

BRENDA KELLY SOUZA SILVEIRA

**EFEITO DO CONSUMO DE CASTANHAS BRASILEIRAS (*Bertholetia excelsa* H.B.K.
E *Anacardium occidentale* L.) EM MARCADORES DA SAÚDE INTESTINAL E
INFLAMATÓRIOS DE MULHERES COM EXCESSO DE PESO**

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

Orientador: Helen Hermana Miranda Hermsdorff

Coorientadores: Josefina Bressan
Hércia Stampini Duarte Martino

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S587e
2023

Silveira, Brenda Kelly Souza, 1993-

Efeito do consumo de castanhas brasileiras (*Bertholetia excelsa* H.B.K. e *Anacardium occidentale* L.) em marcadores da saúde intestinal e inflamatórios de mulheres com excesso de peso / Brenda Kelly Souza Silveira. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (158 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui apêndices.

Orientador: Helen Hermana Miranda Hermsdorff.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.100>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Castanha-do-brasil na nutrição humana. 2. Mulheres - Nutrição. 3. Selênio. 4. Inflamação. 5. Microbiota gastrointestinal. 6. Obesidade. 7. Redução de peso. 8. Dieta de baixa caloria. I. Hermsdorff, Helen Hermana Miranda, 1979-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 613.25

BRENDA KELLY SOUZA SILVEIRA

**EFEITO DO CONSUMO DE CASTANHAS BRASILEIRAS (*Bertholetia excelsa* H.B.K.
E *Anacardium occidentale* L.) EM MARCADORES DA SAÚDE INTESTINAL E
INFLAMATÓRIOS DE MULHERES COM EXCESSO DE PESO**

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Brenda Kelly Souza Silveira
Autora



Helen Hermana Miranda Hermsdorff
Orientadora

Ao meu pai (in memoriam) que sonhou com cada etapa da minha vida acadêmica e sempre fez da minha educação sua prioridade. Ele que conhecia o poder transformador da educação e buscava para mim um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, escritor da minha história, que me levou por caminhos que foram além do que eu havia sonhado.

Aos meus pais, que sonharam para mim as oportunidades que jamais tiveram. Que se doaram e lutaram em todos os aspectos para que minha formação não fosse interrompida. Nós conseguimos e fomos além!

Ao meu marido Guilherme, que apoiou, acreditou e compartilhou cada fase da minha vida Universitária, desde o pré-vestibular. Ele que compreendeu minhas ausências, foi conforto nos dias difíceis, e me deu o maior incentivo que alguém pode ter para caminhar: o nosso filho.

Aos meus familiares que sempre torceram e se orgulharam de cada etapa da minha formação. A minha orientadora, Profa. Helen Hermana M. Hermsdorff, que sempre foi um grande exemplo de liderança, disponibilidade e persistência. Que sempre se preocupou em me inserir em atividades além da pesquisa, para que minha formação fosse completa. Mais do que isso, fez tudo que estava ao seu alcance para que eu conseguisse continuar na universidade e concluísse o doutorado. Obrigada por confiar e acreditar que eu conseguiria!

Às minhas coorientadoras, prof. Josefina e Hércia, que aceitaram tão prontamente a coorientação e foram parceiras na execução desse projeto.

A todas as pesquisadoras do projeto Castanhas Brasileiras, em especial à Daniela, Alessandra e Ana Paula, que foram as melhores companhias que eu poderia ter na coleta de dados e nas conversas durante o café. Gratidão por tanto conhecimento compartilhado!

À Universidade Federal de Viçosa, por proporcionar um ensino de excelência durante toda minha formação nos últimos treze anos.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC) com quem vivi muitos momentos de descontração, desabafos e troca de conhecimentos.

Ao LAMECC e Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio na coleta de dados e análise de marcadores da saúde.

Agradeço ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV pelo suporte na realização dos experimentos e na análise dos dados. O NuBioMol é financiado pelas seguintes agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de

Estudos e Projetos (Finep) e Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

Ao CNPq e à Fapemig pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A Bioclin (Quibasa - Química Básica Ltda), por meio do projeto denominado Projeto Brasil Escola, que forneceu suprimentos para algumas das dosagens bioquímicas necessárias para caracterizar o perfil bioquímico dos participantes do estudo.

A todos que contribuíram de alguma forma para quem eu sou hoje e torceram por mim, muito obrigada!

RESUMO

SILVEIRA, Brenda Kelly Souza Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Efeito do consumo de castanhas brasileiras (*Bertholetia excelsa* H.B.K. e *Anacardium occidentale* L.) em marcadores da saúde intestinal e inflamatórios de mulheres com excesso de peso.** Orientadora: Helen Hermana Miranda Hermsdorff. Coorientadoras: Josefina Bressan e Hércia Stampini Duarte Martino.

As castanhas são fontes de nutrientes e compostos bioativos relacionados a desfechos positivos em saúde, incluindo melhor controle do peso corporal. Entretanto, a castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K) e a castanha de caju, (*Anacardium occidentale* L.), ambas nativas brasileiras, estão entre as menos estudadas. Além disso, as evidências sobre o efeito das castanhas na inflamação e saúde intestinal são escassas. Por isso, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do consumo de castanhas brasileiras associado à restrição calórica sobre marcadores inflamatórios e da saúde intestinal de mulheres com excesso de peso. Este estudo compõe-se de duas intervenções, ambas com oito semanas de duração. O estudo 1 tratou-se de um ensaio clínico randomizado, controlado, com 40 mulheres alocadas aleatoriamente em dois grupos, 1) controle (n = 19): dieta isenta de castanhas restrita em calorias (-500 kcal/d); 2) castanhas brasileiras (n = 21): 15 g de castanha-do-brasil e 30 g de castanha de caju associadas à dieta restrita em calorias (-500 kcal/d). A estudo 2 tratou-se de um ensaio clínico controlado, não randomizado, com 56 mulheres alocadas em dois grupos, 1) controle (n = 29): dieta isenta de castanhas restrita em calorias (-500 kcal/d); 2) castanha-do-brasil (n = 27): 8 g de castanha-do-brasil com alto conteúdo de selênio (347,2 µg) associadas à dieta restrita em calorias (-500 kcal/d). Em ambas as intervenções, as participantes foram submetidas à avaliação antropométrica, coleta de sangue em jejum para análise da concentração de marcadores inflamatórios no plasma (PCR, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-17A) e teste de permeabilidade intestinal (coleta de urina) no início e ao final da intervenção. No estudo 1, também foram coletadas amostras de fezes e realizado o sequenciamento do gene 16S para análise da microbiota intestinal, além da determinação do pH e concentração de ácidos graxos fecais. As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS versão 24.0, adotando-se um nível de significância de 5%. Em ambas as intervenções, as participantes atingiram restrição calórica e perda de peso semelhantes. O consumo de castanhas brasileiras no estudo 1 resultou no aumento de bactérias comensais (*Ruminococcus*, *Roseburia*, *NK4A214_groups*, and *UCG-022*) e ácido propiônico fecal, mas não houve mudança em marcadores inflamatórios. As castanhas brasileiras também protegeram contra o aumento da

permeabilidade intestinal, observado no grupo controle. Mudanças na permeabilidade intestinal foram correlacionadas com maior redução na gordura corporal, IL-8, e aumento na abundância de *Ruminococcus*. No estudo 2, o consumo de castanha-do-brasil reduziu PCR e citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL1- β , IL-8) e melhorou a permeabilidade intestinal, comparado ao grupo controle. O aumento na concentração plasmática de selênio se correlacionou com maior redução de IL1- β e IL-8. Ademais, reduções de IL-8 foram preditivas de maior redução na permeabilidade intestinal. Nossos resultados indicaram efeito benéfico do consumo de castanhas brasileiras no contexto de uma dieta restrita em calorias sobre marcadores da saúde intestinal e inflamação. Por fim, o efeito foi mais pronunciado após o consumo de castanha-do-brasil com alto conteúdo de selênio nos marcadores avaliados nos dois estudos.

Palavras-chave: Selênio. Microbiota intestinal. Inflamação. Obesidade. Redução de peso. Restrição calórica.

ABSTRACT

SILVEIRA, Brenda Kelly Souza Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Effect of Brazilian nuts intake (*Bertholletia excelsa* H.B.K. and *Anacardium occidentale* L.) on intestinal health and inflammatory markers in women with overweight or obesity.** Advisor: Helen Hermana Miranda Hermsdorff. Co-advisors: Josefina Bressan and Hércia Stampini Duarte Martino.

Nuts are sources of nutrients and bioactive compounds related to positive health outcomes, including better body weight control. However, Brazilian nuts (Brazil nut, *Bertholletia excelsa* H.B.K and cashew nut, *Anacardium occidentale* L.) are among the least studied. Additionally, evidence on the effect of nuts on inflammation and gut health is sparse. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of Brazilian nuts intake in an energy restriction context on inflammatory markers and intestinal health in overweight or obese women. This study was divided into two interventions, both of 8-week follow-up. Phase 1 was a randomized, controlled clinical trial, with 40 women randomly allocated into two groups, 1) control (n = 19): nuts-free and energy-restricted diet (-500 kcal/d); 2) Brazilian nuts (n = 21): 15 g of Brazil nuts and 30 g of cashews associated with an energy-restricted diet (-500 kcal/d). Phase 2 was a controlled, non-randomized clinical trial, with 56 women divided into two groups, 1) control (n = 29): nuts-free and energy-restricted diet (-500 kcal/d); 2) Brazil nuts (n = 27): 8 g of Brazil nuts with a high selenium content (347.2 µg) associated with an energy-restricted diet (-500 kcal/d). In both phases, participants underwent anthropometric assessment, fasting blood collection to determine the concentration of plasma inflammatory markers (CRP, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-17A) and intestinal permeability test (urine collection) at the beginning and the end of intervention. In phase 1, fecal samples were also collected and 16S gene sequencing was performed to analyze the intestinal microbiota, in addition to determining the pH and concentration of fecal fatty acids. Statistical analyzes were performed using SPSS software, version 24.0, adopting 5% as significance level. In both phases, participants achieved similar energy restriction and weight loss. Consumption of Brazil nuts in phase 1 increased commensal bacteria (*Ruminococcus*, *Roseburia*, *NK4A214_groups*, and *UCG-022*) and fecal propionic acid, but did not change inflammatory markers. Brazil nuts also protected against the increase in intestinal permeability observed in the control group. Changes in intestinal permeability were correlated with greater reduction in body fat, IL-8, and increase in *Ruminococcus* abundance. In phase 2,

consumption of Brazil nuts reduced CRP and pro-inflammatory cytokines (TNF, IL1- β , IL-8) and improved intestinal permeability compared to the control group. Increased plasma selenium concentration correlated with greater reduction of IL1- β and IL-8. Furthermore, reductions in IL-8 were predictive of a greater reduction in intestinal permeability. Our results indicated a beneficial effect of Brazilian nut consumption associated with an energy-restricted diet on markers of intestinal health and inflammation. Finally, the effect was more pronounced after consumption of Brazil nuts with a high selenium content.

Keywords: Selenium. Gastrointestinal microbiome. Inflammation. Obesity. Weight loss. Energy restriction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS GERAIS

Figura 1. Interrelação entre obesidade, inflamação, disbiose e permeabilidade intestinal.	29
Figura 2. Potenciais mecanismos envolvidos na modulação da inflamação e saúde intestinal, após o consumo regular de castanhas brasileiras (castanha de caju e castanha-do-brasil).	40
Figura 3. Fluxograma do estudo.	44

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1. The CONSORT flow diagram, showing the flow of participants in each phase of the study.	68
Figure 2. Boxplot of plasma cytokines at baseline and after 8 weeks of intervention, according to treatment group.	71
Figure 3. Intestinal permeability measured by urine excretion of lactulose and mannitol, at baseline and after 8 weeks of intervention, according to treatment group.....	72
Figure 4. Bacterial composition at phylum and gender levels, at baseline and after 8 weeks, according to treatment group.	75
Figure 5. LEfSe analysis identifying the OTUs that most differed between groups at baseline and endpoint (8 weeks of intervention).....	77
Figure 6. Correlation between intestinal permeability, anthropometric variables, interleukin-8 and Ruminococcus gender, among participants of both treatment groups (n = 25). ...	78
Figure 7. Correlation between inflammatory biomarkers and gut microbiota at the phylum level (Verrucomicrobiota, Desulfurobacterota, Firmicutes), among participants of both treatment groups (n = 25).	79
Supplementary figure 1. Alpha-diversity estimated by the Chao 1, Shannon and Simpson index at baseline and after 8 weeks of intervention, according to the treatment group.	85
Supplementary figure 2. Changes in bacterial β -diversity after 8 weeks, according to treatment group.	86

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1. Intestinal permeability outcomes, according to treatment group (control or Brazil nuts).....	103
Figure 2. Pearson or Spearman correlations between changes in plasma selenium, pro inflammatory cytokines and lactulose / mannitol ratio (LM ratio) (n = 46).	106
Figure 3. Mechanisms related to selenium-rich Brazil nut consumption in the context of an energy-restricted diet.....	110
Supplementary figure 1. Study design and methodology.....	112
Supplementary figure 2. The CONSORT flowchart diagram.	113
Supplementary figure 3. Dietary consumption before and during 8-week intervention, according to treatment group.	115

LISTA DE TABELAS

TABELAS GERAIS

Tabela 1. Composição das castanhas brasileiras em porção de 100g.....	34
---	----

TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1. Changes in participants characteristics and food consumption during intervention, according to treatment group.	69
Table 2. Fecal volatile fatty acids and pH at baseline and after 8 weeks of intervention, according to treatment group.	73
Supplementary Table 1. Sequencing data at baseline and after 8 weeks of intervention, by treatment group.	85

TABELAS DO ARTIGO 2

Table 1. Outcome fasting inflammatory biomarkers at baseline and endpoint of 8-wk intervention, according to treatment group.	102
Table 2. Intestinal permeability and inflammatory variation according to the intervention group and weight loss (< or \geq 4 kg) after 8 weeks of intervention.	105
Supplementary table 1. Baseline participants' characteristics and dietary consumption during 8-week intervention for treatment group.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
CB	Castanha-do-brasil
CC	Castanha de caju
CCNT	Condições crônicas não transmissíveis
CHS	Solução de hidróxido de cálcio
CSR	Solução de sulfato cúprico
CT	Grupo controle
DAS-UFV	Divisão de saúde da Universidade Federal de Viçosa
DEXA	Absorciometria de raios-x de dupla energia, do inglês <i>Dual-energy X-ray Absortimetry</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EER	Necessidade Energética Estimada, do inglês <i>Estimated Energy Requirement</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDR	Taxa de falsas descobertas, do inglês <i>false discovery rate</i>
GPRs	Receptores acoplados à proteína G, do inglês <i>G-protein coupled receptor</i>
GPX	Glutationa peroxidase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular, do inglês <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
KCAL	Quilocalorias
LAMECC	Laboratório de metabolismo energético e composição corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low-density lipoprotein</i>
LEfSe	Efeito da Análise Discriminante Linear, do inglês <i>Linear Discriminant Analysis Effect Size</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
NF-κB	Fator nuclear kappa B, do inglês <i>nuclear factor kappa-B</i>
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritroide 2, do inglês <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>

OTU	Unidade de taxonomia operacional, do inglês <i>operational taxonomy units</i>
PC	Perímetro da cintura
PCoA	Análise de Coordenadas Principais, do inglês <i>Principal Coordinate Analysis</i>
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PYY	Peptídeo YY
RDA	Ingestão diária recomendada, do inglês <i>Recommended Dietary Allowance</i>
SRA	Arquivo de Leitura de Sequência, do inglês <i>Sequence Read Archive</i>
TLR	Receptor <i>toll like</i> , do inglês <i>toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
TRxR	Tioredoxinas redutases, do inglês <i>thioredoxin reductases</i>
UFV	Universidade Federal de Viçosa
ZO	Zônula ocludente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. HIPÓTESES	19
3. OBJETIVO GERAL	20
3.1 <i>Objetivos específicos</i>	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1 <i>Sobrepeso e Obesidade</i>	21
4.2 <i>Inflamação e saúde intestinal</i>	24
4.3 <i>Intervenção nutricional na obesidade e desordens associadas</i>	30
4.4 <i>As castanhas brasileiras</i>	33
5. METODOLOGIA	41
5.1 Desenho do estudo	41
5.2 Aspectos éticos	45
5.3 Alimento teste	45
5.4 Determinação da composição das castanhas brasileiras	46
5.5 Critérios de inclusão e não inclusão	46
5.6 Recrutamento e triagem	46
5.7 Período pré-intervenção (<i>run-in</i>)	47
5.8 Planos alimentares e restrição calórica	47
5.9 Coleta de material biológico	48
5.10 Adesão ao protocolo e critérios de descontinuidade	49
5.11 Antropometria e composição corporal	50
5.12 Avaliação do Consumo Alimentar	50
5.13 Biomarcadores inflamatórios	51
5.14 Permeabilidade intestinal	51
5.15 Ácidos graxos fecais de cadeia curta (AGCC)	52
5.16 Potencial hidrogeniônico (pH) fecal	53
5.17 Selênio plasmático	53
5.18 Análise da microbiota intestinal por sequenciamento do gene 16S rRNA	53
5.19 Análise estatística	54
5.20 Retorno às participantes	56
6. RESULTADOS – Artigo Original 1 (Estudo 1)	57
Artigo Original 2 – Estudo 2	94
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
8. CONCLUSÕES GERAIS	123

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
10. APÊNDICES.....	142
APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	142
APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM PRESENCIAL.....	148
APÊNDICE 3 – MODELOS DE CARDÁPIOS DO GRUPO INTERVENÇÃO COM CASTANHAS BRASILEIRAS	151
APÊNDICE 4 – CÁLCULO AMOSTRAL	153
11. ARTIGOS CIENTÍFICOS E PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO TEMA DA TESE.....	155
1. Artigo de Revisão 1	155
2. Artigo de revisão 2	156
3. Artigo de revisão 3	157
4. Capítulo de livro	158

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma pandemia que atinge mais de 650 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, mais de 60,3% da população está acima do peso, e a incidência do sobrepeso e obesidade tem crescido principalmente entre as mulheres (IBGE, 2019; WHO, 2020). Esses dados são alarmantes, pois sabe-se que o aumento excessivo da gordura corporal e o padrão dietético não saudável estão relacionados a outras alterações metabólicas envolvidas na gênese de condições crônicas não transmissíveis (CCNT), como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012; CHILDS; CALDER; MILES, 2019). Algumas dessas alterações incluem a inflamação crônica de baixo grau e o estresse oxidativo, que contribuem para o aumento do risco cardiometabólico (SILVA, et al., 2021; SILVEIRA, et al., 2018) e ainda para o desequilíbrio na composição da microbiota intestinal e aumento da permeabilidade no intestino (BOULANGÉ et al., 2016; GAAL; MERTENS; BLOCK, 2006).

O desequilíbrio na microbiota, denominado disbiose, é prevalente em pessoas com obesidade, assim como a permeabilidade intestinal aumentada. Essas alterações se retroalimentam, de forma que o aumento da permeabilidade afeta o equilíbrio da microbiota, mas o perfil da microbiota também é determinante para a permeabilidade intestinal. A redução na eficiência da barreira intestinal culmina no aumento de antígenos bacterianos que chegam até a circulação sanguínea (FUSCO et al., 2020) desencadeando cascatas pró-inflamatórias que alimentam ainda mais o desequilíbrio intestinal (BOULANGÉ et al., 2016).

Nesse cenário, a perda de peso como consequência da restrição calórica e da adoção de um padrão alimentar saudável que inclua alimentos fontes de antioxidantes é recomendada para controle dessas alterações (CONITEC, 2021; HERMSDORFF, et al., 2009, 2011; KÖKTEN et al., 2021; TILVES et al., 2022). Entretanto, as estratégias de sucesso para prevenção e tratamento da obesidade permanecem limitadas (SUN, et al., 2018). Por isso, alguns alimentos de alto valor nutricional, tais como os frutos secos e castanhas com alto teor em lipídios insaturados e compostos bioativos (avelã, amêndoa, pistache, pinhão, castanha de caju, castanha-do-brasil, macadâmia e nozes), têm sido investigados no controle da obesidade e de suas complicações (CALDAS et al., 2020, 2022; ROCK et al., 2020; WANG, et al., 2021).

As castanhas possuem alta densidade calórica, pois são ricas em lipídios, principalmente os ácidos graxos mono e poli-insaturados (AGMI e AGPI). Além disso, são fontes de nutrientes e compostos bioativos como os polifenóis, flavonoides, tocoferóis, fibras,

minerais e vitaminas (LI, et al., 2020). Apesar da alta densidade calórica, o consumo de castanhas não promove ganho de peso mesmo quando grandes porções são consumidas (>30 g/dia) (HOU et al., 2021; SABATÉ, 2003; SUGIZAKI; NAVES, 2018). Pelo contrário, o consumo regular de castanhas está associado ao melhor controle do peso corporal (BES-RASTROLLO, et al., 2007), da inflamação (MAZIDI et al., 2016, 2018), do estresse oxidativo (SILVEIRA, et al., 2020), redução do risco cardiovascular e da mortalidade (GROSSO et al., 2015). Todavia, a adição isolada de castanhas à dieta sem o ajuste para promover déficit calórico parece insuficiente para promover perda de peso significativa, em virtude das grandes alterações metabólicas causadas pela obesidade (HOU et al., 2021; PIETERS et al., 2005; SABATÉ, 2003).

As castanhas menos estudadas são as castanhas brasileiras, que incluem as castanhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) e castanhas-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.) (INC, 2016). A castanha de caju se destaca por ser rica em ácidos graxos insaturados (79,7%), principalmente ácido oleico (60,7%) e linoleico (17,8%). Diante disso, a maioria dos estudos com essa castanha investigam principalmente seus efeitos sobre o perfil lipídico (JALALI et al., 2020; MAH et al., 2017). Estudos experimentais ou *in vitro* reportaram benefícios da castanha de caju na redução de espécies reativas de oxigênio (EROS), citocinas pró-inflamatórias e na permeabilidade intestinal (FUSCO et al., 2020; SIRACUSA et al., 2020; SOUZA, et al., 2017). Poucos estudos com humanos foram realizados, mas indicam pequeno efeito da castanha de caju e dos demais frutos secos sobre as concentrações de proteína C reativa (PCR) (GOBBO, et al., 2015; MUKUDDER-PETERSEN et al., 2007). Além disso, uma porção diária mínima de 28,4g de castanhas parece ser necessária para se obter benefícios significativos, sendo os efeitos mais pronunciados com porções > 60g/dia (GOBBO, et al., 2015).

Por sua vez, a castanha-do-brasil parece mais promissora por ser uma das principais fontes alimentares de selênio. Se for cultivada em solos com alto teor de selênio como algumas regiões da Amazônia, o consumo de uma a cinco unidades dessa castanha por dia pode ser suficiente para atender às necessidades diárias de selênio (55 µg), um mineral essencial para a síntese de enzimas antioxidantes (selenoproteínas), como as glutatona peroxidases (GPx) (LI, et al., 2020; SILVEIRA, et al., 2020). Em indivíduos com deficiência de selênio, a suplementação via castanha-do-brasil foi efetiva para restaurar as concentrações séricas desse mineral, aumentar as enzimas antioxidantes e reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Esses desfechos foram mediados pela redução do fator nuclear kappa B (NF-

κB), que estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CARDOZO et al., 2016; STOCKLER-PINTO, et al., 2014).

O consumo de castanhas também afeta a saúde intestinal, e esse efeito depende do tipo de castanha consumida, da porção e do grau de processamento (BAMBERGER et al., 2018; HOLSCHER, et al., 2018). Uma metanálise recente identificou aumento no gênero das bactérias *Clostridium*, *Roseburia*, *Dialister*, *Lachnospira* após o consumo diversos tipos de castanhas (pistache, amêndoas, nozes), mas não houve mudança nos filos (CREEDON et al., 2020). Entretanto, os estudos realizados até o momento são de curta duração (< 3 semanas) ou possuem limitações metodológicas que inviabilizam a confiabilidade dos resultados (CREEDON et al., 2020).

Até o momento, não identificamos nenhum ensaio clínico publicado sobre o efeito das castanhas de caju ou castanhas-do-brasil na microbiota ou na permeabilidade intestinal de humanos. De fato, a maioria das evidências sobre os efeitos das castanhas na saúde humana se baseiam em estudos epidemiológicos, experimentais ou *in vitro*, enquanto que os resultados dos estudos clínicos permanecem controversos. Diante do exposto, a literatura é inconclusiva a respeito da eficácia do consumo de frutos secos oleaginosos, especialmente das castanhas brasileiras, sobre a redução do peso corporal, inflamação, microbiota e permeabilidade intestinal.

2. HIPÓTESES

Estudo 1:

A hipótese desse estudo é que o consumo diário de castanhas brasileiras (castanha-do-brasil e castanha de caju), associado a uma dieta restrita em calorias, aumentará a saúde intestinal de mulheres com excesso de peso, comparado ao grupo controle, mediante:

- 1) Melhora no estado nutricional do selênio;
- 2) Mudanças benéficas no perfil da microbiota e redução da permeabilidade intestinal;
- 3) Redução do potencial hidrogeniônico (pH) do lúmen intestinal devido ao aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC);
- 4) Redução do estado inflamatório;
- 5) Maior perda de peso e de gordura corporal.

Estudo 2:

A hipótese desse estudo é que o consumo diário de castanhas-do-brasil com alto conteúdo de selênio, associado a uma dieta restrita em calorias, reduzirá a permeabilidade intestinal de mulheres com excesso de peso, comparado ao grupo controle, mediante:

- 1) Melhora no estado nutricional do selênio;
- 2) Maior perda de peso e de gordura corporal;
- 3) Redução do estado inflamatório.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do consumo diário de castanhas brasileiras, associado a uma dieta restrita em calorias, comparado ao grupo controle, sobre marcadores inflamatórios, microbiota e permeabilidade intestinal, em mulheres com excesso de peso.

*3.1 Objetivos específicos***Estudo 1:**

- ✓ Caracterizar as castanhas de caju e castanha-do-brasil quanto à composição química centesimal, de minerais, perfil de ácidos graxos e de antioxidantes;
- ✓ Avaliar o efeito do consumo combinado de castanhas brasileiras (castanhas de caju e castanha-do-brasil), comparado a dieta livre de castanhas (grupo controle), sobre:
 - Perda de peso e composição corporal;
 - Marcadores inflamatórios;
 - Perfil da microbiota e permeabilidade intestinal;
 - Produção de AGCC e modificação pH fecal;
 - Selênio plasmático;
- Investigar a relação entre perda de peso, inflamação e desfechos relacionados à saúde intestinal (microbiota, permeabilidade, pH fecal e produção de AGCC).

Estudo 2:

- ✓ Caracterizar a castanha-do-brasil quanto à composição química centesimal, de minerais, perfil de ácidos graxos e de antioxidantes;

- ✓ Avaliar o efeito do consumo de castanha-do-brasil com alto conteúdo de selênio, comparado a dieta livre de castanhas (grupo controle), sobre:
 - Perda de peso e composição corporal;
 - Selênio plasmático;
 - Marcadores inflamatórios;
 - Permeabilidade intestinal.
- Investigar a relação entre perda de peso, estado nutricional de selênio, inflamação e permeabilidade intestinal.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Sobrepeso e Obesidade

O sobrepeso e a obesidade são condições epidêmicas classificadas pelo o índice de massa corporal (IMC) superior a 25 e 30 kg/m², respectivamente, e caracterizadas pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (WHO, 2014). Aproximadamente 1,9 bilhões de adultos no mundo estão acima do peso, destes, mais de 650 milhões tem obesidade (WHO, 2020). No Brasil, dados mais recentes da Pesquisa Nacional de Saúde (2019) indicam que 60,3% da população está acima do peso adequado (IBGE, 2019). Embora a prevalência de excesso de peso esteja aumentando em ambos os sexos, atualmente a maior prevalência é identificada entre as mulheres (62,6%). Especificamente sobre a obesidade, a prevalência entre os homens subiu de 9,6% para 22,8% no período entre 2002 e 2019, e de 14,5% para 30,2% entre as mulheres no mesmo período (IBGE, 2019).

O aumento do sobrepeso e da obesidade é pandêmico desde 1980 e impacta a economia mundial com gastos estimados em 2 trilhões de dólares ou 2,8% do produto interno bruto (PIB) global (TREMMELE et al., 2017). Individualmente, as pessoas acometidas pelo sobrepeso e pela obesidade tem despesas 46% maiores com internações, 80% maiores com medicamentos e 27% mais consultas ambulatoriais comparado a pessoas com peso adequado (SMITH; SMITH, 2016). Por ser uma condição que reduz a qualidade de vida e predispõe à outras comorbidades, a obesidade também pode reduzir a produtividade e o crescimento econômico, em consequência da perda de dias de trabalho, limitações físicas, redução da expectativa de vida e potencial incapacitante (TREMMELE et al., 2017).

Além dos impactos econômicos, o sobrepeso e a obesidade aumentam o risco de mortalidade por todas as causas e o risco de morte prematura, especialmente por causas associadas à desfechos cardiovasculares (DI ANGELANTONIO et al. 2016; ENGIN; VIRDIS, 2016). Nesse cenário, o aumento do sobrepeso e da obesidade é alarmante, especialmente quando consideramos que o excesso de gordura corporal desencadeia diversas alterações metabólicas, tais como resistência à insulina, dislipidemia, inflamação crônica, estresse oxidativo, permeabilidade intestinal aumentada, disbiose, entre outras (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012). Por esse motivo, a obesidade é um dos principais fatores de risco para diversas CCNT como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares (CHILDS; CALDER; MILES, 2019).

Isso acontece porque a obesidade é uma doença inflamatória crônica e subclínica. O tecido adiposo possui atividade endócrina e a expansão das células adiposas provoca vasoconstrição e isquemia nesse tecido, estimulando o aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF), a leptina, além da redução das anti-inflamatórias como a adiponectina e IL-10 (SIMENTAL-MENDÍA; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ; REYES-ROMERO, 2013). A infiltração de células imunes no tecido adiposo também aumenta na obesidade, de modo que parte do TNF circulante é produzido pelos adipócitos, mas grande parte se origina dos macrófagos (PRADO et al., 2009). Essa inflamação crônica de baixo grau promove a resistência à insulina, uma condição que retroalimenta todas as outras alterações metabólicas presentes na obesidade (RULL et al., 2010).

O aumento da gordura corporal modifica o fenótipo do tecido adiposo branco, tornando os adipócitos disfuncionais e inflamados, junto com a infiltração de células imunes na fração vascular do estroma. Como órgão imune e secretor, o tecido adiposo produz citocinas inflamatórias que afetam não apenas sua própria função, mas também a de órgãos remotos (HOTAMISLIGIL, 2017; KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021). Por isso, a obesidade está relacionada a outras desordens endócrino-metabólicas que afetam o metabolismo de lipídios e carboidratos, causando resistência à insulina e dislipidemias (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017).

O aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo caracteriza a inflamação de baixo grau e persistente que também pode ser chamada de metainflamação (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021). Essa resposta inflamatória é mais intensa no tecido adiposo visceral, comparado ao tecido adiposo subcutâneo, pois este apresenta maior hipertrofia, infiltração de macrófagos e maior associação com a síndrome metabólica. Por

isso, o perímetro da cintura é considerado um dos melhores preditores de risco cardiometabólico e se correlaciona fortemente com o tecido adiposo visceral (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021).

Além do estado inflamatório, o estresse oxidativo também aumenta devido ao acúmulo excessivo de gordura corporal. Em condições de homeostase, as EROS são neutralizadas pelos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático (DAY, 2009). Na obesidade, o aumento da produção de radicais livres somado à redução na capacidade antioxidante provoca um desequilíbrio que caracteriza o estresse oxidativo (CHILDS; CALDER; MILES, 2019). O estresse oxidativo e a inflamação se retroalimentam, de modo que a inflamação induz o aumento da produção de EROS, e o aumento da produção de EROS induz o dano tecidual que promove a inflamação. Algumas consequências do estresse oxidativo incluem danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), alterações na estrutura e função de proteínas, peroxidação lipídica, apoptose, etc (CHILDS; CALDER; MILES, 2019).

Na obesidade também acontecem alterações intestinais, tais como o desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, denominado disbiose, e o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal. O padrão alimentar não saudável é um dos principais responsáveis pela disbiose e aumento da permeabilidade, e essas alterações contribuem para o aumento da inflamação e do estresse oxidativo que retroalimentam as alterações na saúde intestinal (BOULANGÉ et al., 2016; GAAL; MERTENS; BLOCK, 2006). Alguns estudos experimentais sugerem uma relação causal entre alterações na microbiota e obesidade quando demonstraram que animais *germ-free* eram resistentes à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, mas ao receberem o transplante da microbiota de ratos obesos, apresentaram expressivo aumento na gordura corporal (RIDAURA et al., 2013; TURNBAUGH et al., 2006). A utilização de antibióticos em animais jovens também modificou a transcrição dos principais genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídios (CHO, et al., 2012), reforçando essa hipótese.

Todavia, os mecanismos pelos quais a disbiose promove as alterações metabólicas na obesidade ainda não foram bem esclarecidos (SUN, et al., 2018). Até o momento, sabe-se que os microrganismos liberam produtos e moléculas sinalizadoras que podem atuar de forma local ou sistêmica. Com o estímulo para a inflamação e aumento na produção de EROS, ocorre também dano tecidual e redução da eficiência da barreira intestinal. Por sua vez, o intestino mais permeável torna a barreira susceptível à passagem dos microrganismos e de seus componentes, que estimulam as células imunes a produzirem citocinas pró-inflamatórias aumentando ainda mais a produção de EROS (CANI, et al., 2007; SUN, et al., 2018).

Como exposto, a obesidade é uma doença complexa que envolve muitas alterações endócrino-metabólicas que se retroalimentam. Assim, a redução do peso e manutenção do peso corporal por meio de uma dieta saudável restrita em calorias ainda é a principal estratégia para controle da obesidade e suas alterações. Todavia, o controle da obesidade ainda é um desafio, como será discutido adiante. Por fim, os avanços no conhecimento sobre o impacto da microbiota intestinal no metabolismo e na inflamação trazem novas hipóteses e alvos terapêuticos para controle da obesidade.

4.2 Inflamação e saúde intestinal

A microbiota intestinal de um ser humano saudável é composta por 4 filos dominantes – Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria –, que se subdividem em mais de 500 espécies (HMPC, 2012). No cólon, 90% dos microrganismos são Firmicutes (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Eubacteria*, *Lactobacillus*) e Bacteroidetes (*Porphyromonas*, *Prevotella*), enquanto que Actinobacteria (*Bifidobacterium*) e Proteobacteria (*Helicobacter*) estão em menor proporção (< 2,5%), pois estão mais presentes no íleo. A simbiose entre os microrganismos e o organismo humano se desenvolveu ao longo de anos de evolução, originando uma comunidade dinâmica, diversa e numerosa (~ 10¹⁴ bactérias) (BIBBÒ et al., 2016; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017).

A microbiota desempenha diversas funções que beneficiam o hospedeiro, tais como produção de enzimas que digerem carboidratos, regulação do metabolismo de ácidos biliares, síntese de vitaminas e AGCC, entre outras. Os AGCC (butirato, propionato e acetato) são produzidos a partir da fermentação de carboidratos não digeridos e absorvidos pelos enterócitos, portanto, podem ser usados local ou sistemicamente ao adentrarem pela circulação portal (MORRISON; PRESTON, 2016). O butirato, em especial, é a fonte primária de energia para os colonócitos e os impede de sofrer autofagia (LOUIS; FLINT, 2017).

Apesar de serem fonte de energia, a produção intestinal dos AGCC, especialmente butirato e propionato, está associada ao controle da inflamação e maior saciedade, devido à inibição de NF-κB e aumento da síntese do peptídeo YY (PYY), o que promove efeitos metabólicos positivos (BOULANGÉ et al., 2016). Eles também interagem com receptores acoplados à proteína G (GPRs) presentes nos enterócitos, afetando a sensibilidade à insulina nos adipócitos e em alguns órgãos, o que influencia a regulação do metabolismo energético (BOULANGÉ et al., 2016). Por exemplo, a ativação do GPR43 reduz a sensibilidade à

insulina nos adipócitos e aumenta a sensibilidade no fígado e músculos, promovendo menor deposição de gordura e maior utilização periférica de glicose (BACKHED et al., 2004).

A presença de AGCC no lúmen intestinal também altera seu pH, tornando o meio mais ácido. Em pH mais ácido, há maior produção de butirato, maior captação de acetato e menor produção de propionato comparado ao pH próximo ao neutro (pH = 6,7). Além disso, o pH mais baixo inibe o crescimento de algumas cepas de bactérias patogênicas. Essa mudança no pH intestinal também tem um grande impacto na competição entre diferentes grupos de bactérias dentro da comunidade microbiana. Por exemplo, sabe-se que o pH levemente ácido (~ 5,5) reduz o crescimento do filo Bacteroidetes em relação a Firmicutes e Actinobactérias. Embora muitos estudos associem a redução de Bacteroidetes em relação aos Firmicutes com a obesidade, não é possível atribuir essa mudança ao aumento na produção de AGCC e acidificação do pH. Além disso, não existe consenso de que pessoas com obesidade tenham maior proporção de Firmicutes do que Bacteroidetes (LOUIS, P.; FLINT, 2017).

