A.; PATTERSON, B. H.; LEVANDER, O. A.; VEILLON, C.; TAYLOR, P. R.; HELZLSOUER, K.; McADAM, P. A.; ZECH, L. A.; Human [<sup>71</sup>Se] selenomethionine metabolism: A kinetic model. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. 917-926, 1991.
- SUN, Q. A.; ZAPPACOSTA, F.; JEANG, K. T.; LEE, B. J.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Redox regulation of cell signalling by selenocysteine in mammalian thiredoxin reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 24522-24530, 1999.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomed. Pharmac.**, v. 57, p. 134-144, 2003.
- TAYLOR, E. W. Selenium and cellular immunity. Evidence the selenoproteins may be coded in the + 1 reading frame overlapping the human CD4, CD8 and HLA-DR genes. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 49, p. 85-95, 1995.
- TELL, R. W.; KAIN, S. R. Selenium modified mutagenicity and metabolism of benzo(alpha)pyrene in an S9-dependent system. **Mutant. Res.**, v. 127, p. 9-14, 1984.

- TERRY, N.; ZAYED, A. M.; DeSOUZA, M. P.; TARUN, A. S. Selenium in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 51, p. 401-432, 2000.
- THOMSON, C. D.; REA, H. M.; DOESBURG, V. M.; ROBINSON, M. F. Selenium concentration and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. **Br. J. Nutr.**, v. 37, p. 957-962, 1977.
- ULLREY, D. E.; BRADY, P. S.; WHETTER, P. A.; KU, P. K.; MAGEE, W. T. Selenium supplementation of diets for sheep and beef cattle. **J. Anal. Sci.**, v. 45, p. 559-565, 1977.
- US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE (USA). **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington DC: National Academy Press, 2000. 506 p.
- VAN VLEET, J. F. Current knowledge of selenium vitamin E deficiency in domestic animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 176, p. 321-325, 1980.
- VANDESPAS, J. B.; CONTEMPÉ, B.; DUALE, N. L.; DECKX, H.; BEBE, N.; LONGOMBÉ, A. O.; THILLY, C. H.; DIPLOCK, A. T.; DUMONT, J. E. Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. S271-S275, 1993.
- VARO, P.; ALFTHAN, G.; HUTTUNEN, J. K.; ARO, A. Nationwide selenium supplementation in Finland – Effects on diet, blood and tissue levels, and health. In: BURK, R. F. (ed.). **Selenium in Biology and human Health**. New York: Springer Verlag, p. 197-218, 1994.
- VENDELAND, S. C.; BUTLER, J. A.; WHANGER, P. D. Intestinal absorption of selenite, selenate and selenomethionine in the rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 3, p. 359-365, 1992.
- WANG, Z.; JIANG, C.; GANTHER, H. E.; LU, J. Antimitogenic and proapoptotic activities of methylselenitic acid in vascular endothelial cells and associated effects on P13K-AKT, ERK, JNK and p 38 MAPK signalling. **Cancer Res.**, v. 61, p. 7171-7178, 2001.
- WASCHULEWSKI, I. H.; SUNDE, R. Effects of dietary methionine on utilization of tissue selenium from dietary selenium methionine for glutathione peroxidase in the rat. **J. Nutr.**, v. 118, p. 367-374, 1988.
- WASOWICZ, W.; GROMADZINSKA, J.; RYDZYNSKI, K.; CIESLAK, J.; TOMCZAK, J. Selenium status of low-selenium area residents: polish experience. **Toxicol. Lett.**, v. 137, p. 94-101, 2003.
- WASOWICZ, W.; GROMADZINSKA, J.; SZRAM, K.; RYDZYNSKI, K.; CIESLAK, J.; PIETRZAK, K. Selenium, zinc, and copper concentrations in blood and milk of lactating women. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 79, p. 221-233, 2001.
- WEI, H.; CAI, Q.; RAHN, R. O. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 73–77, 1996.
- WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **Br. J. Nutr.**, v. 91, p. 11-28, 2004.
- WHANGER, P. D. Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis. **J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.**, v. 6, p. 209-221, 1992.

- WHANGER, P. D. Selenium versus metal toxicity in animals. In: **Proceedings of the Symposium on Selenium – Tellurium in the Environment**. Pittsburgh, Pennsylvania, Industrial Health Foundation, p. 234-252, 1976.
- WHANGER, P. D. Selenocompounds in plants and animal and their biological significance. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 21, p. 223-232, 2002.
- WHANGER, P. D.; IP, C.; POLAN, C. E.; UDEN, P. C.; WILBAUM, G. Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability and tissue deposition of selenium in selenium enriched ramps (*Allium tricoccum*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 5723-5730, 2000.
- YANG, G.; ZHOU, R. Further observations on the human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area of China. **J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.**, v. 8, p. 159-165, 1994.
- YANG, G. Q.; GE., K.; CHEN, J.; CHEN, X. Selenium-related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. **World Rev. Nutr. Diet.**, v. 55, p. 98-152, 1988.
- YANG, G. Q.; YIN, S.; ZHOU, R.; GU, L.; YAN, B.; LIU, Y. Studies on safe maximal daily dietary Se-intakes in a seleniferous area of China, Part I. Relationship between selenium intake and tissue levels. **J. Trace Elem. Electr. Health Dis.**, v. 3, p. 77-87, 1989a.
- YANG, G. Q.; YIN, S.; ZHOU, R.; GU, L.; YAN, B.; LIU, Y. Studies on safe maximal daily dietary Se-intakes in a seleniferous area of China, Part II. Relationship between selenium intake and manifestations of clinical signs and certain biological altercations. **J. Trace Elem. Electr. Health Dis.**, v. 3, p. 123-130, 1989b.
- YU, S. Y.; ZHU, Y. J.; HUANG, Q. S.; ZHI-HUANG, C.; ZHANG, Q. N. A preliminary report of the interventional trials of primary liver cancer in high risk populations with nutritional supplementation of selenium in China. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 29, p. 289-294, 1991.
- YU, S. Y.; ZHU, Y. J.; LI, W. G. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qigong. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 56, p. 117-124, 1997.

## **CAPÍTULO 2 - Biodisponibilidade de selênio em cultivares de feijão comum e em feijão submetido à adubação foliar com selenito de sódio**

### **RESUMO**

O feijão é uma leguminosa consumida regularmente na dieta da população brasileira sendo considerado, em muitos países, uma importante fonte de proteína, carboidratos complexos, vitaminas e minerais. Além de seus componentes nutritivos, o feijão apresenta quantidades relevantes de compostos químicos com propriedades antinutricionais, os quais têm mostrado reduzir o valor nutricional dos alimentos, diminuindo a digestibilidade ou biodisponibilidade de macro e micronutrientes. Este estudo teve por objetivo avaliar a biodisponibilidade de selênio (Se) em 5 cultivares de feijão cozidos com sua água de maceração: branco (Ouro Branco), negro (Diamante Negro) e marrom-rajado (BRS Radiante, Pérola e Talismã), e em feijão Pérola submetido à adubação com selenito de sódio e seu controle. Ratas adultas Wistar foram submetidas a um período de depleção de 7 dias com dieta sem adição de Se. Posteriormente, os animais foram divididos em nove grupos (n= 10 animais por grupo) e alimentados por um período de 28 dias com as dietas experimentais com feijão e dietas controle (AIN-93 sem adição e com adição de Se). As dietas com feijão bem como a dieta controle com Se foram formuladas de modo a fornecer 0,1mg Se kg<sup>-1</sup>. A atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) plasmática e hepática bem como a concentração de Se nos eritrócitos foram utilizados como biomarcadores da biodisponibilidade do nutriente. Não foram observadas diferenças na biodisponibilidade de Se entre os cultivares estudados (P>0,05). A biodisponibilidade relativa de Se variou de 68,5 % (Diamante Negro) a 55,5 % (BRS Radiante) avaliado pela atividade GPx plasmática. O feijão Pérola submetido à adubação com Se apresentou biodisponibilidade relativa superior ao feijão não adubado, embora suas concentrações no nutriente tenham sido semelhantes.

## **Bioavailability of selenium in common bean cultivars and in foliar fertilized beans with sodium selenide**

### **ABSTRACT**

Common beans is a legume consumed frequently in the Brazilian diet and considered, in many countries, an important source of protein, complex carbohydrates, vitamins and minerals. However, beans also possesses appreciable amount of chemical compounds with antinutritional properties. These compounds reduce the nutritional value of foods due the lowest absorption and bioavailability of macro- and micronutrients. The aim of this current study was to evaluate the bioavailability of Se in 5 beans cultivars cooked with their soaking water: white (Ouro Branco), black (Diamante Negro) and brown (BRS Radiante, Pérola and Talismã), and in Pérola beans fertilized or no with sodium selenite. Female adult Wistar rats were placed in a selenium-free diet for 7 days (depletion). Then, they were distributed in 9 groups (n= 10 animals per group) and fed with experimental diets with beans and control diets (AIN-93 without addition of Se and with addition of Se) for 28 days. The diets with bean as well as the control diets were formulated in order to supply 0,1 mg Se kg<sup>-1</sup>. The activity of plasm and liver glutathione peroxidase (GPx) enzymes and erythrocyte Se were used as biomarkers for bioavailability of the nutrient. There was no difference in Se bioavailability between bean cultivars (P>0,05). The relative bioavailability of Se varied from 68,5 % (Diamante Negro) to 55,5 % (BRS Radiante) evaluated by plasm GPx activity. Pérola beans fertilized with Se presented higher relative bioavailability related to bean without fertilization, despite their similar concentrations in Se.

# BIODISPONIBILIDADE DE SELÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO COMUM E EM FEIJÃO SUBMETIDO À ADUBAÇÃO FOLIAR COM SELENITO DE SÓDIO

## 1. Introdução

O selênio (Se) é um elemento essencial à nutrição humana com importantes funções biológicas relacionadas, principalmente, à atividade das enzimas tipo 1,5'-iodotironina deiodinase, envolvida no metabolismo dos hormônios da tireóide (ARTHUR *et al.*, 1993), e glutatona peroxidase (GPx), que auxilia nos mecanismos de defesa da célula contra danos oxidativos (URSINI e BINDOLI, 1987).

A recomendação diária de ingestão do nutriente para adultos é de 55 µg com base na expressão máxima da atividade GPx em plasma sanguíneo (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000). A deficiência de Se está implicada na etiologia de doenças graves como a de Keshan, uma cardiopatia amplamente observada na China em áreas onde o baixo nível de Se no solo reflete-se no seu teor nos alimentos (GE e YANG, 1993; TAN *et al.*, 2002). Não obstante este fato, evidências de deficiência deste elemento traço em humanos são relativamente raras e muitas populações com baixo nível de ingestão do nutriente não têm mostrado sintomas aparentes (DANIELS, 1996). Contudo, nos últimos anos, estudos epidemiológicos têm correlacionado positivamente o estado nutricional de Se no organismo humano com uma ampla faixa de desordens incluindo doenças cardíacas e vários tipos de câncer (SALONEN *et al.*, 1982; WHANGER, 2004).

Em alimentos, o Se pode estar presente em menor proporção, nas formas inorgânicas de selenito e selenato e, em maior quantidade, em formas orgânicas como selenometionina, selenocisteína e selenocistina dentre outras (BENDER e BENDER, 1997). Estudos utilizando vários modelos experimentais constataram que as formas de Se ligadas organicamente são mais retidas que o Se inorgânico, sendo a selenometionina a forma mais biodisponível do nutriente comparativamente com as outras formas orgânicas mencionadas (BEHNE *et al.*, 1991; BEHNE e KYRIAKOPOULOS, 1993).

Os vegetais, de modo geral, incorporam o Se absorvido do solo em proteínas, principalmente na forma de selenometionina e selenocisteína. Todavia, a concentração de Se em alimentos de origem vegetal pode variar em função da

localidade em que foi produzido, particularmente quanto ao nível de Se no solo (LEVANDER, 1987; GUPTA *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, pesquisas foram realizadas com o objetivo de enriquecer alimentos de origem vegetal com Se por meio da adubação de culturas com sais inorgânicos (selenito e selenato) (LU *et al.*, 1996; FINLEY *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002). Esta prática vem sendo discutida tanto no sentido de prevenção da deficiência de Se pela elevação do seu nível dietético (CHEN *et al.*, 2002), quanto de redução do risco de câncer pelo aumento da ingestão de formas do elemento que promova metabólitos considerados antimutagênicos (HU *et al.*, 2002).

No Brasil, alimentos de origem vegetal apresentam, em sua maioria, baixos teores de Se sendo os pescados considerados uma das principais fontes do nutriente (FERREIRA, 1999). Entretanto, o elevado consumo de pescados não faz parte do hábito alimentar de grande parte da população brasileira. Além disso, segundo NEVE *et al.* (1987), as formas de Se encontradas nos peixes apresentam baixa biodisponibilidade (20% a 50 %), em relação aos alimentos de origem vegetal (85% a 100 %). Desta forma, a prática de enriquecimento de alimentos de origem vegetal, utilizando técnicas de adubação com Se, poderia constituir-se numa medida eficaz de elevação da ingestão e adequação deste elemento traço pela população brasileira.

Neste sentido, o feijão, considerado um dos alimentos de maior consumo *per capita* no Brasil e uma importante fonte de proteína na dieta brasileira, pode constituir-se em um veículo promissor para o Se por meio do enriquecimento. Deve-se considerar, no entanto, que a contribuição de um alimento na melhoria do estado nutricional de Se em humanos e animais não está apenas em função da sua concentração no alimento natural ou enriquecido, mas, sobretudo, de sua biodisponibilidade.

Em alimentos, a biodisponibilidade de Se tem se mostrado variável em função de fatores intrínsecos ao alimento e, principalmente, das formas químicas do nutriente presentes no mesmo (MARKS e MASON, 1993; IP e LISK, 1993; FINLEY e CINDY, 2001) e dos processos de preparação do alimento para consumo.

A biodisponibilidade de Se é geralmente avaliada pela determinação da atividade enzimática de glutathiona peroxidase (GPx) e do nível de Se em componentes sanguíneos (plasma, eritrócitos e sangue total) ou em outros tecidos

(LEVANDER, 1987; NEVE, 1995). Estes parâmetros estão relacionados com o estado nutricional relativo ao Se tanto em humanos como em animais.

Não obstante o seu elevado potencial nutritivo, o feijão tem sido alvo de muitos estudos relativos à presença de substâncias antinutritivas que podem complexar proteínas, vitaminas e sais minerais promovendo sua indisponibilização para o organismo. Sendo assim, faz-se necessário determinar a biodisponibilidade de Se em feijões como uma das principais medidas de avaliação do seu potencial como fonte de Se.

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da adubação com selenio de sódio nos níveis de selênio do cultivar Pérola e a biodisponibilidade de Se neste cultivar e em cultivares de feijão das classes branca, pretorepresentativos das variedades de maior consumo no Brasil.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Obtenção e preparo do material experimental**

Foram utilizados os cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) Pérola (PE), Ouro Branco (OB), Diamante Negro (DN) e BRS Radiante (BRS) fornecidos pela EMBRAPA – Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, GO, o cultivar Talismã (TL) fornecido pela Universidade Federal de Viçosa, MG e o cultivar Pérola submetido a adubação com Se (PE+Se) e seu respectivo controle (PE-Se), fornecidos pela EPAMIG, MG.

Para obtenção do feijão PE+Se foi realizada, aos 30 dias após o plantio, adubação foliar com 10 g ha<sup>-1</sup> de Se na forma de selenito de sódio diluído em 200 litros de água aplicados com pulverizador costal de 20 litros. Outra área do plantio foi submetida ao mesmo processo de pulverização utilizando-se água isenta de selenito de sódio, constituindo-se no tratamento controle (PE-Se).

Obtidos os cultivares de feijão, foi realizada a preparação do material experimental que se iniciou com a seleção e lavagem dos grãos seguindo-se de um período 15 horas de maceração em água à temperatura ambiente, empregando-se a proporção feijão:água de 1:2. Após este período, os feijões foram cozidos, juntamente com a água de maceração acrescida de mais 500 mL de água, em panela de pressão doméstica por 15 minutos contados após a saída constante de vapor pela válvula de pressão. Os feijões com seu caldo de cocção foram dispostos em bandejas de aço inoxidável e secos a 60 °C em estufa de ar circulante por cerca

de 24 horas sendo, posteriormente, moídos em microprocessador doméstico e passados por peneira com malha de 850  $\mu\text{m}$  até sua completa trituração e obtenção de uma farinha homogênea.

## 2.2. Determinação da concentração de Se

As amostras dos materiais experimentais acima especificados foram submetidas a processo fechado de mineralização úmida, seguido da determinação do teor de Se por Espectrofotometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos de acordo com metodologia descrita por DIAZ-ALARCÓN e colaboradores (1994).

Amostras de aproximadamente 0,5 g foram pesadas dentro de potes de politetrafluoretileno (PTFE) aos quais foram adicionados 5 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio a 30 %. O processo de mineralização foi realizado em microondas modelo Ethos Plus, marca Milestone seguindo-se a programação especificada no Quadro 1. Após a mineralização das amostras, foi feita a redução do  $\text{Se}^{+6}$  para o estado de oxidação  $\text{Se}^{+4}$  pela adição de HCl concentrado e aquecimento a 90 °C por 30 minutos. Este procedimento é necessário à obtenção de hidretos de Se quando da determinação do elemento por espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos. Após o resfriamento das soluções, procedeu-se a sua transferência quantitativa para balões volumétricos de 25 mL completando-se o volume com água deionizada, procedendo-se da mesma forma com os padrões constituintes da curva de calibração. A precisão (percentagem de recuperação) do processo de mineralização da amostra foi obtida pelo método de padronização interna, acrescentando-se quantidades crescentes de Se às amostras antes de sua mineralização. A percentagem de recuperação foi de 101,02 %.

**Quadro 1.** Programa de digestão dos materiais experimentais em microondas marca Milestone, modelo Ethos Plus

Etapa	Tempo	Temperatura
1	10 minutos	100 °C
2	20 minutos	200 °C

### **2.3. Determinação da composição centesimal**

Na determinação da composição centesimal do material experimental foram analisados os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídios seguindo-se os métodos oficiais recomendados pela AOAC (1984). O teor de carboidrato foi obtido pela subtração percentual dos teores de proteína, lipídios e cinzas.

### **2.4. Determinação do perfil de aminoácidos**

A determinação da composição relativa e quantificação dos aminoácidos presentes nos cultivares de feijão utilizados neste experimento bem como do cultivar pérola adubado com Se (PE-Se) e seu controle (PE-Se), foi realizada pelo método feniltiocarbamil aminoácidos (PTC) (análise de aminoácidos: derivação pré-coluna com fenilisotiocianato) (ROSA *et al.*, 1987). As amostras foram submetidas às etapas consecutivas de a) hidrólise com LiOH 4N para o triptofano por 24 h à 110 °C e com HCl 6N bidestilado por 22 h à mesma temperatura para os demais aminoácidos; b) derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC); e c) separação dos derivados feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag-3,9 x 150 mm) com monitoração de comprimento de onda em 254 nm. Obteve-se a quantificação dos PTC-aminoácidos pela integralização das áreas dos picos de cada aminoácido tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida derivado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que as amostras.

### **2.5. Ensaio biológico**

Para determinação da biodisponibilidade de Se nas variedades de feijão, foi conduzido ensaio biológico no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Noventa ratas (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe *Rodentia*), da linhagem Wistar, adultas, com idade média de 50 dias foram pesadas, distribuídas em gaiolas individuais e mantidas em ambiente com temperatura variando entre  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas. Inicialmente as ratas foram submetidas a um período de depleção de Se de 7 dias durante os quais receberam, *ad libitum*, água deionizada e dieta AIN-93M com mistura de minerais isenta de Se. Ao término deste período, os animais foram distribuídos, de acordo com o peso, entre os nove grupos

experimentais com 10 animais por grupo. Durante um período de 28 dias, foram fornecidos água deionizada *ad libitum* e dietas experimentais controladas variando de 10 a 20 g diários. Em ambos os períodos experimentais, o peso e consumo alimentar dos animais foram registrados semanalmente para obtenção do consumo total e cálculo do ganho de peso e do coeficiente de eficiência alimentar (CEA= ganho de peso (g) / consumo alimentar (g) x 100).

### **2.5.1. Constituição das dietas experimentais**

As dietas experimentais utilizadas no ensaio constaram dos cultivares de feijão anteriormente mencionadas tomando a identificação destes antecidos pela letra D (DPE, DOB, DDM, DBRS, DTL, DPE-Se e DPE+Se), e de duas dietas denominadas de controle positivo (CP: com mistura de minerais com Se na forma de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) e controle negativo (CN; com mistura de minerais isenta de Se) (Quadro 2).

A composição das dietas experimentais teve como base a dieta AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993).

Considerando-se o requerimento de Se indicado na referida dieta padrão de 0,15 mg Se kg<sup>-1</sup> de dieta para roedores adultos com base na expressão máxima da atividade GPx, foi estabelecido, neste ensaio, um nível inferior de fornecimento de Se (0,10 mg kg<sup>-1</sup>) de modo a permitir a observação de possíveis diferenças nos níveis de atividade da enzima entre os grupos experimentais.

Para o cálculo das quantidades de feijão dos diferentes cultivares a serem adicionadas às dietas, tomou-se a cultivar de menor concentração de Se (PE: 82,59 µg kg<sup>-1</sup>), calculando-se a quantidade máxima de feijão que se poderia adicionar a dieta AIN-93M de modo a aproximar-se do teor de Se estabelecido, resguardando os ingredientes considerados indispensáveis e considerando informações bibliográficas relativas à quantidade máxima possível de ingestão de feijão por roedores que não promovessem transtornos intestinais. Com base no teor de Se fornecido à dieta pela cultivar de menor concentração do elemento (PE= 0,075 mg kg<sup>-1</sup> de dieta), calculou-se a quantidade de feijão a ser utilizada na composição das dietas dos demais cultivares, com exceção da dieta DPE+Se onde foi empregada a mesma quantidade de feijão calculada para o seu controle (DPE-Se). Com o objetivo de totalizar o fornecimento de 0,10 g Se kg<sup>-1</sup> de dieta, foi adicionado às dietas experimentais com feijão uma mistura de minerais que

fornecesse os 0,025 mg Se Kg<sup>-1</sup> de dieta pela adição de Se na forma de selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>).