Estudos com humanos e animais demonstraram que a obesidade está associada a uma microbiota com menor diversidade bacteriana e maior proporção do filo Firmicutes comparado aos Bacteroidetes, embora essa relação ainda seja controversa (CASTANER et al., 2018; KOUTOUKIDIS et al., 2022; MICHELS et al., 2022). Além disso, essa proporção tende a ser revertida com mudanças no perfil alimentar, especialmente com o ajuste na ingestão de lipídios (KOUTOUKIDIS et al., 2022). É possível que o aumento de Firmicutes contribua para uma maior digestão de polissacarídeos e gorduras e, conseqüentemente, aumento das calorias extraídas dos alimentos (MICHELS et al., 2022; NGOWI et al., 2021). Em relação ao gênero, pessoas com obesidade, hipertensão e dislipidemias, em geral, apresentam maiores proporções dos gêneros *Romboutsia*, *Blautia*, *Dorea*, *Ruminococcus* e *Clostridium sensu stricto*, e proporções reduzidas de *Bacteroides*, *Roseburia*, *Butyricoccus*, *Alistipes*, *Clostridium IV*, *Parasutterella* e *Parabacteroides* (ZENG, et al., 2019).

Quando a composição da microbiota intestinal se altera com mudanças funcionais no transcriptoma, proteoma ou metaboloma microbiano, tem-se o quadro de disbiose (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). Portanto, denomina-se disbiose a perda de homeostase na microbiota intestinal, seja por mudanças na composição do microbioma, na sua funcionalidade ou atividade metabólica, ou ainda alterações em sua distribuição local. Desse modo, há três tipos de processos de disbiose, que não são mutuamente exclusivos: 1) redução dos microrganismos comensais, 2) aumento excessivo de microrganismos potencialmente prejudiciais e, 3) diminuição da diversidade microbiana geral (DEGRUTTOLA et al., 2016). A disbiose pode ser desencadeada pelo padrão alimentar, por infecções, uso de antibióticos,

deficiência imunológica, inflamação, ou quaisquer condições que provoquem desequilíbrio na microbiota (DEGRUTTOLA et al., 2016; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017).

Hoje, a microbiota é considerada um órgão endócrino que interage molecularmente com o organismo humano, influenciando-o sistemicamente, incluindo o aumento na extração de energia dos alimentos, alteração em hormônios responsáveis pela regulação da saciedade, além de modificar o sistema imune no intestino (RÉGNIER et al., 2021). Por isso, a disbiose é reconhecida como um fator ambiental importante para a gênese das doenças metabólicas (BOULANGÉ et al., 2016; RÉGNIER et al., 2021; TEIXEIRA; SOUZA; et al., 2012). Esse desequilíbrio na microbiota pode contribuir significativamente para o aumento da permeabilidade intestinal, assim como o aumento da permeabilidade retroalimenta a disbiose por diversos mecanismos, incluindo a ativação de vias inflamatórias (CANI, et al., 2012). A inflamação tem se destacado como um importante preditor da disbiose caracterizada pela proliferação de enterobactérias, um grupo de bactérias gram-negativas do filo Proteobacteria (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). A inflamação aumenta a apoptose das células epiteliais resultando no aumento de fosfolipídios disponíveis para serem usados como substrato por essas bactérias (GARSIN, 2010).

Concomitante à inflamação ocorre o aumento na produção de EROS, por exemplo, por consequência da ativação de células imunes como neutrófilos e do complexo NADPH oxidase necessários à fagocitose. Esse aumento do estresse oxidativo intestinal contribui para o aumento de sulfetos e aminas terciárias necessárias para a respiração das bactérias anaeróbias (GARSIN, 2010). Em contrapartida, o aumento do fluxo sanguíneo no intestino promove um aumento da oxigenação no tecido, condição desfavorável para bactérias produtoras de butirato como os *Clostrídios* e favorável a bactérias patogênicas como a *Salmonella* (RIVERA-CHÁVEZ et al., 2016).

Todas essas alterações em conjunto, incluindo o desequilíbrio na microbiota, a inflamação e estresse oxidativo, contribuem para aumentar a permeabilidade intestinal. Em homeostase, a barreira intestinal é semipermeável a fim de regular a passagem de nutrientes, toxinas e antígenos do lúmen intestinal para a circulação sanguínea. Esse epitélio é revestido por uma camada de muco formado por água e proteínas glicosiladas chamadas mucinas secretadas pelas células caliciformes, que atua como a primeira etapa de barreira, impedindo a passagem de grandes moléculas e microrganismos. A segunda barreira é composta pelo epitélio intestinal formado por vários tipos de células epiteliais, com predomínio de enterócitos. As células caliciformes responsáveis pela secreção de muco (mucinas formadoras

de gel) ficam localizadas entre os enterócitos, e produzem muco a fim de protegê-los (BISCHOFF et al., 2014; FARRÉ et al., 2020).

As células epiteliais são unidas pelos complexos juncionais. Na região mais apical está a zônula ocludente (ZO, do inglês *zonula occludens*), seguido da zônula aderente e dos desmossomos. Essa estrutura conhecida como junção apertada (do inglês, *tigh junctions*) é responsável pela regulação seletiva da passagem de moléculas. As vias de transporte no epitélio podem ser paracelular, transcelular, mediada por transportador e endocítica. Na permeabilidade paracelular, pelo menos dois tipos de poros são regulados por junções apertadas. O primeiro é um poro menor regulado pelas proteínas claudina. O segundo é um poro muito maior conhecido como via de “vazamento” regulado pelas proteínas ocludina e ZO (FARRÉ et al., 2020).

A inflamação e a disbiose causam aumento da permeabilidade intestinal por diversos mecanismos, incluindo a degradação do muco protetor, dano epitelial, redução das proteínas claudina, ocludina e ZO, com consequente afrouxamento das junções apertadas (FARRÉ et al., 2020). Algumas bactérias, como *E. coli* e a família Enterobacteriaceae, estão relacionadas à degradação do muco, enquanto outras bactérias comensais, como *Akkermansia muciniphila*, regulam as camadas de muco e aumentam a produção de ocludina (CHELAKKOT et al., 2018). Com a redução do muco, os microrganismos atingem o epitélio intestinal onde estimulam a resposta imune inata e adaptativa. A ativação de receptores *toll-like* (TLR) ativa a via NF- κ B aumentando a produção de quimiocinas e citocinas, bem como o recrutamento e ativação de células imunes. Os linfócitos liberam interferon gama (IFN- γ) e TNF causando disfunção na barreira intestinal (BISCHOFF et al., 2014).

O TNF leva à redistribuição da proteína ocludina da junção oclusiva e ZO, aumentando fluxo de moléculas grandes, e o IFN- γ abre uma rota paracelular para a entrada de antígenos luminiais de alta massa molecular. Em consequência à ação do TNF e IFN- γ , os enterócitos aumentam a síntese de IL-13 na tentativa de aumentar a expressão de claudina (HAN et al., 2016; SCHWARZ et al., 2007; WEBER, C. R. et al., 2010).

Todas essas alterações inflamatórias, da microbiota e membrana intestinal são frequentemente observadas em populações com obesidade. O excesso de gordura corporal e o padrão alimentar não saudável promovem aumento da inflamação e redução de bactérias comensais e da diversidade de microrganismos. Por sua vez, o desequilíbrio na microbiota aumenta a permeabilidade intestinal permitindo que antígenos cheguem ao epitélio intestinal e a circulação, aumentando a inflamação local e sistêmica (**Figura 1**). Portanto, estratégias para controle da obesidade devem incluir como alvo terapêutico a perda de peso, somada ao

reestabelecimento do equilíbrio na microbiota, já que ambos são mediadores da inflamação e redução da permeabilidade intestinal. No tópico a seguir, as principais estratégias para controle da obesidade serão discutidas.

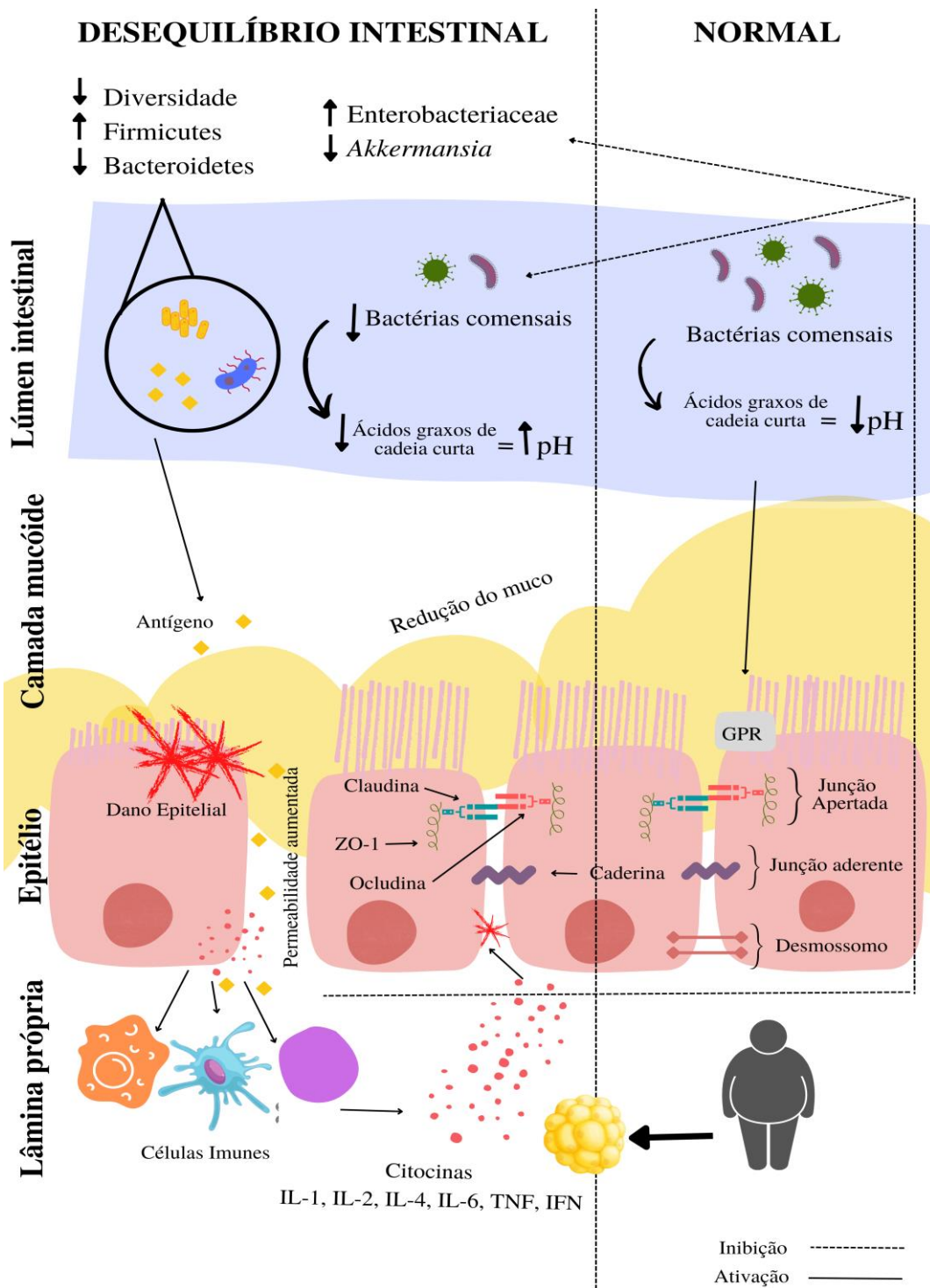


Figura 1. Interrelação entre obesidade, inflamação, disbiose e permeabilidade intestinal.

Na obesidade, o aumento do tecido adiposo promove aumento de citocinas inflamatórias que modificam o ambiente intestinal, contribuindo para desequilíbrios na microbiota (disbiose) e aumento da permeabilidade. Na disbiose, as bactérias potencialmente patogênicas intensificam a inflamação e degradam o muco protetor. Com a permeabilidade aumentada, antígenos microbianos atingem a lâmina própria estimulando a inflamação. As bactérias comensais produtoras de butirato reduzem, aumentando o pH do lúmen e a proliferação de bactérias indesejadas. Figura de autoria própria.

4.3 Intervenção nutricional na obesidade e desordens associadas

Apesar de ser uma doença multifatorial causada por distúrbios endócrinos, genéticos, ambientais, emocionais e psicossociais; os fatores comportamentais são a principal causa do aumento da obesidade nos últimos anos, incluindo o sedentarismo e a alimentação inadequada (HRUBY; HU; 2015). Nesse sentido, o tratamento convencional do sobrepeso e da obesidade inclui dieta moderadamente restrita em calorias (500 a 1.000 kcal/dia) associado a mudanças no padrão alimentar e no estilo de vida (ABESO, 2022; CONITEC, 2021). Padrões alimentares caracterizados por alimentos *in natura* e baixo consumo de alimentos processados e ultraprocessados estão associados ao menor consumo calórico, menor peso corporal e menor risco cardiometabólico (ESTRUCH; ROS, 2020; SILVEIRA, et al., 2018).

A perda de peso resultante de uma alimentação com restrição calórica tem se mostrado eficaz no controle da inflamação crônica, com a redução nas concentrações de TNF, IL-6, leptina, de moléculas de adesão intercelular (ICAM-I), além da PCR (HERMSDORFF; ZULET; MARTÍNEZ, 2011; HERMSDORFF, et al., 2009, 2011). Também foram descritas mudanças no perfil da microbiota após a perda de peso, bem como redução da permeabilidade intestinal (DAMMS-MACHADO et al., 2017; KOUTOUKIDIS et al., 2022; STANISLAWSKI et al., 2021). Muitas intervenções são capazes de promover a perda de peso, mas a longo prazo, a maioria dos indivíduos recuperam o peso perdido. Portanto, as terapias da obesidade almejam causar perda intencional de 5 a 10% do peso inicial, e mantê-lo por mais de um ano. Apenas 25% dos sujeitos submetidos ao tratamento alcançam essa meta (GREENWAY, 2015).

A longo prazo, o aconselhamento, apoio social e restrição de alimentos parece insuficiente para manutenção da perda de peso. Intervenções que alteram a fisiologia do controle do peso corporal tendem a ser mais eficazes, pois consideram não somente o balanço energético, mas a recuperação da homeostase metabólica e controle das alterações subclínicas (ABESO, 2022; LATIFANI et al., 2020; ROSS et al., 2019). Isso foi observado em grupo de indivíduos submetidos a intervenção para perda de peso. Aqueles que apresentaram maior pontuação no índice de qualidade da dieta, maior ingestão de micronutrientes e um padrão alimentar com menor teor de gordura (32% vs 37% das calorias totais) conseguiu manter pelo menos 9kg a menos no peso corporal durante 3,4 anos, comparado àqueles com pior padrão alimentar (PASCUAL et al., 2019).

Comparado a outros padrões alimentares, como dietas reduzidas em carboidratos ou gorduras, a dieta mediterrânea parece mais promissora. Em todas as estratégias, a maioria dos

sujeitos recuperam total ou parcialmente o peso perdido, desaparecendo os benefícios cardiometabólicos promovidos pelo emagrecimento. Contudo, mesmo com o reganho de peso, a adoção de uma dieta mediterrânea promove melhoras metabólicas que perduram (GE et al., 2020). O padrão alimentar mediterrâneo é caracterizado pela alta ingestão de frutas, hortaliças, peixes, azeite de oliva e castanhas, e baixo consumo de carnes vermelhas e carboidratos refinados (HERMSDORFF, et al., 2009). Isso resulta em uma dieta com alto teor de micronutrientes e compostos bioativos, como os polifenóis, além de ácidos graxos insaturados, especialmente os monoinsaturados.

Todos esses compostos são descritos na literatura como moduladores da microbiota e da inflamação, exercendo efeito protetor sobre a permeabilidade. Os AGMI parecem contribuir para o controle do peso corporal, inclusive pelo aumento da atividade de enzimas lipolíticas (YANG, et al., 2017). Além de serem recomendadas para redução do risco cardiovascular, dietas ricas em AGMI e AGPI, e reduzidas em ácidos graxos saturados (AGS) aumentam a proporção Bacteroidetes/Firmicutes e a contagem de bactérias lácticas benéficas (*Bifidobacteria* e *Akkermansia muciniphila*) (RINNINELLA et al., 2019), e não se relacionam com aumento da permeabilidade intestinal e inflamação, mesmo quando promovem ganho de peso (BIBBÒ et al., 2016).

Assim como os AGI, os compostos bioativos como os polifenóis (catequinas, flavonóis, flavonas, antocianinas, ácidos fenólicos) têm efeito positivo sobre o controle do peso corporal por mecanismos que incluem redução da proliferação de pré-adipócitos, supressão da diferenciação de adipócitos e acúmulo de triglicerídeos, aumento da lipólise e da β -oxidação e redução da inflamação (WANG, et al., 2014). Os benefícios se estendem à microbiota: aumentam abundância de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e a produção de AGCC, além de inibirem bactérias patogênicas, como *Clostridium perfringens* e *Clostridium histolyticum* (SINGH et al., 2017).

Apenas 5 a 10% dos polifenóis ingeridos podem ser diretamente absorvidos no intestino. Os outros 90-95% ficam sujeitos à atividade de enzimas microbianas para formação de metabólitos com efeito fisiológico diferente e menor peso molecular, permitindo então sua absorção. Algumas espécies capazes de metabolizar polifenóis são *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.* Eles também promovem maior integridade da membrana epitelial devido ao aumento do muco protetor e regulação da atividade imune (CARDONA et al., 2013).

A deficiência de minerais como selênio e zinco também pode afetar a microbiota, incluindo modulação da virulência de algumas cepas bacterianas (ZMORA et al., 2017).

Ratos *germ-free* foram alimentados com dieta baixa em selênio e apresentaram maior atividade de GPx no fígado e intestino comparado aos ratos convencionais, indicando que, diante da escassez de selênio na dieta, a microbiota pode competir com o hospedeiro pelo mineral (HRDINA et al., 2009).

Sobre essa perspectiva, alguns alimentos específicos têm recebido destaque devido ao seu alto valor nutricional e potencial para modificar a microbiota, reduzir a inflamação causada pela obesidade e, conseqüentemente, melhorar a resposta metabólica e os resultados da restrição calórica. Entre esses alimentos estão os frutos secos oleaginosos ou castanhas, tais como avelã, amêndoa, pistache, pinhão, castanha de caju, castanha-do-brasil, macadâmia e nozes. O consumo de castanhas tem sido relacionado ao controle do peso corporal (BES-RASTROLLO, et al., 2007), da glicemia (MAZIDI et al., 2018), do perfil lipídico, inflamação (MAZIDI et al., 2016, 2018), estresse oxidativo (SILVEIRA, et al., 2020), redução do risco cardiovascular e da mortalidade (GROSSO et al., 2015). Entretanto, esses resultados se baseiam majoritariamente em estudos epidemiológicos, enquanto os resultados dos estudos clínicos permanecem controversos, como será discutido no tópico adiante.

O consumo de castanhas também modifica a microbiota, hoje reconhecida como órgão endócrino. De acordo com uma metanálise recente, o consumo de castanhas (amêndoas, nozes, pistache; por 18 dias a 8 semanas) aumentou significativamente os gêneros *Dialister*, *Lachnospira*, *Roseburia* e *Clostridium*, e reduziu *Parabacteroides*, sem modificar os filos, a diversidade ou produção de fezes (CREEDON et al., 2020). Entretanto, os efeitos divergem muito de acordo com a porção e o tipo de castanha estudada. Por exemplo, o consumo de pistache parece afetar muito mais o número de bactérias produtoras de butirato do que as amêndoas (UKHANOVA et al., 2014). Essa diferença pode ser atribuída à diferente composição das castanhas no que se refere ao tipo de polifenóis, quantidade de cada mineral e perfil de ácidos graxos.

Além disso, apesar de diversos tratamentos e abordagens terem sido investigados para controle da obesidade e das alterações metabólicas associadas, as estratégias de sucesso para lidar com essa condição permanecem limitadas (SUN, et al., 2018). Diante do impacto que a obesidade tem na qualidade de vida de seus portadores, é de extrema importância continuar as investigações a respeito de como os alimentos podem prevenir e controlar a obesidade e suas complicações, especialmente no que se refere às castanhas, que são alimentos com alta palatabilidade e valor nutricional.

4.4 As castanhas brasileiras

Compreende-se por amêndoa a parte interna de todos os frutos secos que possuem uma semente envolvida por um epicarpo rígido, tais como avelã, amêndoa, pistache, pinhão, castanha de caju, castanha-do-brasil, macadâmia e nozes (ROS, 2010; ROS; HU, 2013), também conhecidos apenas como frutos secos oleaginosos ou castanhas. As castanhas são alimentos com alta densidade calórica devido ao alto conteúdo de lipídios, principalmente os AGI. Além dos AGI, destacam-se em sua composição os nutrientes e compostos bioativos relacionados a desfechos positivos em saúde, tais como os polifenóis, flavonoides, tocoferóis, fibras, minerais e vitaminas (LI, et al., 2020). O Guia Alimentar para a População Brasileira recomenda o consumo de castanhas no contexto de uma alimentação saudável, onde predominam alimentos *in natura* ou minimamente processados, e menciona que as castanhas são uma boa opção para lanches, já que são práticas para transportar e consumir, e promovem saciedade (BRASIL, 2014). Na **tabela 1**, apresentamos a composição das castanhas utilizadas no presente projeto.

Tabela 1. Composição das castanhas brasileiras em porção de 100g.

Nutrientes	CASTANHA-DO-BRASIL				CASTANHA DE CAJU		
	Estudo 1	Estudo 2	TBCA	FELBERG et al. 2004	Estudo 1	TBCA	RICO et al. 2015
Calorias (kcal)	658,7	657,5	674,0	-	540,7	582,0	598,0
Umidade (g)	1,3	1,3	3,5	-	4,7	5,2	5,3
Cinzas (g)	3,3	2,5	3,4	3,4	2,7	2,5	2,6
Proteínas (g)	17,3	15,0	14,5	14,3	22,4	18,2	20,2
Carboidratos (g)	12,0	2,5	15,1	11,6	28,7	30,2	20,9
Lipídios (g)	54,7	65,0	63,5	-	34,1	43,8	47,4
AGS (g)	13,3	21,2	15,3	-	5,3	-	17,3
AGMI (g)	20,0	11,2	27,4	-	22,7	-	65,4
AGPI (g)	21,3	31,2	21,0	-	6,0	-	17,1
Fibras (g)	10,7	12,5	7,9	2,2	7,4	3,3	3,6
Selênio (µg)	340,0	4340,0	3382,0	3440,0	50,0	-	-

TBCA: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

Estudos observacionais reportam associação entre consumo de castanhas e redução da inflamação (RAJARAM; CONNELL; SABATÉ, 2010), do estresse oxidativo (STOCKLER-PINTO, et al., 2014), da hipercolesterolemia (LEE, et al., 2014) e do risco cardiovascular (ABBASPOUR et al., 2019). Por esse motivo, a *American Heart Association (AHA)* recomenda o consumo diário de 30g de castanhas variadas para prevenção das CCNT (AHA/ACC et al., 2014). Entretanto, essa recomendação se baseia em estudos observacionais, enquanto que os resultados dos ensaios clínicos são controversos.

Apesar de terem características nutricionais semelhantes, as castanhas diferem em sua composição. Neste projeto serão abordados os efeitos das castanhas brasileiras (castanha de caju e castanha-do-brasil), que apesar de estarem entre as castanhas mais consumidas no Brasil, ainda são as menos estudadas, segundo o *International Nut and Dried Fruit Council (INC)* (INC, 2016). A castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) destaca-se por ser rica em AGI (79,7%), principalmente ácido oleico (60,7%) e linoleico (17,8%), combinado a uma variedade de flavonóis (catequinas e galocatequinas), ácidos fenólicos (ácido elágico e ácido gálico), vitaminas, aminoácidos e fibras (RICO; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2015; ROTHWELL et al., 2013).

Os estudos com a castanha de caju avaliam principalmente as alterações nos lipídios plasmáticos (BAER; NOVOTNY, 2019; MAH et al., 2017). Há evidências de que a porção média utilizada capaz de modificar o perfil lipídico é de 28,4g, e os efeitos mais pronunciados são observados com porções > 60g, e em populações com risco cardiometabólico comparado aos indivíduos saudáveis (GOBBO, et al., 2015). Mesmo nesse tópico, ainda há controvérsias, de modo que alguns ensaios clínicos reportam melhora com porções diárias entre 28 e 64g/dia (BODHINI; MOHAN, 2018; MAH et al., 2017; PIETERS et al., 2005), enquanto outros estudos, incluindo uma metanálise (doses 30 a 42g/dia), não suportam essas alegações (BAER; NOVOTNY, 2019; DARVISH DAMAVANDI et al., 2019; GOBBO, et al., 2015; MUKUDDER-PETERSEN et al., 2007). De fato, a porção diária e o tempo de intervenção (mínimo oito semanas) parecem mais determinantes para modificar o perfil lipídico do que o tipo de castanha consumida (GOBBO, et al., 2015).

Alguns estudos avaliaram o efeito da árvore da castanha de caju na inflamação, incluindo extrato das folhas (AWAKAN et al., 2018; DUANGJAN et al., 2019; ONASANWO et al., 2012), da casaca e caule (OLAJIDE; ADEROGBA; FIEBICH, 2013) e também do ácido anacárdico isolado (AUGUSTO et al., 2020; CARVALHO et al., 2013; ÖNAL et al., 2020; SUNG, B. et al., 2008). Os estudos sobre o efeito da castanha de caju na inflamação foram realizados majoritariamente com animais, principalmente ratos e

camundongos, utilizando doses de 100 mg/kg (CORDARO; FUSCO; et al., 2020; CORDARO; SIRACUSA; et al., 2020; D'AMICO et al., 2022; OLIVEIRA, et al., 2019; SIRACUSA et al., 2020).

Bons resultados foram relatados em animais (FUSCO et al., 2020) e *in vitro* (SOUZA, et al., 2017), incluindo redução de EROS, citocinas pró-inflamatórias, permeabilidade intestinal, LPS plasmático, e regulação das vias Nrf2 e NF-kB (FUSCO et al., 2020). Contudo, em humanos, uma metanálise que incluiu castanha de caju, mas também outras castanhas, não identificou efeito sobre as concentrações de PCR com consumo médio de 28g/d (3 a 26 semanas) (GOBBO, et al., 2015). Porções maiores (> 60 g/dia ou 20% do valor calórico total) durante oito semanas também não modificaram as concentrações de PCR e ácido úrico, um resultado esperado, considerando que PCR é uma proteína de fase aguda (MUKUDEM-PETERSEN et al., 2007).

Para melhoria das defesas antioxidantes, a adoção de um padrão alimentar saudável (*prudente diet*) pode ser mais determinante do que a inclusão isolada de castanha de caju na dieta (DAVIS, et al., 2007). A escassez de estudos com a castanha de caju limita conclusões a respeito de seu efeito na saúde. Por enquanto, a literatura indica que o consumo superior a 30g por no mínimo oito semanas pode ser necessário para alcançar benefícios significativos na melhora de marcadores de risco cardiometabólico (AUNE et al., 2017).

A castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.) parece mais promissora. Ela também possui alto teor de lipídios (25% de AGMI, 21% de AGPI, 15% de AGS), fitoesteróis, tocoferol e fenólicos, além de micronutrientes (YANG, 2009). Essa castanha se destaca por ser a principal fonte alimentar de selênio, principalmente como selenometionina (forma orgânica) que é mais biodisponível. O teor de selênio pode variar entre 100 a 1000 mg/g⁻¹ de peso seco, dependendo do conteúdo desse mineral no solo em que a castanha foi cultivada (CARDOSO, et al., 2017).

O selênio é um micronutriente essencial importante para manutenção do estado redox, da função tireoidiana, imune e reprodutiva, pois é cofator enzimático para importantes enzimas antioxidantes conhecidas como selenoproteínas, tais como GPx e as tioredoxinas redutases (TRxR) (CARDOSO, et al., 2017; LI, et al., 2020). No plasma, a selenoproteína P representa 50% do selenoproteoma, e os outros 50% são as GPx, TRxR e as desidases de iodotironinas (MANGIAPANE; PESSIONE; PESSIONE, 2014; MEHDI et al., 2013).

A deficiência de selênio contribui para o aumento do estresse oxidativo e das CCNT (LI, et al., 2020; RAYMAN, 2012). Nesse contexto, o consumo insuficiente desse mineral tem sido reportado globalmente e estima-se que uma a cada sete pessoas no mundo tem baixa

ingestão de selênio (JONES et al., 2017; LI, et al., 2020). Essa prevalência poderia ser revertida com o consumo diário de castanha-do-brasil em pequenas porções, já que uma a cinco unidades/dia são suficientes para atender às necessidades diárias de selênio (55 ug) e aumentar consideravelmente a expressão de selenoproteínas, como as GPx (LI, et al., 2020; SILVEIRA, et al., 2020). As demais castanhas necessitam de porções maiores (> 30g/dia) para resultarem em benefícios semelhantes.

A suplementação de selênio também pode reduzir a inflamação como consequência dos efeitos benéficos na função imune e no controle do estresse oxidativo (LI, et al., 2020). Entretanto, duas metanálises demonstraram que, apesar de ser uma boa fonte de selênio altamente biodisponível, o consumo de castanha-do-brasil (5 a 20 g/d; 6 a 16 semanas) não foi suficiente para modificar as concentrações de PCR (GODOS et al., 2022; HOU et al., 2021), e esse resultado é corroborado por outros estudos (CARDOZO; STOCKLER-PINTO; MAFRA, 2016; DUARTE, et al., 2019; GHANAVATI et al., 2021; HU, et al., 2016; MARANHAO et al., 2011). É importante ressaltar que a PCR parece ser um marcador inflamatório pouco responsivo à suplementação com castanhas (GOBBO, et al., 2015; MAZIDI et al., 2016), mas mudanças identificadas em outros marcadores inflamatórios indicam que pode existir um efeito protetor (COLPO et al., 2014; SILVA, et al., 2019).

De fato, o TNF e algumas interleucinas parecem mais susceptíveis à redução após a introdução de castanhas na dieta (SILVA, et al., 2019). Em indivíduos em hemodiálise e com deficiência de selênio, a suplementação de uma castanha-do-brasil por dia durante três meses foi suficiente para reduzir a expressão do fator pró-inflamatório NF- κ B e das citocinas TNF e IL-6. Esse efeito foi atribuído à ativação do Nrf2 com consequente aumento das enzimas antioxidantes e controle do estresse oxidativo que promovia aumento da inflamação (CARDOZO; STOCKLER-PINTO; MAFRA, 2016; STOCKLER-PINTO, et al., 2014). Outros ensaios clínicos também identificaram mudança em marcadores inflamatórios diferentes da PCR após o consumo crônico de pequenas porções (STOCKLER-PINTO, et al., 2014, 2015) ou agudo em porções maiores (> 20g) (COLPO et al., 2014).

Apesar de possuir quase três vezes mais AGS do que a maioria das castanhas (16,3 g de AGS / 100g de castanha), o consumo de uma a cinco unidades de castanha-do-brasil não eleva significativamente o consumo de AGS pela dieta (< 1% do valor calórico total) (TACO, 2011). Portanto, efeitos adversos causados pelo excesso de AGS não são esperados.

O efeito das castanhas na perda de peso também tem sido investigado. Apesar de serem alimentos de alta densidade calórica, a ingestão de castanhas não está relacionada ao ganho de peso (HOU et al., 2021; SABATÉ, 2003; SUGIZAKI; NAVES, 2018). Algumas

hipóteses têm sido levantadas para explicar a ausência de ganho de peso como o aumento da saciedade, da excreção de gorduras e redução no consumo de ultraprocessados (HOU et al., 2021). Por outro lado, a adição de castanhas à dieta sem o ajuste para promover déficit calórico parece insuficiente para promover emagrecimento (HOU et al., 2021; SABATÉ, 2003). Ghanavati e colaboradores demonstraram que uma dieta restrita em calorias suplementada com mix de castanhas durante oito semanas promoveu maior redução nas concentrações de IL-6 e ICAM-1 comparado ao controle (sem castanhas). Entretanto, ambos os grupos perderam peso de forma semelhante (GHANAVATI et al., 2021).

Outro aspecto importante se refere à digestão parcial das castanhas, especialmente quando consumidas inteiras. O consumo de castanhas inteiras pode fornecer 16 a 25% menos calorias do que o previsto nas tabelas de composição porque estas não consideram a mastigação e digestibilidade, e grande parte das castanhas não é absorvida (BAER; NOVOTNY, 2018; GEBAUER et al., 2016; REHM; DREWNOWSKI, 2017; SUGIZAKI; NAVES, 2018). Diante disso, alguns questionamentos podem ser feitos: os nutrientes não digeridos das castanhas, por exemplo, fibras, lipídios e polifenóis, podem se tornar substratos para a microbiota intestinal alterando-a? Essa mudança na microbiota se relaciona com melhorias na integridade da barreira intestinal por mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes? Consequentemente, isso poderia contribuir para um melhor controle de peso? Ainda, o consumo de castanhas poderia promover maior perda de peso, redução da inflamação e, por consequência, melhorar a saúde intestinal?

Uma metanálise recente indicou que o consumo de castanhas modifica a microbiota intestinal em nível de gênero, mas não os filos ou a diversidade (CREEDON et al., 2020). Houve aumento de *Clostridium*, *Dialister*, *Lachnospira* e *Roseburia*, e redução de *Parabacteroides*, sem mudanças nos filos. Entretanto, os estudos incluídos eram de baixa qualidade (alto risco de viés) e avaliavam apenas três tipos de oleaginosas (nozes, amêndoas e pistache), portanto, a força da evidência dessa metanálise é fraca (CREEDON et al., 2020). Outra revisão da literatura corrobora com esses achados, indicando que, em estudos de curto prazo (< 8 semanas), a diversidade da microbiota pode não ser afetada. Além disso, não se sabe se essas mudanças na microbiota são suficientes para produzir resultados mensuráveis relacionados aos desfechos metabólicos (FITZGERALD et al., 2021).

Atualmente sabemos que o efeito das castanhas na microbiota intestinal em humanos depende ainda do tipo consumido, do tamanho da porção e do grau de processamento (por exemplo, castanhas torradas, laminadas, inteiras, em pasta, etc.). Por exemplo, o consumo de castanhas em pasta leva ao maior consumo calórico devido a disponibilidade de lipídios

comparado às castanhas inteiras que são parcialmente digeridas. Enquanto a pasta oferece mais lipídios, as castanhas inteiras podem atuar mais como fonte de fibras, desse modo, o consumo de pasta ou sementes inteiras pode afetar a microbiota por mecanismos diferentes (BAMBERGER et al., 2018; HOLSCHER, et al., 2018).

As evidências do efeito da castanha de caju sobre a microbiota e permeabilidade intestinal são escassas e baseadas em estudos com animais utilizando outras partes, como o extrato da casca da castanha de caju (KANG et al., 2018; MAEDA et al., 2021; MORAES, et al., 2019; SU, et al., 2021), ou extrato das folhas (ADEYEMI et al., 2021), ou do óleo de castanha de caju (MOITA et al., 2021; VIEIRA, et al., 2020, 2021).

Ao nosso conhecimento, não foi publicado nenhum ensaio clínico sobre o efeito isolado da ingestão de castanhas de caju ou castanha-do-brasil na microbiota ou na permeabilidade intestinal. Entretanto, duas teses brasileiras foram identificadas. A primeira avaliou o efeito do consumo diário de uma castanha-do-brasil (370 µg de selênio) em 29 indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, durante dois meses. Não houve mudança na composição global da microbiota, mas a diversidade interpessoal (β diversidade) variou conforme mudanças na expressão de selenoproteína P (ALENCAR, 2019). A segunda tese repetiu a mesma intervenção, porém em 97 indivíduos saudáveis. Mais uma vez, não houve mudança na composição global da microbiota, contudo, houve aumento de gêneros importantes à saúde como *Faecalibacterium*, *Bilophila* e *Bulleida* (HASHIMOTO, 2019).

A microbiota eubiótica, ou seja, que está em equilíbrio, é muito estável sob condições de estresse leves ou de curta duração (SOMMER et al., 2017). Portanto, indivíduos saudáveis podem apresentar uma microbiota mais estável, e pequenas mudanças na alimentação podem ser insuficientes para produzir modificações quantificáveis. Em geral, os resultados dos estudos sobre a microbiota intestinal variam amplamente, pois este ainda é um campo pouco explorado e pouco compreendido pela academia devido à dificuldade de controle das variáveis de confusão e à complexidade das interações entre microbiota-ambiente-hospedeiro.

Mais estudos são necessários para avançar no conhecimento sobre o papel das castanhas, especialmente das castanhas brasileiras, sobre os desfechos de saúde discutidos. É preciso considerar que o tipo de castanha consumida, a porção, a frequência de consumo e forma de preparo podem ser determinantes para o desfecho final (SILVEIRA, et al., 2020; UKHANOVA et al., 2014). Por isso, acreditamos que o consumo diário de castanhas (castanhas brasileiras combinadas ou apenas castanha-do-brasil), associado a uma dieta restrita em calorias, potencializará a perda de peso, devido ao seu potencial em modificar alterações metabólicas associadas à obesidade (**Figura 2**).