Determinados os quantitativos de feijão empregados na composição das dietas, calculou-se o fornecimento de proteínas por parte destas igualando-os pela adição de caseína de modo a obterem-se dietas isoprotéicas (21,54 %). Devido ao baixo teor de lipídios em feijões, não foi realizado ajustes na quantidade de óleo adicionado às dietas enquanto que, com relação à celulose, por ser o feijão uma boa fonte de fibra, optou-se pela supressão do referido componente.

### **2.5.2. Sacrifício dos animais e coleta de material para análise**

Terminado o período experimental, os animais foram anestesiados sob atmosfera de dióxido de carbono, procedendo-se a abertura das cavidades abdominal e torácica para coleta de sangue por punção cardíaca. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos contendo heparina como anticoagulante. Em seguida, coletou-se o fígado dos animais o qual foi lavado em solução salina, pesado, embalado, identificado e congelado em nitrogênio líquido para posterior processamento.

### **2.5.3. Análise da atividade de GPx em plasma e fígado**

Para análise da atividade de GPx plasmática, logo após o sacrifício dos animais, o sangue coletado foi centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos a 4 °C obtendo-se plasma sangüíneo e massa eritrocitária. Do fígado parcialmente descongelado, foi pesado aproximadamente 1 g de tecido e adicionado 10 mL de tampão frio (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA e 5 mM de betamercaptoetanol) procedendo-se a homogeneização da amostra e posterior centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C removendo-se o sobrenadante para avaliação da atividade GPx celular.

A atividade GPx plasmática e hepática foi avaliada pelo método modificado de PAGLIA E VALENTINE (1967) usando *kit* comercial da Cayman Chemical (nº 703102) o qual emprega hidroperóxido de cumeno como substrato. Para padronização da análise, utilizou-se GPx de eritrócito bovino fornecida pelo referido *kit*. A atividade de GPx das amostras foi obtida em leitora de ELISA a temperatura de 25 °C por meio do monitoramento da oxidação de NADPH a 340 nm. A unidade de atividade da enzima foi definida como 1 µmol de NADPH oxidado

min<sup>-1</sup> e os resultados foram expressos  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$  de plasma ou em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína para o fígado. A determinação de proteínas totais no fígado foi realizada espectrofotometricamente pelo método colorimétrico de biureto com absorção a 540 nm, utilizando-se *kit* comercial (CELM, São Paulo, Brasil).

**Quadro 2.** Composição das dietas experimentais (g Kg<sup>-1</sup>)

INGREDIENTES (g)	DIETAS EXPERIMENTAIS (g Kg <sup>-1</sup> )										
	CN	CP	DPE	DOB	DDN	DBRS	DTL	DPE+Se	DPE-Se		
Caseína	260,22	260,22	-	4,94	9,59	1,00	7,45	9,57	9,46		
Maltodextrina	155	155	-	-	-	-	-	-	-		
Sacarose	100	100	-	-	-	-	-	-	-		
Óleo de soja	40	40	40	40	40	40	40	40	40		
Fibra (celulose microfina)	50	50	-	-	-	-	-	-	-		
Minerais	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>		
Vitaminas	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
L-cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8		
Bitartrato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5		
Amido de milho q.s.p.	345,4	345,4	-	190,9	320,8	21,29	285,71	285,52	285,63		
Feijão Pérola	-	-	910,70	-	-	-	-	-	-		
Feijão Ouro Branco	-	-	-	714,83	-	-	-	-	-		
Feijão Diamante Negro	-	-	-	-	580,27	-	-	-	-		
Feijão BRS Radiante	-	-	-	-	-	888,41	-	-	-		
Feijão Talismã	-	-	-	-	-	-	617,54	-	-		
Feijão Pérola suplementado com	-	-	-	-	-	-	-	615,61	-		
Feijão Pérola não suplementado	-	-	-	-	-	-	-	-	615,61		

Fonte: Adaptado de REEVES *et al.* (1993) *op cite*; ausência ou redução do fornecimento de Se; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; DPE: Feijão Pérola; DOB: Feijão Ouro Branco; DDN: Feijão Diamante Negro; DBRS: Feijão BRS Radiante; DTL: Feijão Talismã; DPE+Se: Feijão Pérola submetido à adubação com Se; DPE-Se: Feijão Pérola sem adubação com Se; q.s.p.: quantidade suficiente para completar 1 kg; <sup>a</sup> Mistura de minerais isenta de Se. <sup>b</sup> Mistura de Minerais com 2,857 mg de Se kg<sup>-1</sup>, na forma de selenito de sódio. <sup>c</sup> Mistura de minerais com 0,025 mg de Se kg<sup>-1</sup>, na forma de selenito de sódio; Se fornecido pelos feijões nas respectivas dietas: 0,075 mg kg<sup>-1</sup>

#### 2.5.4. Determinação da concentração de Se em eritrócitos

A determinação da concentração de Se eritrocitário foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos de acordo com método proposto por HANSSON *et al.* (1987) e FINLEY *et al.* (1996) com modificações. Inicialmente, tomou-se 0,5 mL de amostra de eritrócitos por animal, procedendo-se a sua mineralização pela adição de 5 mL de solução nitroperclórica (3:1) seguido de pernoite e de um programa de aquecimento em bloco digestor, descrito no Quadro 3. A elevação programada da temperatura de digestão das amostras tem como objetivo, evitar a perda de Se por volatilização em condições de rápido e elevado aquecimento. Em seguida à mineralização das amostras, realizou-se o processo de redução do  $\text{Se}^{+6}$ , presente na solução, para o estado de oxidação  $\text{Se}^{+4}$  por meio da adição de 5 mL de HCl 6M seguido de aquecimento a 90 °C por 1 hora. Após resfriamento, as soluções tiveram seu volume aferido com água deionizada para 25 mL. A determinação da concentração de Se nas amostras foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica acoplado de gerador de hidretos desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Geoquímica da Universidade Federal de Ouro Preto. O coeficiente de recuperação do analito foi de 92 % pelo método de adição de padrão.

**Quadro 3.** Programa de aquecimento em bloco digestor para mineralização de amostras de eritrócitos submetidas à determinação da concentração de Se

Temperatura (°C)	Tempo (min)
50	30
70	30
100	30
120	30
180	até a ausência de fumos de ácido (cerca de 2 h)

#### 2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições. Os tratamentos constaram de 7 dietas experimentais constituídas com fontes diferenciadas de Se (cultivares de feijão e feijão suplementado com seu controle) e de duas dietas controle, perfazendo o total de 9

tratamentos. Os dados de consumo, ganho de peso, CEA, atividade GPx em plasma e fígado e concentração de Se nos eritrócitos foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Sistema para Análises Estatísticas - SAEG, versão 8.0, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (FUNARBE, 1998).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Composição centesimal e concentração de Se dos cultivares de feijão

A composição centesimal e o teor de Se dos cultivares de feijão utilizados encontram-se na Quadro 4. Os teores de proteína, lipídio e Se foram utilizados como base para o cálculo dos constituintes das dietas experimentais usadas no ensaio biológico.

**Quadro 4.** Composição centesimal em base úmida e concentração de Se em base úmida e base seca dos cultivares de feijão

Cultivar/cor	Umidade	Proteína	Lipídio	Cinza	Carboidrato	Se	
						base úmida	base seca
----- g/100g -----						----- µg/100g -----	
PE (MR)	6,31	21,78	2,22	3,82	64,00	8,26	8,81
OB (B)	5,65	24,80	2,32	3,58	64,00	10,49	11,12
DN (P)	7,03	22,67	2,64	3,97	62,81	12,92	13,90
BRS (MR)	5,17	24,28	2,31	3,55	65,64	8,44	8,90
TL (MR)	3,72	23,99	2,11	3,67	65,52	12,14	12,61
PE-Se	6,99	22,22	1,73	3,86	65,20	12,19	13,10
PE+Se	7,25	22,37	1,79	4,03	64,56	12,33	13,29

Média de três determinações; PE: feijão pérola; OB: feijão ouro branco; DN: feijão diamante negro; BRS: feijão BRS radiante; TL: feijão talismã; PE-Se; feijão pérola sem suplementação; PE+Se: feijão pérola suplementado com Se; MR: marrom-rajado; B: branco; P: preto.

#### 3.2. Concentração de Se

As plantas são fontes primárias de Se e concentrações variáveis deste nutriente em alimentos de origem vegetal têm sido observadas em função da disponibilidade do elemento no solo onde foram produzidos e de possíveis limites genéticos inter e intraespecíficos (ZHANG *et al.*, 2003).

A concentração de Se aqui determinada, refere-se a feijões macerados e cozidos com a água de maceração. Esta forma de processamento foi escolhida em

função das observações obtidas por RAMÍREZ-CÁRDENAS (2006), quando do estudo de quantificação e biodisponibilidade de minerais nestes mesmos cultivares submetidas a distintas formas de processamento.

De acordo com os resultados de teor de Se apresentados na Quadro 4, verificou-se variação na concentração do mineral nos cultivares de feijão produzidos pela EMBRAPA (PE, OB, DN, BRS) e pela UFV (TL) apresentando o cultivar PE o mais baixo valor (8,81  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e o cultivar DN o mais alto (13,90  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Estudos de quantificação de Se em feijão têm mostrado haver variação na concentração do elemento no grão em função do local de produção e/ou da variedade/cultivar estudada a exemplo do que ocorre em soja (ZHANG *et al.*, 2003).

FERREIRA (1999), avaliando a contribuição em minerais de diversos alimentos componentes da dieta brasileira oriundos de várias localidades, observou que a concentração de Se em feijões variou de 0,5 a 23,9  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , sendo os feijões dos cultivares de cor preta os que apresentaram níveis mais elevados do nutriente. Embora a concentração de Se encontrada no feijão tipo preto utilizado no presente estudo tenha diferido consideravelmente dos reportados por FERREIRA (1999), a mesma tendência foi observada, ou seja, o cultivar DN (preto) apresentou maior teor de Se que os demais feijões de cor mais clara.

Comparando-se os dados de concentração de Se no cultivar Pérola fornecimento pela EMBRAPA (PE) em relação ao mesmo cultivar produzido pela EPAMIG (PE-Se), verifica-se que o segundo apresentou um percentual de 28 % a mais de Se em relação ao primeiro (Quadro 4). Considerando-se a ausência significativa de perdas entre os cultivares de feijão durante o seu processamento, esse fato pode ser atribuído a diferenças nas condições de cultivo, principalmente com relação à disponibilidade de Se no solo onde foi produzido. Este mesmo cultivar, quando produzido sob as mesmas condições experimentais do PE-Se e submetido à adubação com selenito de sódio (PE+Se) não apresentou elevação na concentração do mineral. Diante do exposto, pode-se inferir que o cultivar PE suplementado com Se (PE+Se) produzido no campo experimental da EPAMIG, possa ter chegado à sua capacidade máxima de acúmulo do nutriente não permitindo que houvesse maiores incorporações do mineral no grão.

Trabalhos ainda não publicados de mapeamento do Se em território brasileiro realizado por pesquisador da Technical University of Braunschweig, Germany em cooperação com pesquisadores da Universidade de São Paulo

(MARTENS *et al.*, 2004), têm utilizado o feijão como alimento nativo na predição da distribuição e disponibilidade de Se nos solos brasileiros. Os resultados têm mostrado, por exemplo, que o feijão cultivado na região de São Paulo contém muito menos Se em relação ao feijão produzido na região sul ou nordeste do país, onde o solo é mais rico neste mineral. Todavia, de acordo com os pesquisadores, as diferenças parecem não ser tão elevadas a ponto de interferir na nutrição, uma vez que características genéticas da planta parecem regular a acumulação do nutriente no grão.

### 3.3. Perfil de aminoácidos

Alimentos de origem vegetal incorporam Se nas proteínas principalmente na forma de selenometionina e selenocisteína (JAFFÉ, 1992).

Grande parte do Se presente em plantas e animais se encontra ligado a proteínas originando as selenoproteínas (JAFFÉ, 1992). Estudos de enriquecimento de alimentos com Se via adubação de culturas com sais inorgânicos do elemento têm constatado alterações relativas não só à concentração de Se como ao perfil de aminoácidos no alimento estudado.

Brócoli cultivado em solos adubados com níveis crescentes de selenato de sódio apresentou elevação no nível de todos os aminoácidos detectados quando produzido sob a concentração mais baixa do elemento, sendo observado ainda, que níveis mais elevados de adubação produziram respostas mistas (LEE *et al.*, 2005).

Em outro estudo com chá verde, HU e colaboradores (2001) constataram elevação no nível de aminoácidos essenciais, com destaque para metionina e cisteína, em folhas produzidas sob adubação de Se na forma de selenito de sódio.

No presente trabalho, a cultivar PE submetida à adução com Se (PE+Se) apresentou apenas pequenas elevações na concentração da maioria dos aminoácidos analisados em relação ao seu controle (PE-Se) (Quadro 5) a exemplo do observado com a concentração de Se (Quadro 4).

Avaliando a composição aminoacídica dos demais cultivares estudados não foi observada correlação linear entre aminoácidos livres totais e conteúdo de Se. Entretanto, quando comparados isoladamente, os aminoácidos ácido aspártico ( $r = 0,98^{**}$ ), serina ( $r = 0,90^{**}$ ), ácido glutâmico ( $r = 0,87^{**}$ ), glicina ( $r = 0,82^{**}$ ) e metionina ( $r = 0,71^{**}$ ) apresentaram correlações lineares positivas com a

concentração de Se nos feijões. Contudo, não se pode dizer qual a variável condicionante ou até mesmo se ambas estão sob efeito de outra variável desconhecida.

Neste sentido, comparando-se ainda o cultivar PE produzido pela EMBRAPA com o mesmo cultivar produzido pela EPAMIG (PE-Se), observou-se distintos perfis aminoacídicos indicando um provável efeito das condições de cultivo sobre a composição de aminoácidos dentro de um mesmo cultivar.

**Quadro 5.** Composição aminoacídica dos cultivares de feijão em base úmida

Aminoácidos	Cultivares de feijão						
	PE*	OB*	DN*	BRS*	TL*	PE-Se	PE+Se
	----- mg aminoácido/g proteína -----						
Fenilalanina+tirosina	62,44	47,98	69,25	58,48	67,53	61,20	67,50
Histidina	19,28	15,72	15,88	15,24	18,34	23,85	24,13
Isoleucina	22,04	17,34	24,26	24,30	25,84	34,20	36,65
Leucina	45,91	33,87	50,73	47,78	50,02	57,60	62,13
Lisina	36,27	27,01	42,79	43,24	39,18	52,20	52,75
Metionina	9,18	8,06	10,58	9,06	11,25	9,00	10,73
½ Cistina	nd	nd	nd	nd	nd	5,40	5,36
Treonina	22,95	19,35	26,02	21,00	22,09	36,90	38,89
Triptofano	nd	nd	nd	nd	nd	10,35	11,17
Valina	27,09	22,58	28,23	26,36	30,01	39,15	42,02
Alanina	28,92	24,59	29,55	26,36	28,76	33,75	34,87
Arginina	42,24	32,26	34,85	28,83	38,76	42,75	45,15
Ácido aspártico	73,92	68,55	77,19	68,37	74,20	91,36	94,32
Ácido glutâmico	89,99	86,69	93,51	81,96	94,20	116,56	118,01
Glicina	22,50	19,76	22,49	19,36	21,26	32,85	32,63
Prolina	33,51	25,00	28,67	25,95	30,01	28,35	30,40
Serina	34,89	30,64	37,05	30,48	34,18	41,40	44,70

Média de duas determinações; nd: não determinado; \*Fonte: RAMÍREZ-CÁRDENAS (2006) *op cit*; PE: feijão pérola; OB: feijão ouro branco; DN: feijão diamante negro; BRS: feijão BRS radiante; TL: feijão talismã; PE+Se: feijão pérola suplementado com Se; PE-Se; feijão pérola sem suplementação.

### 3.4. Biodisponibilidade

O feijão apresenta em sua constituição elevado conteúdo de proteína, fibra e minerais bem como de importantes fatores antinutricionais como polifenóis e fitatos, os quais limitam a utilização de todo o seu potencial nutritivo pelo organismo,

particularmente no que se refere à biodisponibilidade de minerais essenciais como ferro e zinco (SANDBERG, 2002).

Com relação ao Se, são escassos os estudos sobre a influência de fatores antinutricionais na sua biodisponibilidade, sendo quase ou senão inexistentes pesquisas de biodisponibilidade deste mineral em feijão. Apenas algumas indicações têm sido feitas por GIBSON (1994) sobre o possível efeito negativo de fibra alimentar solúvel (pectina) na biodisponibilidade deste mineral bem como da necessidade de estudos sobre o efeito que o ácido fítico possa ter sobre a mesma.

Estudos com Se têm constatado não haver controle homeostático para a absorção do elemento pelo intestino e diferenças na biodisponibilidade do nutriente estão relacionadas, principalmente, à forma de Se ingerida (PATRICK, 2004).

Em alimentos de origem vegetal, grande parte do Se se encontra incorporado à proteínas nas formas principais de selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCys) (JAFFÉ, 1992).

Embora estudos de determinação das formas de Se presentes no feijão ainda não tenham sido realizados, supõe-se que, em condições normais de fornecimento de Se e a exemplo de outras leguminosas como a soja (YANG *et al.*, 2003), as principais formas do nutriente presentes no grão sejam aquelas ligadas às proteínas.

De acordo com PADOVESE *et al.* (2001), o feijão, assim como a maioria das leguminosas, apresenta em sua fração nitrogenada quantidade relativamente elevada do aminoácido não-protéico S-metil-cisteína, presente normalmente na forma de dipeptídeo (gama-glutamil-S-metil-cisteína).

Estudo com a leguminosa *Phaseolus lunatus* demonstrou aumento na concentração do análogo Se-metil-seleno-cisteína pela substituição do enxofre presente em S-metil-cisteína quando do fornecimento à planta de Se inorgânico (NIGAN e McCONNEL, 1973). Este aminoácido também foi identificado como a principal forma de Se em plantas consideradas acumuladoras do elemento submetidas ao enriquecimento como brócoli (FINLEY e CINDY, 2001) e alho (IP e LISK, 1995), apresentando, nestes alimentos, atividade antimutagênica e anticancerígena. Diante destas considerações, não se sabe se modificações nas formas de Se presente no feijão PE+Se possam ter ocorrido em virtude de alterações

no metabolismo da planta em condições de elevação no fornecimento do elemento na forma de selenito de sódio decidindo-se, portanto, pela avaliação de sua biodisponibilidade no mineral.

No Quadro 6, são apresentados os valores médios para consumo alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar nas diferentes dietas experimentais. De acordo com os resultados da análise estatística não foram observadas diferenças significativas de consumo entre as dietas experimentais estudadas, com exceção da dieta OB, cujo consumo foi inferior às dietas CN e CP.

**Quadro 6.** Consumo alimentar (CA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais em função das dietas experimentais

Dieta	CA (g)	GP (g)	CEA (%)
CN	371,44a	28,10a	7,64a
CP	373,38a	28,00a	7,50a
DPE	333,13ab	9,90b	2,90b
DOB	313,14b	13,00b	4,07b
DDN	355,03ab	13,90b	3,90b
DBRS	339,10ab	13,20b	3,80b
DTL	344,21ab	14,70b	4,24b
DPE-Se	353,07ab	15,50b	4,38b
DPE+Se	341,48ab	13,60b	3,85b

PE: feijão pérola; OB: feijão ouro branco; DN: feijão diamante negro; RS: feijão BRS radiante; TL: feijão talismã; PE-Se: feijão pérola sem suplementação; PE+Se: feijão pérola suplementado com Se; Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Com relação ao ganho de peso e ao coeficiente de eficiência alimentar, não se constatou diferença entre as dietas experimentais com feijão, sendo observado, entretanto, que estas diferiram das dietas CN e CP, as quais se mostraram iguais entre si e superiores às demais. Este fato deve ter ocorrido em virtude do baixo valor biológico da proteína presente no feijão em relação à caseína nas dietas controle, como observado pela avaliação do perfil de aminoácidos apresentado no Quadro 5.

A determinação da atividade de GPx e da concentração de Se em fluidos corporais e tecidos constituem os principais biomarcadores utilizados em

estudos de biodisponibilidade de Se em humanos e animais (ORTUÑO *et al.*, 1996). Entretanto, as respostas a estes parâmetros têm se mostrado amplamente dependente de fatores como a dose de Se utilizada, o metabolismo das formas de Se estudadas, o estado nutricional inicial dos animais ou humanos, e ainda da duração do período experimental estabelecido para a pesquisa (DIPLOCK, 1993).

A atividade GPx em plasma e fígado são considerados biomarcadores funcionais da biodisponibilidade de Se enquanto que a sua concentração eritrocitária é um dos determinantes da retenção do nutriente no organismo podendo, inclusive, apresentarem-se ou não positivamente correlacionados (REA *et al.*, 1979).

No presente estudo, a determinação da concentração de Se eritrocitário não permitiu observar diferenças na retenção de Se entre as dietas estudadas. Tal fato se deu, provavelmente, em função do curto período experimental utilizado (28 dias). De acordo com ZACHARA (1992), a apreciação de modificações significativas nestas células, exceto a longo prazo (várias semanas), são raramente observadas em virtude da sua vida média de 120 dias, sugerindo que a incorporação de Se em eritrócitos só se produz durante a eritropoiese. Observa-se, entretanto, uma tendência de superioridade da dieta CP em relação à dieta CN e uma posição intermediária a estas das dietas com feijão, indicando que diferenças significativas possivelmente seriam observadas com o prolongamento do período experimental.

Considerando-se a atividade GPx em plasma sanguíneo, observou-se diferença significativa entre as dietas CP e CN (4531 e 3619  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ , respectivamente) demonstrando a validade, neste estudo, da utilização deste parâmetro como biomarcador na detecção de diferenças de biodisponibilidade de Se (Quadro 7).

Considerando-se as dietas à base de feijão, não foram observadas diferenças significativas na atividade de GPx plasmática entre os grupos de animais, mostrando, de acordo com este parâmetro, não haver diferença na biodisponibilidade de Se entre os cultivares estudados e entre o cultivar submetido à adubação com Se e seu controle.

**Quadro 7.** Atividade enzimática de glutathiona peroxidase plasmática (GPx plasmática), glutathiona peroxidase hepática (GPx hepática) e concentração eritrocitária de Se (Se eritrocitário) em ratos alimentados com diferentes dietas experimentais

Dieta	GPx plasmática (nmol min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	GPx hepática (nmol min <sup>-1</sup> mg de P <sup>-1</sup> )	Se eritrocitário (µg L <sup>-1</sup> )
CN	3619b	266,15a	295,69a
CP	4531a	255,35a	424,50a
DPE	2553cd	249,81a	380,77a
DOB	2635cd	240,16a	360,30a
DDN	3104bcd	230,63a	343,48a
DBRS	2514d	242,99a	332,47a
DTL	2999bcd	244,38a	351,68a
DPE-Se	2800cd	277,57a	395,75a
DPE+Se	3242bc	317,21a	374,28a

PE: Feijão Pérola; OB: Feijão Ouro Branco; DN: Feijão Diamante Negro; BRS: Feijão BRS Radiante; TL: Feijão Talismã; PE-Se; Feijão Pérola sem suplementação; PE+Se: Feijão Pérola Suplementado com Se; Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Estes resultados demonstram não haver influência de fatores antinutricionais presentes no feijão, como fibra solúvel e fitatos, sobre a biodisponibilidade de Se já que, quantidades distintas destes componentes foram ingeridas entre os grupos de animais, devido não só a diferenças de concentração dos mesmos nos cultivares de feijão cozidos (RAMÍREZ-CÁRDENAS, 2006) quanto ao emprego de quantidades distintas do alimento nas diversas dietas experimentais estudadas.

Foi constatado, entretanto, que as dietas à base de feijão foram significativamente inferiores à dieta CP apresentado biodisponibilidades relativas de 71,5 % (DPE+Se), 68,5 % (DDN), 66,2 % (DTL) 61,8 % (DPE-Se), 58,1 % (DOB), 56,3 % (DPE) e 55,5 % (DBRS). Observam-se, de acordo com os dados, diferenças consideráveis de biodisponibilidade relativa entre os cultivares de feijão bem como entre o cultivar submetido à adubação com Se e seu controle. Uma correlação linear positiva ( $r = 0,92^{**}$ ) foi observada entre os valores de biodisponibilidade relativa de Se e os teores do elemento nos cultivares estudados, excetuando-se o cultivar PE+Se. Esta observação pode levar à hipótese da existência de variações qualitativas e/ou

proporcionais nas formas de Se armazenadas no grão quando de sua acumulação em diferentes níveis de concentração. Este fato parece não estar correlacionado com diferenças entre cultivares, uma vez que o mesmo cultivar (PE e PE-Se) com concentrações distintas de Se apresentou valores variáveis de biodisponibilidade relativa. Quando o cultivar PE+Se foi considerado, a correlação foi reduzida para  $r = 0,87^{**}$ , indicando que um mesmo cultivar com concentrações de Se semelhantes (PE-Se e PE+Se) pode apresentar valores de biodisponibilidade relativa diferentes em função de possíveis alterações metabólicas na incorporação de Se quando submetida à adubação foliar com selenito de sódio. Desta forma, a mais elevada biodisponibilidade relativa de Se na dieta PE+Se pode ter ocorrido em virtude de alterações quantitativas e, ou qualitativas nas formas de Se presentes no cultivar submetido à adubação.

Cerca de 30 % do Se armazenado nos tecidos animais encontra-se no fígado. Estudos têm demonstrado que em animais submetidos à deficiência de Se a atividade GPx hepática se reduz rapidamente a valores próximos de zero (KNIGHT e SUNDE, 1988; WEISS *et al.*, 1997).

Quando a atividade GPx no fígado foi utilizada como biomarcador da biodisponibilidade de Se, observou-se a ausência de diferenças significativas entre as dietas controle (CN e CP). Este fato pode ter ocorrido em função do emprego de hidroperóxido de cumeno como substrato para GPx.

De acordo com LAWRENCE *et al.* (1978), há no fígado, em adição a atividade GPx dependente de Se, uma Glutathione S-transferase (GST) não dependente de Se com atividade peroxidase. Segundo os mesmos autores, animais deficientes neste nutriente apresentam elevação da atividade de GST como mecanismo de compensação. Uma afinidade enzimática ( $K_m$ ) de 0,57 mM para a GST foi determinado quando hidroperóxido de cumeno foi usado como substrato (PIERCE e TAPPEL, 1978).

Desta forma, não foi possível estabelecer considerações sobre a biodisponibilidade de selênio entre os cultivares de feijão quando avaliada pela atividade GPx em fígado utilizando hidroperóxido de cumeno como substrato.

#### 4. Conclusões

A adubação foliar do feijoeiro do cultivar Pérola com selenito de sódio na dose de 10 g de Se ha<sup>-1</sup> não elevou a concentração de Se no grão tão pouco alterou sua composição aminoacídica.

Os cultivares de feijão estudados bem como o cultivar pérola adubado com Se e seu controle não apresentam diferenças entre si na biodisponibilidade de Se medida pela atividade GPx plasmática não estando, portanto, condicionada por fatores antinutritivos presentes no alimento.

Em termos de biodisponibilidade relativa dos cultivares de feijão, calculada com base na diferença de atividade da GPx plasmática entre as dietas com feijão e a dieta padrão, foram constatadas variações entre os cultivares os quais apresentaram percentuais de 68,5 % (DDN), 66,2 % (DTL), 58,1 % (DOB), 56,3 % (DPE) e 55,5 % (DBRS).

O cultivar pérola submetido à adubação com Se apresentou maior biodisponibilidade relativa do nutriente (71,5 %) em relação ao seu controle (61,8 %). Este fato reflete na eficácia do processo de adubação utilizado na melhoria da biodisponibilidade de Se em feijão, com possível aumento dos seus efeitos fisiológicos.

#### 5. Referências Bibliográficas

- ARTHUR, J. R.; NICOL, R.; BECKETT, G.J. Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.57, p.36S-239S, 1993.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – A.O.A.C. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 14<sup>a</sup> ed., Washington, DC., 1984. 1141p.
- BEHNE, D.; KIRIAKOPOULOS, A.; SCHEID, S.; GESSNER, H. Effects of chemical form and dosage on incorporation of selenium into tissue proteins in rats. **J. Nutr.**, v.121, p.806-814, 1991.
- BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. **Am. J. Nutr. Suppl.**, v.57, p.310S-312S, 1993.
- BENDER, D.A., BENDER, A.E. **Nutrition: a reference handbook.** Oxford: Oxford University Press, 1997. 573p.
- CHEN, L.; YANG, F.; XU, J.; HU, Y.; HU, Q.; ZHANG, Y.; PAN, G. Determination of selenium concentration of rice China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.5128-5130, 2002.

- DANIELS, L. A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 54, p.185-199, 1996.
- DIAZ-ALARCÓN, J. P.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; LOPÉZ-GARCIA DE LA SERRANA, H.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Determination of selenium levels in vegetable and fruits by hydride generation atomic absorption spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 2848-2851, 1994.
- DIPLOCK, A. T. Indexes of selenium status in human populations. **Am. J. Clin. Nutr. Suppl.**, v. 53, p. 256S-258S, 1993.
- FERREIRA, S. K. **Quantificação e avaliação dos teores de minerais em alimentos e em dietas utilizados no Brasil**. Viçosa: UFV, 1999. 137p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- FINLEY, J. W.; MATTHYS, L.; SHULER, T.; KORYNTA, E. Selenium content of foods purchased in North Dakota. **Nutr. Res.**, v. 16, n. 5, p. 723-728, 1996.
- FINLEY, J. W.; IP, C.; LISK, D. J.; DAVIS, D. C.; HINTZE, K. J.; WHANGER, P. D. Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.2679-2683, 2001.
- FINLEY, J. W.; CINDY, D. D. Selenium (Se) from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis. **BioFactors**, v. 14, n. 1-4, p. 191-196, 2001.
- GE, K.; YANG, G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiology of endemic disease in China. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.57, p.259-263, 1993.
- GIBSON, R. S. Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, p. 1223S-1232S, 1994.
- GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C.; GUPTA, M. D. Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: implications for management. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v. 31, p. 1791-1807, 2000.
- HANSSON, L.; PETTERSSON, J.; OLIN, A. A comparison of two digestion procedures for the determination of selenium in biological material. **Talanta**, v 34, n. 10, p. 829-833, 1987.
- HU, Q. H.; PAN, G. H.; ZHU, J. C. Effect of fertilization on selenium content of tea and the nutritional function of Se-enriched tea in rats. **Plant and Soil**, v.238, p.91-95, 2002.
- HU, Q.; PAN, G.; ZHU, J. Effect of selenium on green tea preservation quality and amino acid composition of tea protein. **J. Hort. Sci. Biotech.**, v. 76, n. 3, p. 344-346, 2001.
- IP, C.; LISK, D. J. Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic. **Nutr. Cancer**, v. 20, p. 129-137, 1993.
- IP, C.; LISK, D. J. Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. **Carcinogenesis**, v.16, p.2649-2652, 1995.
- LAWRENCE, R. A.; PARKHILL, L. K.; BURK, R.F. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. **J. Nutr.**, v. 108, n.6, p. 981-987, 1978.

- LEE, J.; FINLEY, J. W.; HARNLY, J. M. Effect of selenium fertilizer on free amino acid composition of broccoli (*Brassica oleracea* Cv. majestic) determined by gas chromatography with flamelonization and mass selective detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 23, p. 9105-9111, 2005.
- LEVANDER, O. A. A global view of human selenium nutrition. **Ann. Rev. Nutr.**, v.7, p.227, 1987.
- LU, J. X.; PEI, H. H.; IP, C.; LISK, D. J.; GANTHER, H.; THOMPSON, H. J. Effect of an aqueous extract of selenium-enriched garlic on *in vitro* markers and *in vivo* efficacy in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v.17, p.1903-1907, 1996.
- JAFFÉ, W. Selenium, un elemento esencial y tóxico. Datos de Latinoamérica. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 42, n. 2, p. 90-93, 1992.
- KNIGHT, S. A.; SUNDE, R. A. Effect of selenium repletion on glutathione peroxidase protein level in rat liver. **J. Nutr.**, v. 118, n. 7, p. 853-858, 1988.
- MARKS, H. S.; MASON, A. C. Selenium bioavailability of soy-based diets in rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 4, n. 9, p. 523-527, 1993.
- MARTENS A., GONZAGA MARTENS I. B., FRANCISCATO COZZOLINO S. M. The geographical variation in the selenium content of beans as indicator of its natural distribution in Brazil. In: **8<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine**, Budapest – Hungria, 2004.
- NEVE, J.; HENRY, M.; PERETZ, A.; MARESCHI, J. P. The nutritional importance of selenium. **Cah. Nutr. Diet.**, v.22, p.145-148, 1987.
- NEVE, J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 9, p. 65-73, 1995.
- NIGAM, S. N.; McCONNEL, W. B. Biosynthesis of Se-methylselenocysteine en lima beans. **Phytochemistry**, v. 12, p.359-362, 1973.
- ORTUÑO, J.; ROS, G.; PERIAGLO, M. J.; MARTTÍNEZ, C.; LÓPEZ, G. Biodisponibilidad del selenio y métodos de evaluación. **Food Sci. Technol. Internat**, v. 2, p. 135-150, 1996.
- PADOVESE, R.; KINA, S. M.; BARROS, R. M.; BORELLI, P.; MARQUEZ, U. M. L. Biological importance of gamma-glutamyl-S-methylcysteine of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chem.**, v. 73, p. 291-297, 2001.
- PAGLIA; D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.
- PATRICK, L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. **Altern. Med. Rev.**, v. 9, p. 239-258, 2004.
- PIERCE, S.; TAPPEL, A. L. Glutathione peroxidase activities from rat liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 523, n. 1, p. 27-36, 1978
- RAMÍREZ-CÁRDENAS, L. A. **Biodisponibilidade de zinco e de ferro, valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos a tratamentos domésticos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 180 p. (Tese de doutorado).

- REA, H. M.; THOMPSON, C. D.; CAMPBELL, D. R.; ROBINSON, M. F. Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase (EC1.11.1.9.) activities of New Zealand residents and visitors to New Zealand. **Br. J. Nutr.**, v. 42, p. 201-212, 1979.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- ROSA, J. C.; IZUMI, C.; BELTRAMINI-SABBAG, L. M.; GREENE, L. J. Quantitative HPLC analysis of phenylisothio-Carbamyl-amino acids at picomol levels. **XVI Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBq) – Caxambu/MG, 22 a 25/04/87 – Arq. Biol. Technol.**, v. 30, n. 1, p. 35, 1987.
- FUNARBE. SAEG - **Sistema para análises estatísticas** - versão 8.0. Viçosa, MG: Fundação Authur Bernardes, 1998. (Software).
- SALONEN, J. T.; ALFTHAN, G.; HUTTUNEN, J. K.; PIKKARAINEN, J.; PUSKA, P. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. **Lancet.**, v.2, p.1975-1979, 1982.
- SANDBERG, A. S. Bioavailability of minerals in legumes. **Brit. J. Nutr.**, v. 88, Suppl. 3, p.S281-S285, 2002.
- TAN, J.; ZHU, W.; WANG, W.; LI, RIBANG.; HOU, S.; WANG, D.; YANG, L. Selenium in soil and endemic disease in China. **Sci. Total Envir.**, v.284, p.227-235, 2002.
- URSINE, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem. Phys. Lipids.**, v.44, p.255-276, 1987.
- US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE (USA). **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington DC: National Academy Press, 2000. 506 p.
- WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **Br. J. Nutr.**, v.91, p. 11-28, 2004.
- WEISS, S. L. ; EVENSON, J. K.; THOMPSON, K. M.; SUNDE, R. A. Dietary selenium regulation of glutathione peroxidase mRNA and other selenium-dependent parameters in male rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 8, p. 85-91, 1997.
- ZACHARA, B. A. Mammalian selenoprotein. **Trace Elem. Electrolytes Health Dis.**, v. 6, p. 137-151, 1992.
- ZHANG, Y.; PAN, G.; CHEN, J.; HU, Q. Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. **Plant and soil**, v. 253, n. 2, p. 437-443, 2003.
- YANG, F.; CHEN, L.; HU, Q.; PAN, G. Effect of the application of selenium on selenium content of soybean and its products. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 93, n. 1-3, p. 249-256, 2003.

## ANEXOS

**Quadro 1A.** Resumo da análise de variância para consumo alimentar (CA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratas alimentadas com diferentes dietas experimentais

FV	GL	Quadrado Médio		
		CA (g)	GP (g)	CEA (%)
Dietas	8	3442,08**	704,48**	44,55**
Resíduo	81	1066,42	124,26	7,69
CV %		9,41	62,28	55,38

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

**Quadro 2A.** Resumo da análise de variância para atividade de Glutathione Peroxidase plasmática (GPx plasmática) Glutathione Peroxidase eritrocitária (GPx eritrocitária) e concentração eritrocitária de Se (Se eritrocitário) de ratas alimentadas com diferentes dietas

FV	GL	Quadrado Médio		
		GPx plasmática (nmol min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	GPx hepática (nmol min <sup>-1</sup> mg de P <sup>-1</sup> )	Se eritrocitário (µg L <sup>-1</sup> )
Dietas	8	4118739,00**	5428,55 <sup>ns</sup>	14087,92 <sup>ns</sup>
Resíduo	81	239920,80	4022,77	10773,39
CV %		15,74	23,33	28,66

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

### **CAPÍTULO 3 - Potencial anticarcinogênico de feijão e castanha-do-Pará sobre o risco de câncer de cólon induzido por 1,2-dimetilhidrazina em ratos F344**

#### **RESUMO**

A castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), alimento nativo da região amazônica, é rica em selênio (Se), enquanto o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa consumida regularmente na dieta brasileira. Ambos tem sido alvo de interesse por parte dos pesquisadores como alimentos promotores da saúde em virtude da presença de compostos com relevantes propriedades funcionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anticarcinogênico da castanha-do-Pará e do feijão preto, utilizados isoladamente ou em combinação, sobre o câncer de cólon induzido quimicamente em ratos. Após um período de 28 dias de depleção de Se, ratos machos F344 (45) foram alimentados por 12 semanas com as seguintes dietas hiperlipidêmicas: controle AIN-93 sem adição de Se (CN); controle AIN-93 suplementada com 4 mg Se kg<sup>-1</sup> (CP); dieta contendo a mesma dose de Se da dieta CP fornecidos pela castanha-do-Pará (C); dieta C formulada com feijão (F+C) e; dieta com feijão (F). O carcinógeno de cólon 1,2-dimetilhidrazina · 2HCl (DMH) ou o seu veículo (controle) foram aplicados aos animais em duas doses consecutivas na segunda e terceira semanas após a introdução das dietas experimentais. Ao final do período experimental foram realizadas a avaliação da atividade das enzimas Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione S-transferase (GST) bem como a determinação da concentração plasmática de Se. Os biomarcadores do risco de câncer de cólon avaliados incluíram diferenciação celular medido pela relação entre a porcentagem de células secretoras de sialomucinas e de sulfomucinas (SIM:SUM); proliferação celular, avaliada pela altura de cripta em número de células e; alterações morfológicas da cripta (altura, diâmetro da base e diâmetro do ápice) e do cólon (densidade de cripta por mm de cólon). As dietas CP, C, F e F+C promoveram o mesmo nível de expressão das enzimas GPx e GST não sendo observadas alterações de suas atividades quando da aplicação do carcinógeno (DMH+) em relação aos seus respectivos controles (DMH-). Estas dietas também promoveram maior grau de diferenciação celular e menor grau de proliferação celular da mucosa colônica em relação à dieta CN, não sendo observadas alterações de padrão quando da aplicação do DMH. A administração de doses

supranutricionais de Se na forma de SeMet ou fornecida pela castanha-do-Pará e a utilização do feijão de forma isolada ou em combinação com a castanha nas dietas avaliadas favoreceu a homeostase do desenvolvimento colônico evitando alterações na diferenciação e proliferação celular em ratos tratados com DMH, sugerindo um papel protetor destes alimentos no câncer de cólon. Os resultados indicam ainda um possível envolvimento de mecanismos múltiplos de ação.

### **CAPÍTULO 3 - Anticarcinogenic potential of common bean and Brazil nut on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in F344 rats**

#### **ABSTRACT**

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), the richest known natural food source of selenium, is native of the Amazon rain, while the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume consumed frequently in the Brazilian diet. Both foods raised the attention of researchers for their potential as health promoters due to the presence of components with excellent functional properties. The aim of this study was to evaluate the anticarcinogenic potential of the Brazil nut and black beans, used separately or combined, on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. After 28 day-period of Se depletion, male F344 rats (45) were fed during 12 weeks with the following hyperlipidic diets for 12 weeks: control AIN-93 without addition of Se (CN); control AIN-93 supplemented with 4 mg Se kg<sup>-1</sup> (CP); diet with the same dose of Se of CP diet provided by Brazil nut (C); diet C formulated with beans (F+C) and diet with beans (F). The colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine · 2HCl (DMH) or its vehicle (control) were applied to the animals in two consecutive doses in the second and third weeks after the introduction of the experimental diets. At the end of the experimental period, the activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) and the levels of plasm Se were analyzed. The biomarkers for the risk of colon cancer evaluated included cellular differentiation, measured by the ratio of producing cells of sialomucins and sulphomucins (SIM:SUM); cellular proliferation, evaluated by the height of crypt in cells numbers; morphologic alteration of crypt (height, diameter of the base and diameter of the apex) and of colon (density of crypt for mm of colon). The diets CP, C, F and F+C promoted the same level of expression of GPx and GST, showing no alteration in the activity of these enzymes in the treated animals with the carcinogen (DMH+) in relation to its respective controls (DMH-). These diets also promoted higher degree of cellular differentiation and lower degree of cellular proliferation of the colonic mucosa in relation to CN diet, not being observed alterations of standard with the application of the DMH. The administration of supranutritional doses of Se in the form of SeMet or supplied by the Brazil nut and the use of the beans of isolated form or combined with the nut favoured the homostasis of the colonic development

preventing alterations in the cellular differentiation and proliferation in rats treated with DMH suggesting a protective role of these foods in the colon cancer. The results still indicate a possible involvement of multiple mechanisms of action.

# POTENCIAL ANTICARCINOGENICO DE FEIJÃO E CASTANHA-DO-PÁRÁ SOBRE O CÂNCER DE CÓLON INDUZIDO POR 1,2-DIMETILHIDRAZINA RATOS F344

## 1. Introdução

O estudo do câncer nestas últimas décadas ganhou impulso considerável a partir do desenvolvimento de tecnologias que possibilitaram nível de conhecimento mais aprofundado sobre esta patologia, refletindo a preocupação política, social e científica frente a esta importante causa de mortalidade e morbidade mundial, responsável pela morte anual de 7,0 milhões de pessoas em todo o mundo, e de 130.000 apenas no Brasil (BRASIL, 2006).