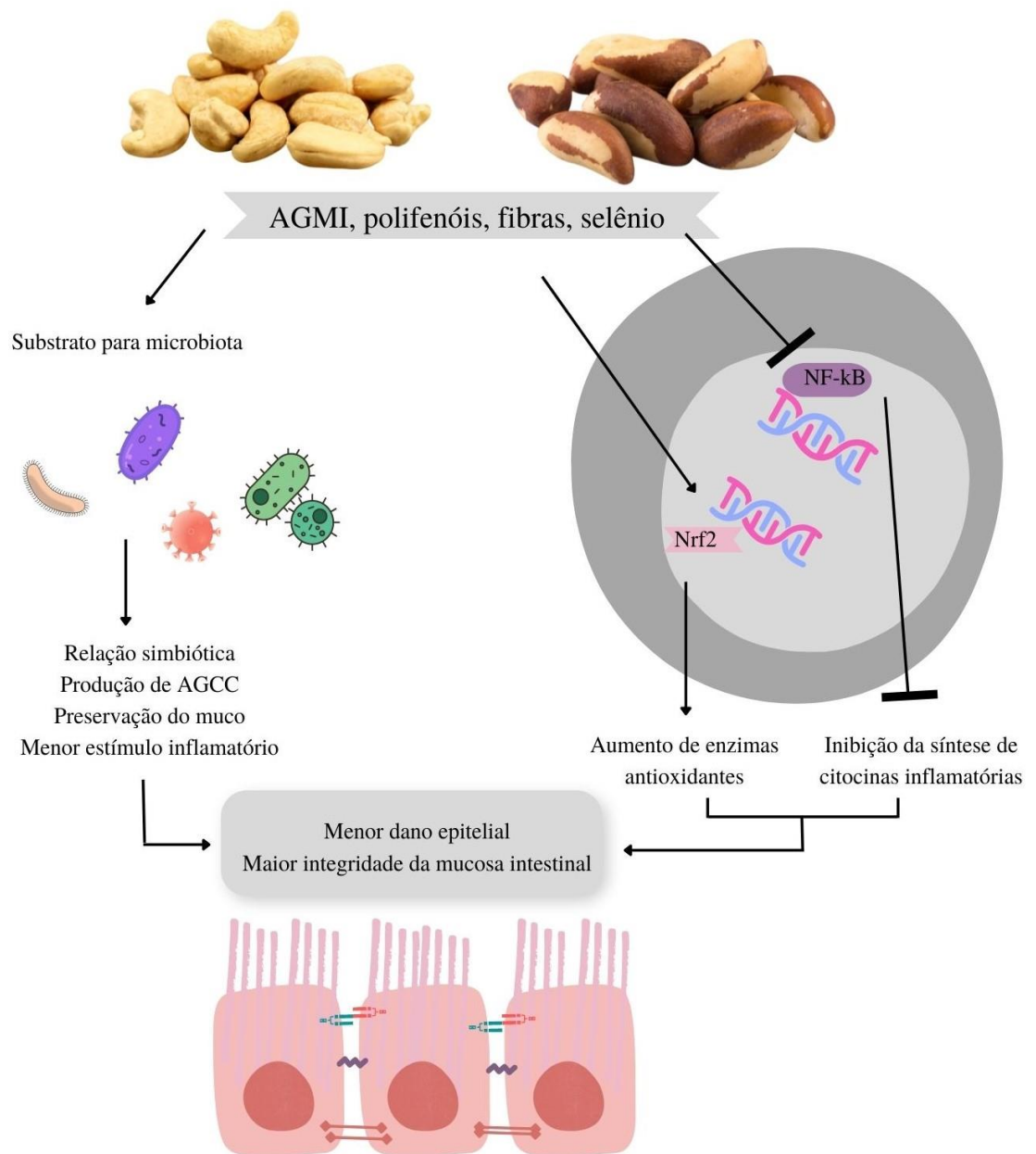


Figura 2. Potenciais mecanismos envolvidos na modulação da inflamação e saúde intestinal, após o consumo regular de castanhas brasileiras (castanha de caju e castanha-do-brasil). Nutrientes e compostos bioativos presentes nas castanhas, tais como os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), polifenóis, fibras e selênio, modulam os fatores de transcrição fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) e fator nuclear kappa B (NF- κ B), aumentando a síntese de enzimas antioxidantes e reduzindo a produção de citocinas inflamatórias. As partes não digeridas das castanhas são utilizadas como substrato pelas bactérias intestinais, contribuindo para aumento de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e redução de bactérias potencialmente patogênicas, o que contribuiu para menor inflamação e preservação da barreira intestinal. Figura de autoria própria.

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

O presente estudo contempla as duas primeiras etapas do projeto guarda-chuva “Estudo Castanhas Brasileiras”, sendo que a coleta do estudo foi realizada entre junho de 2019 e março de 2020, e a coleta do estudo 2 entre agosto e dezembro de 2022, conforme descrito a seguir:

- **Estudo 1:** tratou-se de um estudo clínico, randomizado controlado com duração de 8 semanas, em que 40 mulheres foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais paralelos, ambos submetidos à dieta com restrição de calorias: controle (CT) (n= 19) ou intervenção com castanhas brasileiras (n = 21), que inclui castanhas de caju e castanhas-do-brasil (CC+CB), como publicado em CALDAS et al., 2022. Para a aleatorização, foi empregado o método de randomização estratificada por blocos, considerando as variáveis índice de massa corporal (IMC), gordura corporal percentual e idade. O sistema de randomização computadorizado software WinPepi, versão 11.65 (Copyright J.H. Abransom, 23 de agosto de 2016) foi utilizado para gerar a sequência de alocação das participantes.

De acordo com o cálculo amostral, cada grupo devia conter, no mínimo, 18 participantes. Esse valor foi definido com base no cálculo amostral, utilizando a fórmula proposta por (MERA et al., 1998), e adotando-se um poder estatístico de 80% ($\alpha \leq 0,05$). Brevemente, foram selecionadas as duas medidas mais utilizadas em estudos de intervenção que avaliam a perda de peso em populações com risco cardiovascular: IMC e o perímetro da cintura (PC). Nesse sentido, considerou-se uma diferença esperada de 4% no IMC e 2% no PC. Foram utilizados como referência os valores de *baseline* do estudo “Effects of Daily Consumption of Cashews on Oxidative Stress and Atherogenic Indices in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, Controlled-Feeding Trial” (DARVISH DAMAVANDI et al., 2019). O cálculo completo está descrito no **APÊNDICE 4**.

- **Estudo 2:** tratou-se de um estudo clínico controlado, não randomizado, com duração de 8 semanas, em que 56 mulheres distribuídas em dois grupos experimentais paralelos ambos submetidos à dieta com restrição de calorias: controle (CT) (n = 29) ou intervenção com castanhas-do-brasil (CB) (n = 27). Nesse estudo, 10 novas voluntárias foram alocadas no

grupo CT e outras 19 voluntárias do estudo 1 completaram o grupo CT do estudo 2, totalizando 29 voluntárias neste grupo. Desse modo, o segundo estudo foi controlado, mas não randomizado devido à impossibilidade logística de coletar dados para um novo grupo controle.

De acordo com o cálculo amostral, cada grupo devia conter, no mínimo, 30 participantes. Esse valor foi definido com base no cálculo amostral, utilizando o software GPower v. 3.1.9.7, e adotando-se um poder estatístico de 80% ($\alpha \leq 0,05$). Brevemente, consideramos a perda de peso como desfecho primário e utilizamos como referência as diferenças médias na perda de peso encontradas no estudo “The effect of almonds on anthropometric measurements and lipid profile in overweight and obese females in a weight reduction program: A randomized controlled clinical trial” (ABAZARFARD; SALEHI; KESHAVARZI; 2014) O cálculo completo está descrito no **APÊNDICE 4**.

Todas as participantes, independente do grupo, receberam a prescrição de uma dieta restrita em calorias (-500 kcal/dia). A distribuição de macronutrientes planejada foi a mesma em todos os grupos (controle ou intervenção): 22% de proteínas, 48% de carboidratos, 30% de lipídios, < 10% de AGS, < 10% de AGPI e 10-20% de AGMI. As mulheres pertencentes ao grupo CT seguiram uma dieta isenta de castanhas durante todo o estudo.

- ***Estudo 1:*** As participantes do grupo CC+CB consumiram castanhas brasileiras diariamente (30 g de castanha de caju e 15g de castanha-do-brasil). No estudo 1, foi utilizado 30 g de castanha de caju porque a literatura indica que essa é a porção mínima necessária para se obter melhora metabólica (GOBBO, DEL *et al.*, 2015). Além disso, foi utilizado 15 g de castanha-do-brasil porque essa porção aportou 52 mcg de selênio, valor próximo à *Recommended Dietary Allowance* (RDA) (55 mcg) (IOM, 2011), sem aumentar significativamente o consumo de AGS (<1% do valor calórico total) que estão em alta concentração (28,4%) nessa castanha.
- ***Estudo 2:*** O grupo CB consumiu diariamente 8 g de castanha-do-brasil. No estudo 2, a castanha-do-brasil utilizada possuía maior conteúdo de selênio. Por isso, utilizamos 2 unidades/dia (8 g) para aportar uma alta dose de selênio (347,2 mcg), sem ultrapassar a UL (400 mcg).

Durante a intervenção, as participantes compareceram ao laboratório nos dois dias de coleta (inicial e final), e na quarta semana da intervenção, para visita de monitoramento presencial. Ao início e ao final da intervenção as participantes foram submetidas à avaliação

antropométrica e de composição corporal e à coleta de material biológico (sangue, fezes e urina). Todos os procedimentos de coleta realizados no estudo 1 foram realizados no estudo 2 **(Figura 3)**.

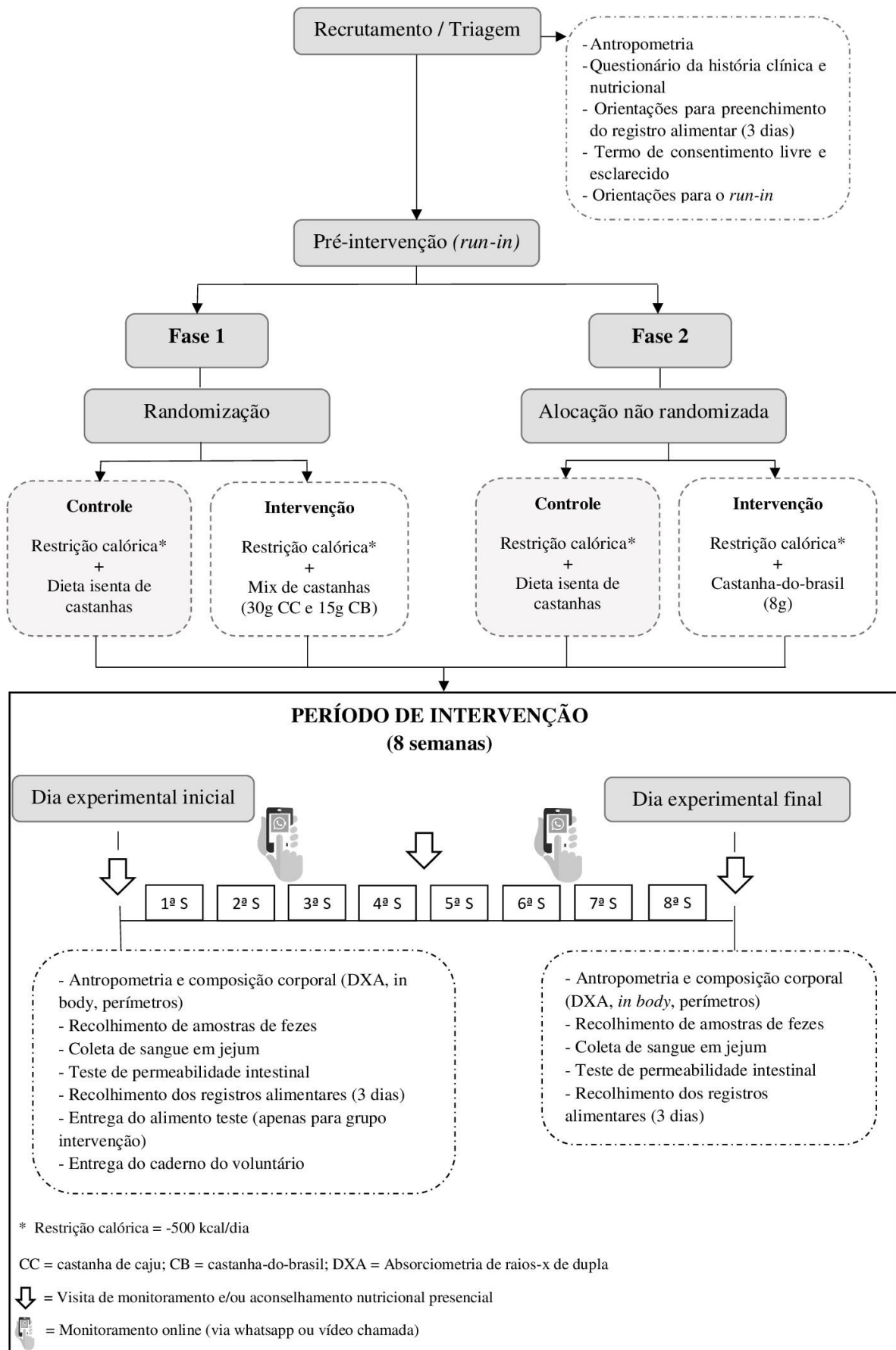


Figura 3. Fluxograma do estudo.

5.2 Aspectos éticos

Os dois estudos deste projeto foram submetidos como projetos independentes ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (CEPH/UFV) e ao Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC). Desse modo, todos os procedimentos descritos nesse projeto estão de acordo com a Resolução CNS/466 de 2012 e Declaração de Helsinki, foram aprovados e registrados, sob os números de aprovação e registro a seguir:

- **Estudo 1**: Título “Efeito do consumo diário de castanhas brasileiras sobre redução do peso e composição corporal, metabolismo energético, apetite, ingestão alimentar, reguladores metabólicos e marcadores genéticos” (CAAE: 92004818.0.0000.5153; Nº 2.832.601/2018 e Identificador ReBEC RBR-3ntxrm)
- **Estudo 2**: Título “Efeito do consumo diário de castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K) sobre redução do peso e composição corporal, metabolismo energético, apetite, ingestão alimentar, reguladores metabólicos e marcadores genéticos” (CAAE 21448719.0.0000.5153; Nº 3.649.033/2019 e Identificador ReBEC RBR-8zfn5c)

Na triagem, todas as participantes foram informadas sobre os objetivos e procedimentos a serem realizados. Aquelas que aceitaram participar do estudo sem oposição aos objetivos e procedimentos foram convidadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias (**APÊNDICE 1**).

5.3 Alimento teste

As castanhas-do-brasil e castanhas de caju utilizadas no estudo 1 foram produzidas no Brasil, procedentes das empresas Inovam Brasil® e Embrapa® (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), respectivamente. Já as castanhas-do-brasil utilizadas no estudo 2 foram produzidas no Brasil, no estado do Amazonas, e fornecidas pela empresa ECONUT.

A matéria-prima foi obtida de uma mesma safra, porcionada em embalagens laminadas, seladas a vácuo (Seladora Selovac modelo 200 B) e armazenadas em freezer a -20°C até o momento de sua distribuição às participantes. As castanhas foram entregues em dois momentos: no dia da coleta inicial e na visita de monitoramento presencial na quarta semana. A entrega das castanhas foi feita em etapas para melhor controle da conservação do alimento e da quantidade consumida.

5.4 Determinação da composição das castanhas brasileiras

Após triturar as castanhas, o teor de proteínas, lipídios, cinzas, fibras e umidade foram determinados de acordo com os métodos da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1995). A quantidade total de carboidratos foi calculada pela diferença: $100 - (\% \text{ água} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinza})$. O perfil lipídico foi analisado em um cromatógrafo gasoso modelo CG Solution da marca SHIMADZU, equipado com detector FID. A concentração de selênio foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica.

5.5 Critérios de inclusão e não inclusão

Foram incluídas mulheres adultas (21 a 55 anos), com $\text{IMC} \geq 27 \text{ kg/m}^2$, excesso de gordura corporal ($\geq 32\%$), PC elevado ($\geq 80 \text{ cm}$) e pelo menos mais um fator de risco cardiometabólico, que poderia ser: pressão arterial $\geq 130/90 \text{ mmHg}$, triglicerídeos $\geq 150 \text{ mg/dL}$, glicemia de jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$ e $\leq 130 \text{ mg/dL}$. Porém, mulheres com $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ foram incluídas mesmo quando não apresentavam nenhum outro fator de risco cardiometabólico além da obesidade, desde que atendessem aos critérios relacionados à antropometria e composição corporal.

Não foram incluídas pessoas com alergia à castanhas ou outros frutos secos, gestantes ou lactantes, mulheres na menopausa, atletas, fumantes, veganas, diabéticas, trabalhadoras noturnas, pessoas em uso de medicamentos (corticosteroides, anti-inflamatórios, antibióticos) ou suplementos, que relataram adesão à dietas de emagrecimento nos últimos 3 meses ou variação de peso superior a 6%, ainda que involuntária, que relataram teste positivo para COVID-19 nos últimos 30 dias ou que não foram liberadas pelo médico após teste positivo, independente do tempo, que relataram consumo excessivo de álcool ($> 170 \text{ g/semana}$) ou consumo habitual de castanhas ($> 30\text{g/dia}$ para castanha de caju e $> 5 \text{ g/dia}$ para castanha-do-brasil) ou problemas de mastigação.

5.6 Recrutamento e triagem

As participantes do estudo foram recrutadas na comunidade local (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) por meio da afixação de cartazes e distribuição de panfletos no comércio local, nos Programa de Saúde da Família (PSF), nos Núcleos de Apoio à Saúde da Família (NASF) e divulgação do estudo em emissoras de rádio e redes sociais, deixando à disposição um

telefone e e-mail para contato. Após contato telefônico, ou por e-mail, foi realizada uma triagem telefônica para agendar uma visita presencial para aquelas participantes pré-selecionadas e interessadas em participar do estudo.

Na primeira visita, as participantes foram informadas sobre todos os procedimentos. Em seguida, foi verificada a elegibilidade das participantes por meio de um questionário de seleção presencial semiestruturado (**APÊNDICE 2**) com questões referentes a história clínica e dietética, dados sociodemográficos, antropométricos e de composição corporal, pressão arterial e exames bioquímicos dos últimos três meses apresentados pela voluntária (quando disponíveis). Ainda na ocasião dessa primeira visita, as participantes selecionadas foram orientadas a preencher três registros alimentares de 24 horas em dois dias da semana e um dia de final de semana, para avaliação do seu consumo habitual.

5.7 Período pré-intervenção (*run-in*)

Após a verificação dos critérios de elegibilidade na triagem, as participantes iniciaram o período pré-intervenção (*run-in*), a fim de identificar e excluir participantes com baixo potencial de adesão ao protocolo da pesquisa. Esse período teve duração de 7 dias e as participantes foram instruídas a manter sua alimentação e atividade física habituais, não consumir determinados alimentos (azeite de oliva, bebidas alcólicas, castanhas, pasta de amendoim, abacate, suplementos vitamínicos, minerais e ômega 3) e não fumar nesse período. Ao final dos 7 dias, as participantes compareceram novamente ao laboratório. Foram excluídas aquelas que relataram não conseguir aderir às recomendações ou apresentaram variação superior a 1 kg no peso corporal.

5.8 Planos alimentares e restrição calórica

Ao iniciar a intervenção, todas as participantes receberam cinco opções de cardápio alimentar restrito em calorias para serem seguidos durante as oito semanas do estudo (**APÊNDICE 3**). A restrição calórica foi calculada subtraindo-se 500 kcal da necessidade calórica diária (*Estimated Energy Requirement (EER)*) (IOM, 2005) e a distribuição dos macronutrientes obedeceu às recomendações das diretrizes para manejo da obesidade (AHA/ACC et al., 2014). Todos os cardápios foram calculados em planilha do excel, com base nas tabelas brasileiras de composição dos alimentos (BRASIL, 2011; TACO, 2011).

A dieta foi fracionada em cinco refeições: desjejum, lanche da manhã, almoço, lanche da tarde e jantar. Os grupos intervenção consumiram as castanhas no lanche da manhã. Portanto, no estudo 1, as participantes do grupo intervenção comeram apenas as castanhas brasileiras no lanche da manhã (~280 kcal), enquanto que as participantes do estudo 2 consumiram as castanhas-do-brasil junto com iogurte e fruta (~280 kcal), e as participantes do grupo controle comeram lanche equivalente em calorias e macronutrientes, mas isento de castanhas.

As refeições dos cinco cardápios foram equivalentes em calorias, de forma que a voluntária podia optar pelo desjejum do cardápio 1, o almoço do cardápio 2, o lanche da manhã do cardápio 3, sem que isso modificasse a ingestão diária total de calorias ou macronutrientes, possibilitando maior variedade na dieta. Os alimentos incluídos no cardápio foram selecionados considerando o hábito alimentar e a classe socioeconômica das participantes.

5.9 Coleta de material biológico

A coleta (inicial e final) foi dividida em dois dias: um para entrega das fezes e realização do teste de permeabilidade intestinal no Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC), e outro para coleta sangue e avaliação da composição corporal pelo DEXA (Absorciometria de raios-x de dupla energia, do inglês *Dual-energy X-ray Absorptiometry*) na Divisão de Saúde da UFV (DSA-UFV). As participantes foram orientadas a coletar a amostra de fezes a qualquer momento do dia e mantê-la sob refrigeração (4°C) em uma caixa de isopor com gelo fornecida pelos pesquisadores, dentro da geladeira, até sua entrega no laboratório na manhã seguinte, ou no período mais curto possível após a coleta sem ultrapassar 24 horas, pois nem todas evacuem diariamente. Também foram orientadas a coletar toda a urina produzida após consumir o jantar padronizado (urina noturna). Essa urina foi armazenada em recipiente plástico com capacidade de 2L e mantida sob refrigeração (4°C), para ser utilizada como urina controle.

No primeiro dia de coleta (não consecutivo), as participantes compareceram ao LAMECC após jejum de 10-12 horas. Foram recolhidas as amostras de fezes e a urina noturna, e realizada a avaliação antropométrica (**item 5.11**), incluindo aferição dos perímetros da cintura e do quadril, peso corporal, altura e avaliação da composição corporal. Na sequência, foi realizado o teste de permeabilidade intestinal, de modo que as participantes ingeriram em até 10 minutos, 200 mL de uma solução contendo lactulose (10 g), manitol (5 g)

e sacarose (20 g). A partir desse momento, a voluntária permaneceu no laboratório por 4 horas e meia, durante as quais todo o volume de urina foi coletado em um recipiente para armazenamento da urina pós-prandial. Nos primeiros 60 minutos não foi permitido a ingestão de alimentos ou água. A partir de então, as participantes ingeriram somente água (150 mL após 2 e 3 horas de teste). O volume total de urina coletado em jejum (urina noturna ou controle negativo) e pós-prandial foi aliquoteado (30 mL) e acrescido de timerosal (7 mg) para impedir crescimento microbiano. As amostras de urina e fezes foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

No segundo dia de coleta, as participantes compareceram à DSA-UFV, após jejum noturno de 10h, para realização do DEXA e coleta de sangue. As amostras de sangue (20 a 30 ml) foram coletadas à vácuo por um profissional da enfermagem capacitado. O sangue foi coletado em tubos adequados para sorologia, tubos EDTA e tubos para análise de elementos traços e permaneceu em repouso por 20 minutos à 4°C , antes de serem centrifugados à 3500 rpm por 15 minutos à 4°C . Em seguida, procedeu-se a separação de amostras biológicas (soro, plasma, células mononucleares, eritrócitos e sangue total) em microtubos que foram armazenados em ultra-freezer (Thermo Scientific/Forma 900 Series®) a -80°C até o momento da análise.

Quinzenalmente, foi feito o contato remoto com as participantes via WhatsApp ou chamada de vídeo para verificar e motivar a adesão ao protocolo da pesquisa, e na quarta semana foi feito o monitoramento presencial para avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar pelo recordatório alimentar de 24 horas (R24h). Todas as avaliações e coletas realizadas na coleta inicial foram repetidas ao final do estudo, no último dia de intervenção.

5.10 Adesão ao protocolo e critérios de descontinuidade

A adesão das participantes foi avaliada por meio de R24h, além da dosagem das concentrações plasmáticas de selênio ao final da intervenção. Foram excluídas aquelas que não seguiram o protocolo de intervenção, apresentaram efeitos adversos, engravidaram, manifestaram sintomas de menopausa (diagnosticados pelo médico) ou testaram positivo para COVID-19. Para estimular a adesão ao protocolo da pesquisa, as participantes receberam um caderno do projeto Castanhas Brasileiras contendo informações sobre todos os procedimentos do estudo, as orientações a serem seguidas durante o período de intervenção, telefones para contato e campos para anotação. Nesse caderno, elas deveriam registrar qualquer alteração no

tipo e/ou dosagem de medicamentos de uso contínuo, bem como mudanças no estado de saúde geral.

5.11 Antropometria e composição corporal

A antropometria foi realizada no primeiro e no último dia de intervenção, após jejum de 10h. As participantes foram orientadas a usar roupas leves, esvaziar a bexiga, retirar os sapatos e quaisquer outros acessórios antes da avaliação. A estatura foi medida em estadiômetro vertical milimetrado com extensão de 2,2 m (precisão 0,5 cm) e, no momento da aferição, a voluntária estava em pé, em posição firme, com o calcanhar e nádegas apoiados na superfície posterior do estadiômetro, os braços relaxados, cabelos soltos e cabeça posicionada no plano de Frankfurt.

A composição corporal foi avaliada por meio da técnica de DEXA com tecnologia fan-beam (Lunar Prodigy Advance DXA System, versão 13,31, GE Lunar), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Como método alternativo, foi utilizado o dispositivo de análise de impedância bioelétrica (Inbody 230, Biospace Corp., Seoul, Korea) com capacidade de 150kg e precisão de 100g, para determinar o peso e a composição corporal. O IMC foi calculado dividindo-se o peso (kg) pela altura (m) ao quadrado e classificado de acordo com os pontos de corte propostos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017).

Os perímetros do quadril (maior proeminência) e da cintura (sobre a cicatriz umbilical) foram medidos com fita inelástica (precisão 0,1 cm). No momento da aferição as participantes estavam de pé, com as pernas firmes no chão e abertas na linha dos ombros, cabeça posicionada no plano de Frankfurt e braços cruzados de modo que as mãos tocassem os ombros. A medida da cintura foi feita no momento da expiração.

5.12 Avaliação do Consumo Alimentar

O consumo alimentar habitual foi avaliado antes de iniciar o estudo, no período de *run-in*, quando as participantes preencheram três registros alimentares referentes a dois dias de semana e um dia de final de semana. Durante o estudo foi aplicado um R24h na visita de monitoramento presencial, para verificar a adesão ao protocolo. Os três registros alimentares foram aplicados novamente ao final da intervenção.

As informações de ingestão alimentar obtidas pelos inquéritos alimentares foram registradas no software Erica-REC24h (BARUFALDI et al., 2016), em que estão cadastrados

quase dois mil alimentos extraídos da base de dados de aquisição de alimentos e bebidas da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008/2009), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). Os alimentos que não constavam na base de dados do ERICA-REC24h foram incluídos pelos pesquisadores. Para estimar a ingestão de energia, macro e micronutrientes, utilizou-se o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc. versão 24.0), onde a quantidade de alimentos consumida (g ou mL) foi relacionada aos dados de uma tabela de composição nutricional (IBGE, 2011).

5.13 Biomarcadores inflamatórios

A concentração plasmática de PCR foi determinada pelo método ultrasensível utilizando kit comercial específico (Quibasa-Química Básica) e a técnica de imunoturbidimetria em auto-analisador (Mindray / BS-200® Chemistry Analyzer). Foram excluídos das análises os valores de PCR superiores a 45 mg/dL.

As concentrações das citocinas plasmáticas foram determinadas por citometria de fluxo usando o equipamento BD Citômetro de fluxo FACSVerse™ (BD Biosciences, EUA). A concentração plasmática das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF e IL-17A) foi medida usando um kit comercial (Cytometric Bead Array CBA Human, BD Biosciences, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados usando FCAP Array Software v3.0 (BD Biosciences, EUA).

5.14 Permeabilidade intestinal

O teste de permeabilidade se baseia na diferença da absorção de dois carboidratos não metabolizáveis, a lactulose e o manitol. Em situações adequadas, o percentual de absorção do manitol varia entre 5 e 30%, enquanto que a lactulose não é absorvida (aceitável < 0,5%). Para razão lactulose manitol, considera-se aceitável valores < 0.030 (DAMMS-MACHADO et al., 2017). Para as análises, a urina foi descongelada, homogeneizada em vórtex e 2 ml de urina foi retirado com auxílio de uma seringa estéril. A seringa foi acoplada a uma membrana microporosa polietersulfônica (PES) (0,22 μ m \times 13 mm), de modo que a amostra foi filtrada diretamente em *vials* para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O volume final de urina filtrada nos *vials* foi de 600 μ l.

A excreção de lactulose e manitol na urina foi quantificada por HPLC usando equipamento Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a detector de índice de refração (IR)

(Shodex RI-101) mantido a 40 °C. Os analitos foram separados isocraticamente em coluna Aminex HPX-87C (250 × 4,0 mm) mantida a 70 °C. Água ultrapura foi usada como fase móvel com fluxo de 0,3 mL/min. A curva de calibração foi estabelecida com o uso de lactulose e manitol como padrões externos. O volume total de urina coletada foi multiplicado pela concentração de cada açúcar, a fim de obter a quantidade total excretada na urina. Os resultados foram expressos como porcentagem de excreção de manitol (% M) e lactulose (% L) e como a razão lactulose/manitol (L/M). O ponto de corte da razão LM > 0,035 foi adotado para classificar a permeabilidade intestinal aumentada (LINSALATA et al., 2014, 2018).

5.15 Ácidos graxos fecais de cadeia curta (AGCC)

Para determinação dos AGCC nas fezes, foram preparadas duas soluções: solução de hidróxido de cálcio (CHS) e solução de sulfato cúprico (CSR). A solução CHS foi preparada diluindo 52,9 g de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) em 200 mL de água ultrapura e homogeneizando com auxílio de uma barra magnética. A solução CSR foi preparada diluindo 50 g de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em 300 ml de água ultrapura, adicionado de 2 g de ácido crotônico (ácido 2 butenóico) como padrão interno. A mistura foi homogeneizada e o volume completado para 400 ml.

Para realizar o preparo das amostras, as fezes foram descongeladas em temperatura ambiente e aliqüotadas (500 mg) para serem diluídas em 1 ml de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada no vórtex por 5 minutos. O sobrenadante (600 μL) foi transferido para um microtubo de 2 ml onde foi adicionado 600 μL da solução CHS e 300 μL da solução CSR, seguido da agitação no vórtex por 10 segundos e congelamento. Em seguida, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (1,0 ml) foi transferido para novos tubos de microcentrífuga, adicionado de 28 μL de H_2SO_4 concentrado e novamente congelado. Os tubos foram descongelados e recongelados em sequência. Por fim, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos, e 600 μL do sobrenadante foi transferido para *vials* de HPLC para análise.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a detector de índice de refração (IR) Shodex RI-101, mantido a 40 °C. Os ácidos orgânicos foram separados isocraticamente em coluna Phenomenex Rezex ROA, 300 × 7,8 mm mantida a 40 °C. O ácido sulfúrico 5 mM (H_2SO_4) foi usado como fase móvel com fluxo de 0,7 mL/min. Os ácidos acético, propiônico e butírico foram usados como padrões externos na curva de calibração.

5.16 Potencial hidrogeniônico (pH) fecal

O pH das fezes foi determinado utilizando um pHmetro (Instrutherm®, modelo PH-1900), após a diluição e homogeneização de 500 mg de fezes em 5 mL de água ultrapura.

5.17 Selênio plasmático

As concentrações plasmáticas de selênio foram determinadas em um laboratório comercial, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, conforme protocolos padrões. Até o momento, não há valores de corte universais para o selênio plasmático. Consideramos valores < 70 µg/L como selênio baixo, e 70-90 µg/L como faixa normal, considerando os valores mínimos necessários para atingir a atividade ótima da selenoproteína (ALCÂNTARA et al., 2022; CAO et al., 2022).

5.18 Análise da microbiota intestinal por sequenciamento do gene 16S rRNA

As participantes forneceram amostras de fezes no início e no final da intervenção, que foram armazenadas em criotubos e permaneceram congeladas a -80 ° C até a extração do DNA microbiano.

O DNA genômico total foi extraído de amostras de fezes (300mg), seguindo um protocolo de ruptura mecânica (agitação e impacto) e extração de fenol/clorofórmio (STEVENSON; WEIMER, 2007). A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas por espectrofotometria medindo A260/280. Amplicons da região 16S rRNA V3-V4 foram gerados usando primer direto 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e primer reverso 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') e um adaptador de conjunto de primers com código de barras para a plataforma Illumina NovaSeq (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA) (CAPORASO et al., 2012). As amostras foram carregadas em uma célula de fluxo Illumina para reações de sequenciamento pareado usando a plataforma Illumina NovaSeq PE250 na Novogene Corporation no campus da Universidade da Califórnia em Davis (Sacramento, Califórnia, EUA). Amplicons foram sequenciados em uma corrida NovaSeq 2x250bp usando primers e procedimentos de sequenciamento personalizados (CAPORASO et al., 2012). As sequências obtidas para todas as amostras foram submetidas ao banco de dados *Sequence*

Read Archive (SRA) no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) sob o número de acesso PRJNA860372.

O processamento e a análise dos dados foram realizados no software Mothur v.1.44.3 (SCHLOSS et al., 2009). Em resumo, as leituras de extremidade pareada R1 e R2 foram unidas e as sequências menores que 380 ou maiores que 440 bp foram removidas. Sequências que continham homopolímeros com pelo menos oito nucleotídeos ou contendo pares de bases ambíguos também foram eliminadas. Sequências de quimera foram detectadas e removidas usando UCHIME versão 4.2 (EDGAR et al., 2011). Após a limpeza das sequências, elas foram alinhadas com o gene 16S rRNA usando o banco de dados SILVA v.138 (QUAST et al., 2012).

As sequências finais pareadas foram agrupadas em Unidades de Taxonomia Operacional (OTUs). Cada OTU representa um grupo geneticamente único de organismos biológicos, e foi adotado ponto de corte de similaridade de sequências de 97%. A classificação taxonômica das OTUs foi realizada com base no banco de dados SILVA v.138. As amostras foram agrupadas de acordo com o grupo experimental (controle ou intervenção) e momento da intervenção (linha de base e após 8 semanas). A cobertura de todas as amostras foi avaliada pelo estimador de cobertura Good's coverage, considerando como ponto de corte >97%. Para corrigir o viés de amostragem devido a tamanhos de bibliotecas de amplicons desiguais, as amostras foram normalizadas para o menor número de sequências produzidas a partir de qualquer amostra.

5.19 Análise estatística

O cálculo do poder foi realizado no software GPower v. 3.1.9.4, utilizando como variável principal a excreção de lactulose (%). Foram selecionadas as opções *a posteriori* não paramétricos, significância bilateral ($\alpha = 5\%$) e foi utilizado a média \pm DP de ambos os grupos intervenção.

As análises foram realizadas no software SPSS (versão 24.0) adotando nível de significância de 5% em todos os testes. A distribuição das variáveis (simétricas ou assimétricas) foi analisada pelo teste de Shapiro Wilk. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EP), box plot ou gráfico de barras. O teste t para amostras independentes ou Mann-Whitney foram usados para detectar diferenças entre grupos. Já o teste t pareado ou o teste de Wilcoxon foram usados para avaliar diferenças intragrupo. As correlações de Pearson

e Spearman foram utilizadas para investigar associação entre permeabilidade intestinal, variáveis antropométricas, citocinas e microbiota intestinal.

A análise de regressão linear simples foi realizada para verificar se o aumento do selênio plasmático (variável explicativa) é preditivo de redução de citocinas inflamatórias (variáveis dependentes), e também se reduções na concentração de citocinas (variáveis explicativas) são preditivas de reduções na razão LM (variável dependente). Os resíduos foram avaliados segundo os pressupostos de normalidade, homocedasticidade, linearidade e independência.

A tabela de dados normalizada foi usada para calcular a diversidade alfa e beta, bem como para calcular a abundância relativa de OTUs. Os índices Chao1, Shannon e Simpson foram usados para estimar a diversidade alfa da comunidade microbiana, e as diferenças intra e entre grupos foram analisadas por meio dos testes t pareado e para amostras independentes, respectivamente.

Análises de beta diversidade foram realizadas a fim de comparar a composição microbiana entre os grupos na linha de base e após intervenção. A beta diversidade foi avaliada estatisticamente ao nível das OTUs, filo e gênero, usando o software Past (versão 4.05, pela PCoA) com base no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis e análise multivariada permutacional (PERMANOVA, permutações de Monte Carlo), adotando-se 10.000 permutações.

Diferenças na abundância relativa das diferentes categorias taxonômicas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis com post hoc Tukey-Kramer, utilizando o software Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP v.2.1.3) (PARKS, et al., 2014). O efeito das intervenções (controle x intervenção com castanhas brasileiras) na abundância de táxons bacterianos em nível de OTU, filo e gênero foi analisado pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis H-test usando taxa de falsa descoberta (FDR) pela correção de Benjamini para comparações múltiplas (STAMP; versão 2.1.3). As diferenças intra-grupo (linha de base x 8 semanas) foram identificadas utilizando Wilcoxon e as diferenças entre grupos (controle x intervenção) foram identificadas utilizando Mann-Whitney para amostras independentes.

O Tamanho do Efeito da Análise Discriminante Linear (LEfSe) (SEGATA et al., 2011) foi calculado para identificar as OTUs (em nível de gênero ou acima) que mais diferiram em abundância na linha de base e após 8 semanas, segundo o grupo de tratamento.