O avanço da ciência também permitiu estabelecer uma relação entre dieta e o binômio saúde-doença, o que levou à geração de novos produtos denominados de alimentos funcionais. Estes produtos, além do seu papel nutricional, apresentam capacidade de reduzir os riscos de doenças. Diversos alimentos tem sido objeto de pesquisa visando à análise de suas características e propriedades funcionais. Constata-se que algumas espécies de plantas destinadas à alimentação humana são portadoras de componentes funcionais nutritivos e não-nutritivos, estes últimos chamados também de compostos bioativos, fitoquímicos ou fitoterápicos (FERGUNSON *et al.*, 2004). Tais constituintes apresentam, em sua maioria, atividade antioxidante e são capazes de ativar sistemas de enzimas antioxidantes e, ou detoxificantes que ajustam e modulam o sistema fisiológico do organismo humano, de modo a promover a saúde e reduzir o risco de doenças (WATTENBERG, 1983).

Desta forma, a ciência tem buscado cada vez mais determinar quais alimentos e ingredientes – isoladamente ou em combinação – oferecem significativas propriedades funcionais e nomear os alimentos que apresentam níveis elevados dessas substâncias.

A castanha-do-Pará, alimento nativo da região amazônica, tem despertado o interesse por parte de pesquisadores devido à sua elevada concentração natural de Selênio (Se), mineral com função antioxidante e comprovado potencial anticâncer.

A ação antioxidante do Se, mediada pela enzima glutathione peroxidase (GPx), da qual faz parte como componente essencial, tem sido considerado como um dos possíveis mecanismos pelos quais o Se exerce seu efeito quimioprotetor.

Segundo alguns pesquisadores (IP e LISK, 1997; IP, 1998; ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001) a GPx faz parte do sistema secundário de defesa da célula contra danos oxidativos, os quais estão envolvidos em processos cancerígenos. O potencial anticâncer do Se parece também estar relacionado com alterações no metabolismo de carcinógenos via atividade de enzimas que participam da Fase II do sistema de detoxificação de xenobióticos, dentre as quais está a Glutathione S-Transferase (IP e LISK, 1997). Esta enzima age inativando os produtos da Fase I do sistema de detoxificação, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (ROSSIT e FROES, 2000).

Pesquisas têm demonstrado que a utilização de alimentos enriquecidos com Se, por meio da adubação, ou de alimentos naturalmente ricos neste nutriente parece ser um caminho mais seguro e eficaz em relação aos suplementos, no aumento da ingestão visando à prevenção de deficiências ou redução do risco de câncer (IP e LISK, 1994a; IP e LISK, 1994b; LU *et al.*, 1996; FINLEY *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002). Além disso, a eficácia do Se como agente anticarcinogênico parece estar intimamente relacionada com a forma química do elemento, a qual se mostra variável de acordo com o alimento (IP, 1998).

Com relação à castanha, encontram-se já disponíveis pesquisas de quantificação e especiação do elemento (CHANG *et al.*, 1995; VO NDERHEID *et al.*, 2002; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2005) e de sua biodisponibilidade (CHANSLER *et al.*, 1986; THOMSON *et al.*, 2006). Entretanto, no que se refere ao potencial anticarcinogênico da castanha em virtude do elevado teor de Se, ainda são incipientes as pesquisas relativas ao assunto havendo a necessidade de um número maior de evidências científicas que suportem os apelos sobre o efeito protetor do câncer atribuído ao referido alimento.

A exemplo da castanha, o feijão, leguminosa bastante consumida no Brasil, também tem sido, nos últimos anos, objeto de pesquisa como alimento promotor da saúde em virtude da presença de importantes substâncias consideradas funcionais, dentre as quais se destacam compostos fenólicos, fitato e fibras. Taninos e outros polifenóis (antocianinas e flavonóides) têm sido estudados como possíveis fatores protetores contra patologias mediadas por radicais livres em humanos como é o caso do câncer (GONZALEZ DE MEJIA *et al.*, 1999; AZEVEDO *et al.*, 2003; BAWADI *et al.*, 2005). O fitato, por sua vez, por complexação com o ferro, pode provocar redução favorável na formação de radicais hidroxil no cólon

(HARLAND e MORRIS, 1995). Já a fibra, como fator protetor na carcinogênese de cólon foi proposta pela primeira vez por BURKITT (1971) e, posteriormente, diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação do consumo de fibra com um menor risco de câncer gastrointestinal com destaque para o câncer coloretal (TROCK *et al.*, 1990; BOYLE e LEON, 2002).

Dentre os vários tipos de câncer já estudados, o câncer de cólon é o que parece sofrer maior influência dos fatores dietéticos, sendo o consumo de dietas hiperlipídicas e o baixo consumo de fibra alguns dos fatores relacionados com a maior incidência da doença (REDDY, 2000). Pesquisas também têm demonstrado a eficácia do Se, isoladamente ou como componente de alimentos, na prevenção do câncer de cólon em animais e humanos (WHANGER, 2004).

Neste sentido, alterações histológicas da mucosa colônica bem como do padrão de glicoproteínas do muco têm sido empregados como marcadores de mudanças premalignas em pacientes com risco de desenvolvimento de tumores colônicos e na determinação do efeito potencial de alimentos ou de seus componentes na prevenção do câncer de cólon (YANG *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 1997; HONG *et al.*, 1997; JENAB e THOMPSON, 2000). Pesquisas (FILIPE e BRANFOOT, 1974; ALTMANN, 1983) têm demonstrado a predominância de mucinas sulfatadas em cólon distal considerado normal de ratos e humanos sendo o quociente entre células secretoras de sialomucinas e sulfomucinas (SIM:SUM) relacionado ao grau de diferenciação celular da mucosa colônica (JENAB e THOMPSON, 2000).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial protetor da castanha-do-Pará e do feijão, de forma isolada ou em conjunto, sobre o risco de câncer de cólon induzido quimicamente em ratos F344 alimentados com dietas hiperlipídicas.

## **2. Material e Métodos**

Este ensaio foi conduzido no Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos da Facultad de Veterinária da Universidad de Murcia, Espanha. As análises dos alimentos e do material biológico animal foram realizadas nos laboratórios do referido departamento, no Hospital Veterinário da Facultad de Veterinária e nos laboratórios do Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) pertencente à mesma universidade. As análises histológicas foram

conduzidas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, MG.

## 2.1. Animais

Foram empregados 45 ratos machos Fischer (F334), recém desmamados com 21 dias de idade provenientes da Harlan, Barcelona, Espanha. Após dois dias de adaptação, os animais foram distribuídos em gaiolas (três animais por gaiola) e mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas por todo o período experimental.

## 2.2. Dietas experimentais

No período de depleção de Se os animais consumiram dieta baseada na AIN-93, sem adição de Se e hipercalórica.

Durante o período experimental os animais foram alimentados com cinco dietas distintas: CN (controle negativo; sem adição de Se), CP (controle positivo; 4 mg SeMet kg<sup>-1</sup>), F (dieta com feijão), C (dieta com castanha-do-Pará), F+C (dieta com feijão+castanha-do-Pará).

Para elaboração das dietas com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi utilizado o tipo negro, cultivar “Uirapuru”, produzido em Viçosa, MG, Brasil, sob condições de campo, seguindo os tratos culturais convencionais para a cultura. Estudos têm constatado que os cultivares de feijão do tipo negro apresentam elevada concentração de fitoquímicos como taninos e fitatos (RAMÍREZ-CÁRDENAS, 2006), bem como de selênio (FERREIRA *et al.*, 2002). Os grãos de feijão, após sua colheita, foram armazenados em câmara fria até sua preparação para uso nas dietas.

A castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.), branqueada e embalada em bandejas de poliestireno cobertas com filme de PVC, foi obtida em loja de alimentos no mercado de Bélem, PA, Brasil.

As dietas foram formuladas a partir da dieta padrão AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) com modificações, de modo que se obtivessem dietas hiperlipídicas com composição final o mais semelhante possível com relação ao teor de proteína e valor energético (Quadro 1).

A quantidade de castanha-do-Pará empregada na dieta C foi calculada com base no fornecimento, pelo referido alimento, de 4 mg de Se por kg de dieta. A

dieta C+F teve sua percentagem de feijão calculada com base na quantidade máxima permitida quando resguardados todos os ingredientes considerados indispensáveis e considerando ainda informações bibliográficas relativas à quantidade máxima possível de ingestão de feijão por roedores, que não provoque transtornos intestinais. A dieta F teve sua quantidade de feijão semelhante àquela calculada para a dieta F+C.

Neste trabalho, procurou-se ainda manter o mesmo teor de fibra nas dietas alterando-se, todavia, a sua fonte. Nas dietas com feijão (F, F+C), o referido alimento foi a principal fonte de fibra enquanto que nas demais (CN, CP e C), a fibra foi adicionada como celulose. Sabe-se que o efeito protetor da fibra no câncer de cólon está relacionado não apenas com o seu teor na dieta, mas também com o tipo de fibra utilizado e que esta pode mitigar, por vezes, o efeito pro-carcinogênico do consumo de dietas hiperlipídicas.

**Quadro 1.** Formulação das dietas experimentais com base na Dieta Padrão AIN-93G (g kg<sup>-1</sup>)

Ingrediente	Dietas				
	CN	CP	F	C	F+C
Caseína (g)	238,533	238,533	71,000	167,5	0
Amido Dextrinizado (g)	66,000	66,000	0	0	0
Sacarose (g)	60,000	60,000	0	0	0
Celulose (g)	167	167	0	154	0
Mix de Minerais (g)	35 <sup>1</sup>	35 <sup>3</sup>	35 <sup>2</sup>	35 <sup>1</sup>	35 <sup>1</sup>
Mix de Vitaminas (g)	10	10	10	10	10
Óleo de milho (g)	220	220	250	0	0
DL-Metionina (g)	3	3	3	3	3
Bitartarato de colina (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
T-butyl (g)	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
Amido de milho (g)	197,953	197,953	43,944	263,042	0
Feijão (g)	0	0	584,542	0	584,542
Castanha (g)	0	0	0	364,944	364,944

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; <sup>1</sup>Mistura de minerais AIN-93G sem Se; <sup>2</sup>Mistura de minerais AIN-93G com Se; <sup>3</sup>Mistura de minerais AIN-93G com 4 mg de Se na forma de DL-SeMet.

### 2.3. Preparação do material experimental

O feijão utilizado neste experimento foi preparado de acordo com o procedimento doméstico. Inicialmente realizou-se a separação e descarte dos grãos danificados, seguindo-se de lavagem e maceração em água destilada na proporção feijão:água de 1:2 (w/v) por um período de 16 horas de acordo com metodologia

descrita por RAMÍREZ-CÁRDENAS (2006). Após este período, o feijão juntamente com a água de maceração, acrescido de uma quantidade fixa de água destilada de modo a cobrir os grãos, foi cozido em panela de pressão doméstica marca Fagor, a uma pressão de  $1 \text{ kg cm}^{-2}$  por cerca de 5 minutos, contados após a saída constante de vapor pela válvula de pressão. Ao final do cozimento, a pressão foi liberada e os grãos de feijão com sua água de cozimento foram colocados em bandejas de aço inoxidável e secos em estufa de circulação de ar marca HERAEUS, à temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , por aproximadamente 24 horas. Os grãos secos foram então triturados em Termomix modelo TM-21, passados em peneira de 25 mesh, embalados em sacos de PVC e armazenados sob refrigeração até seu uso.

As castanhas foram inicialmente secas em estufa de circulação forçada de ar marca HERAEUS, à temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , por aproximadamente 24 horas e, em seguida, trituradas em Termomix modelo TM-21, embaladas em sacos de PVC e armazenadas sob refrigeração até sua utilização.

#### **2.4. Composição centesimal do material experimental e das dietas**

Para a determinação do teor de umidade, proteína, lipídios, fibra e cinzas no material experimental e nas dietas foram empregados os métodos oficiais recomendados pela AOAC (1999). O teor de carboidratos foi obtido pela subtração percentual dos teores de proteína, lipídios e cinzas.

#### **2.5. Determinação de Se**

Para a determinação de Se, foram pesados aproximadamente 0,3 gramas de amostra em potes de politetrafluoretileno (PTFE) devidamente limpos e identificados aos quais foram adicionados 5 mL de ácido nítrico concentrado, 3 mL de água ultrapura e 2 mL de peróxido de hidrogênio a 30 %, procedendo-se a digestão em microondas marca Milestone, modelo Ethos sel. A programação utilizada no processo de digestão encontra-se no Quadro 2. A exatidão do método foi determinada pela adição de padrão. As análises foram realizadas em triplicata e utilizando brancos reativos.

A determinação da concentração de Se nas amostras foi realizada por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) elegendo-se dentre os isótopos lidos ( $^{74}\text{Se}$ ,  $^{76}\text{Se}$ ,  $^{77}\text{Se}$ ,  $^{78}\text{Se}$  e  $^{82}\text{Se}$ ) o que apresentava menor coeficiente de variação para cada tipo de amostra. A precisão do método foi medida

por 3 leituras seqüenciais da mesma amostra de modo a obter-se o coeficiente de variação.

**Quadro 2.** Programa de digestão do material experimental e dietas em microondas marca Milestone, modelo Ethos sel

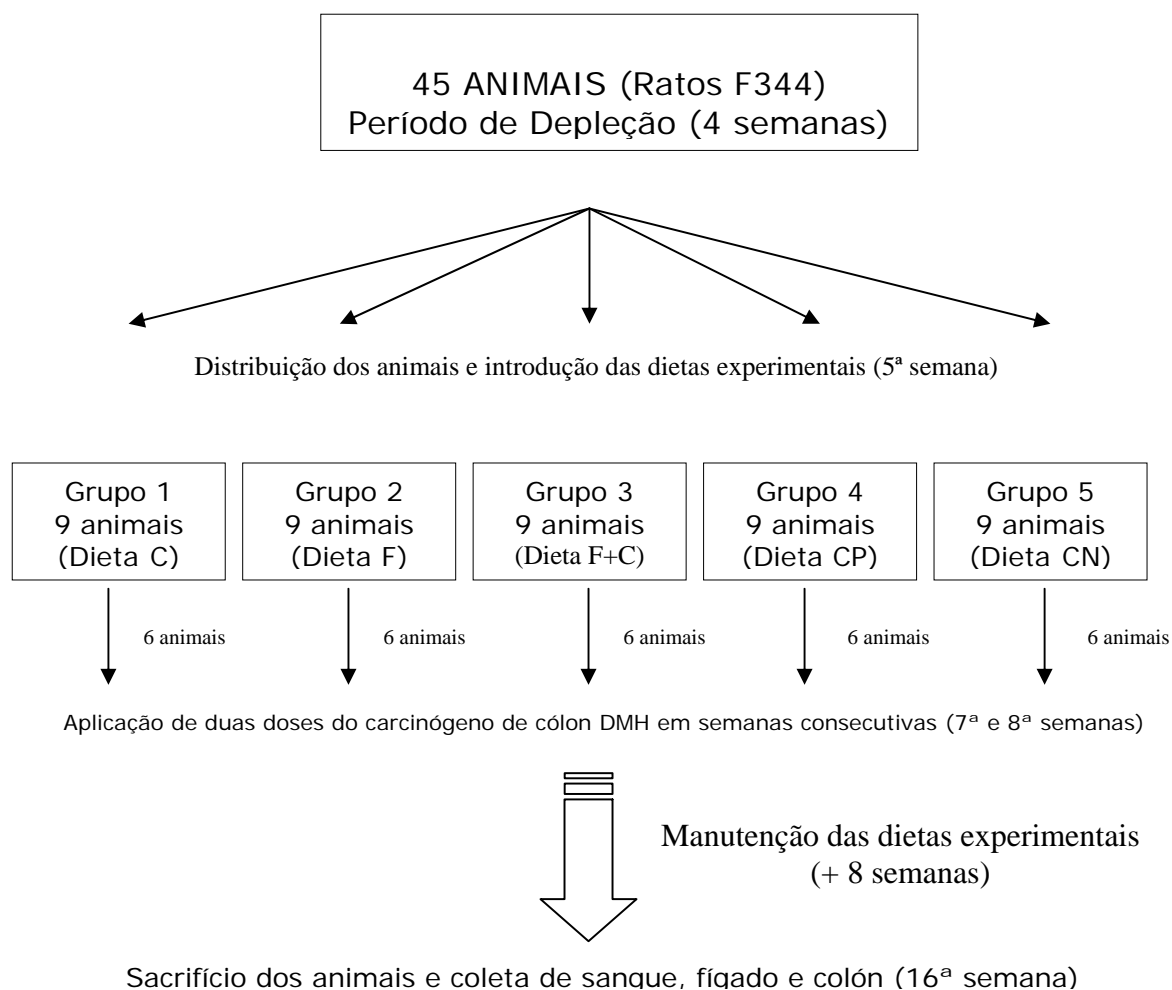
Etapas	Tempo	Temperatura	Potência do microondas
1	5 minutos	Até 100 °C	até 500 W
2	10 minutos	100 °C	até 500 W
3	5 minutos	100 a 200 °C	até 500 W
4	20 minutos	200 °C	até 500 W

## 2.6. Desenho experimental

O desenho experimental seguido está representado na Figura 1 e tomou como referência o modelo proposto por FINLEY *et al.* (2000), com algumas modificações.

Quarenta e cinco ratos F344 machos, com 3 semanas, recém-desmamados, foram pesados e inicialmente alimentados com dieta controle sem Se (CN) por um período de 28 dias (período de depleção em Se). Ao término deste, amostras de sangue de aproximadamente 2 mL foram coletadas da cauda dos animais devidamente anestesiados, e preparadas para determinação de Se plasmático por ICP-MS (descrita no item 2.9) e atividade enzimática de Glutathione Peroxidase (GPx) em eritrócitos (item 2.8.2). Estes índices foram utilizados como biomarcadores do estado nutricional inicial de Se nos animais.

Determinado o estado nutricional inicial de Se, os animais foram divididos em cinco grupos de nove animais (G1, G2, G3, G4 e G5) aos quais foram administradas as dietas anteriormente especificadas (C, F, F+C e CP) permanecendo um grupo com a dieta deficiente em Se (CN).



**Figura 1.** Desenho experimental seguido para avaliação do efeito de distintas dietas experimentais na prevenção do câncer de cólon induzido em ratos F344 por 1,2-dimetilhidrazina (DMH)

Três semanas após a introdução das dietas experimentais, iniciou-se a indução de câncer pela aplicação subcutânea, a seis animais de cada grupo, de duas doses, ministradas em semanas consecutivas, do carcinógeno de cólon 1,2-dimetilhidrazina · 2HCl (DMH, 25 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, dissolvido em solução de EDTA 1 mmolar e corrigido para pH 6,5 com NaOH 0,1 M). Aos três animais restantes foram aplicadas injeções do veículo (solvente) os quais constituíram os grupos controle para indução de câncer dentro de cada tratamento.

Após a aplicação das injeções, os animais foram mantidos nas dietas experimentais por mais oito semanas consecutivas até seu sacrifício.

Durante todo o período experimental, o peso e consumo alimentar dos animais foram registrados semanalmente e utilizados para os cálculos de ganho de

peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA= ganho de peso (g) / consumo alimentar (g) x 100).

## **2.7. Sacrifício dos animais e coleta de material para análise**

Ao término do período experimental, os animais foram sacrificados por exsanguinação via punção cardíaca, após anestesia intraperitoneal com uma combinação de ketamina ( $75 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal) e xilazina ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal). O sangue foi coletado em tubos com heparina e distribuído em microtubos para sua devida preparação e/ou acondicionamento de acordo com o protocolo da análise a que se destinava. O fígado foi rapidamente coletado, limpo em solução salina, pesado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior análise. O cólon dos animais foi coletado e a sua porção distal foi esvaziada por meio da passagem pelo seu interior de solução fixadora de formaldeído a 10 %. Em seguida, os fragmentos de cólon distal foram fixados na mesma solução e destinados às análises histológicas.

## **2.8. Análise enzimática**

### **2.8.1. Preparo das amostras**

Imediatamente após a coleta do sangue, tomou-se uma alíquota de cada amostra e procedeu-se a sua separação em plasma e eritrócitos por meio de centrifugação a  $1.000 \times g$  por 10 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Desta forma, a camada de plasma sobrenadante foi pipetada e armazenada em microtubos a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Descartada a camada de leucócitos que separa as duas frações, foi adicionado aos eritrócitos precipitados 4 volumes de água fria grau HPLC sendo, em seguida, centrifugados a  $10.000 \times g$  por 15 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , provocando assim a ruptura das células vermelhas. Ao final do processo de centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até a realização da análise de atividade enzimática.

Para obtenção de homogenato de fígado, pesou-se 1 g de amostra ao qual foi adicionado 5 mL de tampão frio (tampão fosfato de sódio 50 mM com 0,40 mM de EDTA e 1 mM de DTT, pH 7 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), seguindo-se sua homogeneização e centrifugação do homogenato a  $12000g$  por 15 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi armazenado a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até sua análise.

### 2.8.2. Análise da atividade de glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST)

As amostras de plasma, eritrócitos e homogenato de fígado foram analisadas para atividade de GPx seguindo-se o método proposto por PAGLIA e VALENTINE (1967) com algumas modificações. Peróxido de hidrogênio foi utilizado como substrato. A análise foi realizada à temperatura de 37 °C, em autoanalisador Cobas Mira plus. O controle de qualidade foi obtido pela utilização de padrão da enzima GPx, originada de eritrócito bovino, e pelo estudo de precisão a partir da obtenção de sete leituras consecutivas da mesma amostra.

A análise de GST em homogenato de fígado seguiu o método descrito por HABIG *et al.* (1974) utilizando-se 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A análise foi realizada à temperatura ambiente (25 °C) utilizando-se espectrofotômetro UV-visível, modelo U-2000, marca Hitachi. O controle de qualidade foi obtido pelo estudo de precisão a partir da obtenção de sete leituras consecutivas da mesma amostra.

### 2.9. Análise da concentração de Se em plasma sanguíneo

Para análise da concentração de Se em plasma sanguíneo, procedeu-se, inicialmente, a digestão fechada das amostras em microondas marca Milestone, modelo Ethos sel.

Alíquotas de 100 µL de plasma foram acondicionadas em potes de TFM aos quais foram adicionados 400 µL de ácido nítrico e 200 µL de peróxido de hidrogênio. O programa de digestão utilizado encontra-se no Quadro 3.

**Quadro 3.** Programa de digestão de amostras de plasma sanguíneo em Microondas Marca Milestone modelo Ethos sel

Etapas	Tempo	Potência do microondas
1	2 minutos	250 W
2	1 minuto	0 W
3	5 minutos	400 W
4	5 minutos	500 W

Após a digestão, as amostras foram diluídas com água ultra pura para um volume de 10 mL e analisadas por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) conforme descrito no item 2.5.

## 2.10. Análises histológicas do cólon

As amostras de cólon distal foram submetidas à técnica padrão de coloração (HE) e à técnica histoquímica Orceína-Azul de alcian para determinação morfométrica de alterações histológicas das criptas e do padrão de glicoproteínas do muco, respectivamente.

Fragmentos de cólon distal foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, clareados em xilol e incluídos em parafina histológica a 58 °C.

Foram obtidas secções histológicas semi-sequenciais, transversais e longitudinais, de 3 µm de espessura, com intervalo de 50 µm entre secções. As preparações foram então coradas segundo as técnicas descritas a seguir.

A análise do padrão de secreção de mucinas ácidas e quantificação de células secretoras de sulfomucinas, sialomucinas e de secreção mista foi realizada empregando-se a técnica alternativa Orceína-Azul de alcian (Orceína-AA), descrita por SINGH e GORTON (1989) com algumas modificações. Seções de 3 µm de tecido embebido em parafina foram hidratadas e oxidadas em solução de 0,25 % de permanganato de potássio diluído em solução de ácido sulfúrico a 0,25 % por 1 minuto, seguindo-se de sua descoloração em solução de ácido oxálico a 2 % por aproximadamente 5 segundos. As seções foram então lavadas em água destilada e coradas por 6 horas em solução de orceína (pH 1,5), obtida pela diluição de 1 g de orceína sintética em 100 mL de álcool 75 % adicionado de 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. As preparações foram então lavadas por 10 minutos em água corrente e diferenciadas em solução alcoólica acidificada por 10 segundos. As preparações foram novamente lavadas em água e coradas, por 2 minutos, em Azul de Alcian (pH 2,5) 1 %, diluído em 3 % de ácido acético, seguindo-se os procedimentos de desidratação, diafanização e montagem. Realizadas as contagens, obtiveram-se as percentagens de células secretoras de sulfomucinas (SUM), sialomucinas (SIM) e de secreção mista (SUMSIM) bem como o quociente entre as percentagens de SIM e SUM (SIM:SUM).

As seções histológicas de cólon submetidas às técnicas de coloração acima descritas foram analisadas por microscopia de luz em conjunto com o software Image-Pro Plus da Cybernetic.

No estudo morfométrico, utilizando secções de tecido colônico coradas com HE, foram determinados a altura de cripta em número de células, obtida pela contagem das células colunares, altura de cripta pela medição do comprimento da

cripta desde a base até seu ápice, diâmetro da base da cripta medindo-se o maior diâmetro da porção inferior da cripta com lúmen visível, diâmetro do ápice da cripta medindo-se o maior diâmetro da porção superior da cripta voltada para o lúmen do cólon e densidade de cripta, obtida pela contagem do número de criptas por mm linear de cólon.

As medições e contagens foram realizadas em criptas inteiras, seccionadas longitudinalmente, onde pudesse ser observado, tanto quanto possível, a luz da glândula desde a base, logo acima da muscular da mucosa, até o ápice, voltado para o lúmen colônico. Para as determinações acima especificadas foram analisadas, no mínimo, 20 criptas por animal.

### **2.11. Análise estatística**

O experimento foi montado seguindo-se o esquema fatorial 5x2, correspondendo a cinco dietas e a aplicação ou não do carcinógeno de cólon DMH. Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições para aplicação de DMH e 3 repetições sem aplicação do carcinógeno.

Os dados foram interpretados por meio de análise de variância, e as médias testadas pelo teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Para tanto, lançou-se mão do programa Sistema para Análises Estatísticas - SAEG, versão 9.0, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (FUNARBE, 2000).

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1. Composição centesimal e concentração de Se**

A composição centesimal e concentração de Se do feijão e da castanha-do-Pará e das dietas estudadas encontram-se no Quadro 4. Os teores de proteína, lipídio, fibra e Se no material experimental foram utilizados como base para o cálculo dos constituintes das dietas experimentais usadas no ensaio biológico.

**Quadro 4.** Composição centesimal e concentração de Se de feijão e castanha-do-Pará e das dietas experimentais em base úmida

Material experimental	Umidade	Proteína	Lipídio	Fibra	Cinza	Carboidrato	Se
	----- g/100g -----						µg/100g
Feijão	6,35	24,36	1,45	23,55	4,29	63,55	12,36
Castanha	1,89	16,55	70,58	nd	3,56	7,42	1199,80
Dieta							mg kg <sup>-1</sup>
CN	3,05	20,97	22,47	nd	3,67	49,84	0,15
CP	2,64	21,36	22,24	nd	3,42	50,34	4,34
F	4,39	19,97	25,41	nd	5,41	44,82	0,26
C	3,48	20,92	24,13	nd	4,77	46,70	4,25
F+C	4,53	20,75	24,64	nd	6,59	43,49	3,82

Média de três determinações; CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; nd= não determinado.

Embora a dieta CN tenha sido elaborada com mistura de minerais isenta de Se, observa-se, de acordo com os dados de concentração de Se nas dietas, que a mesma apresentou o nível recomendado do nutriente para os animais em estudo. O Se presente nesta dieta deve, em grande parte, ser proveniente da caseína utilizada na sua composição.

## 3.2. Ensaio Biológico

### 3.2.1. Consumo, ganho de peso e CEA

No período de depleção de Se, os valores médios de consumo diário, ganho de peso e CEA dos animais foram, respectivamente, 16,46±0,22 g por dia, 108,61±13,17 g e 24,75±1,70 %. Ao final deste período, os animais apresentaram atividade média de GPx em eritrócitos de 209,14±29,41 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de Hg (CV= 14,06 %) e concentração de Se plasmática de 219,54±24,49 µg L<sup>-1</sup> (CV=11,15 %). A concentração de Se plasmática observada encontra-se abaixo dos valores reportados por UTHUS *et al.* (2002), de 588,25 µg L<sup>-1</sup>, e por FINLEY *et al.* (2000), de 577,20 µg L<sup>-1</sup>, em ratos F344 com níveis normais de Se, o mesmo ocorrendo para a atividade GPx em eritrócitos de acordo com resultados obtidos por FENG *et al.* (1999).

Tem sido demonstrado que a suplementação de Se, em doses acima da recomendação nutricional, apresenta maior efeito sobre a redução da incidência de vários tipos de câncer em indivíduos onde o nível de Se no plasma mostrou-se

relativamente mais baixo ao início da investigação (CLARK *et al.*, 1996) denotando que o estado nutricional inicial de Se tem efeito sobre a resposta à suplementação.

Os dados médios de consumo alimentar total, ganho de peso e CEA dos animais durante o período experimental que se seguiu à depleção de Se são apresentados no Quadro 5.

**Quadro 5.** Consumo alimentar (CA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais em função das dietas experimentais

Dieta	CA (g)	GP (g)	CEA (%)
CN	1357,81a	161,32a	11,88c
CP	1344,33a	160,94a	11,97bc
F	1178,93bc	155,64a	13,20ab
C	1194,21b	144,54a	12,10bc
F+C	1156,50c	155,48a	13,44a

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha. Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Os valores médios de consumo das dietas controle (CN e CP) foram estatisticamente semelhantes e significativamente mais elevados que os das dietas F, C e F+C sendo observado, entre estas, redução significativa de consumo da dieta F+C em relação à dieta C. Entretanto, tais diferenças de consumo entre as dietas não influenciaram nos resultados de ganho de peso dos animais, os quais se mostraram estatisticamente iguais. Este fato pode ser explicado pelo maior coeficiente de eficiência alimentar dos grupos de animais alimentados com as dietas experimentais de menor consumo (F e F+C) os quais apresentaram valores médios superiores aos grupos das dietas de consumo mais elevado (CN e CP) não sendo observadas diferenças significativas entre as dietas CN, CP e C.

Considerando-se a ausência de diferenças significativas de consumo entre as dietas CN e CP e do CEA entre as dietas CN, CP e C, pode-se inferir que o teor de Se parece não ter influenciado tais parâmetros.

Grande parte das diferenças observadas no CEA entre os grupos de animais parece estar relacionada com a presença de feijão nas dietas experimentais F e F+C as quais apresentaram valores mais elevados.

As alterações na ingestão média de Se promovidas pelo consumo diferenciado das dietas experimentais, com dose elevada do nutriente (CP, C e

F+C), mostraram-se insignificantes em virtude, principalmente, da magnitude da concentração de Se presente nas mesmas ( $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) não sendo, portanto, consideradas na avaliação dos efeitos relativos ao nutriente.

### **3.2.2. Atividade enzimática de GPx e GST e concentração plasmática de Se**

O efeito do Se na prevenção do câncer é frequentemente observado em nível supranutricional ou farmacológico, e a bioatividade específica do Se depende de sua forma química (COMBS e GRAY, 1998). Entretanto, o mecanismo específico pelo qual o Se inibe o câncer não está claro. Potenciais mecanismos podem incluir vias mediadas pelas selenoproteínas, alteração na atividade de enzimas de detoxificação, proteção antioxidante, controle do ciclo celular, estimulação do apoptose e inibição específica do crescimento de células tumorais pela produção de metabólitos específicos de Se (WHANGER, 2004).

Considerando-se que a GPx age na conversão de peróxidos para compostos menos danosos e devido aos danos peroxidativos associados com o câncer, é razoável assumir que estas peroxidases poderiam estar envolvidas na redução de tumores. Todavia, há poucas informações que suportam esta possibilidade. De acordo com WHANGER (2004), a maior proteção do Se contra tumores ocorre em níveis elevados de ingestão do elemento, mas a atividade de GPx atinge seu ponto máximo a níveis nutricionais com nenhum aumento a níveis mais elevados em muitos tecidos.

Por outro lado, é difícil prever o comportamento da GPx nos vários tecidos, em níveis mais elevados de ingestão de Se e sob condições fisiológicas distintas, como observado por BELLISOLA *et al.*, (1996). A presença de polimorfismos genéticos de GPx e sua associação com o risco de câncer é outro fator que pode alterar o requerimento mínimo de Se para expressão máxima da atividade GPx em humanos (RATNASINGHE *et al.*, 2000; HU e DIAMOND, 2003; ICHIMURA *et al.*, 2004).

O sangue contém três tipos de selenoproteínas já identificadas. No plasma sanguíneo são encontradas a GPx plasmática ou extracelular e a selenoproteína P enquanto que os eritrócitos contêm a mais abundante forma de GPx contendo Se, a GPx intracelular, celular ou citosólica (COHEN *et al.*, 1985).

Os valores obtidos de atividade GPx em plasma e eritrócitos encontram-se no Quadro 6. Foram observadas diferenças significativas, tanto na

atividade de GPx plasmática quanto eritrocitária, entre os grupos de animais alimentados com as dietas CN e CP. Considerando-se a atividade de GPx plasmática, não foi observada diferença significativa entre as dietas CP, F e C. Entretanto, a dieta F+C mostrou-se significativamente inferior à dieta CP. Ao que parece, o consumo conjunto da castanha e do feijão na dieta F+C reduziu a atividade GPx plasmática dos animais, levando a diferenças significativas na indução da atividade da enzima quando comparado com a dieta com mesmo nível de Se suprido na forma de selenometionina.

**Quadro 6.** Atividade de glutathiona peroxidase plasmática (GPx plasmática) e glutathiona peroxidase eritrocitária (GPx eritrocitária) nos animais em função das dietas experimentais

Dieta	GPx plasmática (nmol min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	GPx eritrocitária (nmol min <sup>-1</sup> mg de Hg <sup>-1</sup> )
CN	2170,62c	231,65b
CP	2834,91a	315,98a
F	2535,64ab	241,46b
C	2505,36abc	310,04a
F+C	2333,83bc	299,58a

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha. Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Foi observado ainda, que as dietas com níveis supranutricionais de Se fornecido pela castanha (C e F+C) apresentaram atividade GPx plasmática semelhante à dieta sem adição de Se (CN). Este fato se deu, provavelmente, devido à saturação da enzima em níveis de Se próximos à recomendação nutricional não sendo, portanto, atribuída à biopotência das formas de Se presentes na castanha-do-Pará na expressão da atividade GPx plasmática.

WEISS *et al.* (1997), estudando o efeito de níveis crescentes de Se (0,0 a 0,2 mg kg<sup>-1</sup>) na forma de selenito de sódio na regulação da atividade GPx em ratos, observaram que a atividade GPx plasmática alcançava o seu platô próximo a 0,1 mg kg<sup>-1</sup> não sendo observado nenhum aumento significativo quando dietas com 0,15 e 0,20 mg kg<sup>-1</sup> foram empregadas.

Avaliando-se a atividade GPx em eritrócitos, verificou-se que as dietas C e F+C apresentam-se estatisticamente iguais à dieta CP enquanto a dieta CN mostrou-se inferior a estas e estatisticamente semelhante à dieta F.

A promoção da atividade GPx eritrocitária nos grupos de animais alimentados com doses supranutricionais de Se (dietas CP, C e F+C) indica que níveis acima da recomendação nutricional do elemento podem ser requeridos para obtenção da expressão máxima da enzima. Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por WEISS *et al.* (1997), que estudando o padrão de comportamento da enzima em níveis crescentes de suplementação com Se, constataram elevação da atividade GPx eritrocitária em doses de Se acima da recomendação nutricional, em contraste com a atividade da enzima em plasma e tecido hepático. Já FENG *et al.* (1999), avaliando o efeito protetivo de doses crescentes de Se na forma de sais inorgânicos (selenito e selenato de sódio) e selenometionina sobre a carcinogênese de cólon em ratos, observaram elevação da atividade GPx, tanto hepática quanto eritrocitária, quando do emprego de doses supranutricionais do elemento em relação às dietas deficientes e adequadas em Se em todas as formas estudadas. Outros pesquisadores (HAFEMAN *et al.*, 1974), constataram ainda que a atividade de GPx eritrocitária continua a elevar-se até níveis dietéticos de Se próximos à toxidez.

Em ambas as variáveis não foi verificado efeito do carcinógeno e da interação dieta x carcinógeno, indicando que as diferenças observadas na atividade GPx plasmática e eritrocitária entre os grupos de animais não foram influenciadas pela presença de DMH (Quadro 7).

**Quadro 7.** Resumo da análise de variância para atividade de glutathiona peroxidase plasmática (GPx plasmática) e glutathiona peroxidase eritrocitária (GPx eritrocitária) de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução de câncer de cólon com DMH

FV	GL	----- Quadrado Médio -----	
		GPx plasmática (nmol min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	GPx eritrocitária (nmol min <sup>-1</sup> mg de Hg <sup>-1</sup> )
Dietas	4	493401,20**	12806,89**
Carc	1	74002,17 <sup>ns</sup>	417,14 <sup>ns</sup>
Dietas*Carc	4	38644,70 <sup>ns</sup>	1129,36 <sup>ns</sup>
Resíduo	35	69226,80	1183,01
CV(%)		10,69	12,34

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

No Quadro 8 são apresentados os valores médios das atividades de GPx e GST hepáticas. De acordo com a análise estatística dos dados observaram-

se efeitos significativos isolados, das dietas e da aplicação de DMH. Ambas as enzimas apresentaram comportamento idêntico com relação às dietas estudadas, ou seja, os níveis hepáticos de atividade das enzimas antioxidantes GPx e GST foram significativamente maiores nos grupos de animais alimentados com as dietas CP, F, C e F+C em relação ao grupo da dieta controle sem adição de Se (CN), o que implica em uma promoção, por parte destas dietas, da capacidade antioxidante para defesa contra o estresse oxidativo.

O efeito na redução da atividade de ambas as enzimas no grupo de animais alimentados com a dieta CN ocorreu, provavelmente, em função do seu nível reduzido de Se quando comparado com a dieta CP, C e F+C. Este fato denota a participação do Se na modulação da atividade enzimática, tanto de GPx quanto de GST hepáticas, sob níveis diferenciados do elemento, corroborando com resultados obtidos por outros pesquisadores (MASUKAWA *et al.*, 1984; DAVIES *et al.*, 1987; CHRISTENSEN *et al.*, 1994).

**Quadro 8.** Atividade de glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST) em homogenato de fígado de ratos alimentados com dietas experimentais e em ratos submetidos ou não à indução de câncer de cólon com DMH

Dieta	GPx hepática (nmol min <sup>-1</sup> mg de P <sup>-1</sup> )	GST hepática (nmol min <sup>-1</sup> mg de P <sup>-1</sup> )
CN	95,06b	56,20b
CP	141,63a	70,49a
F	137,20a	69,51a
C	125,96a	68,63a
F+C	133,52a	79,01a
DMH		
+	119,94b	71,39a
-	133,41a	66,14b

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; DMH: 1,2-dimetilhidrazina · 2HCl ; (+) com DMH; (-) sem DMH. Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Em estados de deficiência de Se, a atividade GPx hepática tem mostrado decrescer mais rapidamente que outras selenoproteínas (YANG *et al.*, 1989). Na dieta CN, a dose de Se em nível aproximado ao requerimento nutricional, preveniu a saturação da atividade GPx, uma selenoproteína, segundo WEISS *et al.* (1997), de relativamente baixa hierarquia para uso do Se. Entretanto, nas demais

dietas, o Se foi suficiente para maximizar a atividade da enzima, não sendo verificadas diferenças significativas entre elas.

Vale salientar, que para GST, estudos têm constatado elevação de sua atividade hepática quando do emprego de dietas deficientes no nutriente como mecanismo compensatório da redução da atividade GPx sob tais condições (CASES *et al.*, 1999; FINLEY *et al.*, 2000). Todavia, nesse estudo, o nível de Se presente na dieta CN não deve, provavelmente, ter sido suficientemente baixo para promover o efeito compensatório mencionado.

A ausência de diferenças significativas entre os níveis de atividade de GPx hepática entre a dieta com feijão (F; Se= 0,26 mg kg<sup>-1</sup>) e as demais dietas com níveis elevados de Se (CP, C e F+C; aprox. 4,0 mg kg<sup>-1</sup>) sugere um possível efeito platô da atividade GPx no fígado quando do emprego de concentrações acima do nível de ingestão considerado adequado para roedores como verificado por WEISS *et al.* (1997).

Entretanto, considerando ambas as enzimas hepáticas, outros fatores presentes no feijão, podem estar contribuindo na modulação de suas atividades.

De acordo com alguns pesquisadores (WATTENBERG, 1992; DASHWOOD, 1999; MANSON *et al.*, 2000; REDDY, 2000), alimentos vegetais são portadores de numerosos agentes anticarcinogênicos os quais apresentam vários mecanismos potenciais de ação na iniciação e em estágios posteriores de carcinogênese. Compostos classificados como agentes bloqueadores podem prevenir ou reduzir consideravelmente a iniciação do processo cancerígeno em função de vários fatores dentre os quais estão à capacidade de alteração da atividade de enzimas que metabolizam drogas tanto na fase I como na fase II do sistema celular de detoxificação de xenobióticos bem como pela captura ou redução na formação de oxigênio reativo e outras espécies de radicais livres, ou seja, na capacidade antioxidante da célula.

No que se refere ao feijão como agente protetor do câncer, estudos desenvolvidos por AZEVEDO *et al.* (2003) têm constatado a ação antimutagênica de polifenóis presentes no feijão ou de seus extratos em ratos submetidos a substâncias mutagênicas. De acordo com estes autores, os polifenóis presentes no feijão poderiam ter agido de quatro maneiras diferentes: (1) inibindo o metabolismo de benzopireno e reduzindo a concentração final de seus metabólitos ativos; (2) capturando metabólitos eletrofílicos intermediários; (3) interagindo diretamente com

o composto mutagênico final e; (4) estabelecendo um complexo com o composto, reduzindo sua biodisponibilidade. Uma outra possibilidade seria a alteração do metabolismo hepático promovendo redução da quantidade de metabólitos ativos circulando pelo sangue e, conseqüentemente, induzindo menos dano ao DNA.

HELSEBY *et al.* (2000), estudando o efeito antimutagênico de dieta com farelo de trigo por meio da modificação de enzimas que metabolizam xenobióticos observaram que a suplementação de dietas com farelo de trigo, alimento rico em fibras, reduziu a atividade de GST hepática enquanto que a atividade GST colônica foi elevada. Todavia, os mesmos autores observaram que, a utilização de um produto comercial derivado do farelo de trigo com menor teor de fibra e acrescido de vitaminas, minerais e vários fitoquímicos mostrou um potente efeito na elevação de ambas as enzimas mencionadas.

Diante do exposto, pode-se inferir que o efeito da dieta F na atividade GST deve provavelmente estar relacionado com a presença de micronutrientes e fitoquímicos promovidos pelo feijão, adicionando-se ou não ao efeito da fibra presente nesta leguminosa. Estas observações podem ser corroboradas pela verificação de uma tendência de elevação da atividade enzimática de GST no grupo de animais alimentados com a dieta F+C em relação àqueles das dietas onde a castanha e o feijão foram utilizados isoladamente (C e F), embora não tenha sido possível detectar diferenças significativas entre eles.

Independente da dieta utilizada, a aplicação de DMH promoveu redução na atividade de GPx e elevação da atividade de GST. Tal efeito deve relacionar-se com a função específica de cada enzima o que, por sua vez, pode estar influenciando na utilização do cofator glutationa (GSH) comum às duas enzimas sob estudo.