5.20 Retorno às participantes

Todas as participantes receberam, ao final da intervenção, um relatório individual contendo todas suas medidas antropométricas aferidas durante a pesquisa. Além disso, foram orientadas manter uma alimentação saudável após o fim da intervenção, incluindo novamente na alimentação os alimentos que haviam sido excluídos (azeite, abacate, castanhas, etc.), respeitando os princípios da variedade e moderação. As participantes excluídas ainda no período de *run-in* ou durante a intervenção, também foram orientadas sobre alimentação saudável e receberam o relatório com todas as informações coletadas até o momento do desligamento.

6. RESULTADOS – Artigo Original 1 (Estudo 1)

Daily consumption of cashew nut and Brazil nut modifies the intestinal health of women with overweight/ obesity ongoing energy-restricted intervention: a randomized controlled trial (Brazilian Nuts Study)

Brenda Kelly Souza Silveira, Daniela Mayumi Usuda Prado Rocha, Hércia Stampini Duarte Martino, Mariana Granciere, Mariana Juste Contin Gomes, Hilário Cuquetto Mantovani, Josefina Bressan, Helen Hermana Miranda Hermsdorff

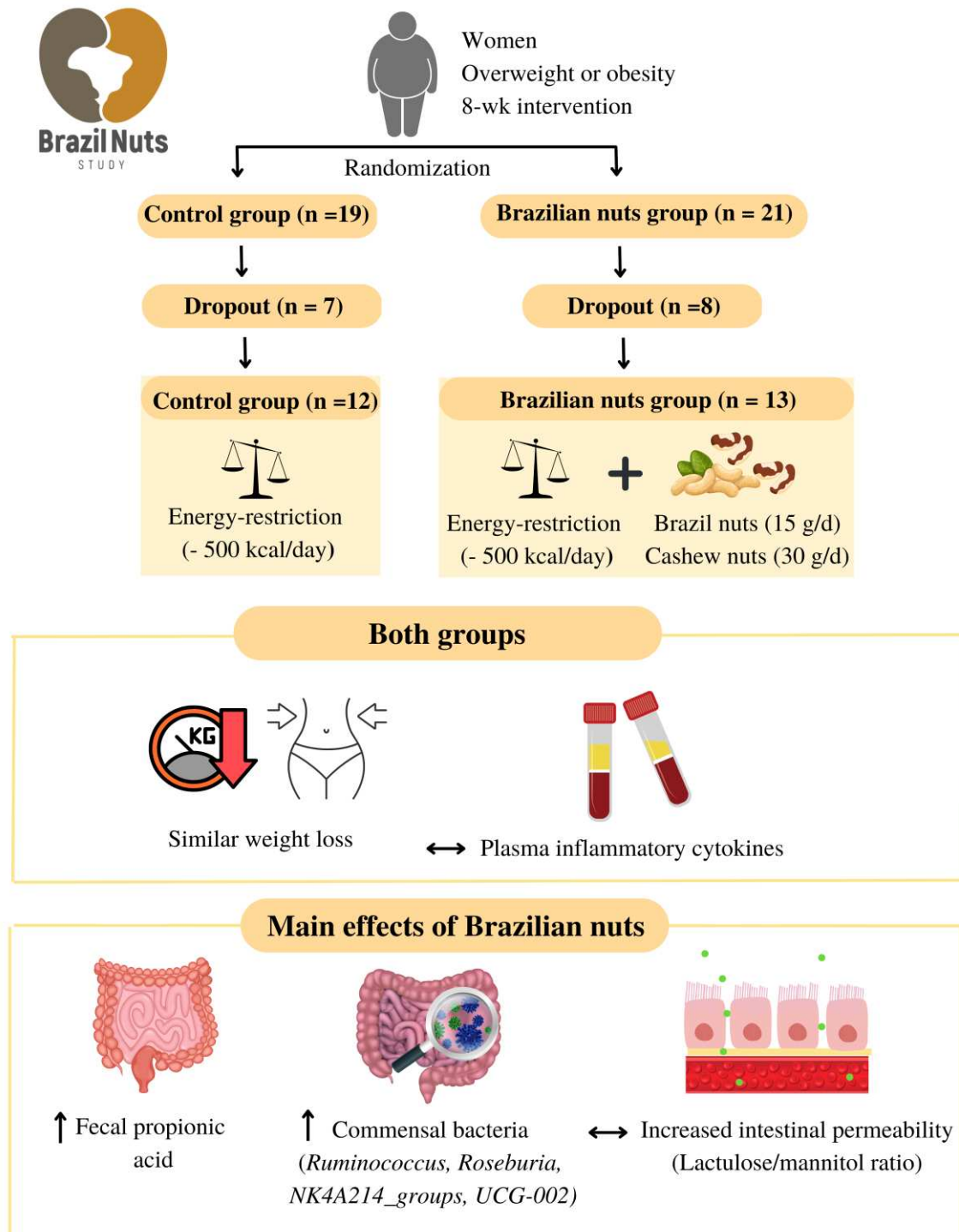
ABSTRACT

Background/objective. Increased intestinal permeability (IP) and dysbiosis are related to obesity, while nuts can provide nutrients and bioactive compounds that modulate gut microbiota and inflammation, enhancing the beneficial effects of weight loss. Therefore, we evaluated the effect of consumption of cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.) and Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K) on intestinal permeability and microbiota, fecal short-chain fatty acids (SCFA) and pH, inflammation and weight loss in energy restriction condition. **Methods.** In this 8-wk randomized controlled trial, 40 women with overweight/ obesity were allocated into two energy-restricted groups (-500 kcal/day): control group (CO: free of nuts) or Brazilian nuts group (BN: 30g cashew nuts and 15g Brazil nuts per day). Permeability was analyzed by the lactulose/mannitol test (LM ratio) and the microbiota by sequencing the 16S gene in the V3-V4 regions. Plasma inflammatory cytokines (TNF, IL-6, IL-10, IL-8, IL-17A) and CRP were analyzed. **Results.** In total, 25 women completed the intervention. Both groups lost weight without statistical differences. Lactulose excretion increased only in the CO group ($p < 0.05$). The BN consumption increased fecal propionic acid and potentially beneficial bacteria, such as *Ruminococcus*, *Roseburia*, *NK4A214_groups*, and *UCG-022*, but also Lachnospiraceae family, *Bacteroides*, and *Lachnoclostridium*, compared to the CO group. Changes in IP were correlated to a greater reduction in body fat (kg), IL-8, and increases in *Ruminococcus* abundance. **Conclusion.** Our results indicate a beneficial effect of BN consumption in an energy-restricted condition, related to an increase in potentially beneficial bacteria and body fat loss as pathways. Besides, BN consumption protected against increased intestinal permeability but was insufficient to reduce permeability or enhance weight loss.

Finally, the effect of BN on intestinal health needs to be evaluated in the context of higher fiber and lower lipids diets. Brazilian Registry of Clinical Trials – ReBEC (ID: RBR-3ntxrm).

KEYWORDS: short-chain fatty acids; inflammation, obesity, selenium, dysbiosis.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Obesity, characterized by excessive body fat, is a risk factor for cardiovascular diseases due to various metabolic disorders, low-grade inflammation, and oxidative stress (LEITE et al., 2021; OLIVEIRA, et al., 2020; SILVA, et al., 2021). Obesity itself is also able to induce derangements in intestinal health, regardless of a dietary pattern (NAGPAL et al., 2018). This condition contributes to an imbalanced gut microbiota profile, leading to increased extraction of from food, disruptions in genes that regulate energy metabolism, and epithelial damage by pro-inflammatory mechanisms (AOUN; DARWISH; HAMOD, 2020; DAVIS, 2016). Thus, obesity also is related to lower microbial diversity and disorders in intestinal health (AOUN; DARWISH; HAMOD, 2020; CÂNDIDO et al., 2018; GÉRARD, 2016).

The products of microbiota metabolism, especially short-chain fatty acids (SCFA), such as acetate, propionate and butyrate, can act locally on the intestine or systemically reach distant organs such as liver, kidneys and brain, via portal circulation. These SCFA can be oxidized and used as energy sources by enterocytes or transported via the portal vein to the circulation (INCZEFI et al., 2022; USUDA; OKAMOTO; WADA, 2021; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). SCFAs also contribute to the control of inflammation by regulating the expression of inflammatory cytokines and the immune system (BOULANGÉ et al., 2016; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017).

In this context, energy restriction and healthy eating habits are the main strategies to reverse obesity and unbalances in intestinal health (HERMSDORFF, et al., 2011). Weight loss and diets rich in fiber and polyphenols effectively reduce intestinal permeability, increasing the proportion of potentially beneficial bacteria and reducing inflammation (DEL BO' et al., 2021; SILVEIRA, et al., 2018; TILVES et al., 2022; TWARDOWSKA et al., 2022). In this sense, nuts are important sources of these nutrients, contribute to increased satiety and exert a probiotic effect (HOU et al., 2021; LAMUEL-RAVENTOS; ONGE, 2017; ROCHA et al., 2023).

The scientific literature reports that regular consumption of nuts promotes better body weight control (LIU, et al., 2019; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ; BES-RASTROLLO, 2011; SILVA, et al., 2022), reduce inflammation (RAJARAM; CONNELL; SABATÉ, 2010) and oxidative stress (STOCKLER-PINTO, et al., 2014), and modulates the microbiota (CREEDON et al., 2020; OJO, et al., 2021). However, most of these studies investigated the effect of walnuts, almonds, pistachios, and other nuts, and have an epidemiological design.

Regarding the Brazilian nuts (BN), the cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) is native to South America and stands out for being rich in unsaturated fatty acids (79.7%), mainly oleic (60.7%), and linoleic fatty acids (17.8%) (RICO; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2015), while Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) stands out for being one of the main sources of selenium (100 to 1000 mcg/g dry weight) in the form of selenomethionine, the most bioavailable form (CARDOSO, et al., 2017; SILVEIRA, et al., 2020). Both BN are sources of polyphenols, monounsaturated fatty acids (MUFA), n-3 series fatty acids, and fiber that act to reduce intestinal permeability and modulate beneficially the microbiota (DEL BO', et al., 2021; INCZEFI et al., 2022; TWARDOWSKA et al., 2022).

Despite their attractive nutritional composition, the BN is among the least studied nuts (INC, 2016). In addition, most studies evaluated the effect of BN in the context of the habitual diet (GODOS et al., 2022; SILVA, et al., 2022; SILVEIRA, et al., 2020), and to our knowledge, no clinical trial has investigated the effect of BN on gut microbiota and intestinal permeability. Furthermore, the addition of nuts to the usual diet seems insufficient to promote weight loss (HOU et al., 2021; SABATÉ, 2003). Considering that obesity alone, regardless of diet, promotes changes in intestinal balance (NAGPAL et al., 2018), energy restriction is necessary to enable significant improvements in intestinal health, and BN potentially enhances the results.

Thus, this study aimed to evaluate the effect of the consumption of BN (cashew – *Anacardium occidentale* L. – and Brazil nuts – *Bertholletia excelsa* H.B.K.) on gut microbiota and intestinal permeability, fecal fatty acids, and inflammation among women with overweight/ obesity ongoing an energy-restricted intervention. We hypothesize that BN would enhance intestinal health, through increased weight loss and inflammation, in additionally to the traditional weight loss approach.

METHODOLOGY

Brazilian Nuts Study

The present study analyzed intestinal health and inflammation data from an eight-week randomized, parallel, controlled clinical trial of the Brazilian Nuts Study, registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (ReBEC) identifier ReBEC RBR-3ntxrm. The BN composition was described by Caldas et al. (2022), with unsaturated fatty acids representing 75.9% of total fat in Brazil nuts and 84.6% in cashews.

The Ethics Committee of Universidade Federal de Viçosa approved study protocol (CAAE: 92004818.0.0000.5153; N° 2.832.601/2018), being in accordance with Helsinki Declaration. All participants were informed about the research objectives and procedures and signed a free informed consent form.

Data collection occurred between June 2019 and March 2020 at the Laboratory of Energy Metabolism and Body Composition (LAMECC-UFV), as previously detailed in Caldas et al. (2022). At baseline and after eight weeks of intervention, anthropometric assessment, collection of biological material (blood, feces and urine samples) and food records were performed. We face-to-face interviewed the participants every fifteen days to monitor adherence to the protocol. During the intervention, we instructed the participants not to change their physical activity level and to report any changes in the dose or frequency of medications.

Study participants

The inclusion and non-inclusion criteria were previously described (CALDAS et al., 2022). Briefly, women with overweight at cardiometabolic risk were included, according to the following inclusion criteria: age (20-55 years), overweight (body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m² and < 30 kg/m²), increased body fat ($\geq 32\%$), increased waist circumference (WC) (≥ 80 cm), and at least one other cardiometabolic risk factor, which could be: high blood pressure $\geq 130/90$ mmHg, triglycerides ≥ 150 mg/dL or fasting blood glucose ≥ 100 mg/dL and ≤ 130 mg/dL. Women with obesity (BMI ≥ 30 kg/m²) of same age were also included regardless of other associated risk factors.

Recruitment was done through social media, posters and an online screening questionnaire. The first stage of the screening aimed to verify the eligibility of the participants. In the second stage, a face-to-face visit was scheduled to carry out the anthropometry.

Randomization

Randomization was performed by the minimization method. We considered the variables BMI, percentual body fat (% BF) and age as prognostic factors that should be balanced between the groups. The computerized randomization system WinPepi software, version 11.65 (Copyright J.H. Abransom, August 23, 2016), was used to generate the allocation sequence of participants.

Energy-restricted intervention

We instructed the selected participants to perform a run-in period lasting 7 to 10 days, to exclude women with a low probability of adherence to the protocol. During the intervention, all participants were instructed to follow an energy-restricted diet (-500 kcal/day) and were randomly allocated into two groups: 1) control: energy-restricted and nut-free diet; 2) Brazilian nuts (BN): energy-restricted diet containing 45 g/day of Brazilian nuts (30 g cashew nuts + 15 g Brazil nuts).

We defined the amount of cashews based on the US Food and Drug Administration (FDA) claim that this is the minimum dose needed to obtain benefits in cardiovascular health (FITZGERALD et al., 2021; TAYLOR, 2003). The amount of Brazil nut was defined to provide a value close to the Recommended Dietary Allowance (RDA) of selenium (55 µg) (IOM, 2011). Therefore, 15g of Brazil nuts provided 51 µg Se/day. In total, the cashew and Brazil nut portion provided 66 µg of Se/ day.

All participants received five energy-restricted food menus. Energy restriction was calculated by subtracting 500 kcal from the Estimated Energy Requirement (EER) (IOM, 2005), and the distribution of macronutrients was based on the recommendations of guidelines for obesity management (45% carbohydrates, 33% lipids, 22% proteins) (AHA/ACC et al., 2014). We divided the menu into five meals: breakfast, morning snack, lunch, afternoon snack and dinner. The foods included in the menu were selected according to the socioeconomic class of the participants and the Food Guide for the Brazilian Population (BRASIL, 2014). Twice a week, a nutritionist provided individualized counseling and monitored adherence to meal planning.

Participants in the BN group consumed the nuts in the morning snack (9 to 10 am), and the energy provided by BN (280 kcal/day) were counted in the daily energy intake. Control participants consumed two tablespoons/day of salad dressing (soy oil and lemon juice in 2:1 proportion) prepared by study's researchers. This sauce was included in the meal plan to balance lipid and energy intake between the control and BN groups.

The BN was donated by EMBRAPA – Fortaleza/Ceará-Brazil (cashew nut) and Inovam Brasil® (Brazil nut). The nuts were vacuum packed (Selovac Sealer model 200 B) in laminated packaging and kept at -20° until distribution to the participants.

Food intake assessment

At baseline, participants filled three food records on non-consecutive days (two weekdays and one weekend day). 24-hour recalls were applied every 15 days to monitor

consumption during the intervention. We entered the reported intake in the REC24h-ERICA software, adapted for the Brazilian population (BARUFALDI et al., 2016). To estimate the intake of energy, macro and micronutrients, we related the food consumption data to a nutritional composition table (IBGE, 2011) into the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc. version 26.0).

Anthropometry and body composition

An anthropometric assessment was performed after overnight fasting on the first and last day of the intervention. Weight and body composition were determined using bioelectrical impedance (Inbody 230, Biospace Corp.) with a capacity of 150kg and an accuracy of 100g. Height was measured using a vertical millimeter stadiometer with a length of 2.2 m (accuracy 0.5 cm). An inelastic tape (precision 0.1 cm) was used to measure the hip circumference and waist circumference at the height of the umbilicus. Two measurements were performed, and the mean value was recorded. BMI was calculated by dividing weight (kg) by the square of height (m²).

Biological samples

The participants attended the laboratory fasted overnight (12h) on the first and last day of the intervention. On each occasion, blood samples were collected by venipuncture, under vacuum, using tubes with EDTA and tubes to analyze trace elements. Then, the blood was centrifuged (1500 g, 15 min, 4°C) for plasma separation and stored at -80°C until the analysis. The volunteers also provided freshly collected stool samples (maximum 24 hours before), kept under refrigeration and frozen at -80°C until the analysis. On a non-consecutive day, the participants returned to the laboratory to perform the intestinal permeability test and collect urine samples.

Intestinal Permeability

The participants collected pretest urine: all the urine that was excreted after the last meal of the day until the time of the test. We used this urine as a control. The following day, overnight fasting, the participants drank a solution containing lactulose (10 g), mannitol (5 g), and sucrose (20 g) in a volume of 200 ml and the urine were collected up during four hours and thirty minutes after administration. Food intake was not allowed during the test, and water intake was controlled (150 ml after 2h and 3h of testing). The total volume of urine excreted

the night before the test (control urine) and during the test (test urine) was recorded, the thimerosal added (4:1, mg:ml), and stored at -20°C until analysis.

For the analyzes, the urine was defrosted and homogenized by vortexing. Then, 2 ml of urine was filtered through a microporous polyethersulfonic membrane (PES) (0.22 μm \times 13 mm). The excretion of lactulose and mannitol was quantified by HPLC using Dionex Ultimate 3000 Dual equipment coupled to a refractive index (RI) detector (Shodex RI-101) kept at 40 °C. The analytes were isocratically separated in an Aminex HPX-87C column (250 \times 4.0 mm) maintained at 70°C. We used ultrapure water as the mobile phase with a flow rate of 0.3 mL/min. We established the calibration curve using lactulose and mannitol as external standards. To estimate the total amount excreted in the urine the total volume of urine collected was multiplied by the concentration of each sugar in order to obtain the total amount excreted in the urine. Results were expressed as percentage of excretion of mannitol (% M) and lactulose (% L) and as the lactulose/mannitol ratio (LM ratio). The LM ratio cutoff point > 0.035 was adopted to classify increased intestinal permeability (LINSALATA et al., 2014, 2018).

Inflammatory markers

Plasma C-reactive protein (CRP) was determined by the ultrasensitive method using a specific commercial kit (Quibasa-Chemistry Basic) and the immunoturbidimetry technique in an autoanalyzer (Mindray / BS-200® Chemistry Analyzer). CRP values greater than 45 mg/dL were excluded from the analysis. Plasma cytokine concentrations were determined by flow cytometry using the BD FACSVerser™ Flow Cytometer equipment (BD Biosciences, USA). The plasma concentration of cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A and TNF) was measured using Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences, EUA) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using FCAP Array Software v3.0 (BD Biosciences, USA).

Plasma selenium

Plasma selenium concentrations were determined in a commercial laboratory by inductively coupled plasma mass spectrometry according to standard protocols. So far, there are no universal cut-off values for plasma selenium. We considered values $< 70 \mu\text{g/L}$ as low selenium, and 70-90 $\mu\text{g/L}$ as the normal range, considering the minimum values necessary to achieve optimal selenoprotein activity (ALCÂNTARA et al., 2022; CAO et al., 2022).

Fecal short-chain fatty acids (SCFA)

Feces (~500 mg) were defrosted at room temperature (24 °C), diluted in 1 ml of ultrapure water and vortexed for 5 minutes. The supernatant (600 µL) was transferred to a 2 ml microtube and we performed the sample preparation steps according to Siegfried; Ruckemann; Stumpf (1984).

After preparation, the samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a Dionex Ultimate 3000 Dual chromatograph coupled to a Shodex RI-101 refractive index (IR) detector, kept at 40 °C. The organic acids were isocratically separated on a Phenomenex Rezex ROA column, 300 × 7.8 mm maintained at 40° C. sulfuric acid 5 mM (H₂SO₄) was used as the mobile phase with a flow rate of 0.7 mL/min. Acetic, propionic and butyric acids were used as external standards in the calibration curve.

Fecal (pH)

The feces pH was determined using a pH meter (Instrutherm®, model PH-1900), after diluting and homogenizing 500 mg of feces in 5 mL of ultrapure water.

Gut microbiota analysis by 16S rRNA gene sequencing

Total genomic DNA was extracted from feces samples (300mg) following a mechanical disruption by beat-beating and phenol/chloroform extraction protocol (STEVENSON; WEIMER, 2007). DNA concentration and quality were determined by spectrophotometry by measuring the A₂₆₀/A₂₈₀. Amplicons from the 16S rRNA V3-V4 region were generated using forward primer 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') and reverse primer 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') and a barcode primer set adapter for the platform Illumina NovaSeq (Illumina, San Diego, California, USA) (CAPORASO et al., 2012).

We loaded samples into an Illumina flow cell for paired sequencing reactions using the Illumina NovaSeq PE250 platform at Novogene Corporation the University of California at Davis (Sacramento, California, USA). Amplicons were sequenced in a NovaSeq 2x250bp run using customized primers and sequencing procedures (CAPORASO et al., 2012). The sequences obtained for all samples were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under the access number PRJNA860372.

16S rRNA sequence processing

We performed data processing and analysis using Mothur v.1.44.3 software (SCHLOSS et al., 2009). Shortly, R1 and R2 paired-end reads were joined, and sequences shorter than 380 or longer than 440 bp were removed. Chimera sequences were detected and removed using UCHIME version 4.2 (EDGAR et al., 2011). After cleaning the sequences, they were aligned with the 16S rRNA gene using the SILVA v.138 database (QUAST et al., 2012).

The final paired sequences were grouped into Operational Taxonomy Units (OTUs). Each OTU represents a genetically unique group of biological organisms, and a sequence similarity cut-off of 97% was adopted. We performed the taxonomic classification of OTUs based on the SILVA v.138 database. Samples were grouped according to the treatment group (control or BN) and intervention time (baseline or after 8 weeks). The coverage of all samples was evaluated by the Good's Coverage estimator, considering a cutoff point >97%. To correct sampling bias due to unequal amplicon library sizes, we normalized samples to the smallest number of sequences produced from any sample (**Supplementary Table S1**).

STATISTICAL ANALYSIS

The sample size was defined a priori (CALDAS et al. 2022). Statistical analyzes were performed in SPSS software, version 24.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). A significance level of 5% was adopted in all analyzes. The Shapiro-Wilk test was chosen to test the normality of all variables. Data were expressed as mean \pm standard error (SE), box plot or bar graph.

We excluded from analysis the participants who collected blood samples but did not complete the intestinal permeability protocol. For microbiota and SCFA analyzes, a sub-sample was used because some participants did not provide the fecal sample in the time and under the conditions required by the protocol.

Differences in energy and nutrient intake between groups were investigated using the independent-samples *t*-test or Mann-Whitney. For intra-group differences, the paired *t* and Wilcoxon tests were used. Differences in anthropometric variables, intestinal permeability, fecal pH, SCFA and inflammatory cytokines were investigated using paired *t*-tests for intragroup differences, and independent-samples *t*-test for differences between groups. Pearson and Spearman correlations were used to investigate the association between intestinal permeability, anthropometric variables, cytokines and intestinal microbiota.

The normalized data table was used to calculate α and β -diversity, as well as to calculate the relative abundance of OTUs. The Chao1, Shannon and Simpson indices were used to estimate the α -diversity of the microbial community, and differences within and between groups were analyzed using paired *t*-test and independent-samples *t* test, respectively. The β -diversity analyzes were performed to compare microbial composition between groups at baseline and after the intervention. β -diversity was statistically evaluated at the level of OTUs, phylum and genus, using the Past software (version 4.05, by Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on the Bray-Curtis dissimilarity index and permutational multivariate analysis (PERMANOVA, permutations of Monte Carlo), adopting 10,000 permutations.

Differences in the relative abundance of the different taxonomic categories were evaluated by the Kruskal-Wallis test with Tukey-Kramer post hoc, using the Statistical Analysis of Metagenomic Profiles software (STAMP v.2.1.3) (PARKS, et al., 2014). The effect of treatments (control x BN) on the abundance of bacterial taxa at OTU, phylum and genus level was analyzed by the Kruskal-Wallis H-test using false discovery rate (FDR) by Benjamini correction for multiple comparisons (STAMP; version 2.1.3). Intra-group differences (baseline x 8 weeks) were identified using Wilcoxon and differences between groups (control x BN) were identified using Mann-Whitney for independent samples.

The Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) (SEGATA et al., 2011) was calculated to identify the OTUs (gender level or above) that differed most in abundance at baseline and after 8 weeks, according to the treatment group.

RESULTS

In total, 40 women were randomized and 25 (62.5%) completed the intervention (**Figure 1**). Of these 25, 19 provided stool samples for analysis. The mean age was 31.7 ± 1.8 years, 28% had overweight, and 72% had obesity (class I: 12%, class II: 44%, and class III: 16%). There was no difference in anthropometric variables, body composition, plasma selenium, and food intake between the control and BN groups at baseline (**Table 1**).

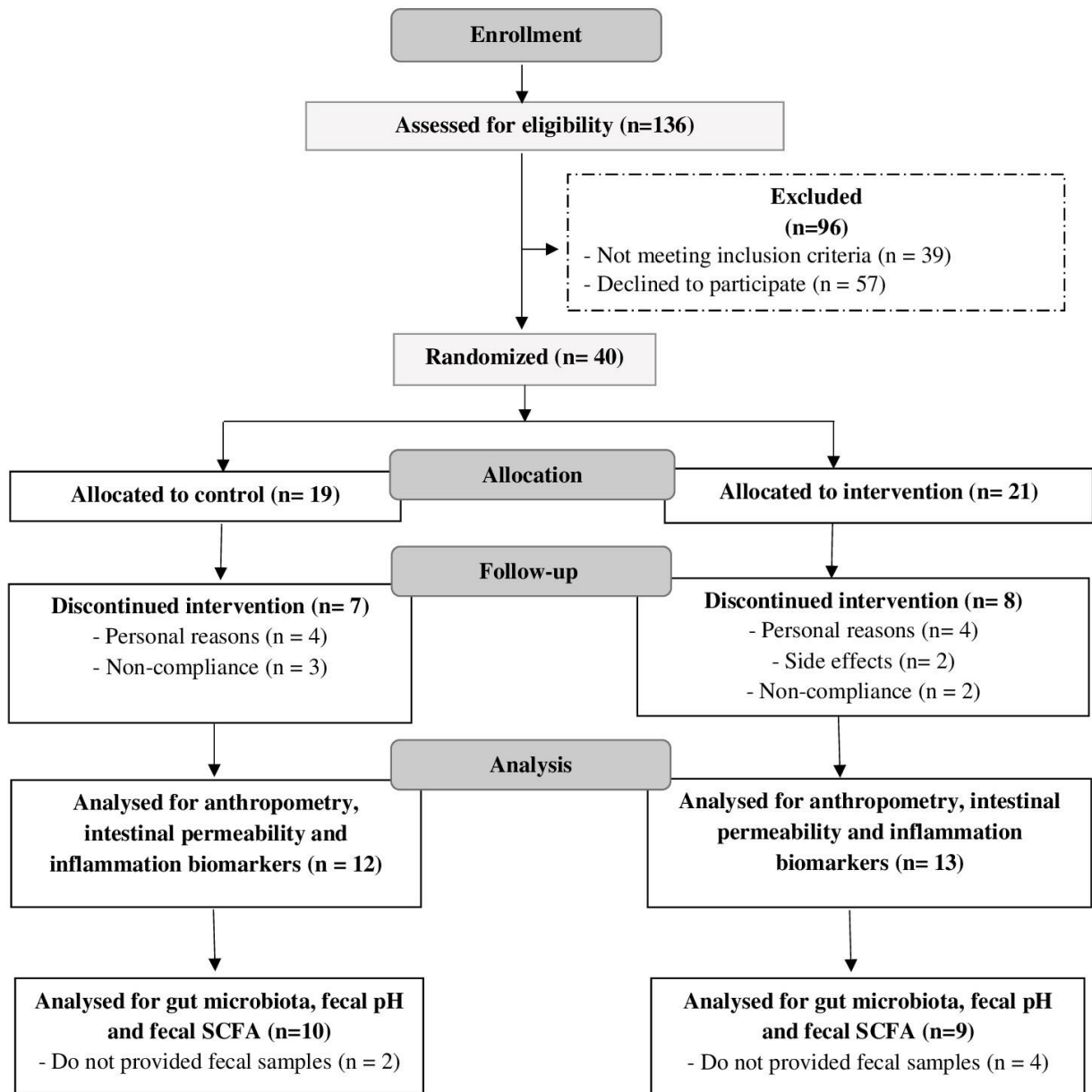


Figure 1. The CONSORT flow diagram, showing the flow of participants in each phase of the study.

Table 1. Changes in participants characteristics and food consumption during intervention, according to treatment group.

	Control group (n = 12)			BN group (n = 13)		
	Baseline	Δ	<i>P</i>	Baseline	Δ	<i>P</i>
Characteristics						
Age (years)	32.5 ± 2.3	-	-	30.4 ± 3.0	-	-
Body weight (kg)	89.2 ± 4.3	-2.1 ± 0.6	0.005	93.0 ± 4.5	-3.4 ± 0.6	<0.001
BMI (kg/m ²)	33.5 ± 1,0	-0.7 ± 0.2	0.005	34.3 ± 1,5	-1.3 ± 0,2	<0.001
WC (cm)	108.9 ± 3.0	-3.0 ± 0.6	0.001	109.1 ± 3.4	-5.6 ± 1.2	0.001
Hip circumference (cm)	117.8 ± 2.5	-1.8 ± 0.6	0.016	118.4 ± 3.4	-2.0 ± 0.9	0.042
Total body fat (kg)	43.0 ± 2.5	-1.3 ± 0.5	0.035	45.7 ± 2.8	-2.9 ± 0.7	0.003
Total body fat (%)	45.2 ± 1.4	-0.5 ± 0.4	0.237	45.5 ± 1.7	-1.7 ± 0.7	0.038
Total lean mass (kg)	42.4 ± 2.0	-0.95 ± 1.4	0.580	42.9 ± 1.5	-0.3 ± 0.2	0.137
Plasma selenium (µg/L)	58.9 ± 3.6	6.3 ± 6.2 *	0.161	59.1 ± 4.9	33.7 ± 7.5 *	0.001
Food consumption						
Energy intake (kcal)	1764.2 ± 211.4	- 254.2 ± 232.1	0.230	1834.1 ± 123.8	- 287.5 ± 117.9	0.016
Protein (%)	18.4 ± 0.9	0.3 ± 1.0	0.456	16.8 ± 1.3	3.1 ± 1.4	0.660
Carbohydrate (%)	51.5 ± 1.7	- 4.0 ± 2.3	0.068	50.6 ± 6.7	- 6.5 ± 2.0	0.006
Lipids (%)	30.5 ± 1.7	3.4 ± 2.1	0.787	33.0 ± 1.4	3.2 ± 1.2	0.234
SFA (g)	20.9 ± 2.9	- 3.8 ± 3.9	0.233	24.1 ± 2.0	- 5.2 ± 2.0	0.013
MUFA (g)	20.3 ± 3.5	- 2.0 ± 4.2 *	0.583	23.1 ± 2.3	2.4 ± 2.5 *	0.442
PUFA (g)	11.5 ± 2.1	4.7 ± 1.8 *	0.008	13.1 ± 1.6	- 0.6 ± 1.5 *	0.416
LA (C18:2n6)	10.0 ± 1.8	4.2 ± 1.6*	0.007	11.4 ± 1.4	0.3 ± 1.3 *	0.755
ALA (C18:3n3)	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.2 *	0.004	1.4 ± 0.1	- 0.5 ± 0.1 *	0.002
Cholesterol (mg)	359.4 ± 47.7	- 129.9 ± 38.6	0.007	340.4 ± 33.6	- 98.9 ± 34.1	0.007
Fiber (g)	20.7 ± 3.3	0.7 ± 4.1	0.739	17.0 ± 2.0	1.6 ± 1.9	0.376
Selenium (µg)	93.9 ± 13.1	12.2 ± 26.6 *	0.589	98.8 ± 9.3	275.4 ± 9.2 *	<0.001

Δ = endpoint – baseline assessment. Values are mean ± SEM (standard error). *P* = intra-group comparison (paired *t* test).

* Indicate difference of Δ values between treatment groups (BN vs control group) (independent-samples *t* test or Mann-Whitney *U* test, *P* < 0.05).

BN: Brazilian nuts, BMI: body mass index; WC: waist circumference; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; LA (C18:2n6): linoleic acid; ALA (C18:3n3): α -Linolenic acid.

Weight loss, dietary intake and plasma selenium concentration were used to compliance to the study protocol (**Table 1**). In this sense, compared to the baseline, both treatments, control and BN, achieved significant weight loss, with a reduction in waist and hip circumference, BMI and body fat (kg), but there was no difference between groups. After 8-wk intervention, the energy restriction obtained was similar between the control ($\Delta -254.2 \pm 232.1$ kcal/day) and BN ($\Delta -287.5 \pm 117.9$ kcal/day) groups. The intake of MUFA was higher in the BN group, while the intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA), linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (ALA) were higher in the control group. Regarding nutritional selenium status, women allocated to the BN group showed a significant increase in selenium intake, as well as in plasma concentrations of this mineral compared to the control group, corroborating adherence to the intake of Brazil nuts (**Table 1**). Regarding inflammatory markers, we did not observe changes in plasma concentrations of CRP, TNF, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-17A (**Figure 2**).

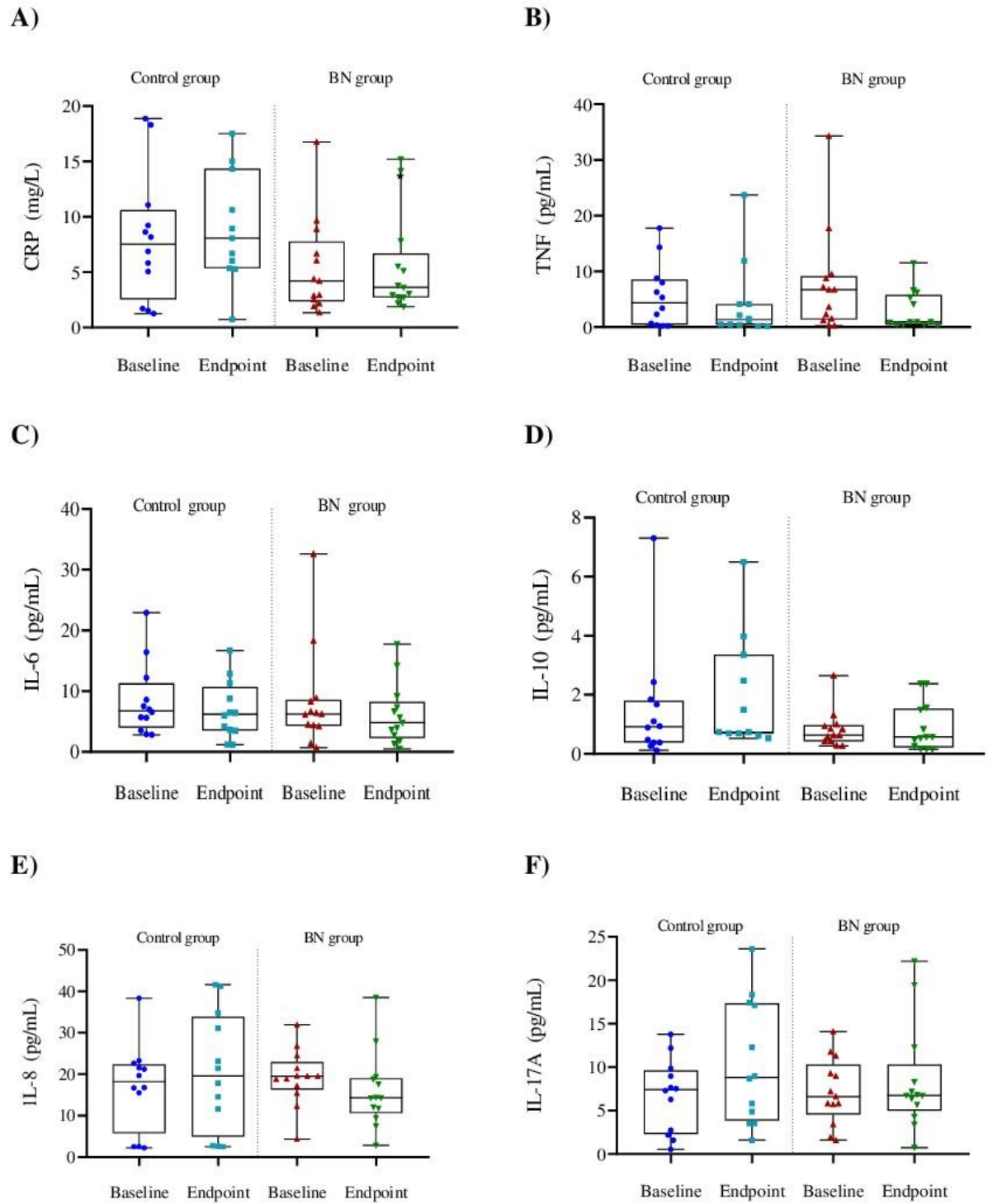


Figure 2. Boxplot of plasma cytokines at baseline and after 8 weeks of intervention, according to treatment group.