DESAI *et al.* (2001), estudando a atividade de enzimas dependentes de glutationa em ratos suplementados com antioxidantes e tratados com carcinógenos, verificaram que a atividade GPx hepática reduziu em animais expostos aos carcinógenos enquanto que a atividade GST se elevou quando o Se foi utilizado como suplemento antioxidante.

GSH, GST e Se apresentam um importante papel na detoxificação de xenobióticos. A GSH e suas enzimas relacionadas assim como GPx e GST estão envolvidas na detoxificação intracelular (GUY *et al.*, 2000). Sabe-se que a GST possui um papel fisiológico no sistema de detoxificação de xenobióticos iniciando a

detoxificação de potentes agentes alquilantes (TRAKSHEL *et al.*, 1988, HABIG *et al.*, 1974). Esta enzima cataliza a reação de tais compostos com o grupo SH da glutationa, originando produtos que são mais solúveis em água (HABIG *et al.*, 1974). O Se é um elemento traço essencial na nutrição humana funcionando como co-fator da GPx (EDENS *et al.*, 2001). A GPx dependente de Se bem como outras enzimas antioxidantes estão envolvidas na eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS).

O DMH é um procarcinógeno que requer ativação dentro do organismo para transformar-se em carcinógeno ativo (LAMONT e O'GORMAN, 1978). A ativação metabólica do DMH inclui primeiramente sua oxidação a azometano (FIALA *et al.*, 1976); uma segunda oxidação converte o azometano em azoximetano, que é logo N-hidroxilado a metilazoximetanol, transformações que ocorrem no fígado e possivelmente em outros tecidos (LAMONT e O'GORMAN, 1978). O metilazoximetanol é instável quimicamente à temperatura corporal; *in vitro* é descomposto espontaneamente em formaldeído, água e nitrogênio. Durante este processo se forma um agente alquilante, o metildiazônio, o qual gera um íon carbônico capaz de metilar DNA, RNA e proteínas (MATSUMOTO e HIGA, 1966). A ação carcinogênica do DMH envolve, portanto, metilação do DNA de células epiteliais do cólon (HAWKS e MAGEE, 1974).

Nesse contexto, a principal função da enzima GST está relacionada à degradação do DMH na Fase II do sistema de detoxificação de xenobióticos presentes nas células hepáticas. A presença do carcinógeno, portanto, pode ter tido efeito sobre a modulação da atividade das duas enzimas no sentido de promover a metabolização do DMH e seu consequente processo de eliminação.

Os dados médios de concentração plasmática de Se estão apresentados no Quadro 9.

**Quadro 9.** Concentração plasmática de Se nos animais em função das dietas experimentais e da aplicação de DMH

Dieta	Concentração plasmática de Se ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	DMH +	DMH -
CN	211,61dA	233,96cA
CP	473,57cA	484,59cA
F	374,28cA	325,07cA
C	1768,87aB	2076,83aA
F+C	1266,53bA	1317,77bA

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; DMH: 1,2-dimetilhidrazina · 2HCl; (+) com indução química e (-) sem indução química de câncer de cólon. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula nas colunas ou maiúscula nas linhas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

De acordo com a análise estatística foi verificado efeito significativo da interação dieta x carcinógeno. Em ambos os grupos de animais submetidos e não submetidos ao DMH, as dietas tenderam a apresentar o mesmo efeito sobre a variável estudada. Neste sentido, os grupos de animais alimentados com a dieta sem adição de Se (CN) apresentaram níveis inferiores de Se plasmático em relação aos demais, enquanto que as dietas com níveis supranutricionais fornecidos pela castanha (C e F+C) promoveram elevação considerável deste parâmetro, diferindo-se significativamente da dieta CP com mesmo nível de Se suprido na forma de SeMet. Observa-se ainda, que a dieta F manteve níveis plasmáticos de Se idêntico à dieta CP. Quando o feijão foi adicionado à dieta com castanha (F+C), verificou-se redução significativa na concentração plasmática de Se em relação à dieta onde a castanha foi utilizada isoladamente.

Em relação às diferenças observadas entre os grupos de animais submetidos e não submetidos ao carcinógeno, dentro de cada dieta experimental, verifica-se que apenas os animais alimentados com a dieta C apresentaram redução na concentração plasmática de Se quando expostos ao carcinógeno de cólon, enquanto que nos demais grupos experimentais não houve diferença significativa.

De acordo com BURK *et al.* (2001), a concentração total de Se plasmático reflete a soma de dois “pools” principais. O primeiro envolve o Se que está presente como selenometionina e que é incorporado na albumina (principal proteína plasmática) de forma não específica. O segundo, diz respeito ao Se que é incorporado em selenoproteínas como a selenoproteína P e GPx plasmática, as quais, por sua vez são claramente reguladas por mecanismos intrínsecos.

BURK e LEVANDER (1999) afirmam que em condições adequadas de Se em humanos, aproximadamente 8  $\mu\text{g}$  de Se  $\text{dL}^{-1}$  de plasma são necessários para satisfazer os requerimentos fisiológicos da enzima GPx plasmática e da selenoproteína P. Concentrações de Se no plasma abaixo deste nível constituem bons índices do grau de comprometimento da ingestão e do estado nutricional de Se. Em níveis de ingestão mais altos, o Se no plasma continua a elevar-se, mas a intensidade de correlação com a ingestão dietética depende da forma química do Se na dieta.

FINLEY e colaboradores (2000) pesquisaram o efeito de dietas com doses supranutricionais de Se na forma de selenato de sódio e brocoli enriquecido com Se na proteção do câncer cólon em ratos F344 submetidos à indução química da doença. Foi observado que na dieta com selenito o nível de Se plasmático atingiu seu máximo na dose de 0,1  $\mu\text{g}$   $\text{kg}^{-1}$  não havendo acréscimo quando dose mais elevada do nutriente foi empregada. Entretanto, na dieta com brocoli, observou-se elevação contínua da concentração de Se no plasma quando da utilização do nível supranutricional do nutriente. Isto indica, de acordo com o autor, diferenças no metabolismo do Se em virtude, provavelmente, da presença de diferentes formas químicas do elemento no brocoli enriquecido o que promoveu a elevação paulatina dos níveis de Se plasmático nos animais.

Estudos de “especificação” de Se em castanha-do-Pará identificaram a selenometionina como a principal forma do elemento (VONDERHEID *et al.*, 2002; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2002; WROBEL *et al.*, 2003; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2005). CHUNHIENG *et al.* (2004) e DUMONT *et al.* (2006), detectaram selenometionina e selenocisteína como os principais componentes dessa matrix sendo o primeiro o maior componente encontrado. Tais estudos têm confirmado a associação do Se às proteínas da castanha, contudo, a natureza destas selenoproteínas ainda necessita ser caracterizada bem como a identificação e quantificação das demais formas de Se presentes em menor quantidade na castanha-do-Pará. Em adição, tem sido constatado que a concentração de Se em castanha-do-Pará pode variar de 0,20 a 253  $\mu\text{g}$   $\text{kg}^{-1}$  dependendo da sua área geográfica de produção (SECOR e LISK, 1989; CHANG *et al.*, 1995). Tal variação pode promover alterações qualitativas nas formas do elemento a exemplo do que ocorre em alho enriquecido com Se onde, a baixas concentrações do nutriente, a selenometilcisteína (SeMCys) é a forma principal de Se, predominando, em altas

concentrações, a forma alfa-glutamil-selenometilcisteína ( $\gamma$ -glutamil-SeMCys) (DONG *et al.*, 2001).

O fornecimento, pela castanha-do-Pará, de níveis supranutricionais de Se nas dietas C e F+C elevou sobremaneira a concentração plasmática do nutriente em relação à dieta com o mesmo nível de Se na forma de selenometionina (CP). De modo contrário, a percentagem de Se associada à GPx plasmática foi maior em animais alimentados com nível elevado de Se na dieta CP comparativamente com os animais alimentados com as dietas C e F+C (Tabelas 3 e 5). Desta forma, é de se supor que a elevação da concentração de Se plasmática observada em animais alimentados com as dietas C e F+C pode estar relacionada não só à incorporação não específica em proteínas plasmáticas do elemento presente na forma principal de selenometionina na castanha, mas também com um possível metabolismo diferenciado das outras formas de Se contidas na noz.

Contudo, estudos realizados por IP e LISK (1999) não confirmam esta hipótese. Estes pesquisadores, objetivando verificar um possível acúmulo diferenciado de Se em tecidos e plasma de ratos alimentados com dietas elevadas no nutriente ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) fornecidos por fontes diferenciadas, observaram que, nos animais supridos com Se na forma de SeMeta ou de castanha-do-Pará, a concentração de Se nos tecidos e no plasma superou àquelas verificadas quando a fonte de Se foi o selenito ou o alho e a cebola enriquecidos. Eles observaram ainda que, contrariamente o verificado neste trabalho, os níveis de Se plasmático nos animais alimentados com SeMet e castanha-do-Pará não diferiram entre si, apresentando concentrações de  $940,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $900,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, o que denota um comportamento semelhante no metabolismo e acúmulo de Se no plasma entre a SeMet e o Se presentes na castanha-do-Pará quando ingeridos a doses elevadas do elemento.

O efeito pronunciado do Se fornecido pela castanha-do-Pará sobre a concentração do nutriente no plasma sanguíneo dos ratos deve-se, portanto, às condições experimentais específicas neste estudo, as quais podem ter alterado a resposta dos animais à incorporação de Se no plasma.

#### **3.2.4. Análises histoquímicas e morfométricas**

No processo de carcinogênese de cólon o intercâmbio entre a proliferação, diferenciação e apoptose é muito importante. De acordo com CHANG *et*

*al.*, 1997, o aumento ou descontrole da proliferação celular, falhas no processo de diferenciação e redução da apoptose podem coletivamente levar a mudanças na morfologia e arquitetura do cólon e da cripta, aumentando o volume celular e elevando a probabilidade de progressão de mutações celulares que podem estar presentes. Desta forma, tem sido sugerido recentemente que a medição destes fatores pode apresentar maior significância prognóstica na avaliação dos efeitos dietéticos sobre a incidência de tumores e o risco de câncer de cólon.

O epitélio da mucosa colônica apresenta células secretoras de mucosubstâncias que se diferenciam principalmente em função das características do muco produzido e liberado por elas (SHEAHAN e JERVIS, 1976).

Numerosos estudos têm utilizado análises histoquímicas e do padrão de secreção e da distribuição de mucosubstâncias do epitélio gastrointestinal como biomarcadores de alterações em estados patológicos induzidos experimentalmente em animais de laboratório (SHEAHAN e JERVIS, 1976; HONG *et al.*, 1997; JENAB e THOMPSON, 2000) ao mesmo tempo em que estudos histoquímicos similares têm sido conduzidos em epitélio gastrointestinal humano sob várias condições (FILIPE e BRANDFOOT, 1974; SHEAHAN e JERVIS, 1976; BOLAND *et al.*, 1982; SUNTER, 1984; HOLT *et al.*, 1998; BERNSTEIN *et al.*, 2002).

#### **3.2.4.1. Diferenciação celular: determinação de sulfomucinas e sialomucinas**

Dentre os métodos histoquímicos mais usados na determinação do padrão de secreção de mucinas ácidas está o método introduzido por SPICER (1965) de Alto ferro diamina-azul de alcian (HID-AB). Este método distingue mucosubstâncias ácidas não sulfatadas (AB positivo) de coloração azul e denominadas de sialomucinas das mucosubstâncias sulfatadas (HID-positivo) coradas de preto, denominadas de sulfomucinas.

Neste trabalho, a determinação do padrão de mucosubstâncias ácidas foi realizada pela utilização de um método alternativo desenvolvido por SINGH e GORTON (1989) utilizando orceína e azul de alcian (Orceína-AB) e cujos resultados apresentaram alta correlação com aqueles obtidos pela técnica HID-AB.

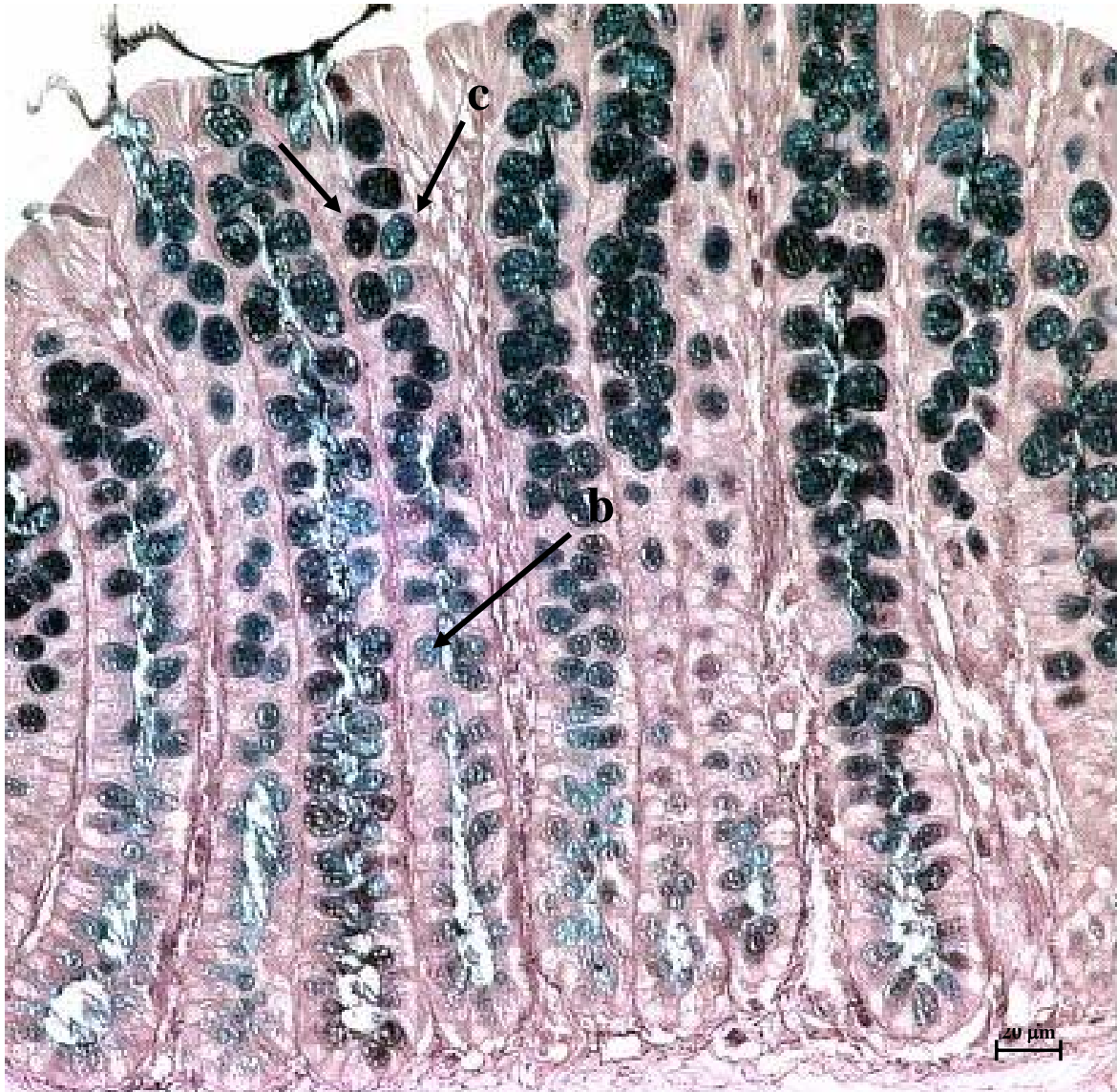
A relação entre sulfomucinas (SUM) e sialomucinas (SIM) em células da mucosa colônica está associada ao seu estado de maturação; ela tem sido usada como marcador válido no grau de diferenciação da mucosa colônica em

estudos com animais (YANG *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 1997; HONG *et al.*, 1997; JENAB e THOMPSON, 2000) e humanos (HOLT *et al.*, 1998).

SHEAHAN e JERVIS (1976), estudando várias espécies animais incluindo roedores e o homem, constataram a predominância de mucosubstâncias ácidas no intestino grosso e, em particular, de sulfomucinas no cólon distal das espécies estudadas.

O redução da razão SIM:SUM é indicativo do aumento da maturidade ou do grau de diferenciação celular, uma vez que o decréscimo na produção de SUM tem sido observado em tecido colônico anormal, preneoplásico e neoplásico (FILIPE e BRANFOOT, 1974; BOLAND *et al.*, 1982; CAMPO *et al.*, 1988; SHAH *et al.*, 1989; SAMS *et al.*, 1990). Desta forma, falha ou redução na diferenciação celular tem sido proposta como um importante fator na avaliação do risco de câncer de cólon (YANG *et al.*, 1996). Quanto mais as células do cólon são estimuladas a se diferenciar menos provavelmente elas irão se proliferar e, hipoteticamente, maior sua taxa de apoptose.

Na Figura 2 é apresentado corte transversal de cólon distal tingido pela técnica histoquímica Orceína-AA. Os dados médios das percentagens de células secretoras de sialomucinas (SIM), sulfomucinas (SUM) e células de secreção mista (SUM+SIM) bem como a razão SIM:SUM são apresentados no Quadro 10.



**Figura 2.** Corte transversal de cólon distal de ratos F344 corado pela técnica histoquímica Orceína-AA mostrando cripta seccionada longitudinalmente com células caliciformes secretoras de sulfomicinas (a), de sialomucinas (b), e de secreção mista (c).

**Quadro 10.** Percentual de células secretoras de sulfomucinas (SUM), células secretoras de sialomucinas (SIM), células de secreção mista (SUM+SIM) e coeficiente entre sialomucinas e sulfomucinas (SIM:SUM) em mucosa colônica de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução de câncer com DMH

Dieta	SUM		SIM		SUM+SIM		SIM:SUM	
	DMH +	DMH -	DMH +	DMH -	DMH +	DMH -	DMH +	DMH -
----- % -----								
CN	54,71aA	58,35aA	19,10aA	7,32aB	26,19bB	34,33aA	0,42aA	0,15aB
CP	55,90aA	55,07aA	15,81aA	15,28aA	28,29bA	29,64aA	0,33aA	0,30aA
F	61,80aA	60,93aA	9,67bA	10,18aA	28,53bA	28,89aA	0,20bA	0,19aA
C	61,84aA	54,49aA	9,04bA	11,70aA	29,12bB	33,81aA	0,17bA	0,24aA
F+C	58,33aA	57,31aA	8,56bA	9,83aA	34,78aA	32,86aA	0,20bA	0,22aA

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; DMH: 1,2-dimetilhidrazina · 2HCl; (+) com indução química e (-) sem indução química de câncer de cólon. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula nas colunas ou maiúscula nas linhas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

As percentagens de células SUM presentes nas criptas da mucosa colônica dos animais foram estatisticamente iguais entre as dietas experimentais e, dentro de cada dieta, entre os animais com e sem aplicação de DMH. Com relação à percentagem de células SIM, as dietas F, C e F+C apresentaram-se iguais entre si e significativamente inferiores às dietas CN e CP quando da aplicação de DMH, não sendo observadas diferenças significativas entre as dietas experimentais nos grupos de animais não submetidos ao carcinógeno. O mesmo foi verificado para a percentagem de células de secreção mista (SUM+SIM) no cólon dos animais DMH-, enquanto que naqueles tratados com carcinógeno (DMH+), observou-se a elevação destas células na mucosa do grupo de animais alimentados com a dieta F+C em relação às demais dietas estudadas.

Obtendo-se a relação SIM:SUM, constatou-se não haver diferenças significativas entre as dietas experimentais nos grupos de animais DMH- enquanto que nos animais DMH+ foi observada redução desta relação nas dietas F, C e C+F, as quais apresentaram-se iguais entre si e diferentes das dietas CN e CP.

Comparando-se os animais submetidos ou não ao DMH dentro de cada dieta experimental, foi observado o mesmo comportamento na percentagem de células SIM e na relação SIM:SUM, sendo constatada a elevação de tais parâmetros em animais alimentados com a dieta CN e submetidos à aplicação do carcinógeno, enquanto que, nas demais dietas, não foram verificadas diferenças significativas.

Os resultados da análise estatística demonstram, portanto, não ter havido diferenças no padrão de secreção de mucosubstâncias ácidas entre os grupos de animais nas dietas experimentais quando da ausência do carcinógeno de cólon. Entretanto, quando os grupos de animais foram submetidos à aplicação de DMH o padrão de secreção foi modificado como observado pelas alterações na percentagem de células SIM e de células SUM+SIM. Estas mudanças influenciaram, por sua vez, o coeficiente entre sialomucinas e sulfomucinas (SIM:SUM), utilizado como índice de maturidade e diferenciação celular da mucosa.

As alterações observadas no coeficiente SIM:SUM demonstram que os animais alimentados com a dieta sem adição de Se (CN) sofreram redução na diferenciação celular quando submetidos ao carcinógeno de cólon, enquanto que a mesma dieta acrescida de dose supranutricional do nutriente (CP) manteve o índice de diferenciação nos animais DMH+, indicando um possível efeito do Se na proteção contra alterações da mucosa colônica. Nas demais dietas experimentais, a exemplo da dieta CP, a presença do DMH não promoveu alterações no processo de diferenciação celular, denotando a influência positiva destas dietas na manutenção da homeostase do desenvolvimento colônico e, em consequência, na proteção da mucosa contra alterações pré-malignas.

Analisando-se o efeito das dietas entre si, nos grupos de animais submetidos à indução de câncer, observou-se que os animais alimentados com dose supranutricional de Se suprido pela adição de castanha-do-Pará à dieta (C) mostraram-se mais protegidos contra alterações no grau de diferenciação celular do que o grupo alimentado com a mesma dose de Se adicionado na forma de SeMet (CP). Considerando-se que a forma de Se utilizada está intimamente relacionada com seus efeitos anticarcinogênicos é de se esperar que as formas de Se presentes na castanha estejam condicionando, ao menos em parte, os resultados obtidos.

Em trabalhos de “especificação” de Se desenvolvidos por CHUNHIENG *et al.* (2004), foi detectado que a maior percentagem de Se presente em castanha-do-Pará está na forma de SeMet, tendo sido detectadas outras formas de Se sem que fosse possível a identificação e quantificação das mesmas. Todavia, não se pode descartar a hipótese do efeito conjunto de outros fatores presentes em matrizes tão complexas como os alimentos e de sua interação com o ambiente colônico.

A ausência de diferenças significativas entre as dietas F, C e F+C indicam não ter havido efeito sinérgico ou aditivo sobre a percentagem de células SUM e SIM e na relação SIM:SUM quando da utilização conjunta de feijão e castanha (F+C) em relação à ação destes alimentos utilizados isoladamente.

Ressalte-se ainda, que o efeito semelhante da dieta F em relação às dietas C e F+C indicam que o feijão ofereceu o mesmo nível de proteção que estas contra possíveis alterações no grau de diferenciação da mucosa avaliado por este parâmetro.

Os feijões são uma boa fonte tanto de fibra dietética quanto de uma ampla faixa de fitoquímicos, os quais têm sido relacionados à redução do risco de câncer de cólon (HUGHES *et al.*, 1997; BAWADI *et al.*, 2005).

Neste trabalho, a elevada percentagem de fibra alimentar solúvel e insolúvel fornecida pelo feijão pode ser considerada um dos fatores condicionantes dos efeitos na redução do risco de câncer das dietas baseadas neste alimento.

Fibra alimentar é a soma de lignina e polissacarídeos originados de plantas, que não são digeridos pelas enzimas do intestino delgado, mas podem ser degradados por fermentação microbiana. Elas podem ser classificadas em fibras solúveis e insolúveis.

As fibras insolúveis como celulose, não fermentáveis, são excretadas de forma inalterada (WIJNANDS *et al.*, 1999). Resultam em fezes mais volumosas e consequente diluição de carcinógenos e promotores luminiais. Em adição, seu trânsito é acelerado, reduzindo o tempo de exposição a irritantes e (co-)carcinógenos. Já as fibras solúveis são substratos fermentáveis para bactérias anaeróbicas no intestino grosso. O principal produto da fermentação são ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato. Os ácidos graxos de cadeia curta reduzem o pH colônico resultando na precipitação de ácidos biliares e inibição da formação de ácidos biliares secundários os quais são citotóxicos e considerados favorecedores da carcinogênese (CHEAH, 1990; Van MUNSTER e NAGENGAST, 1993). Altas concentrações de ácidos graxos secundários têm sido associadas com aumento no risco de câncer de cólon. O butirato tem mostrado suprimir a formação de tumores coloretais (MCINTYRE *et al.*, 1993), protegendo o epitélio colônico de mudanças displásicas, estimulando a diferenciação celular, induzindo a apoptose e diminuindo a proliferação das células colônicas *in vivo* e *in vitro* (AWAD *et al.*, 1991; HAGUE *et al.*, 1996).

A fibra alimentar também tem mostrado reduzir os efeitos prócarcinogênicos observados quando do consumo de dietas hipercalóricas e/ou hiperlipídicas. O aumento dos níveis de insulina e da energia intracelular pode promover estímulos proliferativos no epitélio colônico levando ao aumento de células e criptas anormais com promoção da carcinogênese (BIRD *et al.*, 1985). Além disso, o aumento da energia intracelular poderia resultar em um aumento da oxidação e formação de espécies reativas de oxigênio, aumentando os danos celulares, a oxidação do DNA e a frequência de mutações com consequente influência na iniciação e promoção da carcinogênese colônica (BRUCE *et al.*, 2000).

WIJNANDS *et al.* (1999) estudando o efeito protetor de fibras fermentáveis (galactooligosacarídeos) e não fermentáveis (celulose) sobre o câncer de cólon induzido por DMH em ratos alimentados com dietas com níveis diferenciados de gordura, verificaram que a tumorigênese foi favorecida pelo aumento do conteúdo de gordura da dieta e que as dietas que continham fibra fermentável conferiram maior proteção contra o câncer colorretal em relação às dietas contendo celulose não fermentável.

Desta forma, os já conhecidos efeitos fisiológicos da fibra alimentar indicam que para promover proteção máxima sobre o câncer de cólon uma fibra dietética deveria: a) ser rica em fibra alimentar insolúvel, particularmente celulose; b) conter suficiente fibra alimentar solúvel para produzir butirato sob fermentação e; c) não aumentar a concentração de ácidos biliares nas fezes (HUGHES *et al.*, 1997).

Diante destas considerações, a fibra alimentar do feijão apresenta-se como um bom candidato para as propriedades anticarcinogênicas do feijão uma vez que a mesma: a) está entre as melhores fontes conhecidas de fibra alimentar insolúvel contendo maior percentagem do que muitos cereais (HUGHES e SWANSON 1989); b) é rica em fibra solúvel a qual tem mostrado converter-se facilmente a butirato no cólon (FLEMING *et al.*, 1985); c) não aumentam significativamente a concentração de ácidos biliares fecais a exemplo do observado com o farelo de aveia (ANDERSON *et al.*, 1984) e; d) mostram-se igualmente efetivas ao farelo de aveia na redução das concentrações de colesterol sanguíneo (ANDERSON *et al.*, 1984).

Além de boa fonte de fibra alimentar, os feijões são também ricos em muitos fitoquímicos com propriedades anticarcinogênicas.

Neste sentido, a presença de considerável concentração de ácido fítico ou inositol hexafosfato (IP6) em feijão é outro fator que pode estar influenciando, a exemplo de estudos com trigo (JENAB e THOMPSON, 1998; REDDY *et al.*, 2000), a manutenção da homeostase do desenvolvimento do epitélio colônico.

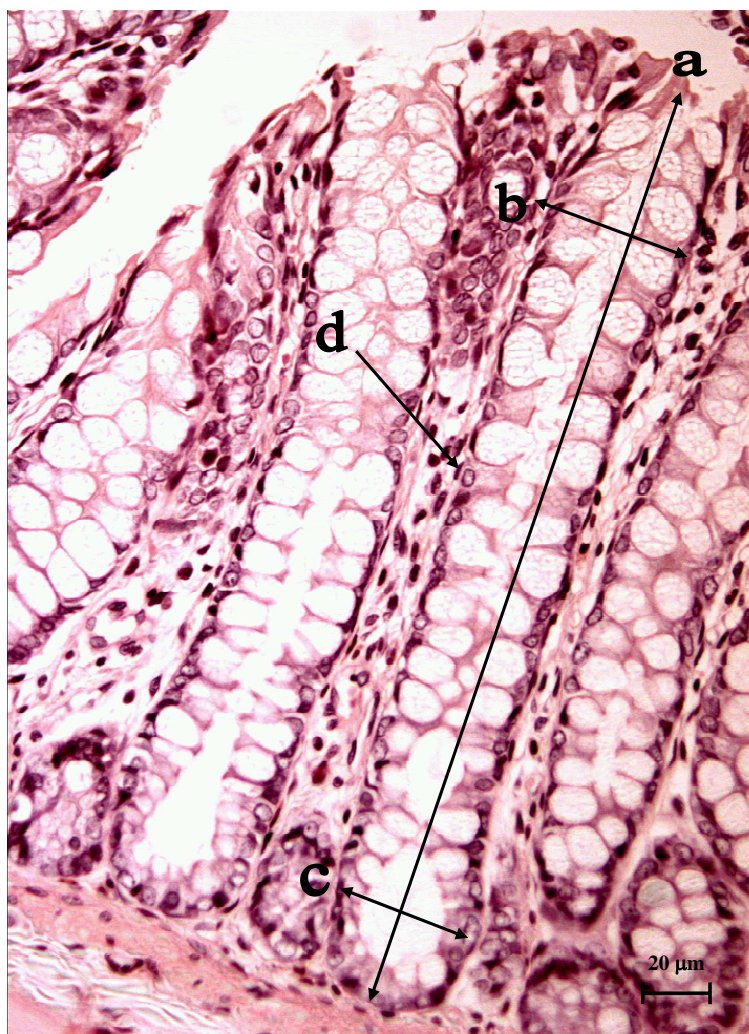
O ácido fítico é uma substância presente em muitas leguminosas sendo considerado um antinutriente em virtude de sua ação na complexação de proteínas, vitaminas e sais minerais reduzindo o aproveitamento destes pelo organismo (URBANO *et al.*, 2000). Entretanto, estudos com animais têm mostrado que esta substância pode inibir o crescimento neoplásico em diversos tipos de câncer incluindo o câncer de cólon (SHAMSUDDIN *et al.*, 1989; ULLAH E SHAMSUDDIN, 1990; PRETLOW *et al.*, 1992). Os mecanismos de ação propostos são o aumento da morte natural da célula, alterações na tradução de sinais, estimulação de genes que levam à maior diferenciação celular e atividade antioxidante (SHAMSUDDIN, 1992; FOX e EBERL, 2002).

Os taninos, outro constituinte do feijão com propriedades antinutritivas, também têm sido relacionados com o efeito protetivo do câncer por esta leguminosa. Estudo realizado por BAWADI *et al.* (2005), demonstrou o efeito de taninos condensados, extraídos do feijão preto, na inibição do crescimento de células Caco-2, denotando sua ação protetora sobre a carcinogênese colônica.

#### **3.2.4.2. Morfologia da mucosa colônica**

Alterações na morfologia da cripta e do epitélio colônico como um todo têm sido utilizadas como indicadores da ação de carcinógenos sobre a mucosa colônica bem como do efeito protetor de agentes anticarcinogênicos.

A Figura 3 apresenta corte transversal de cólon distal corado pela técnica HE indicando o procedimento adotado de medição dos parâmetros morfométricos estudados. Os dados médios de altura da cripta em número de células, obtidos pela contagem das células colunares do epitélio da mucosa colônica são apresentados no Quadro 11.



**Figura 3.** Corte transversal de cólon distal de ratos F344 corado pela técnica HE. (a) altura da cripta; (b) diâmetro do ápice da cripta; (c) diâmetro da base da cripta; (d) célula colunar.

**Quadro 11.** Altura de cripta em número de células de mucosa colônica de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução de câncer com DMH

Dieta	Altura da cripta em número de células	
	DMH +	DMH -
CN	60,34bA	49,88bB
CP	64,06bA	61,64aA
F	64,89bA	66,42aA
C	72,54aA	72,01aA
F+C	64,86bA	61,69aA

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; DMH: 1,2-dimetilhidrazina · 2HCl; (+) com indução química e (-) sem indução química de câncer de cólon. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula nas colunas ou maiúscula nas linhas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

A manutenção do comprimento constante da cripta é obtida pelo balanço entre proliferação e morte celular. Desta forma, a altura da cripta em termos de número de células colunares, dá uma idéia do seu nível proliferativo.

MASKENS (1976), estudando a histogênese e o padrão de crescimento de adenocarcinomas em cólon de ratos induzidos com DMH, observou anterior à formação de tumores, significativa elevação na profundidade da cripta, expressa pelo número de células colunares, de mucosa de ratos tratados com DMH em relação ao seu controle (ratos não tratados).

Constatou-se que a dieta sem adição de Se (CN) promoveu um padrão diferenciado de altura apresentando-se significativamente inferior a dieta CP e as demais dietas estudadas nos animais não tratados com o carcinógeno (DMH -). Entretanto, quando da aplicação do carcinógeno de cólon (DMH +), observou-se elevação significativa da altura de cripta no grupo de animais tratados com a dieta CN enquanto que no grupo CP e nas demais dietas não foram verificadas alterações. Estes resultados indicam o efeito do Se na forma de SeMet na manutenção do padrão de proliferação celular da cripta medido pela altura de criptas em número de células.

Considerando o efeito das dietas entre os grupos de animais tratados com DMH, observou-se que a dieta C apresentou maior grau de proliferação celular em relação às dietas com o mesmo nível de Se (CP e F+C) e a dieta com feijão (F). Entretanto, constatou-se que a utilização conjunta de castanha e feijão na dieta F+C, promoveu redução da proliferação celular comparado à dieta onde a castanha foi empregada isoladamente (C). Este fato indica um possível efeito interativo entre os constituintes destes dois alimentos no grau de proliferação celular da mucosa colônica, medida pela altura da cripta em número de células.

JENAB e THOMPSON (2000) estudaram o efeito do trigo e do ácido fítico de forma isolada e conjunta sobre biomarcadores do câncer de cólon induzido com azoximetano em ratos. Foi constatado, que tanto o trigo quanto o ácido fítico promoveram redução na altura de criptas medida em número de células colunares bem como na razão SIM:SUM, indicando o efeito potencial dos mesmos na redução do risco de câncer de cólon.

A análise estatística dos parâmetros de altura de cripta, diâmetro da base, diâmetro do ápice e densidade de cripta avaliados no estudo morfométrico da

mucosa colônica dos grupos de animais submetidos às dietas experimentais encontram-se no Quadro 12.

**Quadro 12.** Altura, diâmetro da base e diâmetro do ápice de criptas em  $\mu\text{m}$  e densidade de criptas de cólon de ratos alimentados com dietas experimentais

Dieta	Altura da cripta	Diâmetro da base	Diâmetro do ápice	Densidade de cripta (nº de criptas/mm linear de cólon)
CN	180,63b	42,90a	40,44b	20,60ab
CP	254,98a	45,07a	44,43ab	20,13b
F	228,80a	42,17a	42,13b	21,31ab
C	237,18a	42,96a	46,32a	20,31b
F+C	226,83a	40,82a	42,47ab	22,11a

CN: dieta controle negativo; CP: dieta controle positivo; F: dieta com feijão; C: dieta com castanha; F+C: dieta com feijão e castanha; Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

TSUKAMOTO e colaboradores (2006) estudaram o efeito de alterações na atividade de hexosaminidase, em criptas normais e aberrantes (ACF) de ratos F344 tratados com DMH e sua relação com características morfológicas e proliferativas. Estes pesquisadores observaram que, após a décima semana experimental, houve elevação significativa no comprimento da cripta (316,3  $\mu\text{m}$ ) de ratos tratados com DMH e com atividade hexosaminidase reduzida em relação aos grupos não tratado com DMH (224,7  $\mu\text{m}$ ) e tratados com DMH mas com atividade enzimática normal (280,0  $\mu\text{m}$ ). Em estudo anterior realizado por TSUKAMOTO *et al.* (2001), foi observado ainda que criptas com atividade hexosaminidase decrescida apresentam-se mais largas que criptas com atividade enzimática normal tendo sido consideradas normais, criptas com diâmetro igual ou inferior a 60  $\mu\text{m}$  e aberrantes aquelas com diâmetro superior a 115  $\mu\text{m}$ .

Não obstante a constatação, por diversos pesquisadores (BARNES *et al.*, 1999; JENAB e THOMPSON, 2000; MA *et al.*, 2002), de alterações morfológicas da mucosa colônica e de suas glândulas em ratos submetidos à carcinógenos de cólon, nenhuma diferença foi observada, neste trabalho, entre os grupos de animais tratados com DMH e seus controles nas dietas experimentais estudadas (resultados não mostrados).

Diante dos resultados obtidos, não se pode fazer inferências sobre o possível efeito das dietas experimentais sobre a preservação da morfologia

colônica, avaliada pelos parâmetros morfométrico aqui estudados, quando da aplicação do DMH, sendo apenas possível discutir as diferenças promovidas pelas dietas experimentais de forma individual e da relação entre eles.

Comparando-se as dietas experimentais entre si, foram constatadas diferenças em todos os parâmetros avaliados com exceção do diâmetro da base.

Considerando-se a altura de cripta em  $\mu\text{m}$ , verificou-se que os animais alimentados com a dieta CN apresentaram a menor altura média em relação às demais dietas estudadas. No que se refere ao diâmetro não foi observada diferença significativa entre as dietas com nível supranutricional de Se (CP, C e F+C) com o maior valor sendo observado para a dieta C. Contudo, quando o feijão foi utilizado conjuntamente com a castanha-do-Pará (F+C), observou-se redução no diâmetro do ápice da cripta levando a valores próximos àqueles observados para a dieta com o mesmo nível de Se na forma de SeMet (CP).

Não foi observada diferença significativa na densidade de criptas, medida em número de criptas por milímetro linear de cólon, entre as dietas CN, CP, F e C. Entretanto, quando os animais foram alimentados com a dieta F+C, verificou-se elevação significativa desta medida em relação às dietas C.

Estas observações indicam que as dietas alteraram, de forma distinta, a morfologia da mucosa colônica avaliada pela medida altura da cripta, diâmetro da base, diâmetro do ápice e densidade de cripta e pela correlação entre elas.

BUTLER e colaboradores (1992), objetivando determinar os fatores que influenciaram a proliferação celular no cólon distal, observaram, por meio de estudo morfométrico, que o índice proliferativo, obtido pela densidade de criptas e o número de colonócitos por densidade de área, era mais elevado no cólon distal em relação ao proximal e que a proliferação celular das distintas porções do intestino grosso pode ser modificada com a dieta.

Em adição a isto, estudos têm demonstrado que alterações morfológicas e proliferativas da mucosa colônica aparentemente normal podem ser observadas como indicativo de suscetibilidade ou predisposição a doenças do intestino grosso, com destaque para o câncer (SHAMSUDDIN, *et al.*, 1981; TERPSTRA *et al.*, 1987; BARNES, *et al.*, 1999).

#### 4. Conclusões

Nas dietas estudadas, a atividade enzimática de GPx em plasma, eritrócitos e fígado bem como de GST hepática não foram alteradas com a presença do carcinógeno de cólon DMH, em relação aos seus controles. Entretanto, independente da dieta utilizada, a aplicação de DMH promoveu redução da atividade GPx no fígado com concomitante elevação da atividade GST no mesmo órgão.

Todas as dietas com nível supranutricional de Se elevaram a atividade GPx e GST em todos os tecidos avaliados, bem como a concentração plasmática de Se em relação à dieta sem adição do nutriente sendo as dietas com nível supranutricional de Se fornecido pela castanha-do-Pará tão hábeis quanto a dieta com SeMet na promoção da atividade destas enzimas.

A dieta com feijão promoveu o mesmo nível de atividade GPx plasmática e hepática e de GST hepática observados nos grupos de animais alimentados com as dietas elevadas em Se.

Todas as dietas, com exceção da dieta sem adição de Se, mantiveram o grau de diferenciação e proliferação celular da mucosa colônica, medido pelo quociente entre as percentagens de células secretoras de sialomucinas e células secretoras de sulfomucinas e pela altura de cripta em número de células, quando da aplicação do carcinógeno de cólon DMH.

A administração de doses supranutricionais de Se na forma de SeMet ou fornecida pela castanha e a utilização combinada do feijão e da castanha em dietas hiperlipídicas favoreceu a homeostase do desenvolvimento colônico evitando alterações na diferenciação e proliferação celular em ratos tratados com DMH, reduzindo, conseqüentemente o risco de câncer de cólon.

#### 5. Referências Bibliográficas

- ALTMANN, G. G. Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the ascending colon. **Am. J. Anat.**, v. 167, p. 95-117, 1983.
- ANDERSON, J. W.; STORY, L.; SIELING, B.; CHEN, W. J. L.; PETRO, M. S.; STORY, J. Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 48, p. 749-753, 1984.
- ANTUNES, A.J.; MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, n. 5, p. 1096-1098, 1977.
- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; DE SOUZA, M. V.; GROSSI DE SÁ, M. F.; ALMEIDA, E. R. P.; GANDER, E. S.; RECH, E. L. Expression of the methionine-

rich storage albumin gene from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 445-449, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, D.C., 1999, CD-ROM.

AWAD, A. B.; HORVATH, P.J.; ANDERSEN, M. S. Influence of butyrate on lipid metabolism, survival, and differentiation of colon cancer cells. **Nutr. Cancer**, v. 16, p. 125–133, 1991.

AZEVEDO, L.; GOMES, J. C.; STRINGHETA, P. C.; GONTIJO, A.M.M.C.; PADOVANI, C.R.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M.F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1671–1676, 2003.

BARNES, C. J.; HARDMAN, W. E.; CAMERON, I. L. Presence of well-differentiated distal, but not poorly differentiated proximal, rat colon carcinomas is correlated with increased cell proliferation in and lengthening of colon crypts. **Int. J. Cancer**, v. 80, n. 1, p. 68-71, 1999.

BAWADI, H. A.; BANSODE, R. R.; TRAPPEY II, A.; TRUAX, R. E. ; LOSSO, J. N. Inhibition of Caco-2 colon, MCF-7 and Hs578T breast, and DU 145 prostatic cancer cell proliferation by water-soluble black bean condensed tannins. **Cancer Letters**, v. 218, p.153-162, 2005.

BELLISOLA, G.; CINQUE, G.; GALASSINI, S.; GUIDI, G. C.; LIU, N. Q.; MOSCHINI, G. Se status in normal and pathological human individuals before and after sesupplementation. **Nuc. Instr. Meth. Phys. Res.**, v. B109/110, p. 354-357, 1996.

BERNSTEIN, H.; HOLUBEC, H.; WARNEKE, J. A.; GAREWAL, H.; EARNEST, D. L.; PAYNE, C. M.; ROE, D. J.; CUI, H.; JACOBSON, E. L.; BERNSTEIN, C. Patchy field defects of apoptosis resistance and dedifferentiation in flat mucosa of colon resections from colon cancer patients. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 9, n. 5, p. 505-517, 2002.

BIRD, R. P.; MERCER, N. J.; DRAPER, H. H. Animal models for the study of nutrition and human disease: colon cancer, atherosclerosis, and osteoporosis. **Adv. Nutr. Res.**, v. 7, p. 155-186, 1985.

BOLAND, C. R.; MONTGOMERY, C. K.; KIM Y. S. Alterations in human colonic mucin occurring with cellular differentiation and malignant transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 2051-2055, 1982.