BN: Brazilian nuts group, CRP: C-reactive protein, TNF: necrose factor tumor, IL: interleukin. Student's t-test ($P < 0.05$).

After the 8-wk intervention, intestinal permeability measured by the LM ratio and mannitol excretion did not differ between treatments. However, the control group had significantly higher lactulose excretion (%) than the BN group (**Figure 3**). Furthermore, the consumption of BN for eight weeks significantly reduced the concentration of acetic acid in the feces compared to the control group. There was also an increase in propionic acid compared to baseline; however, there was no difference between the groups. Butyric acid and fecal pH did not show significant changes from baseline or between treatments (**Table 2**).

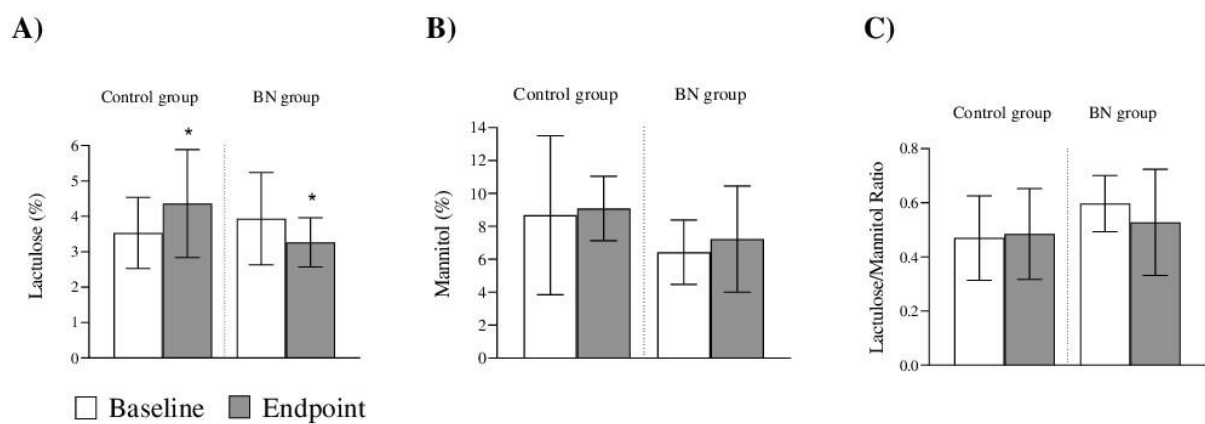


Figure 3. Intestinal permeability measured by urine excretion of lactulose and mannitol, at baseline and after 8 weeks of intervention, according to treatment group.

BN = Brazilian Nuts group. Data are expressed as mean \pm SEM. *Difference between control and BN group (Independent-samples *t* test, $P < 0,05$).

Table 2. Fecal volatile fatty acids and pH at baseline and after 8 weeks of intervention, according to treatment group.

	Control group (n=10)			BN group (n = 9)		
	Baseline	Endpoint	<i>P</i>	Baseline	Endpoint	<i>P</i>
Acetic acid (g/L)	197.2 ± 16.3	180.9 ± 55.5 *	0.342	193.6 ± 62.2	133.0 ± 36.5 *	0.003
Propionic acid (g/L)	74.8 ± 10.7	107.9 ± 93.6	0.301	66.1 ± 24.8	148.8 ± 91.1	0.014
Butyric acid (g/L)	75.9 ± 24.8	63.0 ± 43.6	0.313	60.0 ± 33.5	44.8 ± 23.5	0.117
Fecal pH	7.6 ± 0.6	8.0 ± 0.6	0.137	7.8 ± 0.8	7.7 ± 0.4	0.740

Values are mean ± SEM (standard error). BN: Brazilian nuts group, pH = hydrogen potential. *P* = paired *t* test (*P* < 0.05). * Difference between groups (independent-samples *t* test, *P* < 0.05).

For intestinal microbiota analyzes, the 16S rRNA gene sequencing of the stool samples generated 6.057.594 raw sequences. After filtering and cleaning, 1.119.542 good-quality sequences were obtained. The Good's coverage obtained was always > 98%. We presented the sample sequencing data summary in **Supplementary Table 1**.

In terms of α -diversity, the control group reduced the richness of microorganisms, estimated by the Chao 1 index, as well as by the Shannon index, in relation to the baseline. However, there was no difference in α -diversity estimated by the Chao 1, Shannon and Simpson indices between treatments (**Supplementary Figure 1**). β -diversity analyzes indicated differences between bacterial communities at the level of OTU and phylum, but not gender. Based on Permanova analysis, BN group differed from the baseline at the level of OTU ($p = 0.0015$) and phylum ($p = 0.0159$). The control group also showed changes from baseline in OTU level ($p = 0.0005$) and phylum ($p < 0.001$). In the comparison between groups, there was no difference between the treatments in terms of OTU, phylum, and gender, at the end of intervention (**Supplementary Figure 2**).

Taxonomic analyzes of the bacterial community revealed the presence of 13 phyla, 28 classes, 60 orders, 107 families and 301 genera in all stool samples. The most abundant phyla (>0.1%) in both treatment groups at baseline and after the intervention were: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobiota and Desulfobacterota. There was no difference in phyla abundance between groups at baseline or after 8 weeks of intervention (**Figure 4-A**). In the intragroup comparison, when considering the two predominant phyla, Firmicutes and Bacteroidetes, the control group showed an increase in Firmicutes (82.2 ± 1.0 vs 85.9 ± 1.0 ; $p = 0.004$), a significant reduction in Bacteroidetes (7.4 ± 1.1 vs 4.9 ± 0.5 , $p = 0.006$) and, consequently, an increase in the Firmicutes/Bacteroidetes

ratio (12.0 ± 7.5 vs 19.1 ± 6.5 , $p = 0.034$), in relation to the baseline (**Figure 4-A and Figure 4-C**). The BN group showed a significant increase in Firmicutes (81.4 ± 0.9 vs 86.0 ± 0.7 , $p = 0.028$); however, changes in the Bacteroidetes phylum and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio were not significant (**Figure 4-B and Figure 4-C**). There was no difference in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio between treatments (**Figure 4-C**).

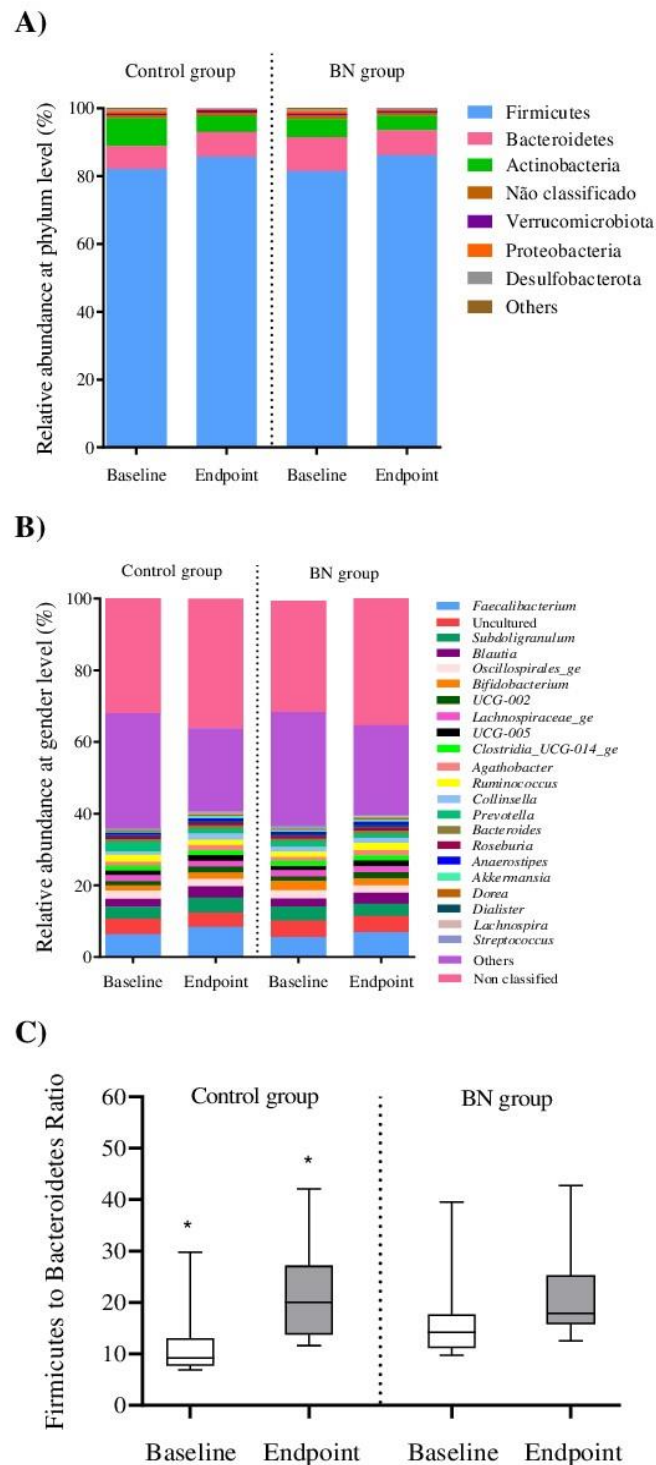


Figure 4. Bacterial composition at phylum and gender levels, at baseline and after 8 weeks, according to treatment group.

A) Bacterial composition at the phylum level; B) Bacterial composition at the gender level; C) Firmicutes to Bacteroidetes ratio (values are mean \pm SEM (standard error)). BN: Brazilian nuts group. The category “Others” corresponds to phyla with relative abundance $< 0.1\%$, they are: Campylobacterota, Elusimicrobiota, Fibrobacterota, Patescibacteria, Spirochaetota and Synergistota. * Intra-group difference (paired t test, $P = 0.034$).

Considering the most prevalent genera (abundance > 1%), after 8 weeks of treatment, the control group showed an increase in the relative abundance of *Blautia* (2.1 ± 0.6 vs 3.1 ± 0.2 ; $p = 0.001$), *UCG -005* (1.1 ± 0.05 vs 1.6 ± 0.16 ; $p = 0.003$), *UGC-002* (1.1 ± 0.09 vs 1.6 ± 0.16 ; $p = 0.008$), and reduction in the abundance of *Ruminococcus* (2.0 ± 0.1 vs 1.4 ± 0.08 ; $p = 0.003$). The BN group showed an increase in the relative abundance of *UGC-002* (1.2 ± 0.09 vs 1.7 ± 0.16 ; $p = 0.037$), and an increase in the abundance of *Ruminococcus* (1.4 ± 0.06 vs 2.1 ± 0.1 ; $p = 0.036$). There was no difference in the abundance of genera between treatments after 8 weeks of intervention (**Figure 4-B**).

LEfSe analysis was used to investigate key gut microbiome differences between treatments. At baseline, LEfSe revealed 10 major OTUs in the BN group and 22 OTUs in the control group. In the BN group, OTUS related to the genera *Bifidobacterium*, *Oscillospirales_ge*, *Senegalimassilia* and *Faecalibacterium* were more abundant. The control group mainly included *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Coprococcus*, *Oscillospirales_ge*, *UCG-002*, *Anaerostipes* and *Muribaculaceae_ge* (**Figure 5-A**). After 8 weeks, the main OTUs in the BN group were *Holdemanella*, *Roseburia*, *NK4A214_groups*, *UCG-002*, Lachnospiraceae family, *Bacteroides* and *Lachnoclostridium*. In turn, in the control group, *Prevotella*, *Subdoligranulum* and *Bifidobacterium* prevailed (**Figure 5-B**).

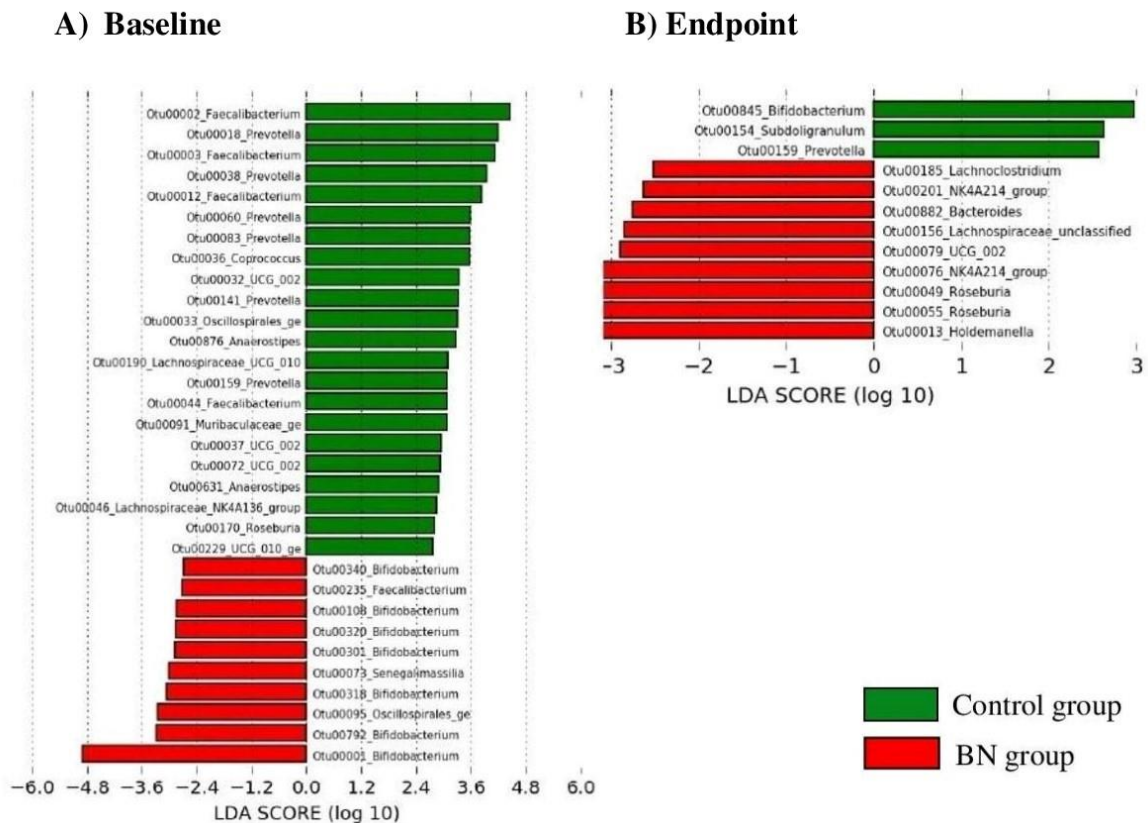


Figure 5. LefSe analysis identifying the OTUs that most differed between groups at baseline and endpoint (8 weeks of intervention).

BN: brazilian nuts group. The histogram shows LDA scores calculated to identify differences in OTU abundance between groups at baseline and after 8 weeks of intervention. The absolute values of the effect size (LDA scores) indicate the scale of the difference between the groups, regardless of whether the value is positive or negative.

We evaluated the correlation between the abundance of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes with intestinal permeability, and anthropometric or dietary fatty acid profile variables, but we observed no significant results (data not shown). However, changes in LM ratio were positively correlated with changes in body fat and IL-8 concentrations, but negatively correlated with *Ruminococcus* abundance. Furthermore, changes in lactulose excretion (%) were positively correlated with changes in body fat ($r = 0.553$; $p = 0.008$) and BMI ($r = 0.449$; $p = 0.018$) (**Figure 6**).

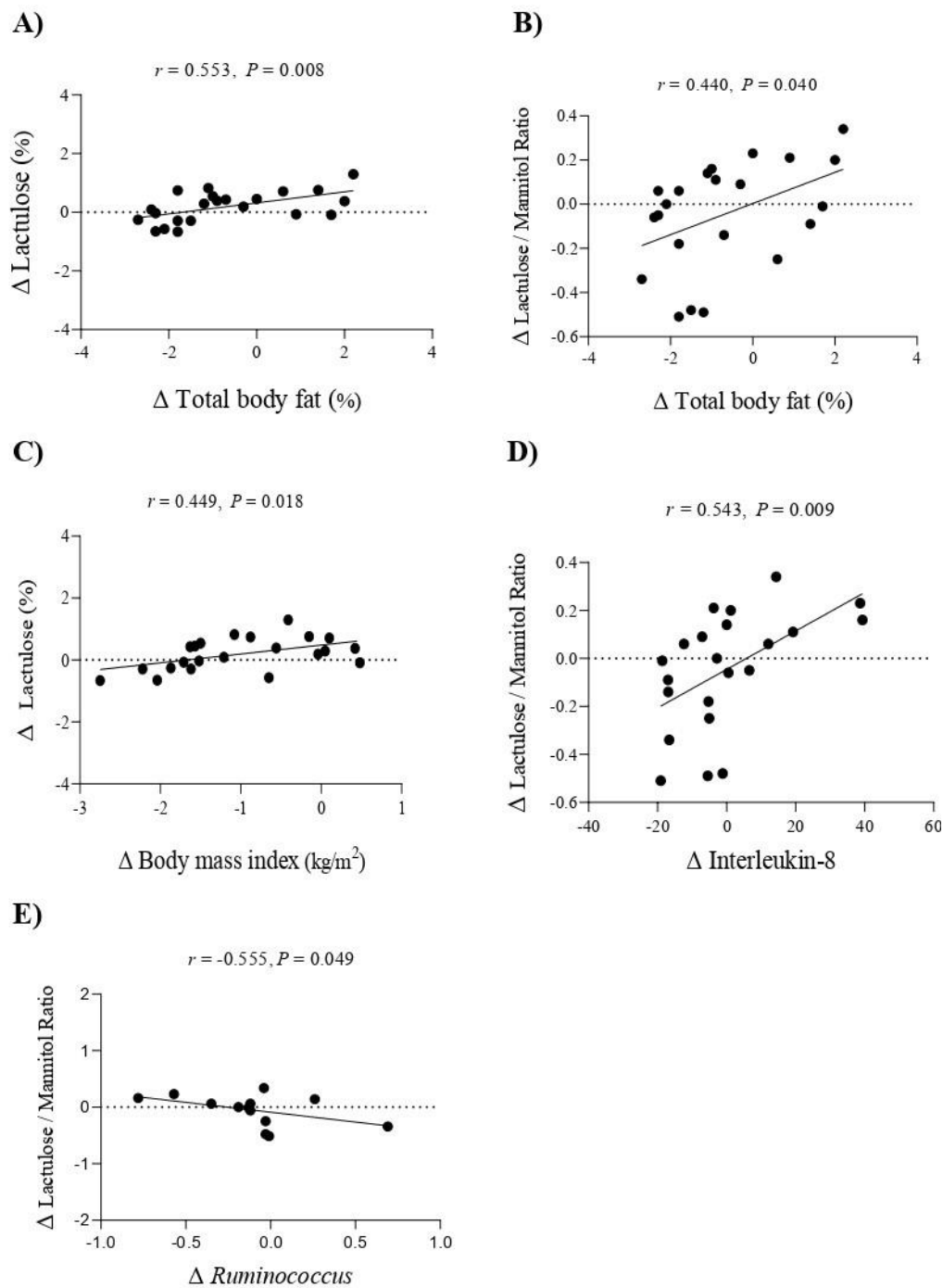


Figure 6. Correlation between intestinal permeability, anthropometric variables, interleukin-8 and *Ruminococcus* gender, among participants of both treatment groups (n = 25). Δ = endpoint – baseline assessment, r = Person or Spearman correlation coefficient.

Finally, correlations were identified between changes in plasma cytokine concentrations and the abundance of microorganisms at the phylum level. IL-17A was positively correlated with the phyla Verrumicrobiota ($r = 0.540$; $p = 0.014$) and Desulfurobacterota ($r = 0.460$; $p = 0.041$). The IL-6 positively correlates with the phylum

Desulfurobacterota ($r = 0.484$; $p = 0.031$) and TNF was positively correlated with the phylum Firmicutes ($r = 0.574$; $p = 0.020$) (Figure 7).

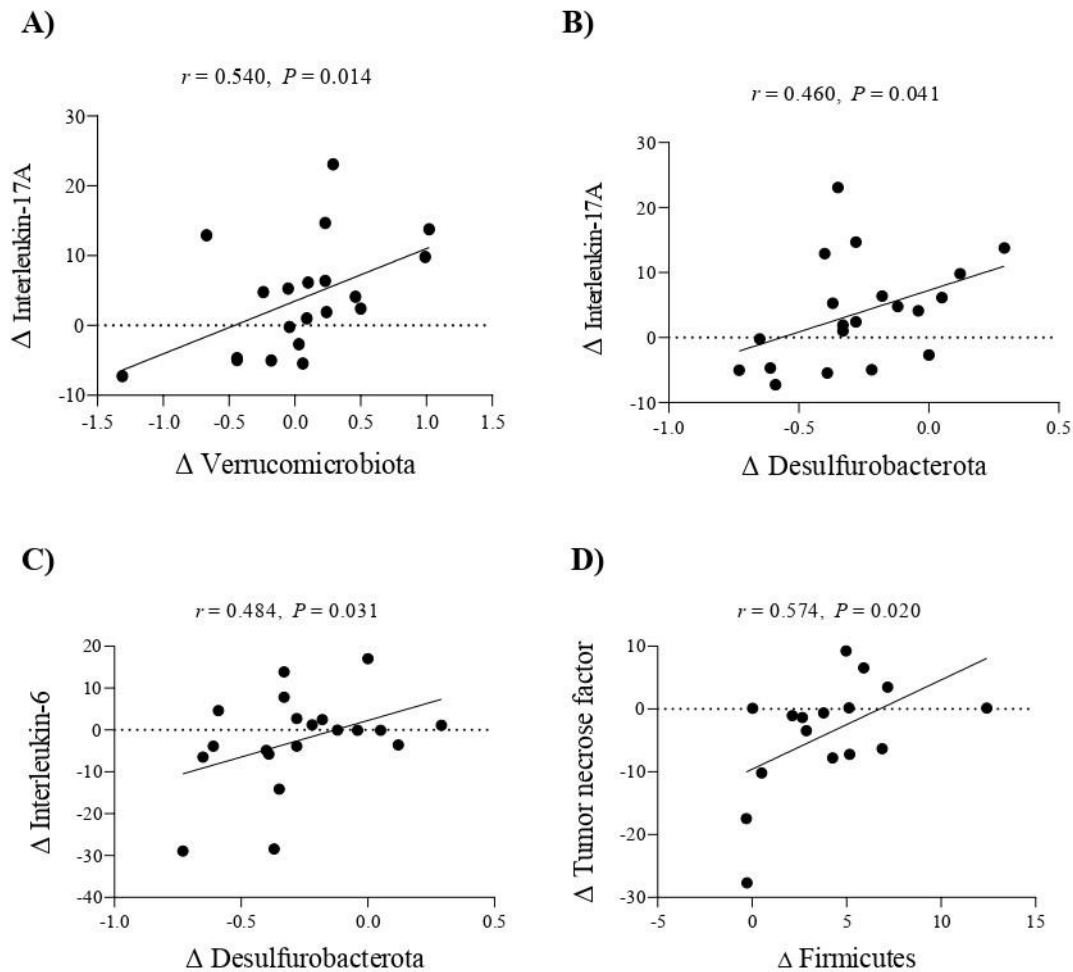


Figure 7. Correlation between inflammatory biomarkers and gut microbiota at the phylum level (Verrucomicrobiota, Desulfurobacterota, Firmicutes), among participants of both treatment groups ($n = 25$).

Δ = endpoint – baseline assessment, r = Person or Spearman correlation coefficient.

DISCUSSION

For the first time, a randomized controlled trial evaluated the effect of BN (cashew and Brazil nut) intake, associated with energy restriction, on the microbiota and intestinal permeability. In this sense, 8-weeks energy-restricted diet with BN consumption resulted in a beneficial modulation of intestinal microbiota and a preventive effect for intestinal permeability, related to adiposity and inflammatory markers.

BN increased the abundance of genera related to better health outcomes such as *Ruminococcus*, *Roseburia*, *UCG-002*, and *NK4A214_groups*. The increase in bacteria of the

genus *Ruminococcus*, which are producers of propionic acid (REICHARDT et al., 2014), is an expected outcome in people with obesity undergoing energy restriction and weight loss (OTT et al., 2017). In our study, both treatment groups lost weight, but only the BN group (energy restriction + BN) increased *Ruminococcus*, while the control group (energy restriction without nuts) reduced the abundance of this genus, at the same time this group had increased fecal propionic acid, indicating a positive effect of this microbiota modulation after BN consumption.

In fact, the BN group showed an increase in the abundance of *UGC-002*, and by LefSe analysis, the main OTUs were *Holdemanella*, *Roseburia*, *NK4A214_groups*, *UCG-002*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroides* and *Lachnospiraceae*. In general, the modulation of the microbiota was positive, with some reservations. *Bacteroides*, *Lachnospiraceae* and *Lachnospiraceae* are resistant to bile and increase after consumption of diets with higher lipid content (DAHL; RIVERO; LAMBERT, 2020; ZHAO, L. et al., 2017). *Roseburia*, *UCG-002*, *NK4A214_groups* and *Ruminococcus* are important SCFA producers identified in the microbiota of healthy people and are related to intestinal health and reduction of inflammatory markers (CALDERÓN-PÉREZ et al., 2020; CHEN, et al., 2021; FOMENKY et al., 2018; KIM, et al., 2021). The increase in *Roseburia* and *Ruminococcus* is a very common finding in nut intervention studies, even in healthy populations and short-term interventions (< 3 weeks) (BAMBERGER et al., 2018; CHOO et al., 2021; CREEDON et al., 2020; FITZGERALD et al., 2021; HOLSCHER, et al., 2018; HOLSCHER, et al., 2018; OJO, et al., 2021). This is possibly due to these genera's ability to metabolize fatty acids, which are highly present in nuts (HOLSCHER, et al., 2018).

Unexpectedly, BN intake also increased the abundance of bacteria with controversial health effects, such as *Lachnospiraceae* and *Lachnospiraceae*. The genus *Lachnospiraceae* is related to obesity induced by high-fat diets (ZHAO, L. et al., 2017) and intestinal diseases such as colitis and carcinoma (LIANG et al., 2020; WANG, et al., 2018). The *Lachnospiraceae* family includes beneficial genera such as *Roseburia*, recognized for its effect on controlling inflammation, preventing atherosclerosis and for being a biomarker of intestinal health (FOMENKY et al., 2018; VACCA et al., 2020). However, analyzes of the *Lachnospiraceae* family, disregarding specific genera, have already identified associations with diabetes and dyslipidemias (VACCA et al., 2020). Finally, the genus *Holdemanella* is associated with non-alcoholic fatty liver disease due to inflammatory mechanisms, including an increase of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL1- β , TNF) (TANG et al., 2018).

About the control group, there was an increase in *Blautia*, UCG-005, UGC-002, and a reduction in *Ruminococcus*. By LefSe analysis, *Prevotella*, *Subdoligranulum* and *Bifidobacterium* prevailed. The genera *Prevotella* and *Bifidobacterium* are beneficial fermenting bacteria, related to the inhibition of potentially pathogenic bacteria and reduced inflammation (FILIPPO, et al., 2010; FITZGERALD et al., 2021; KONG et al., 2019; WANG, et al., 2018). However, evidence on the benefits of higher *Subdoligranulum* abundance *in vivo* is poor (HUL, et al., 2020). The UCG-005 has already been suggested as a marker of ulcerative colitis (LIU, et al., 2021) and *Blautia* is related to the increase of inflammatory cytokines (TANG et al., 2018) and intestinal permeability (LECLERCQ et al., 2014).

At the phylum level, we identified a positive correlation between Verrucomicrobiota and Desulfurobacterota with inflammatory cytokines such as IL-17A, IL-6, and TNF. These phyla are associated with mucus degradation and reduced enterocyte protection (LIU, et al., 2021), and when reduced, there is an improvement in the expression of tight junction proteins (occludin and zonula occludens-1 (ZO -1)), and inflammation control (RAO et al., 2021). Despite this, we did not observe significant changes in these phyla or in the concentration of inflammatory cytokines. Therefore, we believe that changes at the gender rather than phylum level are more accurate in measuring and predicting changes in health outcomes, especially in short-term interventions (CREEDON et al., 2020).

Regarding intestinal permeability, we identified a positive correlation between a reduction in LM ratio with reductions in percentual body fat (% BF), and reductions in IL-8 concentrations. In addition, we noted positive correlation between reductions in lactulose excretion with reductions in % BF and BMI. However, there were no changes in the LM ratio in any treatment groups. We know that weight loss and energy restriction are among the main mediators of intestinal permeability reduction (DAMMS-MACHADO et al., 2017; OTT et al., 2017; TEIXEIRA, et al., 2012; TILVES et al., 2022). Despite having weight loss and reduction in WC and body fat, all participants had increased permeability before and after the intervention (LM ratio > 0.035) (LINSALATA et al., 2014, 2018).

Despite weight loss, we must consider that the absence of improvements in intestinal permeability in both groups may be related to the total daily intake of lipids. Diets rich in lipids promote increases in intestinal permeability (ROHR et al., 2019). For this reason, all participants received balanced fat meal plans during the intervention (30 to 33% of total energy). However, the study population consisted of people with overweight/ obesity and mostly low-income (< \$ 92 monthly, per capita) who had difficulty in accurately reporting the

amount of oil used in food preparation. Despite the nutritional counseling carried out throughout the intervention, the participants also reported frequent consumption of fried and sautéed foods. Therefore, data on fat intake may have been underestimated.

For future perspectives, our results support the hypothesis that BN intake has the potential to modify intestinal permeability in longer duration interventions (higher than eight weeks). First, because only the control group significantly increased lactulose excretion, despite the maintenance of the LM ratio. Second, the BN group increased the abundance of *Ruminococcus*, a genus that has been correlated with variations in the LM ratio and is reduced in people with increased intestinal permeability (LECLERCQ et al., 2014). Third, *Ruminococcus* is also an important producer of propionate, a SCFA associated with a reduction in intestinal permeability due to the regulation of tight junction proteins, increase in antioxidant enzymes (SOD, CAT), and reduction in pro-inflammatory cytokines (IL-1B, IL-6, TNF) (TONG et al., 2016; USUDA; OKAMOTO; WADA, 2021; XU, et al., 2022). Both *Ruminococcus* and propionate increased only in the group that consumed BN.

Moreover, this protective effect of nuts on intestinal permeability may be related to two main mechanisms: lower availability of lipids and greater supply of antioxidant nutrients. Nuts lipids are poorly bioavailable because chewing is not enough to fully break up the fat particles and expose them to digestive enzymes. In this way, part of the fat is not absorbed but eliminated in the feces or used by commensal intestinal bacteria, such as *Ruminococcus*, *Roseburia*, *UCG-002*, *NK4A214_groups* (BAER; NOVOTNY, 2018; CASSADY et al., 2009). Besides, nuts have bioactive compounds and antioxidants that protect against the stress caused by high-fat diets (BARTOSZEK et al., 2020; BEGUIN et al., 2013; BERNARDI et al., 2020; WANG et al., 2020). Among the antioxidants, we highlight the selenium present in Brazil nuts, which protects the intestinal barrier against damage caused by oxidative stress (LIU et al., 2016; MASEKO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2020). At baseline, 76% of participants had low plasma selenium. After the intervention, all participants who consumed nuts achieved good values ($> 70 \mu\text{g/L}$) (ALCÂNTARA et al., 2022), while 75% of the volunteers in the control group remained in insufficiency.

This study has limitations. People with obesity have low adhesion to a weight loss eating plan and usually underestimate food intake by 30 to 50% (CHAO; QUIGLEY; WADDEN, 2021). A meta-analysis estimated that, on average, expected adherence is 60.5% (ROGERS et al., 2016), which can compromise the assessment of food intake and the outcome. The maintenance of free-living participants and low per capita income ($< \$ 92$ monthly, per capita) also limited adherence to the food protocol.

As strengths, we highlight the strict control of lifestyle throughout the intervention period, and continuous nutritional monitoring, to minimize influences on outcomes. Despite limitations, both treatment groups – control and BN – achieved similar energy restriction and a similar reduction in weight and body fat. This is also the first clinical trial to investigate the effect of BN on gut microbiota and intestinal permeability, adding relevant scientific information concerning the relationship between adiposity, inflammation and intestinal health and health foods effects. Finally, our sequencing allowed a broad taxonomic classification of intestinal bacteria, from kingdom to genus, contributing to greater precision in the analysis of results.

CONCLUSION

Brazilian nuts intake complementary to 8-weeks energy restriction promoted an increase in fecal propionic acid and commensal bacteria, such as *Ruminococcus*, *Roseburia*, *NK4A214_groups* and *UCG-022*, indicating beneficial modulation to the microbiota in people with overweight/ obesity. Moreover, compared to the control diet, these nuts protected against intestinal permeability, probably related to the lower lipid bioavailability of BN added to the higher content of antioxidants, mainly selenium. Therefore, the consumption of Brazilian nuts is a viable alternative against the harmful effects associated with obesity, mainly improving intestinal health.

ACKNOWLEDGMENT

The Brazilian Nuts Study's team thanks all the study participants and researchers involved; to Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, Brazil) and to the company Inovam Brasil® (Ji-Paraná, Brazil) for supplying cashew nuts and Brazil nuts, respectively.

We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for providing the facilities for the conduction of the experiments and data analysis. Bioclin (Quibasa - Química Básica Ltda), through the project Projeto Brasil Escola, provides supplies for the biochemical dosages necessary to characterize the biochemical profile of the study participants.

FUNDING STATEMENT

This work was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Code 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, process CDS-APQ-00369-17), and Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq, process 428038/2018-2). J. Bressan and H.H.M. Hermsdorff are CNPq fellows.

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BKSS wrote the manuscript. BKSS, DMUPR, HHMH, and JB designed the experiment. HSDM, JB, and HHMH coordinated and supervised research procedures. BKSS and DMUPR, conducted the research and collected data. BKSS, HCM, MJCG, and MG analyzed the data. BKSS, MJCG, DMUPR, and HHMH interpreted the results. JB, MG, DMUPR, and HHMH review and edited the manuscript.

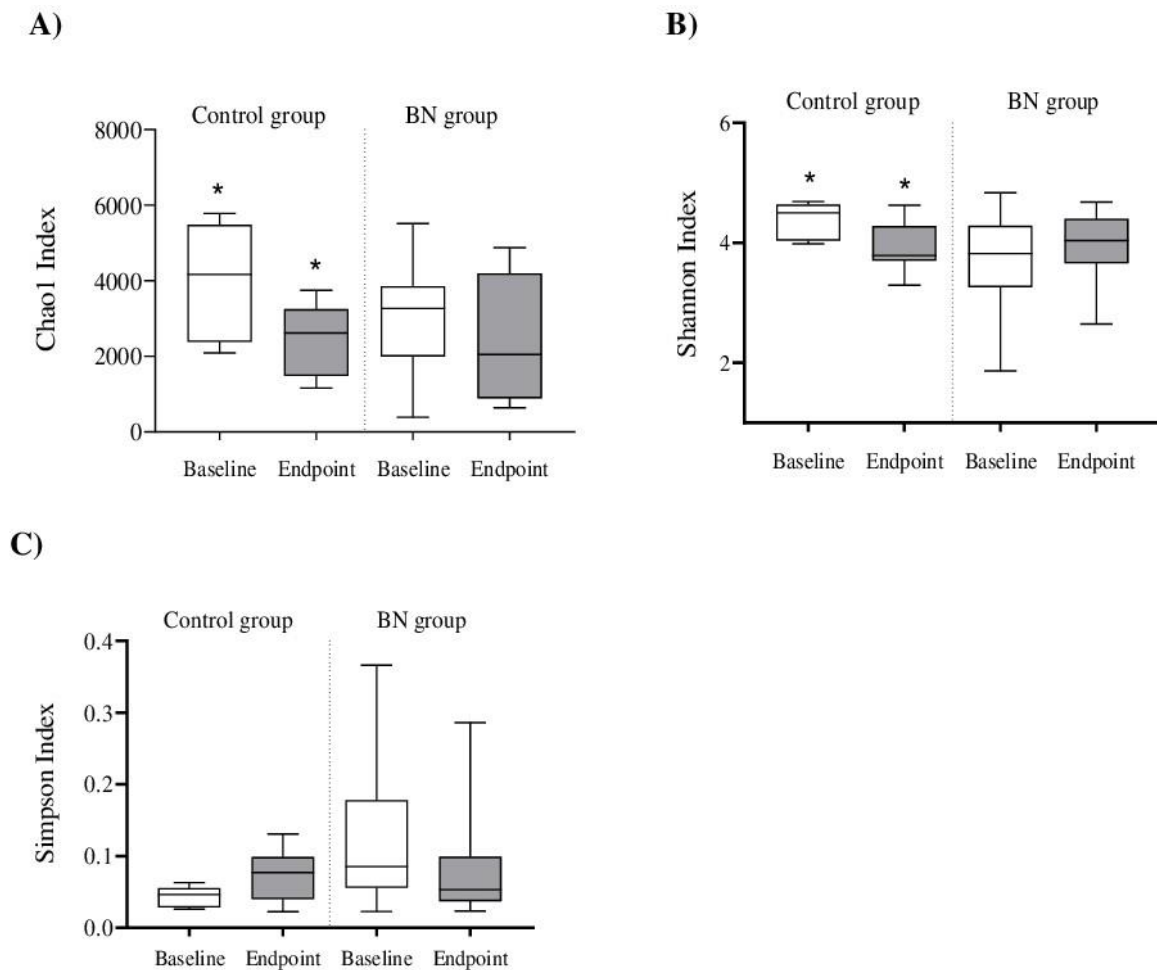
All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Sequencing data at baseline and after 8 weeks of intervention, by treatment group.

Groups	Good's coverage	Raw sequences	After filtering and cleaning		After normalization	
		Reads	Reads	OTUs	Reads	OTUs
Control baseline	0.981 ± 0.004	179121 ± 11442	29533 ± 4278	1077 ± 144	20834 ± 67	1077 ± 144
Control endpoint	0.987 ± 0.002	164200 ± 15741	30067 ± 5160	795 ± 30	20816 ± 40	795 ± 30
BN baseline	0.985 ± 0.004	171719 ± 13601	33721 ± 7734	911 ± 178	20838 ± 91	884 ± 246
BN endpoint	0.987 ± 0.002	157239 ± 17856	30216 ± 6061	772 ± 100	20769 ± 102	728 ± 166

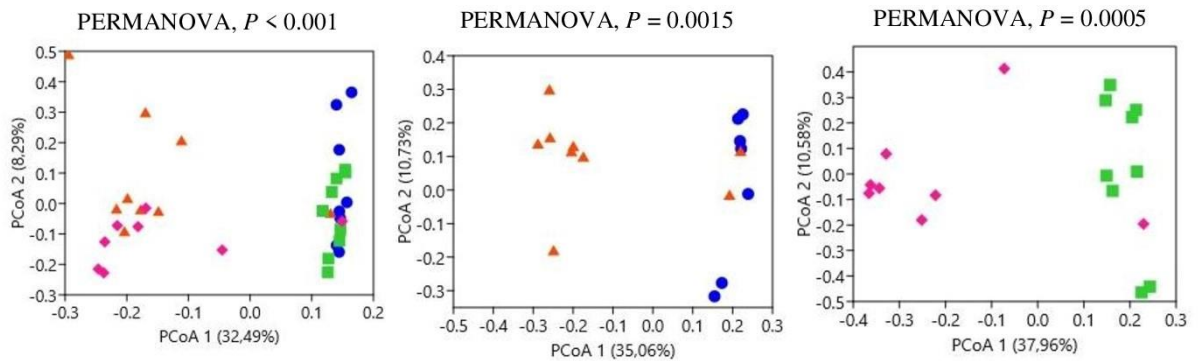
Values are mean ± SD (standard deviation). BN: Brazilian nuts group.



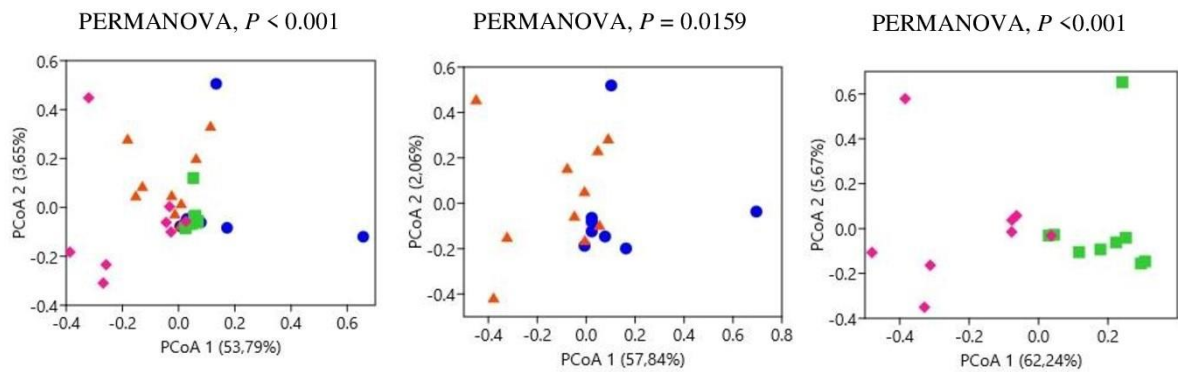
Supplementary figure 1. Alpha-diversity estimated by the Chao 1, Shannon and Simpson index at baseline and after 8 weeks of intervention, according to the treatment group.

BN = Brazilian nuts group. * Intra-group differences (paired *t* test, $P \leq 0.05$).

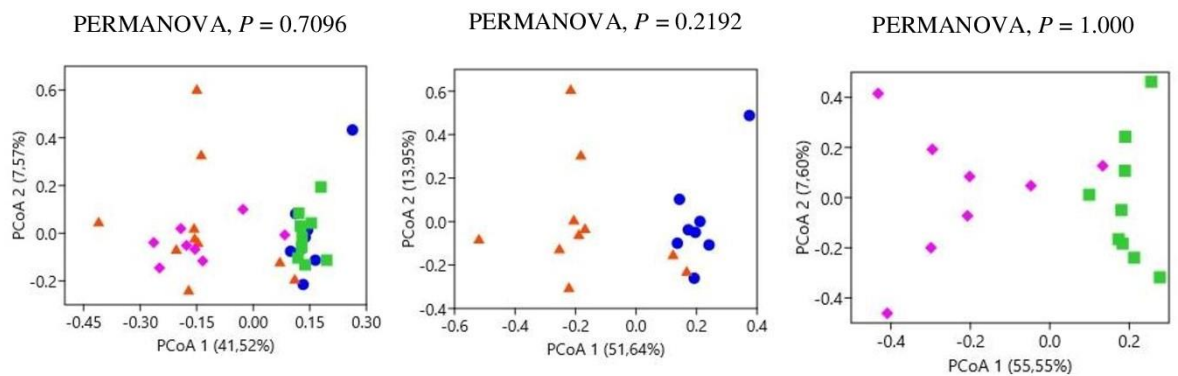
A) OTU



B) PHYLUM



C) GENDER



◆ Control group baseline ■ Control group endpoint ▲ BN group baseline ● BN group endpoint

Supplementary figure 2. Changes in bacterial β -diversity after 8 weeks, according to treatment group.

A) Principal Component Analysis (PCoA) based on the Bray-Curtis similarity index at the OTU level; B) at the phylum level; C) and at the gender level. BN: Brazilian nuts group.

REFERENCES

- AHA/ACC, American College of Cardiology/American Heart Association. AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults. **Circulation**, v. 129, n. 25 suppl 2, p. S102–S138, 2014.
- ALCÂNTARA, D. B. et al. Selenium in Brazil nuts: An overview of agronomical aspects, recent trends in analytical chemistry, and health outcomes. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131207, 2022.
- AOUN, A.; DARWISH, F.; HAMOD, N. The Influence of the Gut Microbiome on Obesity in Adults and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Weight Loss. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 25, n. 2, p. 113–123, 2020.
- BAER, D.; NOVOTNY, J. Metabolizable Energy from Cashew Nuts is Less than that Predicted by Atwater Factors. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 33, 2018.
- BAMBERGER, C. et al. A Walnut-Enriched Diet Affects Gut Microbiome in Healthy Caucasian Subjects: A Randomized, Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 244, 2018.
- BARTOSZEK, Adrian et al. Walnut Oil Alleviates Intestinal Inflammation and Restores Intestinal Barrier Function in Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1302, 2020.
- BARUFALDI, L. A. et al. Programa para registro de recordatório alimentar de 24 horas: aplicação no Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 2, p. 464–468, 2016.
- BEGUIN, P. et al. Effect of polyunsaturated fatty acids on tight junctions in a model of the human intestinal epithelium under normal and inflammatory conditions. **Food & Function**, v. 4, n. 6, p. 923, 2013.
- BERNARDI, S. et al. Polyphenols and Intestinal Permeability: Rationale and Future Perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1816–1829, 2020.
- DEL BO', C. et al. A polyphenol-rich dietary pattern improves intestinal permeability, evaluated as serum zonulin levels, in older subjects: The MaPLE randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 3006–3018, 2021.
- BOULANGÉ, C. L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 42, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. 2^a ed. Brasília, 2014.
- CALDAS, A. P. S.; ROCHA, D. M. U. P.; DIONÍSIO, A. P.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Brazil and cashew nuts intake improve body composition and endothelial health in women at cardiometabolic risk (Brazilian Nuts Study): a randomised controlled trial. **British Journal of Nutrition**, p. 1–11, 2022.
- CALDERÓN-PÉREZ, L. et al. Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6436, 2020.
- CÂNDIDO, F. G.; VALENTE, F. X.; MOREIRA, A. P. B.; ROCHA, D. M. U. P.; ALFENAS, R. C. G. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic

inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 125–143, 2018.

CAO, Y. et al. Reference Ranges of Selenium in Plasma and Whole Blood for Child-Bearing-Aged Women in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 8, p. 4908, 2022.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CARDOSO, B. R. et al. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, n. March, p. 9–18, 2017.

CASSADY, B. A. et al. Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 3, p. 794–800, 2009.

CHAO, A. M.; QUIGLEY, K. M.; WADDEN, T. A. Dietary interventions for obesity: clinical and mechanistic findings. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, 2021.

CHEN, Zhangling et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 7, p. e2118811, 2021.

CHOO, J. M. et al. Almond consumption affects fecal microbiota composition, stool pH, and stool moisture in overweight and obese adults with elevated fasting blood glucose: A randomized controlled trial. **Nutrition Research**, v. 85, p. 47–59, 2021.

CREEDON, A. C. et al. Nuts and their Effect on Gut Microbiota, Gut Function and Symptoms in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2347, 2020.

DAHL, W. J.; RIVERO MENDOZA, D.; LAMBERT, J. M. Diet, nutrients and the microbiome. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 171, p. 237–263, 2020.

DAMMS-MACHADO, A. et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 127–135, 2017.

DAVIS, C. D. The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. **Nutrition Today**, v. 51, n. 4, p. 167–174, 2016.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

FILIPPO, C. DE et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.

FITZGERALD, E. et al. The effect of nut consumption (tree nuts and peanuts) on the gut microbiota of humans: a systematic review. **British Journal of Nutrition**, v. 125, n. 5, p. 508–520, 2021.

FOMENKY, B. E. et al. Direct-fed microbial supplementation influences the bacteria community composition of the gastrointestinal tract of pre- and post-weaned calves. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14147, 2018.

GÉRARD, P. Gut microbiota and obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 147–162, 2016.

GODOS, J. et al. Effect of Brazil Nuts on Selenium Status, Blood Lipids, and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 403, 2022.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 59, 2011.

HOLSCHER, H. et al. Almond Consumption and Processing Affects the Composition of the Gastrointestinal Microbiota of Healthy Adult Men and Women: A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 126, 2018.

HOLSCHER, H. D. et al. Walnut Consumption Alters the Gastrointestinal Microbiota, Microbially Derived Secondary Bile Acids, and Health Markers in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. 6, p. 861–867, 2018.

HOU, L. et al. The effect of *Bertholletia excelsa* on body weight, cholesterol, and c-reactive protein: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 57, p. 102636, 2021.

HUL, M. VAN et al. From correlation to causality: the case of Subdoligranulum. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1849998, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. 2010.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. vol. 39. 2011.

INC, INTERNATIONAL NUT & DRIED FRUIT COUNCIL FOUNDATION. 2016. Disponível em: <<https://www.nutfruit.org/consumers/news/detail/new-inc-research-grant>>. Acesso em: 20 març. 2022.

INCZEFI, O. et al. The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

IOM, INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary References Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. Panel on Macronutrients, Panel on the Definition of Dietary Fiber, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on In. [S.l.]: [s.n.], 2005.

KIM, M.-J. et al. Gut Microbiome Profiles in Colonizations with the Enteric Protozoa *Blastocystis* in Korean Populations. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 34, 2021.

KONG, C. et al. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. **Nutrition**, v. 60, p. 175–184, 2019.

LAMUEL-RAVENTOS, R. M.; ONGE, M.-P. St. Prebiotic nut compounds and human microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 3154–3163, 2017.

- LECLERCQ, S. et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 42, 2014.
- LEITE, N. N. et al. Visceral adiposity index is positively associated with blood pressure: A systematic review. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 15, n. 6, p. 546–556, 2021.
- LIANG, J. Q. et al. A novel faecal *Lachnospirillum* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer. **Gut**, v. 69, n. 7, p. 1248–1257, 2020.
- LINSALATA, M. et al. Comparison of an enzymatic assay with liquid chromatography-pulsed amperometric detection for the determination of lactulose and mannitol in urine of healthy subjects and patients with active celiac disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 4, p. e61-64, 2014.
- LINSALATA, M. et al. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. **BMC Gastroenterology**, v. 18, n. 1, p. 167, 2018.
- LIU, F. et al. Selenium and vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat-stressed pigs. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 7, p. 801–810, 2016.
- LIU, H. et al. Intestinal flora differences between patients with ulcerative colitis of different ethnic groups in China. **Medicine**, v. 100, n. 32, p. e26932, 2021.
- LIU, X. et al. Changes in nut consumption influence long-term weight change in US men and women. **BMJ Nutrition, Prevention & Health**, v. 2, n. 2, p. 90–99. 2019.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; BES-RASTROLLO, M. Nut consumption, weight gain and obesity: Epidemiological evidence. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. S40–S45, 2011.
- MASEKO, T. et al. Selenium-Enriched *Agaricus bisporus* Mushroom Protects against Increase in Gut Permeability ex vivo and Up-Regulates Glutathione Peroxidase 1 and 2 in Hyperthermally-Induced Oxidative Stress in Rats. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2478–2492, 2014.
- NAGPAL, R. et al. Obesity-Linked Gut Microbiome Dysbiosis Associated with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, p. 1–9, 2018.
- NETTO CÂNDIDO, T. L. et al. Effect of the ingestion of vegetable oils associated with energy-restricted normofat diet on intestinal microbiota and permeability in overweight women. **Food Research International**, v. 139, p. 109951, 2021.
- OJO, O. et al. The Effects of Almonds on Gut Microbiota, Glycometabolism, and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3377, 2021.
- OLIVEIRA, T. M. S.; BRESSAN, J.; PIMENTA, A. M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.; HÉBERT, J. R.; HERMSDORFF, H. H. M. Dietary inflammatory index and prevalence of overweight and obesity in Brazilian graduates from the Cohort of Universities of Minas Gerais (CUME project). **Nutrition**, v. 71, p. 110635, 2020.
- OTT, B. et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. **Scientific Reports**, v. 7, n. August, p. 1–10, 2017.

- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2012.
- RAJARAM, S.; CONNELL, K. M.; SABATÉ, J. Effect of almond-enriched high-monounsaturated fat diet on selected markers of inflammation: a randomised, controlled, crossover study. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 6, p. 907–912, 2010.
- RAO, J. et al. Fecal microbiota transplantation ameliorates gut microbiota imbalance and intestinal barrier damage in rats with stress-induced depressive-like behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 11, p. 3598–3611, 2021.
- REICHARDT, N. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **The ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014.
- RICO, R.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. **Food Science and Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 329–338, 2015.
- ROCHA, D. M. U. P.; CALDAS, A. P. S.; SIMÕES E SILVA, A. C.; BRESSAN, J.; HERMESDORFF, H. H. M. Nut-enriched energy restricted diet has potential to decrease hunger in women at cardiometabolic risk: a randomized controlled trial (Brazilian Nuts Study). **Nutrition Research**, v. 109, p. 35–46, 2023.
- ROGERS, M. et al. Weight-loss intervention adherence and factors promoting adherence: a meta-analysis. **Patient Preference and Adherence**, v. Volume 10, p. 1547–1559, 2016.
- ROHR, M. W. et al. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. **Advances in Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 71–91, 2019.
- SABATÉ, J. Nut consumption and body weight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 647S-650S, 2003.
- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. R60, 2011.
- SIEGFRIED, R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. E. HPLC-Methode zur Bestimmung organischer Säuren in Silagen (A HPLC method to determine organic acids in silages). **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, p. 298–304, 1984.
- SILVA, A. DA.; FELÍCIO, M. B.; CALDAS, A. P. S.; HERMSDORFF, H. H. M.; BERSCHFERREIRA, A. C.; TORREGLOSA, C. R.; SHIVAPPA, N.; HÉBERT, J. R.; WEBER, B.; BRESSAN, J. Pro-inflammatory diet is associated with a high number of cardiovascular events and ultra-processed foods consumption in patients in secondary care. **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 11, p. 3331–3340, 2021.
- SILVA, A. DA.; SILVEIRA, B. K. S.; FREITAS, B. V. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Effects of regular Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) consumption on health: An updated systematic review of clinical trials. **Foods**, v. In press, 2022.
- SILVEIRA, B. K. S.; OLIVEIRA, T. M. S.; ANDRADE, P. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; ROSA, C. O. B.; FRANCESCHINI, S. C. C. Dietary Pattern and Macronutrients Profile on

the Variation of Inflammatory Biomarkers: Scientific Update. **Cardiology Research and Practice**, v. 2018, p. 1–18, 2018.

SILVEIRA, B. K. S.; SILVA, A. DA.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Effect of chronic consumption of nuts on oxidative stress: a systematic review of clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–12, 2020.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 2007.

STOCKLER-PINTO, M. M. B. et al. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) Improves Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in Hemodialysis Patients. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, n. 1, p. 105–112, 2014.

TANG, W. et al. Modulation of the Gut Microbiota in Rats by Hupan Qingzhi Tablets during the Treatment of High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–14, 2018.

TAYLOR, C. L. Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion - Nuts and Coronary Heart Disease (Docket No 02P-0505). **U.S. Food & Drug Administration**, 2003. Disponível em: <<http://wayback.archive-it.org/7993/20171114183724/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/Labeling/Nutrition/ucm072926.htm>>. Acesso em: 06 junh. 2022.

TEIXEIRA, T. F. S.; SOUZA, N. C.S.; CHIARELLO, P. G.; FRANCESCHINI, S. C.C.; BRESSAN, J.; FERREIRA, C. L.L.F.; PELUZIO, M. C. G. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 735–740, 2012.

TILVES, C. et al. A behavioral weight-loss intervention, but not metformin, decreases a marker of gut barrier permeability: results from the SPIRIT randomized trial. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 3, p. 655–660, 2022.

TONG, L. et al. Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 2016.

TWARDOWSKA, A. et al. Preventing Bacterial Translocation in Patients with Leaky Gut Syndrome: Nutrition and Pharmacological Treatment Options. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3204, 2022.

USUDA, H.; OKAMOTO, T.; WADA, K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 14, 2021.

VACCA, M. et al. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 573, 2020.

WANG, C.-S.-E. et al. VSL#3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 37, p. 4254–4262, 2018.

WANG, Yajie et al. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104248, 2020.

XU, Q. et al. Propionate Ameliorates Alcohol-Induced Liver Injury in Mice via the Gut–Liver Axis: Focus on the Improvement of Intestinal Permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 6084–6096, 2022.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017

ZHAO, L. et al. A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4644–4656, 2017.

Artigo Original 2 – Estudo 2

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) intake in energy-restricted intervention decrease pro-inflammatory markers and intestinal permeability of women with overweight/obesity: a controlled trial (Brazilian Nuts Study)

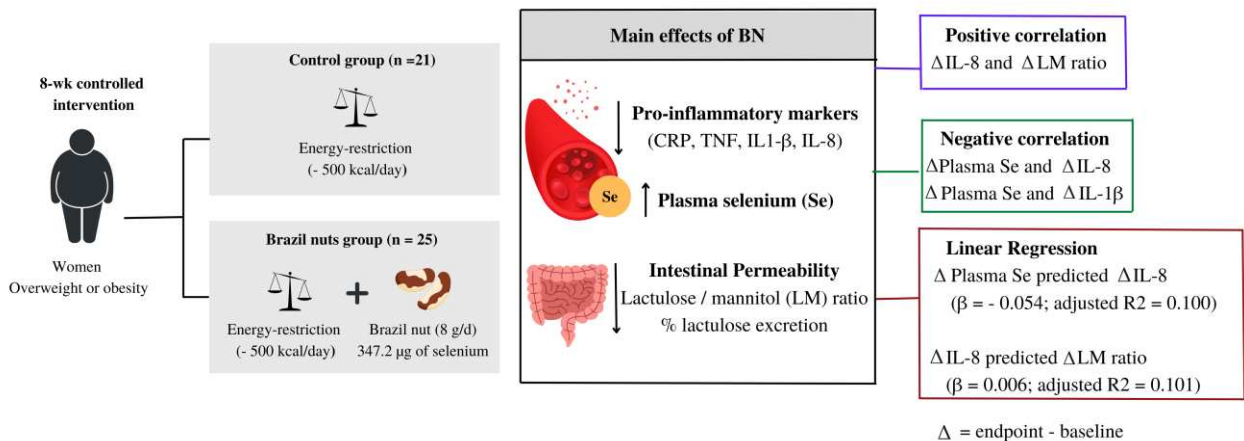
Brenda Kelly Souza Silveira; Alessandra da Silva; Karina Waskow, Hércia Stampini Duarte Martino, Josefina Bressan, Helen Hermana Miranda Hermsdorff

ABSTRACT

Background/objective. Obesity is related to low-grade inflammation and increased intestinal permeability (IP). In this context, Brazil nuts (BN) (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) seems the most promising nut type in control inflammation by enhancing antioxidant defenses. Therefore, our objective was to evaluate the effect of daily BN intake on inflammatory biomarkers and IP in an energy-restricted condition. **Methods.** In this eight-week non randomized controlled trial, 56 women with overweight or obesity were allocated into two energy-restricted groups (-500 kcal/day): control group (CO) (nuts-free diet) and Brazil nuts (BN) group (8g BN/day; 347.2 µg of selenium). Inflammatory cytokines were analyzed in plasma. Permeability was analyzed by the lactulose/mannitol test (LM ratio). **Results.** In total, 46 women completed the intervention. Both groups reached similar energy restriction and weight loss. BN group achieved lower values of CRP, TNF, IL1-β, IL-8, lactulose excretion (%) and LM ratio, compared to CO. Changes (Δ) in plasma selenium (Se) were negatively correlated to changes in IL1-β and IL-8 concentrations. Changes in IL-8 were positively correlated to changes in LM ratio. Complementary, variations in plasma Se ($\beta = -0.054$; adjusted $R^2 = 0.100$; CI 95% = -0.100; -0.007; $P = 0.025$) were predictive of changes in IL-8 concentration, and that variations in IL-8 ($\beta = 0.006$; adjusted $R^2 = 0.101$; CI 95% = 0.001; 0.011; $P = 0.024$) were predictive of changes in the LM ratio. **Conclusion.** Regular BN intake showed to be a promising complementary strategy to control low-grade inflammation and improve IP in women with obesity ongoing to energy restriction. However, BN effects seem Se dose-dependent. Brazilian Registry of Clinical Trials – ReBEC (ID: RBR-3ntxrm).

KEYWORDS: Brazil nut, selenium, meta-inflammation, intestinal health, gut permeability

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Obesity is a condition characterized by metabolic imbalances that result in increased body fat, oxidative stress, and low-grade inflammation or meta-inflammation. This last condition of increased production of pro-inflammatory cytokines without clinical signs of inflammation (KHANNA et al., 2022; WEN et al., 2022) is involved in the genesis of several chronic diseases that accompany obesity, such as hypertension, diabetes, dyslipidemia, cardiovascular diseases, among others (BAKHTIYARI et al., 2022; NEDIANI; DINU, 2022).

The relationship between obesity, inflammation and intestinal disruptions is also described, including increased intestinal permeability (IP) (FARRÉ et al., 2020; GASMI et al., 2021). If loosening of tight junctions accompanies increased body fat and feeds back inflammation, lower intestinal selectivity allows several antigens reaching the lamina propria, and activating the immune system and, consequently, the inflammation. Therefore, obesity promotes increased IP, and increased IP promotes obesity in a vicious cycle (FARRÉ et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2012).

In this context, energy restriction with weight loss and adoption of a healthy dietary pattern are the conventional treatment for managing obesity, low-grade inflammation, and associated complications (ABESO, 2022; MANNA; JAIN, 2015; SILVEIRA et al., 2018). Some foods in particular, such as nuts, have potential anti-inflammatory and anti-obesogenic effects, including hunger control, due to their composition, consisted mainly by unsaturated fatty acids, vitamins, minerals and polyphenols (GERVASI et al., 2021; ROCHA et al., 2023; SILVA et al., 2022). However, the effects are controversial and differ between studies according to the type of nut ingested, quantity and frequency of consumption (MAZIDI et al., 2016, 2018; NEALE et al., 2017).

Considering all the varieties of nuts available, BN have shown to be the most promising in increasing antioxidant defenses and reducing oxidative stress (GODOS et al., 2022; SILVEIRA et al., 2020). However, clinical trials about the effect of BN on inflammation are inconclusive (CARDOZO; STOCKLER-PINTO; MAFRA, 2016; GHANAVATI et al., 2021; SILVA et al., 2019) and, to our knowledge, no clinical trials have investigated the effect of this nut on IP. Therefore, we investigated the effect of daily BN consumption on inflammatory markers and IP of women with overweight/obesity in energy-restricted condition.

METHODS

Study design

The present study is a non-randomized, controlled parallel eight-week intervention (**Supplementary figure 1**). Participants recruitment was by convenience sampling. We highlight that baseline data did not differ between groups. Study protocol was registered in the Brazilian Registers of Clinical Trials – REBEC (protocol: RBR-3ntxrm) and approved by local ethical committee of the Universidade Federal de Viçosa (CAAE: 92004818.0.0000.5153; UP protocol number: 2.832.601/2018), being in accordance with Helsinki Declaration. All participants were informed about research objectives and study procedures, and provided written informed consent.

Study Participants

The recruitment and all intervention procedures occurred at the Department of Nutrition and Health of the Universidade Federal de Viçosa-MG, Brazil, between June 2019 and September 2021. We included only adult women (age 20-55 years), in overweight condition (body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m² and < 30 kg/m²), who presented increased body fat ($\geq 32\%$) and increased waist circumference (WC) (≥ 80 cm), and at least one other cardiometabolic risk factor, which could be: high blood pressure $\geq 130/90$ mmHg, triglycerides ≥ 150 mg/dL or fasting blood glucose ≥ 100 mg/dL and ≤ 130 mg/dL. Women with obesity (BMI ≥ 30 kg/m²) with same age also were included regardless of the presence of other associated risk factors.

We did not include pregnant, lactate, or menopausal women; athletes; vegans; women with history of the following diseases: positive HIV; hepatic, digestive or kidney diseases;

cardiovascular complications; thyroid disruptions; cancer; eating disorders; history of drug and/or alcohol abuse; all inflammatory diseases, aversion or allergy to nuts; infectious episode in the last month (including COVID-19). Other non-inclusion criteria were use of anti-inflammatory drugs, corticosteroids, antibiotics; body weight instability (> 6% of variation in the last 3 months); regular consumption of any quantity of BN; alcohol consumption higher than 21 units (168g) per week; dental problems that interfere with chewing; use of vitamin, mineral, and omega-3 supplements.

The initial recruitment and screening were carried out through social media, posters and an online questionnaire. Women who met essential eligibility criteria were invited to face to face visit at Laboratory of Energy Metabolism and Body Composition (LAMECC-UFV). In this second stage, inclusion criteria were thoroughly verified, including the anthropometric measurements and clinical history.

Energy-restricted intervention

Before starting the intervention, the participants were monitored in a run-in period (7 days) in order to exclude those with low probability of adherence to the protocol. At the beginning of the intervention, all participants were instructed to follow an energy-restricted diet. Five individualized menu options were provided to each participant. The menu was divided into five meals: breakfast, morning snack, lunch, afternoon snack and dinner. Energy restriction was calculated by subtracting 500 kcal from Estimated Energy Requirement (EER) (IOM, 2005), and the distribution of macronutrients was based on the recommendations of guidelines for obesity management (50% carbohydrates, 30% lipids, 20% proteins) (AHA/ACC *et al.*, 2014). Biweekly, a nutritionist provided individualized counseling and monitored the adherence to meal planning.

Women were allocated in control or BN group. Control group followed an energy-restricted diet free of any type of nuts. BN group consumed two units of BN (8 g/day; 347.2 µg of Se) in the morning snack (9 to 10 am). The portion of BN was determined according on pronounced benefits of BN with doses above 290 µg/Se/day (COMINETTI *et al.*, 2011, 2012). The organic BN from Amazonas (Brazil) was donated by ECONUT® (<https://econut.com.br/>). The nuts were vacuum packed (Selovac Sealer model 200 B) in laminated packaging and kept at -20° until distribution to the participants.

In order to balance lipid and energy intake between BN and control group, the research team provided salad dressing to both groups. BN group consumed 1 tablespoons/day

of sauce made from canola oil and lemon (2:1), and control group consumed 2 tablespoons/day of sauce made from soybean oil and lemon (2:1).

Food intake assessment

At baseline, participants filled three-day food records on non-consecutive days (two weekdays and one weekend day). 24-hour recalls were applied by a trained dietitian in the fourth week and at the end of the intervention, to monitor consumption during the intervention. The reported intake was entered in the software REC24h-ERICA, adapted for the Brazilian population (BARUFALDI et al., 2016). To estimate the intake of energy, macro and micronutrients, we related the food consumption data to a nutritional composition table (IBGE, 2011) into the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc. version 26.0).

Data Collection

Anthropometry and body composition

Anthropometric assessment was performed after overnight fasting, on the first and last day of the intervention. Body weight was determined using bioelectrical impedance (Inbody 230, Biospace Corp.) with a capacity of 150 kg and an accuracy of 100 g. Body composition was assessed by Dual-energy X-ray Absorptiometry (DEXA) (Lunar Prodigy Advance DXA System, GE Lunar). Height was measured using a vertical millimeter stadiometer (Seca 206 model, Hamburg, Germany) with a length of 2.2 m (accuracy 0.5 cm). An inelastic tape (precision 0.1 cm) was used to measure the hip circumference in the maximum posterior extension of the gluteus and WC at the height of the umbilicus. Two measurements were performed and the mean value recorded. BMI was calculated by dividing weight (kg) by the square of height (m).

Blood samples

Blood samples were collected at the beginning and end of the intervention period. The participants attended the LAMECC-UFV fasted overnight (12h), blood samples were collected by venipuncture, under vacuum, using tubes with EDTA and tubes for analysis of trace elements. Then, the blood was centrifuged (1500 g, 15 min, 4°C) for plasma separation, and stored at -80°C until the analysis.

Plasma Se concentrations (μL) were determined in a commercial laboratory by inductively coupled plasma mass spectrometry, according to standard protocols.

Intestinal Permeability (IP)

IP was determined based on lactulose/mannitol (LM) test. In the night before the LM test, the participants collected all urine excreted after the last meal of the day, until the beginning of the test. This pretest urine was used only as control. In the LM test day, 10-12h overnight fasting, the participants drank a solution containing lactulose (10 g), mannitol (5 g) and sucrose (20 g) in a volume of 200 ml. Then, all urine excreted was collected during 4 hours and 30 minutes. Food intake was not allowed during the test, and water intake was controlled (150 ml after 2h and 3h of testing). The total volume of urine excreted the night before the test (control urine) and during the test (test urine) was recorded. After thoroughly mixing, two urine samples (control and test) of 30 ml each were separated. Each sample was added with 7mg of thimerosal and stored at -20°C until analysis.

For the analyzes, the urine was defrosted and homogenized by vortexing. Then, 2 ml of urine was filtered through a microporous polyethersulfonic membrane (PES) ($0.22\ \mu\text{m} \times 13\ \text{mm}$). The excretion of lactulose and mannitol was quantified by HPLC using Dionex Ultimate 3000 Dual equipment coupled to a refractive index (RI) detector (Shodex RI-101) kept at $40\ ^{\circ}\text{C}$. The analytes were isocratically separated on an Aminex HPX-87C column ($250 \times 4.0\ \text{mm}$) maintained at 70°C . Ultrapure water was used as the mobile phase with a flow rate of $0.3\ \text{mL}/\text{min}$. The calibration curve was established using lactulose and mannitol as external standards. The total volume of urine collected was multiplied by the concentration of each sugar in order to obtain the total amount excreted in the urine. Results were expressed as percentage of excretion of mannitol (% M) and lactulose (% L) and as the lactulose/mannitol ratio (LM ratio). The LM ratio cutoff point > 0.035 was adopted to classify increased IP (LINSALATA et al., 2014, 2018).

Inflammatory markers

Plasma C-reactive protein (CRP) was determined by the ultrasensitive method in a commercial laboratory by immunoturbidimetry, according to standard protocols. CRP values greater than $45\ \text{mg}/\text{dL}$ were excluded from the analysis. Plasma cytokine concentrations were determined by flow cytometry using the BD FACSVerse™ Flow Cytometer equipment (BD Biosciences, USA). The plasma concentration of cytokines (interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, IL-

8, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)) was measured using Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences, EUA) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using FCAP Array Software v3.0 (BD Biosciences, USA).

Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed in SPSS software, version 24.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). A significance level of 5% was adopted in all analyzes. The Shapiro-Wilk test was chosen to test the normality of all variables. Data were expressed as mean \pm standard error (SE), median (p25-p75), bar graph, box plot or dispersion graph.

Delta (Δ) values were calculated as endpoint – baseline measure. Differences in anthropometric and biochemical variables, body composition, and inflammatory cytokines were investigated using paired *t*-tests for intragroup differences, and independent-samples *t* test for differences between groups. Mann-Whitney-*U* and Wilcoxon tests were chosen to identify differences between IP variables between groups and intra-groups, respectively.

Pearson and Spearman correlations were used to investigate the association between changes (Δ) in IP variables, inflammatory cytokines and plasma Se concentration. Finally, simple linear regression analysis was performed to verify whether the increase in plasma Se (explanatory variable) is predictive of reduction in inflammatory cytokines (dependent variables), and also whether reductions in cytokine concentration (explanatory variables) are predictive of reductions in the LM ratio (dependent variable). The residuals were evaluated according to assumptions of normality, homoscedasticity, linearity and independence.

Statistic power was calculated using the GPower v. 3.1.9.4 software and selecting the option *a posteriori*: for non-parametric testing. We adopted intestinal permeability as primary outcome measured by lactulose excretion (%). We also considered bilateral significance and $\alpha = 5\%$ and used the mean \pm SD of both intervention groups to determine the *d* effect. Finally, our sample have 97% of power to detect differences in intestinal permeability of the two independent groups.

RESULTS

In total, 56 women were allocated to CO or BN treatment groups and 46 (82.1%) completed the intervention (**Supplementary Figure 2**). The mean age was 34.0 years (SD \pm 7.4 years), 17.4 % had overweight, and 82.6% had obesity (class I: 60.9%, class II: 10.9%,

and class III: 10.8%). There was no difference between groups for anthropometric variables, body composition, plasma Se and biochemical markers at baseline (**Supplementary table 1**). There was also no difference between groups for biochemical markers, including fasting glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol (data not shown).

Before the intervention, CO group presented higher consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFA) than BN. Compared to baseline, CO significantly reduced the intake of saturated fatty acid (SFA), while BN increased the intake of PUFA and fiber. During 8-wk intervention, only Se intake differs between groups (**Supplementary figure 3**).

No statistical differences were identified between groups for energy restriction (CO Δ - 253.7 \pm 169.4 kcal/day; BN Δ - 265.8 \pm 141.8 kcal/day), weight loss (CO Δ - 2.5 \pm 0.5 kg; BN Δ - 3.5 \pm 0.5 kg) and WC reduction (CO Δ - 3.5 \pm 0.7; BN Δ - 5.2 \pm 0.6). Plasma Se concentration was used as *compliance* for BN intake. In this sense, BN group showed a significant increase ($P < 0.001$) in plasma Se (Δ 159.4 \pm 17.1 μ g/L) compared to CO group (Δ - 2.2 \pm 8.6 μ g/L), corroborating adherence to the intake of BN.

After 8-wk intervention, BN group presented lower values of CRP, TNF, IL1- β , and IL-8 compared to CO group (**Table 1**). In fact, the BN presented improvements in systemic inflammation. The prevalence of women with normal CRP (< 3 mg/L) in BN group increased (24.0% to 36.0%) after 8-wk intervention, while this prevalence reduced in CO group (23.8% to 4.7%).

BN group also presented lower values for lactulose excretion (%) and LM ratio, compared to CO group. However, delta (Δ) values were similar between groups for all IP variables (lactulose (%), mannitol (%), and LM ratio) (**Figure 1**).

Table 1. Outcome fasting inflammatory biomarkers at baseline and endpoint of 8-wk intervention, according to treatment group.

	Control group (n=21)			BN group (n = 25)		
	Baseline	Endpoint	<i>P</i>	Baseline	Endpoint	<i>P</i>
CRP (mg/L)	8.0 ± 1.3	9.4 ± 1.2 *	0.466	7.1 ± 1.0	5.6 ± 0.8 *	0.133
TNF (pg/mL)	3.5 ± 1.2	3.2 ± 1.2 *	0.831	3.7 ± 1.0	0.8 ± 0.3 *	0.024
IL-10(pg/mL)	1.6 ± .3	1.1 ± 0.2	0.152	2.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.116
IL-6 (pg/mL)	9.5 ± 1.5	6.5 ± 0.8	0.202	11.0 ± 1.3	4.8 ± 5.8	0.013
IL-1β (pg/mL)	3.9 ± 0.8	3.3 ± 0.7 *	0.486	2.2 ± 0.6	0.1 ± 0.1 *	0.005
IL-8 (pg/mL)	15.1 ± 1.7	16.8 ± 2.6 *	0.636	18.2 ± 1.6	10.8 ± 2.1 *	0.001

Values are mean ± SEM (standard error).