BOYLE P.; LEON, M. E. Epidemiology of colorectal cancer. **Brit. Med. Bull.**, v. 64, p. 1-25, 2002.

BRUCE, W. R.; GIACCA, A.; MEDLINE, A. Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v. 9, p. 1271-1279, 2000.

BURK, R. F.; HILL, K. E.; MOTLEY, A. M. Plasma selenium in specific and non-specific forms. **BioFactors**, v. 14, p.107–14, 2001.

BURK, R. F.; LEVANDER, O. A. **Selenium**. In: Modern nutrition in health and disease (Shils, M. E., Olson, J. A., Shike, M., Ross, A. C., eds.), p. 265-276. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1999.

- BURKITT, D. P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, v. 28, p. 3-13, 1971.
- BUTLER, R. N.; BRUHN, B.; PASCOE, V.; FETTMAN, M. J.; ROBERTS-THOMSON, I. C. Regional factors affecting proliferation in the large intestine of the rat. *Proc. Soc. Biol. Med.*, v. 1, p. 133-137, 1992.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer, 2006.
- CAMPO, E.; CONDOM, E.; PALACIN, A.; QUESADA, E.; CARDESA, A. Lectin binding patterns in normal and neoplastic colonic mucosa. A study of Dolichos biflorus agglutinin, peanut agglutinin, and wheat germ agglutinin. *Dis. Colon Rectum*, v. 31, n. 11, p. 892-899, 1988.
- CASES, J.; PUIG, N.; CAPORICCIO, B.; BAROUX, B.; BACCOU, J. C.; BESANÇON, P. Glutathione-related enzymic activities in rats receiving high cholesterol of standard diets supplemented with two forms of selenium. *Food Chem.*, v. 65, p. 207-211, 1999.
- CHANG, J. C.; GUTENMANN, H.; REID, C. M.; LISK, D. J. Selenium contents Brazil nuts from two geographic location in Brazil. *Chemosphere*, v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.
- CHANG, W. C. L.; CHAPKIN, E. S.; LUPTON, J. R. Predictive value of proliferation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 721-730, 1997.
- CHANSLER, M. W.; MUTANEN, M.; MORRIS, V. C.; LEVANCER, O. A. Nutritional bioavailability to rats of selenium in Brazil nuts and mushrooms. *Nutr. Res.*, v. 6, n. 12, p. 1419-1428, 1986.
- CHEAH, P.Y. Hypotheses for the etiology of colorectal cancer—an overview. *Nutr. Cancer*, v. 14, p. 5-13, 1990.
- CHEN, L.; YANG, F.; XU, J.; HU, Y.; HU, Q.; ZHANG, Y.; PAN, G. Determination of selenium concentration of rice China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5128-5130, 2002.
- CHRISTENSEN, M. J.; NELSON, B. L.; WRAY, C. D. Regulation of glutathione S-transferase gene expression and activity by dietary selenium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 202, p. 271-277, 1994.
- CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 4318-4322. 2004.
- CLARK, L. C.; COMBS, G. F.; TURNBULL, B. W.; SLATE, E. H.; CHALKER, D. K.; CHOW, J.; DAVIS, L.S.; GLOVER, R. A. GRAHAM, G. F. GROSS, E. G. KRONGRAD, A.; LESHER, J. L.; PARK, H. K.; SANDERS, B. B. SMITH, C. L.; TAYLOR, J. R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *JAMA*, v.276, p.1957-1963, 1996.
- COHEN, H. J.; CHOVANICC, M. E.; MISTRETTA, D.; BAKER, S. S. Selenium repletion and glutathione peroxidase: Differential effects of plasma and red blood cell enzyme activity. *Am. Clin. Nutr.*, v. 41, p. 735-747, 1985.

- COMBS, G. F. JR.; GRAY, W. P. Chemopreventive agentes: selenium. **Pharmacol. Ther.**, v. 79, p. 179-192, 1998.
- DASHWOOD, R. H. Early detection and prevention of colorectal cancer (review). **Oncol. Rep.**, v. 6, p. 277-281, 1999.
- DAVIES, M. H.; MERRICK, B. A.; BIRT, D. F.; SCHNELL, R. C. Differential effects of dietary selenium on hepatic and renal glutathione-related enzymes and on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. **Drug Nutr. Interact.**, v. 5, n. 3, p. 169-179, 1987.
- DESAI, V. G.; CASCIANO, D.; FEUERS, R.J.; AIDOO, A. Activity profile of glutathione-dependent enzymes and respiratory chain complexes in rats supplemented with antioxidants and treated with carcinogens. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 394, n. 2, p.255–264, 2001.
- DONG, Y.; LISK, D.; BLOCK, E.; IP, C. Characterization of the biological Activity of  $\gamma$ -Glutamyl-Se- methylselenocysteine: A novel, naturally occurring anticancer agent from garlic. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2923-2928, 2001.
- DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chem.**, v. 95, p. 684-692, 2006.
- EDENS, F. W., PARKHURST C. R., HAVENSTEIN G. B. Housing and selenium influences on feathering in broilers. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 10, p. 128-134, 2001.
- FENG, Y.; FINLEY, J. W.; DAVIS, C. D.; BECKER, W. K.; FRETLAND, A. J.; HEIN, D. W. Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 157, p. 36-42, 1999.
- FERREIRA, S. K.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002.
- FERGUNSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.
- FIALA, E. S.; KULAKIS, C.; BOBOTAS, G. Detection and estimation of azomethane in expired air of 1,2-dimethylhydrazine treated rats. **J. Natl. Cancer Inst.** 56, p. 1271–1273, 1976.
- FILIPE, M. I.; BRANFOOT, A. C. Abnormal patterns of mucus secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma. **Cancer**, v. 34, p. 282-290, 1974.
- FINLEY, J. W.; DAVIS, D. C.; FENG, Y. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. **J. Nutr.**, v.130, p. 2384-2389, 2000.
- FINLEY, J. W.; IP, C.; LISK, D. J.; DAVIS, D. C.; HINTZE, K. J.; WHANGER, P. D. Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2679-2683, 2001.
- FLEMING, S. E.; O'DONNELL, A. U. ; PERMAN, J. A. Influence of frequent and long-term bean consumption on colonic function and fermentation. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 41, p. 909-918, 1985.

- FOX, C. H.; EBERL, M. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. **Complem. Therap. Med.**, v. 10, p. 229–234, 2002.
- GANDER, E. S.; KREBBERS, E.; BARROS, L.M.G.; AS, M. F. G. de; RECH, E.L.; ARAGÃO, F. J. L. Transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants containing a Brazil nut methionine-rich albumin gene and their progeny derived by microprojectile bombardment of embryonic axes. In: SBBq, 1994, Caxambu. **Res. SBBq**, 1994. p. E-65.
- GONZALEZ DE MEJIA, E.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; LOARCA-PIÑA, G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. **Mutat. Res.**, v. 441, P. 1–9, 1999.
- GUY, J.; BOMPART, PREVOT, D. S.; BASCANDS, J. L. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: Application to cisplatin-induced toxicity. **Clin. Biochem.**, v. 23, p. 501-504, 2000.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.
- HAFEMAN, D. G.; SUNDER, R. A.; HOEKSTRA, W. G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **J. Nutr.**, v. 104, p. 580-587, 1974.
- HAGUE, A.; BUTT, A. J.; PARASKEVA, C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? **Proc. Nutr. Soc.**, 55, 937–943, 1996.
- HARLAND, B F.; MORRIS, E. A good or a bad food component? **Nutr. Res.**, v. 15, n. 5, p. 733-754, 1995.
- HAWKS, A., MAGEE, P. N. The alkylation's of nucleic acids of rat and mouse *in vivo* by the carcinogen 1,2–dimethylhydrazine. **Br. J. Cancer**, v. 30, p. 440–446, 1974.
- HELSEBY, N. A.; SHUOTUN, Z.; PEARSON, A. E.; TINGLE, M. D.; FERGUSON, L. R. Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolising enzymes. **Mutat. Res.**, v. 454, n. 1-2, p. 77-88, 2000.
- HOLT, P. R.; ATILLASOY, E. O.; GILMAN, J.; GUSS, J.; MOSS, S. F.; NEWMARK, H.; FAN K.; YANG, K.; LIPKIN, M. Modulation of abnormal colonic epithelial cell proliferation and differentiation by low-fat dairy foods. **JAMA**, v. 280, p. 1074-1079, 1998.
- HONG, M. Y.; CHANG, W. C. L.; CHAPKIN, R. S.; LUPTON, J. R. Relationship among colonocyte proliferation, differentiation and apoptosis as a function of diet and carcinogen. **Nutr. Cancer**, v. 28, p. 20-29, 1997.
- HU, Q. H.; PAN, G. H.; ZHU, J. C. Effect of fertilization on selenium content of tea and the nutritional function of Se-enriched tea in rats. **Plant and Soil**, v.238, p.91-95, 2002.
- HU, Y. J.; DIAMOND, A. N. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic difference in the response of selenium. **Cancer Res.**, v. 63, p. 3347-3351, 2003.

- HUGHES, J. S.; GANTHAVORN, C.; SANDERS, S.W. Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. **J. Nutr.**, v. 127, p.2328-2333, 1997.
- HUGHES, J. S.; SWANSON, B. G. Soluble and insoluble dietary fiber in cooked common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Food Microstruc.**, v. 8, p. 15-21, 1989.
- ICHIMURA, Y.; HABUCHI, T.; TSUCHIYA, N.; WANG, L.; OYAMA, C.; SATO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O.; KATO, T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. **J. Urol.**, v. 172, p. 728-732, 2004.
- IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **J. Nutr.**, v.128, p.1845-1854, 1998.
- IP, C.; LISK, D. J. Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. **Carcinogenesis**, v.15, n. 4, p.573-576, 1994a.
- IP, C.; LISK, D. J. Enrichment of selenium in alliums vegetables for cancer prevention. **Carcinogenesis**, v.15, p.1881-1885, 1994b.
- IP, C.; LISK, D. J. Modulation of phase I and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes by selenium-enriched garlic in rats. **Nutr. Cancer**, v.28, n.2, p.184-188, 1997.
- IP, C.; LISK, D. J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutr. Cancer**, v.21, n.3, p. 203-212, 1997.
- JENAB, M.; THOMPSON L. The influence of phytic acid in wheat bran on early biomarkers of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 6, p. 1087–1092, 1998.
- KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J. A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 454, 2002.
- KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; WUILLOUD, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. **Talanta**, v. 66, p. 153-159, 2005.
- LAMONT, J. T.; O'GORMAN, T. A. Experimental colon cancer. **Gastroenterology**, v. 75, p. 1157–1169, 1978.
- LU, J. X.; PEI, H. H.; IP, C.; LISK, D. J.; GANTHER, H.; THOMPSON, H. J. Effect of an aqueous extract of selenium-enriched garlic on *in vitro* markers and *in vivo* efficacy in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1903-1907, 1996.
- MANSON, M. M., GESCHER, A., HUDSON, E. A., PLUMMER, S. M., SQUIRES, M. S., PRIGENT, S. A. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. **Toxicol. Lett.**, v. 112-113, p. 499-505, 2000.
- MASKENS, A. P. Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. **Cancer Res.**, v. 36, p. 1585-1592, 1976.
- MASUKAWA, T.; NISHIMURA, T.; IWATA, H. Differential changes of glutathione S-transferase activity by dietary selenium. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, p. 2266-2270, 1984.

- MATSUMOTO, H. T.; HIGA, H. H. Studies on methylazoxymethanol, the aglicone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. **Biochem. J.**, v. 98, p. 20–22, 1966.
- MCINTYRE, A.; GIBSON, P. R.; YOUNG, G. P. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. **Gut**, v. 34, p. 386–391, 1993.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.
- PRETLOW, T. P.; O'RIORDAN, M. A.; SOMICH, G. A.; AMINI, S. B.; PRETLOW, T. G. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 1509-1512, 1992.
- RAMÍREZ-CÁRDENAS, L. A. **Biodisponibilidade de zinco e de ferro, valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos a tratamentos domésticos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 180 p. (Tese de doutorado).
- RATNASINGHE, D.; TANGREA, J. A.; ANDERSEN, M. R.; BARRETT, M. J.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P. R.; ALBANES, D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. **Cancer Res.**, v. 60, p. 6381-6383, 2000.
- REDDY, B. S. Novel Approaches to the Prevention of Colon Cancer by Nutritional Manipulation and Chemoprevention. **Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.**, v. 9, p. 239–247, 2000.
- REDDY, B. S.; HIROSE, Y.; COHEN, L. A.; SIMI, B.; COOMA, I.; RAO, C. V. Preventive potential of heat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention. **Cancer Res.**, v. 60, n.17, p. 4792–4797, 2000.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- ROSSIT, A.; FROES, N. D. T. C. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. **Rev. Soc. Bras. Cancerol.**, 10, p.26-31, 2000.
- ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.
- FUNARBE. SAEG - **Sistema para análises estatísticas** - versão 9.0. Viçosa: Fundação Athur Bernardes, 2000. (software)
- SAMS, J. S.; LYNCH, H. T.; BURT, R. W.; LANSPA, S. J.; BOLAND, C. R. Abnormalities of lectin histochemistry in familial polyposis coli and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer**, v. 66, n. 3, p. 502-508, 1990.
- SECOR, C. L.; LISK, D.J. Variations in the selenium content of individual Brazil nuts. **J. Food Safety**, v. 9, p. 279-281, 1989.

- SHAH, M.; SHRIKHANDE, S. S.; SWAROOP, V. S. Lectin binding in colorectal mucosa. **Indian J. Gastroenterol.**, v. 8, n. 1, p. 31-33, 1989.
- SHAMSUDDIN, A. M. Phytate and colon-cancer risk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, n., 2, p. 478, 1992.
- SHAMSUDDIN, A. M.; ULLAH, A.; CHAKRAVARTHY, A. K. Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 8, p. 1461–1463, 1989.
- SHAMSUDDIN, A. K.; WEISS, L.; PHELPS, P. C.; TRUMP, B. F. Colon epithelium. IV. Human colon carcinogenesis. Changes in human colon mucosa adjacent to and remote from carcinomas of the colon. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, n. 2, p.413-419, 1981.
- SHEAHAN, D. G.; JERVIS, H. R. Comparative histochemical of gastrointestinal mucosubstances. **Am. J. Anat.**, v. 146, p. 103-132, 1976.
- SINGH, R.; GORTON A. W. P. Orcein-alcian blue staining: a new technique for demonstrating acid mucins in gastrointestinal epithelium. **J. Clin. Pathol.**, v. 42, p. 881-884, 1989.
- SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha–do–Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, 2004.
- SPICER, S. S. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 13, n. 3, p. 211-234, 1965.
- SUNTER, J. P. Cell proliferation in gastrointestinal carcinogenesis. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 19, p. 45–55, 1984.
- TSUKAMOTO, T.; FUKAMI, H.; YAMANAKA, S.; YAMAGUCHI, A.; NAKANISHI, H.; SAKAI, H.; AOKI, I.; TATEMATSU, M. Hexosaminidase-altered aberrant crypts, carrying decreased hexosaminidase alpha and beta subunit mRNAs, in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. **Jpn J. Cancer Res.** v. 92, n. 2, p.109-118, 2001.
- THOMSON, C. D.; CHISHOLM, A.; CAMPBELL, J. M.; MCLACHLAN, S. K. The bioavailability of selenium in Brazil nuts. **Asia Pac. Clin. Nutr.**, v. 15, Supple. 3, S75, 2006.
- TRAKSHEL, G. M.; MAINES, M. D. Characterization of glutathione S-transferases in rat kidney. Alteration of composition by cis-platinum. **Biochem. J.**, v. 252, n. 1, p. 127–136. 1988.
- TROCK, B.; LANZA, E.; GREENWALD, P. Dietary fiber vegetables and colon. **J. Clin. Nutr.**, v. 48, p. 768–774, 1990.
- ULLAH, A.; SHAMSUDDIN, A. M. Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F344 rats. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 12, p. 2219–2222, 1990.
- URBANO, G.; LOPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; VIDAL-VALVERDE, C.; TENORIO, E.; PORRES, J. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? **J. Physiol. Biochem.**, v. 56, n. 3, p.: 283–294, 2000.

- UTHUS, E. O.; YOKOI, K.; DAVIS, C. D. Selenium deficiency in Fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentration and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. **J. Nutr.**, v. 132, p. 1122-1128, 2002.
- Van MUNSTER, I. P.; NAGENGAST, F. M. The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 200 (Suppl.), p. 80–86, 1993.
- VONDERHEID, A. P.; WHOBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S.; B'HYMER, B.; MONTES-BAYON, M.; PONCE DE LEON, C.; CARUSO, J. A. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5722-5728, 2002.
- YANG, K.; FAN, K.; NEWMARK, H.; LEUNG, D.; LIPKIN, M.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J. Cytokeratin, lectin and acidic mucin modulation in differentiating colonic epithelial cells of mice after feeding western-style diets. **Cancer Res.**, v. 56, p. 4644-4648, 1996.
- YANG, J. G.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration. **J. Nutr.**, 1989 v. 119, n.7, p.1010-1012, 1989.
- WATTENBERG, L. M. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. **Cancer Res.**, v. 43, p. 2448s-2453s, 1983 (Suppl.).
- WATTENBERG, L. W. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. **Cancer Res.**, v. 52, p. 2085s-2091s, 1992.
- WEISS, S. L.; EVENSON, J. K.; THOMPSON, K. M.; SUNDE, R. A. Dietary selenium regulation of glutathione peroxidase mRNA and other selenium-dependent parameters in male rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 8, p. 85-91, 1997.
- WHANGER, P., D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **Brit. J. Nutrit.**, v. 91, p. 11-28, 2004.
- WIJNANDS, M. V. W.; APPEL, M. J.; HOLLANDERS, V. M. H.; WOUTERSEN, R.A. A comparison of the effects of dietary cellulose and fermentable galacto-oligosaccharide, in a rat model of colorectal carcinogenesis: fermentable fibre confers greater protection than non-fermentable fibre in both high and low fat backgrounds. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 4, p. 651–656, 1999.
- WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, K.; WROBEL, CARUSO, J. A. Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 375, p. 133-138, 2003.

## ANEXOS

**Quadro 1A.** Resumo da análise de variância para consumo alimentar (CA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução química de câncer com DMH

FV	GL	Quadrado Médio		
		CA (g)	GP (g)	CEA (%)
Dietas	4	74722,190**	367,02 <sup>ns</sup>	4,41**
Carc	1	0,009 <sup>ns</sup>	464,66 <sup>ns</sup>	2,81 <sup>ns</sup>
Dietas*Carc	4	49,823 <sup>ns</sup>	53,00 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>
Resíduo	35	564,628	142,10	0,87
CV(%)		1,91	7,72	7,53

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

**Quadro 3A.** Resumo da análise de variância para atividade de Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione S-Transferase (GST) no fígado de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução química de câncer com DMH

FV	GL	Quadrado Médio	
		GPx hepática -----nmol min <sup>-1</sup> mg de P <sup>-1</sup> -----	GST hepática
Dietas	4	2762,37**	532,87**
Carc	1	1813,42**	275,86*
Dietas*Carc	4	274,45 <sup>ns</sup>	79,90 <sup>ns</sup>
Resíduo	35	175,79	64,06
CV(%)		10,64	11,49

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

\* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

**Quadro 4A.** Resumo da análise de variância para concentração de Se em plasma sanguíneo de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução química de câncer com DMH

FV	GL	Quadrado Médio
		Concentração plasmática de Se (µg/L)
Dietas	4	4255521,0**
Carc	1	47155,6*
Dietas*Carc	4	38466,6**
Resíduo	35	9151,4
CV(%)		11,36

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

\* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

**Quadro 5A.** Resumo da análise de variância para células secretoras de sulfomucinas (SUM), células secretoras de sialomucinas (SIM), células de secreção mista (SUM+SIM) e coeficiente entre sialomucinas e sulfomucinas (SIM:SUM) em mucosa colônica de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução química de câncer com DMH

FV	GL	Quadrado Médio			
		SUM	SIM	SUM+SIM	SIM:SUM
		----- % -----			
Dietas	4	39,57 <sup>ns</sup>	56,56 <sup>**</sup>	34,95 <sup>*</sup>	0,02391 <sup>**</sup>
Carc	1	16,47 <sup>ns</sup>	24,77 <sup>ns</sup>	63,70 <sup>*</sup>	0,01870 <sup>ns</sup>
Dietas*Carc	4	30,74 <sup>ns</sup>	67,76 <sup>**</sup>	30,98 <sup>*</sup>	0,03503 <sup>**</sup>
Resíduo	35	24,09	7,66	10,58	0,00473
CV(%)		8,45	23,24	10,76	27,52

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

\* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

**Quadro 6A.** Resumo da análise de variância para altura de cripta em número de células (ALTNC), altura de cripta (ALTC), diâmetro da base (DB) diâmetro do ápice (DA) e densidade de criptas (DC) em mucosa colônica de ratos alimentados com dietas experimentais e submetidos à indução química de câncer com DMH

FV	GL	Quadrado Médio				
		ALTC	DB	DA	ALTNC	DC
		----- µm -----			(nº de células)	(nº de criptas/mm linear de cólon)
Dietas	4	6062,4 <sup>**</sup>	18,99 <sup>ns</sup>	41,05 <sup>*</sup>	303,83 <sup>**</sup>	5,29 <sup>**</sup>
Carc	1	141,7 <sup>ns</sup>	4,96 <sup>ns</sup>	5,32 <sup>ns</sup>	90,77 <sup>**</sup>	5,26 <sup>ns</sup>
Dietas*Carc	4	1100,5 <sup>ns</sup>	9,88 <sup>ns</sup>	14,70 <sup>ns</sup>	41,33 <sup>*</sup>	0,65 <sup>ns</sup>
Resíduo	35	508,3	10,92	9,13	10,88	1,29
CV(%)		10,02	7,70	7,02	5,13	5,47

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F

\* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F