BN: Brazil nuts, CRP: C-reactive protein; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin.

P = Differences intra-group (paired *t* test, *P* < 0.05). * Differences between groups (independent-samples *t* test, *P* < 0.05).

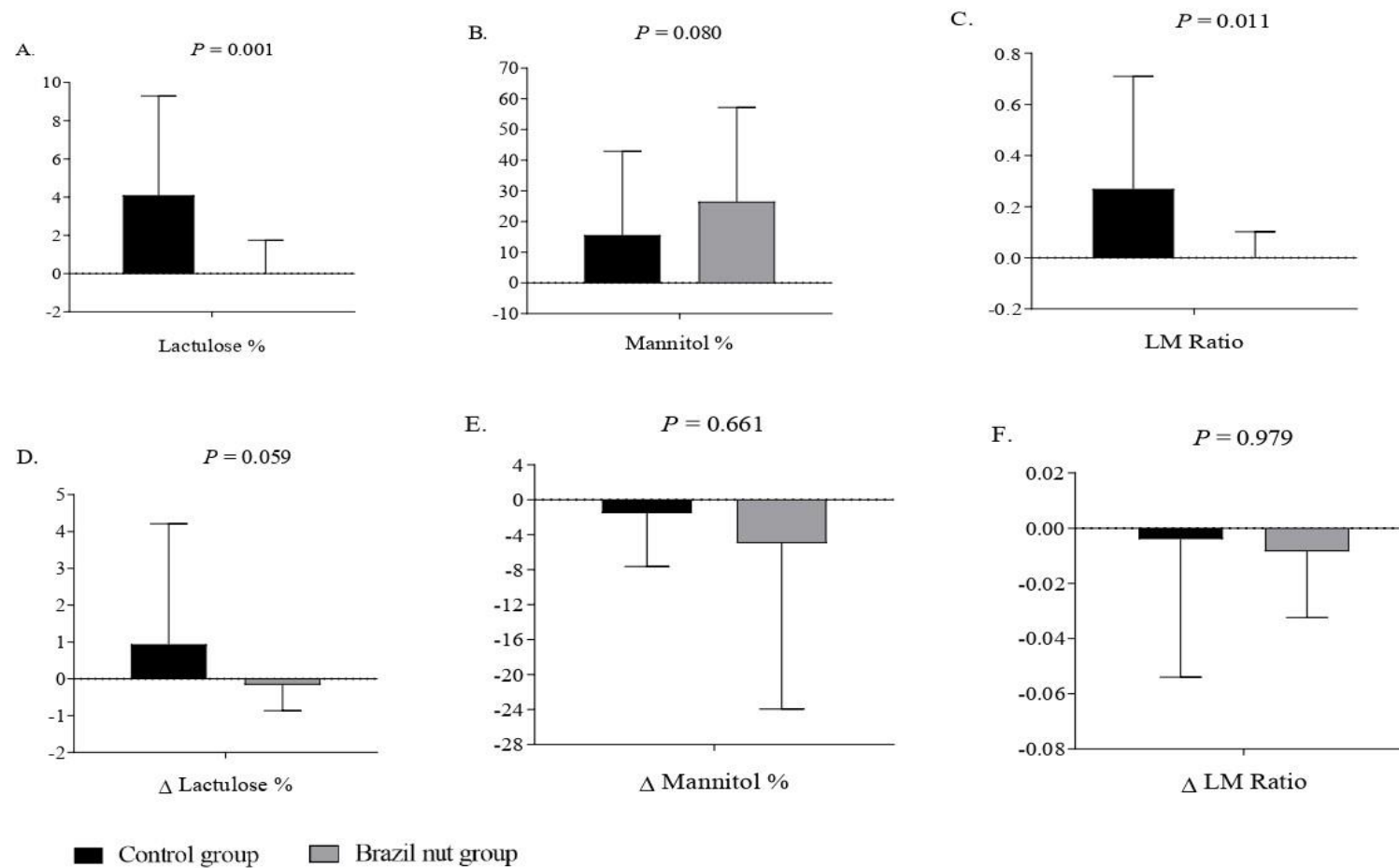


Figure 1. Intestinal permeability outcomes, according to treatment group (control or Brazil nuts).

A) B) C) are absolute values, after 8-weeks intervention, and D) E) F) are delta (Δ) values, which means endpoint – baseline. LM ratio: lactulose / mannitol ratio. P = Mann-Whitney-U test. All values are median, p25-p75.

We also classified the participants according to treatment group (CO or BN) and weight loss achieved after 8-weeks intervention ($<$ or \geq 4kg). The participants who did not achieved the proposed weight loss (at least 4 kg), but consumed BN had greater reduction in TNF, IL-1 β , and IL-8, compared to CO group. In BN group, participants who lost more weight presented greater reductions in CRP (**Table 2**).

As expected, changes (Δ) in plasma Se were negatively correlated to changes in IL-1 β and IL-8 concentrations. In addition, changes in IL-8 were positively correlated to changes in LM ratio (**Figure 2**). Complementary, linear regression analysis indicated that variations in plasma Se ($\beta = -0.054$; adjusted $R^2 = 0.100$; CI 95% = -0.100; -0.007; $P = 0.025$) were predictive of changes in IL-8 concentration, and that variations in IL-8 ($\beta = 0.006$; adjusted $R^2 = 0.101$; CI 95% = 0.001; 0.011; $P = 0.024$) were predictive of changes in the LM ratio.

Table 2. Intestinal permeability and inflammatory variation according to the intervention group and weight loss (< or ≥4 kg) after 8 weeks of intervention.

	Control group (n = 21)			BN group (n =25)		
	Weight loss		<i>P</i>	Weight loss		<i>P</i>
	< 4 kg (n = 14)	≥4kg (n = 7)		< 4 kg (n=14)	≥ 4kg (n=11)	
Δ Lactulose (%)	1.36 ± 0.68	1.30 ± 1.00	0.962	- 1.05 ± 1.12	- 0.00 ± 0.28	0.410
Δ Mannitol (%)	1.60 ± 3.33	- 2.05 ± 5.08	0.541	- 7.01 ± 5.31	-3.55 ± 9.7	0.561
Δ LM Ratio	0.04 ± 0.03	- 0.00 ± 0.10	0.933	0.11 ± 0.09	0.02 ± 0.03	0.434
Δ CRP (pg/mL)	1.01 ± 0.89	0.37 ± 3.07	0.791	- 0.03 ± 0.84	- 2.24 ± 0.76	0.044
Δ TNF (pg/mL)	0.89 ± 1.20 *	- 2.65 ± 1.69	0.111	- 4.23 ± 1.63 *	- 1.26 ± 1.66	0.220
Δ IL-10 (pg/mL)	- 0.44 ± 0.35	8.79 ± 9.83	0.190	- 1.09 ± 0.51	- 0.15 ± 0.23	0.258
Δ IL-6 (pg/mL)	- 3.33 ± 2.17	- 0.33 ± 3.1	0.439	- 4.90 ± 1.34	- 3.08 ± 2.94	0.556
Δ IL1-β (pg/mL)	- 0.53 ± 0.59 *	- 3.08 ± 2.94	0.575	- 2.57 ± 0.78 *	-1.65 ± 1.27	0.524
Δ IL-8 (pg/mL)	1.69 ± 3.99 *	19.63 ± 7.42	0.998	- 10.14 ± 2.41 *	- 5.68 ± 3.62	0.300

Values are mean ± SEM. Delta (Δ) values means endpoint – baseline assessment.

P = refer to the comparison within-group between weight loss categories (independent-samples *t* test).

* refers to significant differences between control and BN groups in those classified with weight loss values < 4kg obtained through independent-samples *t* test.

BN: Brazil nuts. BMI: body mass index WC: waist circumference BF: body fat LM: lean mass CRP: C-reactive protein TNF: tumor necrosis factor IL: interleukin

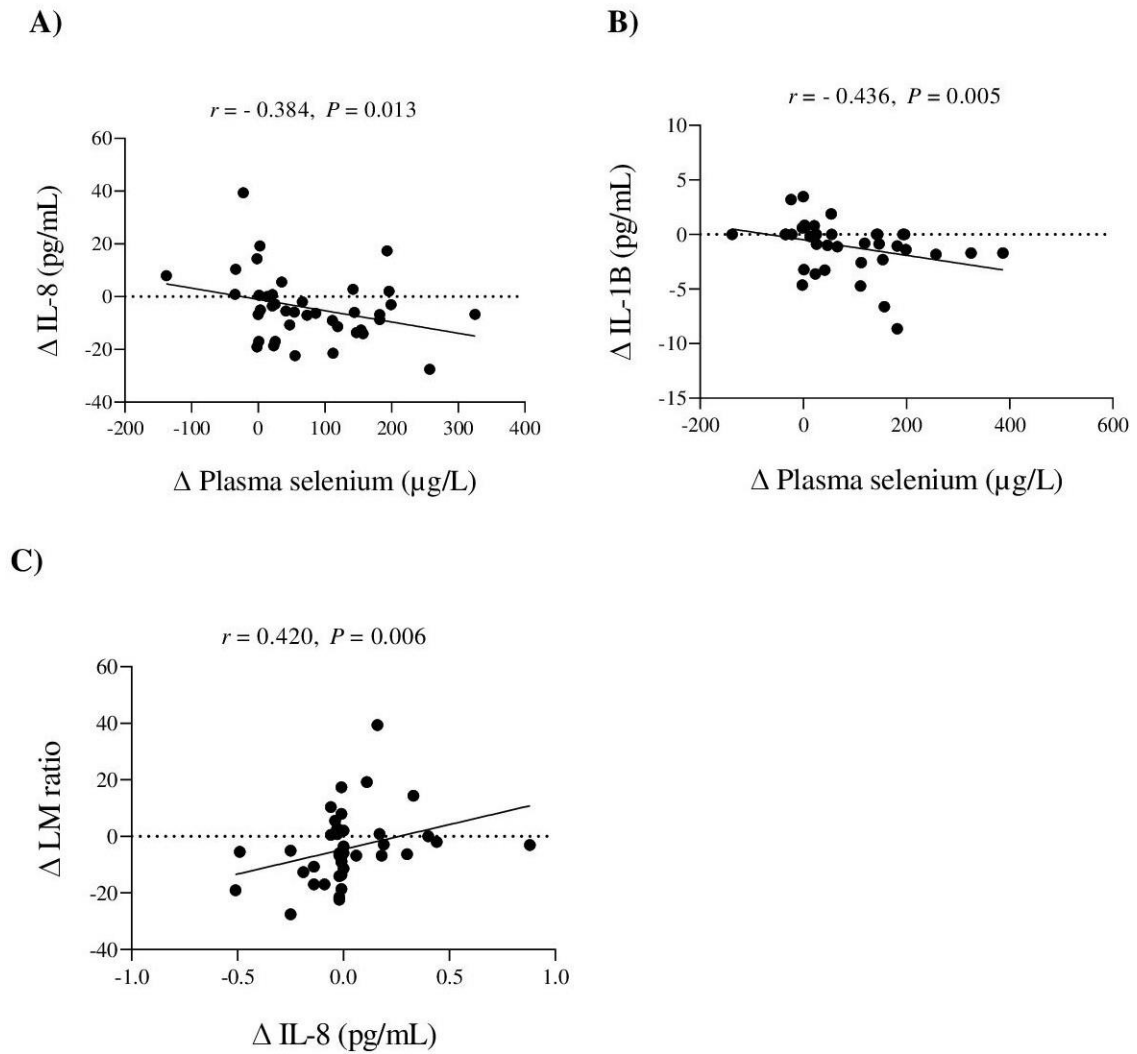


Figure 2. Pearson or Spearman correlations between changes in plasma selenium, pro inflammatory cytokines and lactulose / mannitol ratio (LM ratio) ($n = 46$). IL interleukin. Delta (Δ) values means endpoint– baseline assessment.

DISCUSSION

In this study, BN consumption resulted in lower concentration of inflammatory markers (CRP, TNF, IL-1 β and IL-8), urinary lactulose excretion (%) and LM ratio, compared to the CO group. The BN group also significantly increased plasma Se concentration, and this increase was correlated with greater reductions in pro-inflammatory cytokines (IL-8 and IL-1 β). In turn, the reduction in IL-8 was predictive of greater improvements on IP, as measured by the LM ratio.

We believe that the pronounced effect of BN on inflammatory markers and IP is mainly related to Se pathways, because the main difference in dietary intake between intervention groups was the Se intake. The daily consumption of BN (2 units or 8g) provided a dose of Se 6.3 times greater than the Recommended Dietary Allowances (RDA) (55 μ g), without exceeding the Tolerable Upper Intake Level (UL) (400 μ g) (IOM, 2011). Consequently, plasma Se concentrations were also significantly higher in the BN group. Other aspects of dietary intake were very controlled, so both intervention groups consumed diets with the same lipid profile, macronutrient distribution as well as achieved similar energy restriction (~250 kcal/day) and weight loss.

The Se participates of inflammatory response control by cross-talk with regulatory pathways of oxidative stress. Low plasma Se impairs the synthesis of selenoproteins, which are key enzymes for endogenous antioxidant defense (DUNTAS, 2009; GODOS et al., 2022; SILVEIRA, et al., 2020). The low antioxidant capacity added to the exacerbated production of reactive oxygen species contributes to a pro-oxidant state, triggering systemic inflammation via nuclear factor kappa-B (NF- κ B). Inflammation also feeds back oxidative stress, in a vicious cycle (ALCÂNTARA et al., 2022; SILVA, et al., 2022). Therefore, reestablishing homeostasis of Se and selenoprotein metabolism is a measure to control inflammation. In turn, low plasma Se is associated with the development and progression of several inflammatory diseases (ALEHAGEN et al., 2016; GIACCONI et al., 2021; LUO et al., 2022) including intestinal disruptions (BARROS et al., 2020; CASTRO AGUILAR-TABLADA et al., 2016). In this context, Se supplementation can contribute to manage these pathologies (ALEHAGEN; ALEXANDER; AASETH, 2016; MAHMOODPOOR et al., 2022).

BN is the richest known food source of Se in a very bioavailable form, as selenomethionine (ALCÂNTARA et al., 2022; DIAS et al., 2021) and its effect on inflammation has been described in clinical trials. In patients undergoing hemodialysis, daily consumption of BN (1 unit/day; 290.5 μ g of Se) for three months reduced IL-6 and TNF

compared to baseline values (STOCKLER-PINTO et al., 2014). The same research team showed that this intervention reduced CRP, IL-6 and NF- κ B expression compared to a control group, while increasing the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). In addition, Nrf2 was negatively correlated with NF- κ B, which was expected, since Nrf2 is a transcription factor that stimulates the synthesis of antioxidant enzymes, while NF- κ B promotes the synthesis of inflammatory cytokines (CARDOZO; 2016). In healthy subjects, consumption of a single dose of BN (20 or 50g; $34.8 \pm 3.2 \mu\text{g/g}$ of Se) reduced pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF, IFN- γ) and increased the anti-inflammatory cytokine IL-10, remaining stable for up to 30 days after the ingestion (COLPO et al., 2014).

We noted that clinical trials results point to a dose-dependent relationship between Se and inflammation. Therefore, very high doses of Se can cause unwanted effects and low doses may be insufficient to achieve benefits. Consumption of one unit/day of BN containing very high Se content ($\sim 1261 \mu\text{g/d}$) for two months increased gene expression of pro-inflammatory cytokines in women with obesity, without modifying plasma concentrations (DUARTE et al., 2019). Daily intake of BN (6 units; $48 \mu\text{g Se/d}$) for six weeks did not change CRP concentrations in people aged between 52 and 75 years (HU et al., 2016), while female adolescents with obesity showed no change in CRP concentrations after daily BN consumption (15-25g/d or 10% of total energy from monounsaturated fatty acids (MUFA)) for 16 weeks. However, the daily dose of Se provided by nuts to the adolescents was much lower than that of our study ($108.5 \pm 27 \mu\text{g}$ of Se), baseline CRP values were borderline ($\sim 3 \text{ mg/L}$) and no energy restriction was proposed (MARANHÃO et al., 2011).

Moreover, the participants in the BN group who lost more weight ($\geq 4\text{kg}$) had a greater reduction in CRP in this study. Interventions with other nuts that have low Se content compared to BN did not achieve changes in CRP concentrations, even when using high nut doses (30g/d) (GOBBO et al., 2015; MUKUDDER-PETERSEN et al., 2007). Further, only 0.6% of the total energy were provided by MUFA and 1.6% by PUFA from the 2 units of BN. Although weight loss potentiates the effect of BN, it does not seem to be a prerequisite if BN has a high Se content. We observed that, even among women who did not achieve planned weight loss (4 kg), those who consumed BN reduced more TNF, IL-1 β , and IL-8. Even though CO and BN group presented similar weight loss, only the CO group worsen the prevalence of increased CRP ($\geq 3 \text{ mg/L}$), indicating increase of inflammatory state. Thus, Se supplementation via BN intake may be an interesting strategy for manage inflammation, regardless of weight loss.

Altogether, these evidences support our hypothesis that: 1) Se is the BN component with the greatest potential to modulate inflammation, compared to other nutrients (bioactive compounds and unsaturated fatty acids); 2) higher doses of Se (> 290 µg/d) are required for significant effects; 3) the effect of BN in people with obesity is more pronounced when accompanied by weight loss.

The systemic inflammation and pro-oxidant state are common in people with obesity, and promotes damages to the gut mucosa increasing the IP (MANNA; JAIN, 2015; ROHR et al., 2019). Therefore, energy restriction and weight loss are measures recognized for reducing inflammatory cytokines (HERMSDORFF, et al., 2009, 2011; KÖKTEN et al., 2021) and improve IP (DAMMS-MACHADO et al., 2017; OTT et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2012; TILVES et al., 2022). As expected, we noted that women with normal IP at the end of intervention had lower values of BMI, WC, hip circumference, body fat (%), IL1-β and greater concentration of IL-10, independent of treatment group (data not shown).

Despite the similar weight loss achieved by both intervention groups, the BN group had significantly lower values of lactulose (%) and LM ratio, compared to CO group. We also identified a correlation between increases in plasma Se with reductions in IL-8 and IL1-β. In turn, changes in IL-8 concentration were predictors of LM ratio improvement. These findings reinforce our hypothesis that the increase in plasma Se after BN intervention reduced inflammation, promoting reduction of IP (**Figure 3**).

To our knowledge, this is the first clinical trial that evaluated the effect of BN consumption on IP. We also did not find interventions with humans that have evaluated the relationship between Se and IP, but experimental studies already shown the protective effect of Se supplementation on the intestinal mucosa against oxidative stress, via Nrf2 activation and increase of selenoproteins (LIU et al., 2016; MASEKO et al., 2014; YE et al., 2021).

This study has limitations and strengths. The main limitation is the lack of blinding and randomization of participants. However, we highlight that the CO group was appropriated, which means no difference between groups in terms of age, anthropometry, body composition, metabolic markers, and eating behaviors at baseline. The consume of salad sauce could also be a confound factor. To minimize this interference, both groups received the sauce and the lipid profile of both diets was the same. As strengths, we mention the strict monitoring and control of food intake during all the intervention, and the maintenance of free-living participants. Finally, this was the first study to investigate the effect of daily BN intake containing a high dose of Se on IP.

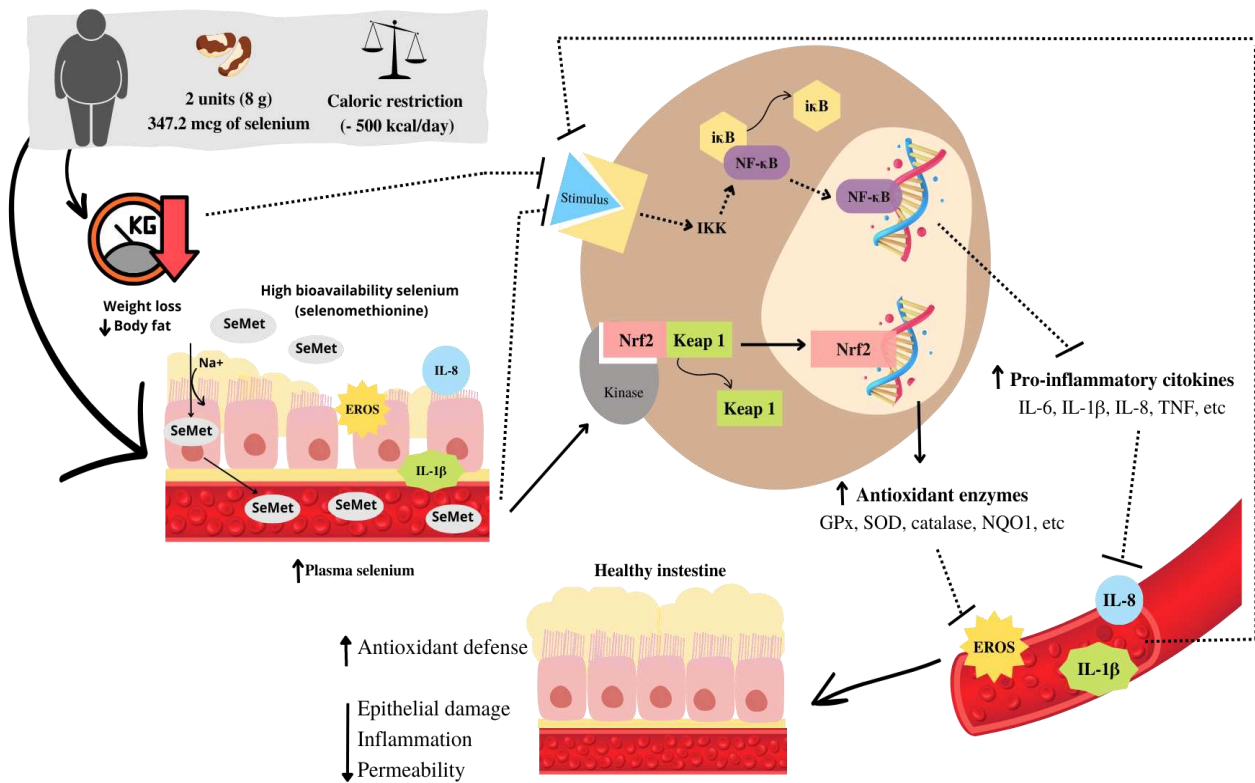


Figure 3. Mechanisms related to selenium-rich Brazil nut consumption in the context of an energy-restricted diet.

SeMet: selenomethionine, EROS: reactive oxygen species, IL: interleukin, Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NF- κ B: nuclear factor kappa-B.

Energy restriction promotes weight loss reducing the pro-inflammatory stimulus. Brazil nuts provide high bioavailable selenium (SeMet), so increase plasma selenium and consequently, Nrf2 activation. As result, the production of antioxidant enzymes increases improving redox state. This reduction in the pro-oxidant stimulus led to less epithelial damage and less NF- κ B activation, which means less pro-inflammatory cytokines reaching the bloodstream. As result, the intestinal environment receives more antioxidant enzymes and less pro-inflammatory stimulation, especially IL-8 and IL-1 β , resulting in less epithelial damage and decrease in intestinal permeability.

CONCLUSION

Daily intake of BN during 8 weeks reduced plasma inflammatory markers (CRP, TNF, IL1- β and IL-8) and improved intestinal permeability in women with overweight/ obesity in energy-restriction, compared to those women with free-nuts diet. Our outcomes also indicate a Se dose dependent effect of BN consumption as well as an interrelationship of increase in plasma Se, reductions in pro-inflammatory cytokines and improvements on IP. Therefore, BN

intake showed to be a good complementary strategy to control low-grade inflammation in women with obesity, and consequently, improve IP.

ACKNOWLEDGMENT

The Brazilian Nuts Study's team thanks all the study participants and researchers involved; to ECONUT (Amazon state, Brazil) for supplying Brazil nuts.

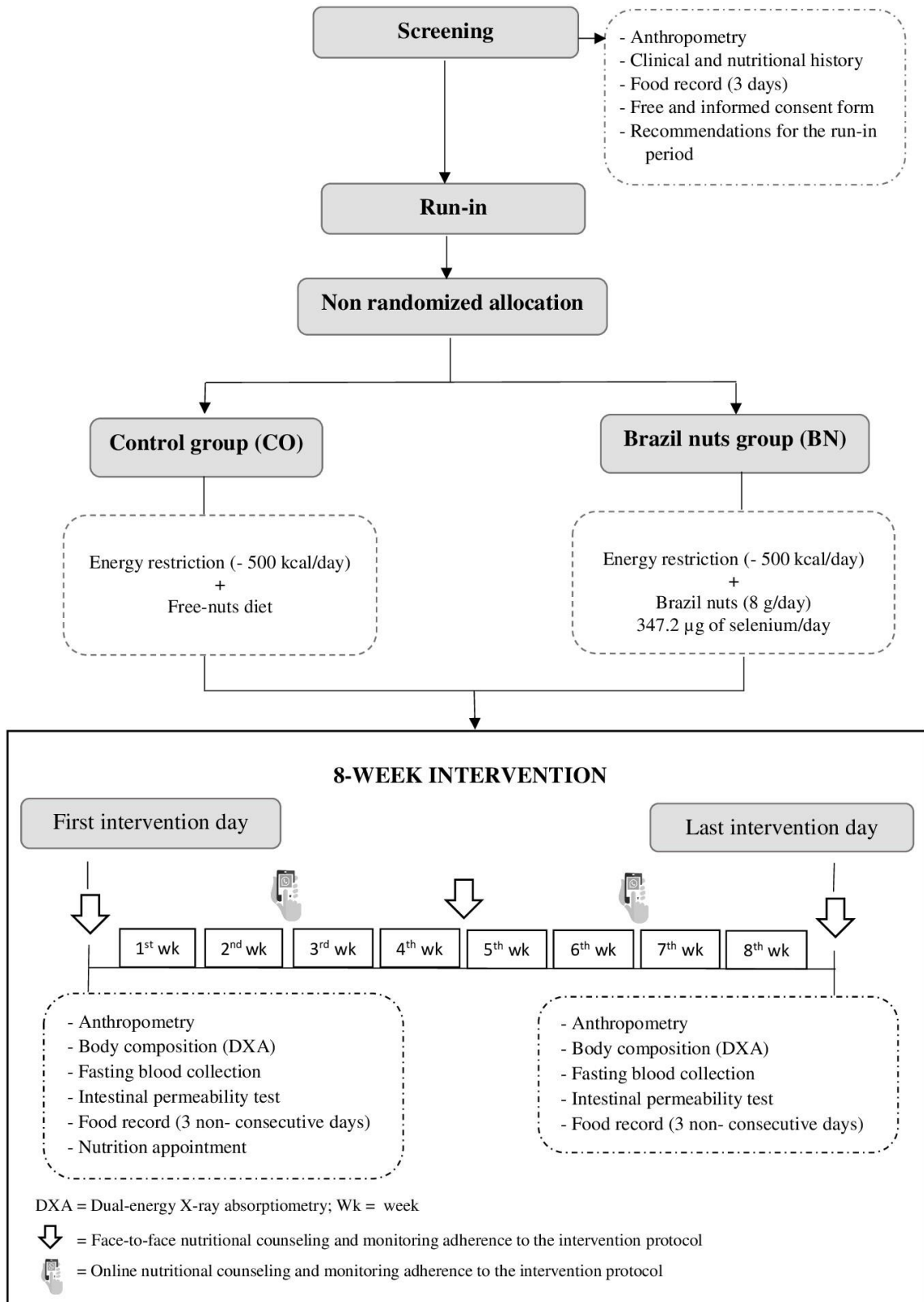
We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for providing the facilities for the conduction of the experiments and data analysis. Bioclin (Quibasa - Química Básica Ltda), through the project Projeto Brasil Escola, provides supplies for the biochemical dosages necessary to characterize the biochemical profile of the study participants.

FUNDING STATEMENT

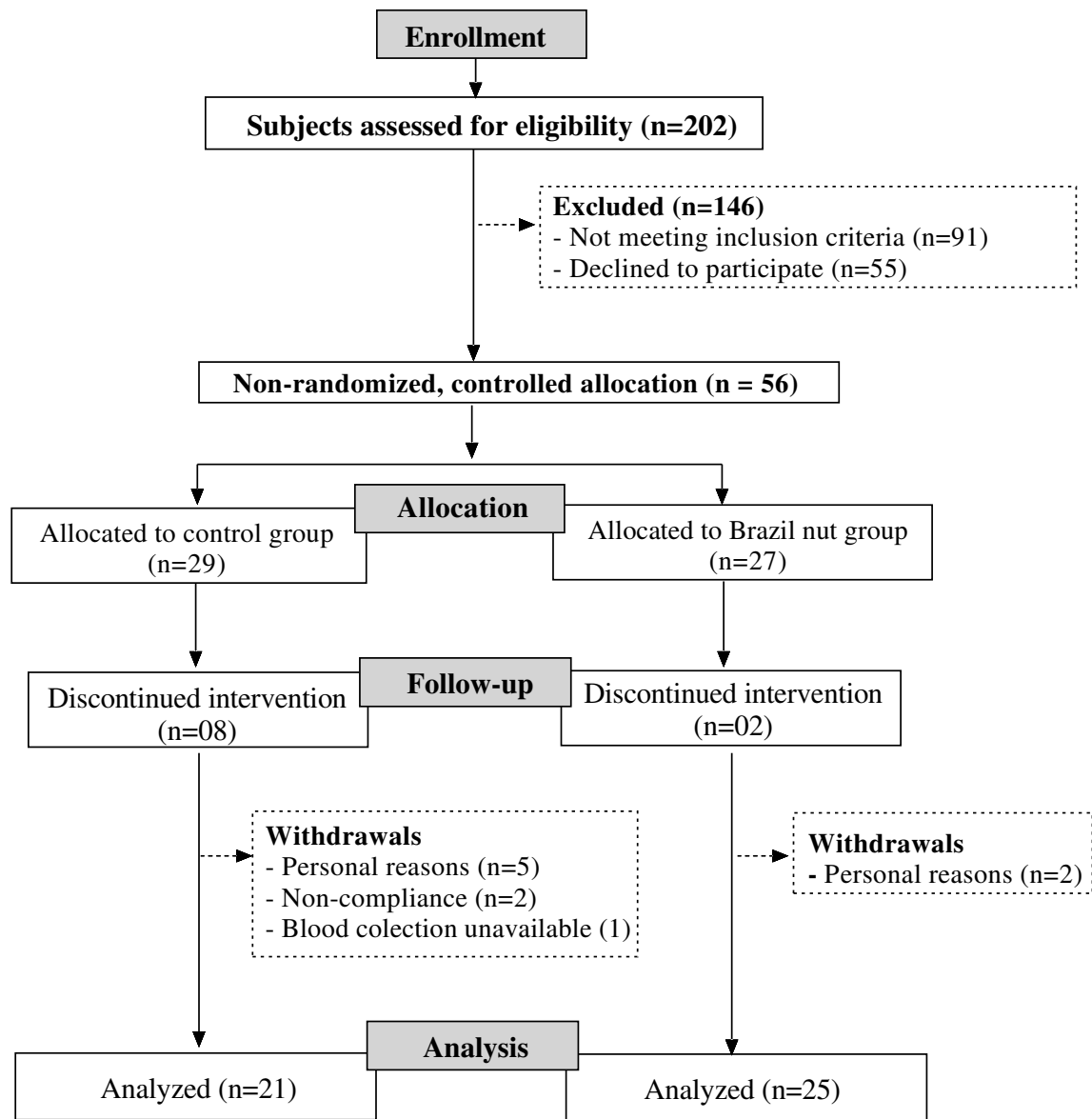
This work was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Code 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, process CDS-APQ-00369-17), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process 428038/2018-2). J. Bressan and H.H.M. Hermsdorff are CNPq fellows.

The authors declare no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary figure 1. Study design and methodology.



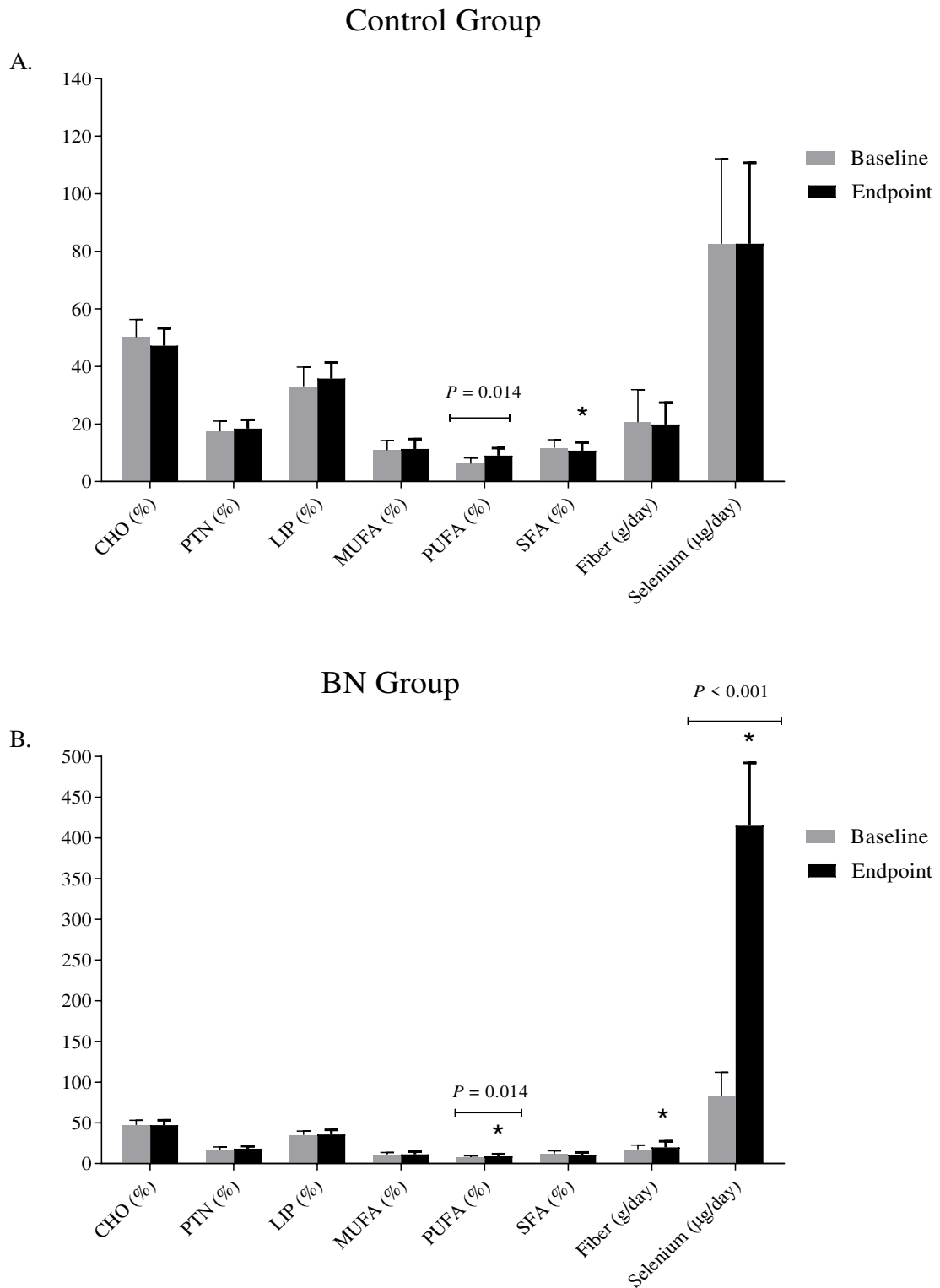
Supplementary figure 2. The CONSORT flowchart diagram.

Supplementary table 2. Baseline participants' characteristics and dietary consumption during 8-week intervention for treatment group.

	Control group (n = 21)	BN group (n = 25)	<i>P</i>
Baseline characteristics			
Age (years)	33.1 ± 1.8	34.8 ± 1.5	0.380
BMI (kg/m ²)	34.5 ± 1.2	32.8 ± 0.6	0.097
WC (cm)	109.9 ± 2.5	107.8 ± 1.8	0.200
WHR	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.173
Total BF (kg)	44.1 ± 2.0	39.9 ± 1.3	0.093
Total BF (%)	49.1 ± 0.9	47.3 ± 0.9	0.195
Total LM (kg)	40.2 ± 1.2	40.4 ± 0.9	0.590
Total LM (%)	45.1 ± 1.0	47.6 ± 0.8	0.073

Data are expressed as mean ± SEM. *P* = refer to t-tests for differences between independent continuous variables.

BN: Brazil nuts, BMI: body mass index WC: waist circumference WHR: waist-to-hip ratio BF: body fat MUFA: monounsaturated fatty acids. PUFA: polyunsaturated fatty acids. SFA: saturated fatty acids.



Supplementary figure 3. Dietary consumption before and during 8-week intervention, according to treatment group.

BN: Brazil nuts CHO: carbohydrate PTN: protein LIP: lipids MUFA: monounsaturated fatty acids PUFA: polyunsaturated fatty acids SFA: saturated fatty acids. * Intra-group difference (baseline x endpoint) (paired *t*-test, $P < 0.05$). Student *t* test was performed for comparison between groups ($P < 0.05$). PUFA was different between groups at baseline. Selenium was different between groups during 8-week intervention.

REFERENCES

- ABESO, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Posicionamento sobre o tratamento nutricional do sobrepeso e da obesidade**. 2016.
- AHA/ACC, American College of Cardiology/American Heart Association. AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults. **Circulation**, v. 129, n. 25 suppl 2, p. S102–S138, 2014.
- ALCÂNTARA, D. B. et al. Selenium in Brazil nuts: An overview of agronomical aspects, recent trends in analytical chemistry, and health outcomes. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131207, 2022
- ALEHAGEN, U. et al. Relatively high mortality risk in elderly Swedish subjects with low selenium status. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 91–96, 2016.
- ALEHAGEN, U.; ALEXANDER, J.; AASETH, J. Supplementation with Selenium and Coenzyme Q10 Reduces Cardiovascular Mortality in Elderly with Low Selenium Status. A Secondary Analysis of a Randomised Clinical Trial. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, 2016.
- BAKHTIYARI, M. et al. Contribution of obesity and cardiometabolic risk factors in developing cardiovascular disease: a population-based cohort study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1544, 2022.
- BARROS, S. É. DE L. et al. Relationship between selenium status and biomarkers of oxidative stress in Crohn's disease. **Nutrition**, v. 74, p. 110762, 2020.
- BARUFALDI, L. A. et al. Programa para registro de recordatório alimentar de 24 horas: aplicação no Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 2, p. 464–468, 2016.
- CARDOZO, L. F. M. F.; et. al. Brazil nut consumption modulates Nrf2 expression in hemodialysis patients: A pilot study. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 60, n. 7, p. 1719–1724, 2016.
- CASTRO AGUILAR-TABLADA, T. et al. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Are Associated with Decreased Serum Selenium Concentrations and Increased Cardiovascular Risk. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 780, 2016.
- COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 459–465, 2014.
- COMINETTI, C. et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v. 27, n. 9, p. 891–896, 2011.
- COMINETTI, C. et al.. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v. 32, n. 6, p. 403–407, 2012.
- DAMMS-MACHADO, A. et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 127–135, 2017.
- DIAS, J. P. V. et al. Dietary Selenium Intake and Type-2 Diabetes: A Cross-Sectional Population-Based Study on CUME Project. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

- DUARTE, G. B. S. et al. Consumption of Brazil nuts with high selenium levels increased inflammation biomarkers in obese women: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 63–64, p. 162–168, 2019.
- DUNTAS, L. H. Selenium and Inflammation: Underlying Anti-inflammatory Mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, v. 41, n. 06, p. 443–447, 2009.
- FARRÉ, R. et al. Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1185, 2020.
- GASMI, A. et al. Relationship between Gut Microbiota, Gut Hyperpermeability and Obesity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 827–839, 2021.
- GERVASI, T. et al. Health Benefits Related to Tree Nut Consumption and Their Bioactive Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5960, 2021.
- GHANAVATI, M. et al. Effect of a nut-enriched low-calorie diet on body weight and selected markers of inflammation in overweight and obese stable coronary artery disease patients: a randomized controlled study. **Eur J of Clin Nutr**, v. In press, 2021
- GIACCONI, R. et al. Reduced levels of plasma selenium are associated with increased inflammation and cardiovascular disease in an Italian elderly population. **Experimental Gerontology**, v. 145, p. 111219, 2021.
- GOBBO, L. C. DEL et al. Effects of tree nuts on blood lipids, apolipoproteins, and blood pressure: systematic review, meta-analysis, and dose-response of 61 controlled intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 6, p. 1347–1356, 2015.
- GODOS, J. et al. Effect of Brazil Nuts on Selenium Status, Blood Lipids, and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 403, 2022.
- HERMSDORFF, H. H. M. et al. Impact of caloric restriction and Mediterranean food-based diets on inflammation accompanying obesity and metabolic syndrome features. **Obesity and Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 69–77, 2009.
- HERMSDORFF, H. H. M. et al. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. **European Journal of Nutrition**, 2011. v. 50, n. 1, p. 61–69.
- HU, Y. et al. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, p. 1901–1911, 2016.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. 2010.
- IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. vol. 39. 2011.
- IOM, INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary References Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. Panel on Macronutrients, Panel on the Definition of Dietary Fiber, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on In. [S.l.]: [s.n.], National Academy Press, Washington

D.C, 2005.

IOM, INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. National Academy Press, Washington D.C, 2011. Disponível em: <<https://www.nap.edu/read/9810/chapter/9>>. Acesso em: 07 junh. 2022.

KHANNA, D. et al. Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. **Cureus**, v. 14, n. 2, p. e22711, 2022.

KÖKTEN, T. et al. Calorie Restriction as a New Treatment of Inflammatory Diseases. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 1558–1570, 2021.

LINSALATA, M. et al. Comparison of an enzymatic assay with liquid chromatography-pulsed amperometric detection for the determination of lactulose and mannitol in urine of healthy subjects and patients with active celiac disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 4, p. e61-64, 2014.

LINSALATA, M. et al. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. **BMC Gastroenterology**, v. 18, n. 1, p. 167, 2018.

LIU, F. et al. Selenium and vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat-stressed pigs. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 7, p. 801–810, 2016.

LUO, Y. et al. The Relationship Between Plasma Selenium, Antioxidant Status, Inflammatory Responses and Ischemic Cardiomyopathy: A Case-Control Study Based on Matched Propensity Scores. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 15, p. 5757–5765, 2022.

MAHMOODPOOR, A. et al. The effects of selenium supplementation on inflammatory markers in critically ill patients. **SN Applied Sciences**, v. 4, n. 12, p. 326, 2022.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423–444, 2015.

MARANHAO, P. A. et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2011.

MASEKO, T. et al. Selenium-Enriched Agaricus bisporus Mushroom Protects against Increase in Gut Permeability ex vivo and Up-Regulates Glutathione Peroxidase 1 and 2 in Hyperthermally-Induced Oxidative Stress in Rats. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2478–2492, 2014.

MAZIDI, M. et al. Impact of different types of tree nut, peanut, and soy nut consumption on serum C-reactive protein (CRP). **Medicine**, v. 95, n. 44, p. e5165, 2016.

MAZIDI, M. et al. The impact of nuts consumption on glucose/insulin homeostasis and inflammation markers mediated by adiposity factors among American adults. **Oncotarget**, v. 9, n. 58, p. 31173–31186, 2018.

MUKUDDEN-PETERSEN, J. et al. Effects of a high walnut and high cashew nut diet on selected markers of the metabolic syndrome: a controlled feeding trial. **The British journal of nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1144–1153, 2007.

NEALE, E. P. et al. The effect of nut consumption on markers of inflammation and

endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ Open**, v. 7, n. 11, p. e016863, 2017.

NEDIANI, C.; DINU, M. Oxidative Stress and Inflammation as Targets for Novel Preventive and Therapeutic Approaches in Non-Communicable Diseases II. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 824, 2022.

NETTO CÂNDIDO, T. L. et al. Effect of the ingestion of vegetable oils associated with energy-restricted normofat diet on intestinal microbiota and permeability in overweight women. **Food Research International**, v. 139, p. 109951, 2021.

OTT, B. et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. **Scientific Reports**, v. 7, n. August, p. 1–10, 2017.

ROCHA, D. M. U. P.; CALDAS, A. P. S.; SIMÕES E SILVA, A. C.; BRESSAN, J.; HERMESDORFF, H. H. M. Nut-enriched energy restricted diet has potential to decrease hunger in women at cardiometabolic risk: a randomized controlled trial (Brazilian Nuts Study). **Nutrition Research**, v. 109, p. 35–46, 2023.

ROHR, M. W. et al. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. **Advances in Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 71–91, 2019.

SILVA, A. C. T. Da et al. Nuts and Cardiovascular Diseases: Focus on Brazil Nuts. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 32, n. 3, 2019.

SILVA, A. DA.; SILVEIRA, B. K. S.; FREITAS, B. V. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Effects of regular Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) consumption on health: An updated systematic review of clinical trials. **Foods**, v. In press, 2022.

SILVEIRA, B. K. S.; OLIVEIRA, T. M. S.; ANDRADE, P. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; ROSA, C. O. B.; FRANCESCHINI, S. C. C. Dietary Pattern and Macronutrients Profile on the Variation of Inflammatory Biomarkers: Scientific Update. **Cardiology Research and Practice**, v. 2018, p. 1–18, 2018.

SILVEIRA, B. K. S.; SILVA, A. DA.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Effect of chronic consumption of nuts on oxidative stress: a systematic review of clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–12, 2020.

STOCKLER-PINTO, M. M. B. et al. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) Improves Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in Hemodialysis Patients. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, n. 1, p. 105–112, 2014.

TEIXEIRA, T. F. S.; COLLADO, M. C.; FERREIRA, C. L.L.F.; BRESSAN, J.; PELUZIO, M. C. G. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. **Nutrition Research**, v. 32, n. 9, p. 637–647, 2012.

TEIXEIRA, T. F. S.; SOUZA, N. C. S.; CHIARELLO, P. G.; FRANCESCHINI, S. C.C.; BRESSAN, J.; FERREIRA, C. L.L.F.; PELUZIO, M. C. G. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clinical Nutrition**, out. 2012. v. 31, n. 5, p. 735–740.

TILVES, C. et al. A behavioral weight-loss intervention, but not metformin, decreases a marker of gut barrier permeability: results from the SPIRIT randomized trial. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 3, p. 655–660, 2022.

WEN, X. et al. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 298, 2022.

YE, R. et al. Trace Element Selenium Effectively Alleviates Intestinal Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11708, 2021.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste projeto, duas intervenções foram conduzidas. Todo o protocolo da pesquisa foi elaborado considerando o nosso público alvo (mulheres com excesso de peso), o controle rigoroso de possíveis variáveis de confusão, bem como a redução nas perdas de seguimento. Algumas dificuldades enfrentadas na fase 1 embasaram mudanças que ocorreram no protocolo da fase 2. A seguir, listo alguns dos desafios enfrentados que podem contribuir para execução de projetos futuros.

- **Ajustes no protocolo e tamanho amostral:** Houve um alto percentual de perda de seguimento (40%) no estudo 1. Um dos fatores que mais contribuiu para as perdas foi o extenso protocolo de coleta de dados que incluía 4 dias de coleta (2 na linha de base e dois após a intervenção), além de visitas frequentes ao laboratório para retirada de materiais e consultas de monitoramento. Para a segunda fase, reduzimos o protocolo e os procedimentos do estudo. Como resultado, a perda de seguimento baixou para 1,11%. Assim, no estudo 2, alcançamos maior tamanho amostral em menor período de tempo.

- **Perfil das socioeconômico das participantes:** Neste projeto, não utilizamos renda e escolaridade como critérios de seleção das participantes. Nossa amostra consistiu majoritariamente de mulheres de baixa renda (< R\$ 500,00 per capita) e baixa escolaridade, geralmente do lar ou autônomas. Esse público possui maior disponibilidade de tempo para comparecer à Universidade para realização dos procedimentos inerentes à pesquisa, entretanto, tem dificuldade para entender as orientações dos pesquisadores, relatam baixo acesso à determinados alimentos (frutas e hortaliças, lácteos e carnes, principalmente) e tem dificuldade em reportar o consumo alimentar com precisão. Isso contribuiu para duas limitações importantes: menor precisão na estimativa do consumo alimentar e menor adesão ao protocolo dietético. Estudos futuros devem considerar a renda como fator limitante à adesão ao protocolo.

- **Adesão ao protocolo dietético:** Uma grande dificuldade na condução de estudos com intervenção dietética é a variabilidade na adesão entre os participantes, especialmente em estudos de vida livre. Além da renda ser um fator limitante, como já discutido, pessoas com excesso de peso tendem a subestimar o consumo de alimentos em 30 a 50% (CHAO; QUIGLEY; WADDEN, 2021). Além disso, a adesão desse público à protocolos dietéticos é de 60,5% (ROGERS et al., 2016). Estudos futuros devem considerar outros fatores que

dificultam ainda mais a adesão ao plano alimentar, tais como estado emocional, jornada de trabalho, tipo de emprego, etc.

- **Duração do estudo:** O estudo teve duração de 8 semanas e esse tempo foi definido com base em dois critérios principais: 1) o tempo mínimo necessário para observar mudanças nos desfechos avaliados; 2) o aumento na desistência das voluntárias à medida que o projeto se estende. Embora não seja um período tão curto e muitos ensaios clínicos adotem 8 semanas como duração, é possível que algumas adaptações mais complexas em marcadores e na microbiota ficassem mais evidentes com um período mais longo. Estudos futuros devem considerar a duração de 12 semanas, porém, com protocolos enxutos e direcionados à objetivos específicos, a fim de reduzir o número de visitas ao laboratório e as perdas de seguimento.

- **Ausência de randomização no estudo 2:** Devido à pandemia da COVID-19, houve atraso na coleta do estudo 2 do Estudo Castanhas Brasileiras, o que inviabilizou a coleta de novos dados para um grupo controle. Por isso, o grupo controle do estudo 2 foi o mesmo do estudo 1, tratando-se de um estudo controlado, mas não randomizado. Com atraso na coleta de dados, também não foi possível realizar análises da microbiota no estudo 2, o que poderá ser realizado futuramente.

Também destaco os principais pontos fortes da nossa pesquisa.

- **Randomização e grupo controle:** No estudo 1, conseguimos realizar a alocação randômica das participantes e utilizamos o método de minimização que foi fundamental para equilibrar os grupos no que se refere a idade, valores de IMC e percentual de gordura. Consequentemente, o perfil metabólico também foi equilibrado entre os grupos. Na fase 2, apesar da impossibilidade de randomização, prezamos pelo grupo controle, e os grupos não diferiram em perfil antropométrico e metabólico na linha de base.

- **Restrição calórica:** Optamos por uma restrição calórica moderada (-500 kcal/dia) e calculada sobre a estimativa de gasto energético, pensando na viabilidade dessa restrição no cotidiano das participantes, e para evitar prescrição de dietas com valor calórico inferior a 1400 kcal. A restrição calculada sobre o cálculo da necessidade energética e não do consumo habitual minimiza variações causadas por sub ou superestimativa do consumo alimentar habitual.

- **Monitoramento e acompanhamento nutricional:** Quinzenalmente, as participantes compareciam ao laboratório para realizar medidas antropométricas, aplicação de R24h e possíveis ajustes na dieta. Dessa forma, conseguíamos identificar de forma precoce as principais dificuldades na adesão à dieta, verificar hábitos e o consumo de alimentos não permitidos durante a intervenção e corrigir falhas de maneira precoce. Ao longo de toda a intervenção, o monitoramento também foi realizado de forma remota via WhatsApp, e esse contato podia ser solicitado tanto pelas participantes quanto pelas pesquisadoras.

- **Análise da microbiota:** Nosso sequenciamento do gene 16S permitiu ampla classificação taxonômica, incluindo reino, filo, classe, ordem, família e gênero. Esse grande detalhamento taxonômico é fundamental para reduzir a variabilidade nos resultados identificada nos estudos com a microbiota. Quanto maior o detalhamento taxonômico, maior a especificidade da atuação daquele grupo de microrganismos. Não realizamos a análise em nível de espécie porque os estudos sobre consumo de castanhas e microbiota ainda são escassos. A análise em nível de espécie envolve alto custo e alto grau de detalhamento, e deve ser utilizada no futuro de forma direcionada para confirmar hipóteses ou associações identificadas nos estudos preliminares.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados das duas intervenções descritas no presente estudo, é possível concluir que:

Estudo 1:

O consumo de castanhas brasileiras (15 g de castanha-do-brasil e 30 g de castanha de caju) durante oito semanas, associado à restrição calórica, promoveu benefícios à saúde intestinal de mulheres com obesidade, por meio do aumento de bactérias comensais (*Ruminococcus*, *Roseburia*, *NK4A214_groups*, e *UCG-022*) e, conseqüentemente, do ácido propiônico fecal, em relação ao grupo controle, sem modificar o pH fecal. Além disso, essa intervenção protegeu contra o aumento da permeabilidade intestinal observado no grupo controle. Contudo, não houve mudança na concentração plasmática de citocinas inflamatórias ou diferenças na perda de peso entre os grupos.

Estudo 2:

O consumo diário de castanha-do-brasil (8 g) com alto conteúdo de selênio (347,2 µg), associado à restrição calórica, melhorou significativamente o estado inflamatório (redução de PCR, TNF, IL1-β e IL-8) e a permeabilidade intestinal de mulheres com excesso de peso. Tais benefícios foram independentes da perda de peso (similar entre os grupos) e relacionados ao aumento significativo na concentração plasmática de selênio, de modo que:

- a. O aumento no selênio plasmático se correlacionou com maiores reduções de IL-8 e IL1-β.
- b. Reduções na concentração plasmática de IL-8 foram preditivas de melhoras na permeabilidade intestinal, medida pela razão lactulose/manitol.

Portanto, o consumo regular de castanhas brasileiras pode ser uma estratégia adjuvante ao tratamento nutricional convencional (restrição calórica e mudanças no padrão alimentar) da obesidade e das alterações metabólicas associadas. Ambas as intervenções promoveram efeito positivo na saúde intestinal. Todavia, somente a intervenção com castanha-do-brasil e alto conteúdo de selênio foi capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias no plasma, e este efeito foi preditivo de maior redução na permeabilidade intestinal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASPOUR, N. et al. Mixed Nut Consumption May Improve Cardiovascular Disease Risk Factors in Overweight and Obese Adults. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1488, 2019.

ABAZARFARD, Z., SALEHI, M., KESHAVARZI, S. The effect of almonds on anthropometric measurements and lipid profile in overweight and obese females in a weight reduction program: A randomized controlled clinical trial. **Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences** v. 19, p. 457–64, 2014.

ABESO, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Posicionamento sobre o tratamento nutricional do sobrepeso e da obesidade**. 2016.

ADEYEMI, K. et al. Influence of Anacardium occidentale leaf supplementation in broiler chicken diet on performance, caecal microbiota, blood chemistry, immune status, carcass, and meat quality. **British Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 552–561, 2021.

AHA/ACC, American College of Cardiology/American Heart Association. AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults. **Circulation**, v. 129, n. 25 suppl 2, p. S102–S138, 2014.

ALCÂNTARA, D. B. et al. Selenium in Brazil nuts: An overview of agronomical aspects,

recent trends in analytical chemistry, and health outcomes. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131207, 2022

ALEHAGEN, U. et al. Relatively high mortality risk in elderly Swedish subjects with low selenium status. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 91–96, 2016.

ALEHAGEN, U.; ALEXANDER, J.; AASETH, J. Supplementation with Selenium and Coenzyme Q10 Reduces Cardiovascular Mortality in Elderly with Low Selenium Status. A Secondary Analysis of a Randomised Clinical Trial. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0157541, 2016.

ALENCAR, L. De L. **A suplementação de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com castanha-do-brasil, pode alterar o estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e a microbiota intestinal?** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo (USP), 129p. 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9132/tde-26082019-093652/publico/Luciane_Luca_de_Alencar_DO_Corrigida.pdf>.

AOAC, Association of Official Agricultural Chemists Methods. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 20. ed. [S.l.]: [s.n.], 1995.

AOUN, A.; DARWISH, F.; HAMOD, N. The Influence of the Gut Microbiome on Obesity in Adults and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Weight Loss. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 25, n. 2, p. 113–123, 2020.

DI ANGELANTONIO, E. et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. **The Lancet**, v. 388, n. 10046, p. 776–786, 2016.

AUGUSTO, R. L. et al. Purified anacardic acids exert multiple neuroprotective effects in pesticide model of Parkinson's disease: in vivo and in silico analysis. **IUBMB Life**, v. 72, n. 8, p. 1765–1779, 2020.

AUNE, D. et al. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 46, n. 3, p. 1029–1056, 2017.

AWAKAN, O. J. et al. Anti-inflammatory and bronchodilatory constituents of leaf extracts of *Anacardium occidentale* L. in animal models. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 62–70, 2018.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.

BAER, D. J.; NOVOTNY, J. A. Consumption of cashew nuts does not influence blood lipids or other markers of cardiovascular disease in humans: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 109, n. 2, p. 269–275, 2019.

BAER, D.; NOVOTNY, J. Metabolizable Energy from Cashew Nuts is Less than that Predicted by Atwater Factors. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 33, 2018.

BAKHTIYARI, M. et al. Contribution of obesity and cardiometabolic risk factors in developing cardiovascular disease: a population-based cohort study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1544, 2022.

BAMBERGER, C. et al. A Walnut-Enriched Diet Affects Gut Microbiome in Healthy

- Caucasian Subjects: A Randomized, Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 244, 2018.
- BARROS, S. É. De L. et al. Relationship between selenium status and biomarkers of oxidative stress in Crohn's disease. **Nutrition**, v. 74, p. 110762, 2020.
- BARTOSZEK, Adrian et al. Walnut Oil Alleviates Intestinal Inflammation and Restores Intestinal Barrier Function in Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1302, 2020.
- BARUFALDI, L. A. et al. Programa para registro de recordatório alimentar de 24 horas: aplicação no Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 2, p. 464–468, 2016.
- BEGUIN, P. et al. Effect of polyunsaturated fatty acids on tight junctions in a model of the human intestinal epithelium under normal and inflammatory conditions. **Food & Function**, v. 4, n. 6, p. 923, 2013.
- BERNARDI, S. et al. Polyphenols and Intestinal Permeability: Rationale and Future Perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1816–1829, 2020.
- BES-RASTROLLO, Maira et al. Nut Consumption and Weight Gain in a Mediterranean Cohort: The SUN Study*. **Obesity**, v. 15, n. 1, p. 107–107, 2007.
- BIBBÒ, S. et al. The role of diet on gut microbiota composition. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, n. 22, p. 4742–4749, 2016.
- BISCHOFF, S. C. et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 189, 2014.
- DEL BO', C. et al. A polyphenol-rich dietary pattern improves intestinal permeability, evaluated as serum zonulin levels, in older subjects: The MaPLE randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 3006–3018, 2021.
- BODHINI, D.; MOHAN, V. Mediators of insulin resistance & cardiometabolic risk: Newer insights. **Indian Journal of Medical Research**, v. 148, n. 2, p. 127, 2018.
- BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **J Physiol Biochem**, v. 68, n. 701, p. 711, 2012.
- BOULANGÉ, C. L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 42, 2016.
- BRASIL. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. [S.l.]: [s.n.], v. 1, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. 2ª ed. Brasília, 2014.
- CALDAS, A. P. S.; ALVES, R. D. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; DE OLIVEIRA, L. L.; BRESSAN, J. Effects of high-oleic peanuts within a hypoenergetic diet on inflammatory and oxidative status of overweight men: A randomised controlled trial. **British Journal of Nutrition**, 2020. v. 123, n. 6, p. 673–680.
- CALDAS, A. P. S.; ROCHA, D. M. U. P.; DIONÍSIO, A. P.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Brazil and cashew nuts intake improve body composition and endothelial health in women at cardiometabolic risk (Brazilian Nuts Study): a randomised controlled trial. **British Journal of Nutrition**, p. 1–11, 2022.

- CALDERÓN-PÉREZ, L. et al. Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6436, 2020.
- CÂNDIDO, F. G.; VALENTE, F. X.; MOREIRA, A. P. B.; ROCHA, D. M. U. P.; ALFENAS, R. C. G. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 125–143, 2018.
- CANI, P. D. et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, 2007.
- CANI, Patrice D et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 279–288, 2012.
- CAO, Y. et al. Reference Ranges of Selenium in Plasma and Whole Blood for Child-Bearing-Aged Women in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 8, p. 4908, 2022.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.
- CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.
- CARDOSO, B. R. et al. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9–18, 2017.
- CARDOZO, L. F. M. F.; STOCKLER-PINTO, Milena B.; MAFRA, Denise. Brazil nut consumption modulates Nrf2 expression in hemodialysis patients: A pilot study. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 60, n. 7, p. 1719–1724, 2016.
- CARVALHO, A. L. N. et al. Anacardic Acids from Cashew Nuts Ameliorate Lung Damage Induced by Exposure to Diesel Exhaust Particles in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- CASSADY, B. A. et al. Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 3, p. 794–800, 2009.
- CASTANER, O. et al. The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. **International Journal of Endocrinology**, p. 1–9, 2018.
- CASTRO AGUILAR-TABLADA, T. et al. Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease Are Associated with Decreased Serum Selenium Concentrations and Increased Cardiovascular Risk. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 780, 2016.
- CHAO, A. M.; QUIGLEY, K. M.; WADDEN, T. A. Dietary interventions for obesity: clinical and mechanistic findings. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, 2021.
- CHELAKKOT, C. et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 2, p. e450–e450, 2018.
- CHEN, Zhangling et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 7, p. e2118811, 2021.

CHILDS; CALDER; MILES. Diet and Immune Function. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1933, 2019.

CHO, I. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 621–626, 2012.

CHOO, J. M. et al. Almond consumption affects fecal microbiota composition, stool pH, and stool moisture in overweight and obese adults with elevated fasting blood glucose: A randomized controlled trial. **Nutrition Research**, v. 85, p. 47–59, 2021.

COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 459–465, 2014.

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

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

CONITEC, Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas do sobrepeso e obesidade em adultos**. 309p. 2021.

CORDARO, M.; SIRACUSA, R.; et al. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts Counteract Oxidative Stress and Inflammation in an Acute Experimental Model of Carrageenan-Induced Paw Edema. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 660, 2020.

CORDARO, M.; FUSCO, R.; et al. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts Modulate the Nrf2 and NLRP3 Pathways in Pancreas and Lung after Induction of Acute Pancreatitis by Cerulein. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 992, 2020.

CREEDON, A. C. et al. Nuts and their Effect on Gut Microbiota, Gut Function and Symptoms in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2347, 2020.

D'AMICO, R. et al. Consumption of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts Counteracts Oxidative Stress and Tissue Inflammation in Mild Hyperhomocysteinemia in Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1474, 2022.

DAHL, W. J.; RIVERO MENDOZA, D.; LAMBERT, J. M. Diet, nutrients and the microbiome. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 171, p. 237–263, 2020.

DAMMS-MACHADO, A. et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 127–135, 2017.

DARVISH DAMAVANDI, R. et al. Effects of daily consumption of cashews on oxidative stress and atherogenic indices in patients with type 2 diabetes: A randomized, controlled-feeding trial. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 1, p. e70744., 2019.

DAVIS, C. D. The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. **Nutrition Today**, v. 51, n. 4, p. 167–174, 2016.

- DAVIS, L. et al. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 155–164, 2007.
- DAY, B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 285–296, 2009.
- DEGRUTTOLA, A. K. et al. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, 2016.
- DIAS, J. P. V. et al. Dietary Selenium Intake and Type-2 Diabetes: A Cross-Sectional Population-Based Study on CUME Project. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.
- DUANGJAN, C. et al. Lifespan Extending and Oxidative Stress Resistance Properties of a Leaf Extracts from *Anacardium occidentale* L. in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–16, 2019.
- DUARTE, G. B. S. et al. Consumption of Brazil nuts with high selenium levels increased inflammation biomarkers in obese women: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 63–64, p. 162–168, 2019.
- DUNTAS, L. H. Selenium and Inflammation: Underlying Anti-inflammatory Mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, v. 41, n. 06, p. 443–447, 2009.
- EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.
- ENGIN, A. Endothelial Dysfunction in Obesity. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 960, p. 345–379, 2017.
- ESTRUCH, R.; ROS, E. The role of the Mediterranean diet on weight loss and obesity-related diseases. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 21, n. 3, p. 315–327, 2020.
- FARRÉ, R. et al. Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1185, 2020.
- FELBERG, Ilana et al. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alim. Nutr. Araraquara**, v.15, n.2, p.163-174, 2004.
- FILIPPO, C. DE et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.
- FITZGERALD, E. et al. The effect of nut consumption (tree nuts and peanuts) on the gut microbiota of humans: a systematic review. **British Journal of Nutrition**, v. 125, n. 5, p. 508–520, 2021.
- FOMENKY, B. E. et al. Direct-fed microbial supplementation influences the bacteria community composition of the gastrointestinal tract of pre- and post-weaned calves. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14147, 2018.
- FUSCO, R. et al. Consumption of *Anacardium occidentale* L. (Cashew Nuts) Inhibits Oxidative Stress through Modulation of the Nrf2/HO–1 and NF-kB Pathways. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4426, 2020.
- GAAL, L. F. VAN; MERTENS, I. L.; BLOCK, C. E. DE. Mechanisms linking obesity with

cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875–880, 2006.

GARSIN, D. A. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 290–295, 2010.

GASMI, A. et al. Relationship between Gut Microbiota, Gut Hyperpermeability and Obesity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 827–839, 2021.

GE, L. et al. Comparison of dietary macronutrient patterns of 14 popular named dietary programmes for weight and cardiovascular risk factor reduction in adults: systematic review and network meta-analysis of randomised trials. **BMJ**, p. m696, 2020.

GEBAUER, S. K. et al. Food processing and structure impact the metabolizable energy of almonds. **Food & Function**, v. 7, n. 10, p. 4231–4238, 2016.

GÉRARD, P. Gut microbiota and obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 147–162, 2016.

GERVASI, T. et al. Health Benefits Related to Tree Nut Consumption and Their Bioactive Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5960, 2021.

GHANAVATI, M. et al. Effect of a nut-enriched low-calorie diet on body weight and selected markers of inflammation in overweight and obese stable coronary artery disease patients: a randomized controlled study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. In press, 2021.

GIACCONI, R. et al. Reduced levels of plasma selenium are associated with increased inflammation and cardiovascular disease in an Italian elderly population. **Experimental Gerontology**, v. 145, p. 111219, 2021.

GOBBO, L. C. DEL et al. Effects of tree nuts on blood lipids, apolipoproteins, and blood pressure: systematic review, meta-analysis, and dose-response of 61 controlled intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 6, p. 1347–1356, 2015.

GODOS, J. et al. Effect of Brazil Nuts on Selenium Status, Blood Lipids, and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 403, 2022.

GREENWAY, F. L. Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 8, p. 1188–1196, 2015.

GROSSO, G. et al. Nut consumption on all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 4, p. 783–793, 2015.

HAN, B. et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Intestinal Obstruction Ameliorates Intestinal Barrier Dysfunction Via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Pathway. **Shock**, v. 46, n. 3, p. 319–328, 2016.

HASHIMOTO, L. L. **Suplementação de minerais por meio da castanha-do-brasil pode modular a microbiota de indivíduos saudáveis**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo (USP), 135p. 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9132/tde-19022020-153422/publico/Leila_Leiko_Hashimoto_DO_Corrigida.pdf>.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Impact of caloric restriction and Mediterranean food-based diets on inflammation accompanying obesity and metabolic syndrome features. **Obesity and**

Metabolism, v. 5, p. 69–77, 2009.

HERMSDORFF, H. H. M.; ZULET, M Ángeles; MARTÍNEZ, J. A. The implication of unknown bioactive compounds and cooking techniques in relations between the variety in fruit and vegetable intake and inflammation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 6, p. 1384–1384, 2011.

HERMSDORFF, H. H. M.; et al. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 59, 2011.

HERMSDORFF, H. H. M.; et al. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. **European Journal of Nutrition**, 2011. v. 50, n. 1, p. 61–69.

HMPC, Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

HOLSCHER, H. et al. Almond Consumption and Processing Affects the Composition of the Gastrointestinal Microbiota of Healthy Adult Men and Women: A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 126, 2018.

HOLSCHER, H. D. et al. Walnut Consumption Alters the Gastrointestinal Microbiota, Microbially Derived Secondary Bile Acids, and Health Markers in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. 6, p. 861–867, 2018.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.

HOU, L. et al. The effect of *Bertholletia excelsa* on body weight, cholesterol, and c-reactive protein: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 57, p. 102636, 2021.

HRDINA, J. et al. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 8, p. 638–648, 2009.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **PharmacoEconomics**, v. 33, n. 7, p. 673–689, 2015.

HU, Y. et al. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, p. 1901–1911, 2016.

HUL, M. VAN et al. From correlation to causality: the case of *Subdoligranulum*. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1849998, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. 2010.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. vol. 39. 2011.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Coordenação de Trabalho e Rendimento.

Pesquisa Nacional de Saúde: 2019. Atenção primária à saúde e informações antropométricas. [S.l.]: [s.n.], 2019.

INC, INTERNATIONAL NUT & DRIED FRUIT COUNCIL FOUNDATION. 2016. Disponível em: <<https://www.nutfruit.org/consumers/news/detail/new-inc-research-grant>>. Acesso em: 20 març. 2022.

INCZEFI, O. et al. The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

IOM, INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary References Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids.** Panel on Macronutrients, Panel on the Definition of Dietary Fiber, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on In. [S.l.]: [s.n.], National Academy Press, Washington D.C, 2005.

IOM, INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids.** National Academy Press, Washington D.C, 2011. Disponível em: <<https://www.nap.edu/read/9810/chapter/9>>. Acesso em: 07 junh. 2022.

JALALI, M. et al. The effects of cashew nut intake on lipid profile and blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 50, p. 102387, 2020.

JONES, G. D. et al. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 11, p. 2848–2853, 2017.

KANG, S. et al. Rumen responses to dietary supplementation with cashew nut shell liquid and its cessation in sheep. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 11, p. 1549–1555, 2018.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375–C391, 2021.

KHANNA, D. et al. Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. **Cureus**, v. 14, n. 2, p. e22711, 2022.

KIM, M.-J. et al. Gut Microbiome Profiles in Colonizations with the Enteric Protozoa Blastocystis in Korean Populations. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 34, 2021.

KÖKTEN, T. et al. Calorie Restriction as a New Treatment of Inflammatory Diseases. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 1558–1570, 2021.

KONG, C. et al. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. **Nutrition**, v. 60, p. 175–184, 2019.

KOUTOUKIDIS, D. A. et al. The association of weight loss with changes in the gut microbiota diversity, composition, and intestinal permeability: a systematic review and meta-analysis. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, 2022.

LAMUEL-RAVENTOS, R. M.; ONGE, M.-P. St. Prebiotic nut compounds and human microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 3154–3163, 2017.

LATIFANI, D. et al. Nutrition Counseling with and without Modules towards Nutrition

Knowledge, Attitude, and Macronutrient Intake among Prediabetic Women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 66, p. S167–S172, 2020.

LAUTERBACH, M. A. R.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 469, n. 3–4, p. 385–396, 2017.

LECLERCQ, S. et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 42, 2014.

LEE, T. C. et al. The impact of polyunsaturated fatty acid-based dietary supplements on disease biomarkers in a metabolic syndrome/diabetes population. **Lipids in health and disease**, v. 13, p. 196, 2014.

LEITE, N. N. et al. Visceral adiposity index is positively associated with blood pressure: A systematic review. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 15, n. 6, p. 546–556, 2021.

LI, Yingxin et al. The effect of Brazil nuts on selenium levels, Glutathione peroxidase, and thyroid hormones: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 3, p. 1845–1852, 2020.

LIANG, J. Q. et al. A novel faecal *Lachnoclostridium* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer. **Gut**, v. 69, n. 7, p. 1248–1257, 2020.

LINSALATA, M. et al. Comparison of an enzymatic assay with liquid chromatography-pulsed amperometric detection for the determination of lactulose and mannitol in urine of healthy subjects and patients with active celiac disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 4, p. e61-64, 2014.

LINSALATA, M. et al. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. **BMC Gastroenterology**, v. 18, n. 1, p. 167, 2018.

LIU, F. et al. Selenium and vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat-stressed pigs. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 7, p. 801–810, 2016.

LIU, H. et al. Intestinal flora differences between patients with ulcerative colitis of different ethnic groups in China. **Medicine**, v. 100, n. 32, p. e26932, 2021.

LIU, X. et al. Changes in nut consumption influence long-term weight change in US men and women. **BMJ Nutrition, Prevention & Health**, v. 2, n. 2, p. 90–99, 2019.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29–41, 2017.

LUO, Y. et al. The Relationship Between Plasma Selenium, Antioxidant Status, Inflammatory Responses and Ischemic Cardiomyopathy: A Case-Control Study Based on Matched Propensity Scores. **Journal of Inflammation Research**, v. 15, p. 5757–5765, 2022.

MAEDA, K. et al. Network analysis and functional estimation of the microbiome reveal the effects of cashew nut shell liquid feeding on methanogen behaviour in the rumen. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 277–290, 2021.

MAH, E. et al. Cashew consumption reduces total and LDL cholesterol: a randomized,

crossover, controlled-feeding trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 5, p. 1070–1078, 2017.

MAHMOODPOOR, A. et al. The effects of selenium supplementation on inflammatory markers in critically ill patients. **SN Applied Sciences**, v. 4, n. 12, p. 326, 2022.

MANGIAPANE, E.; PESSIONE, A.; PESSIONE, E. Selenium and Selenoproteins: An Overview on Different Biological Systems. **Current Protein & Peptide Science**, v. 15, n. 6, p. 598–607, 2014.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423–444, 2015.

MARANHAO, P. A. et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2011.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A.; BES-RASTROLLO, M. Nut consumption, weight gain and obesity: Epidemiological evidence. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. S40–S45, 2011.

MASEKO, T. et al. Selenium-Enriched *Agaricus bisporus* Mushroom Protects against Increase in Gut Permeability ex vivo and Up-Regulates Glutathione Peroxidase 1 and 2 in Hyperthermally-Induced Oxidative Stress in Rats. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2478–2492, 2014.

MAZIDI, M. et al. Impact of different types of tree nut, peanut, and soy nut consumption on serum C-reactive protein (CRP). **Medicine**, v. 95, n. 44, p. e5165, 2016.

MAZIDI, M. et al. The impact of nuts consumption on glucose/insulin homeostasis and inflammation markers mediated by adiposity factors among American adults. **Oncotarget**, v. 9, n. 58, p. 31173–31186, 2018.

MEHDI, Y. et al. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292–3311, 2013.

MERA, R; THOMPSON, H; PRASAD, Chandan. How to calculate sample size for an experiment: a case-based description. **Nutr Neurosci**, [s. l.], v. 1, p. 87–91, 1998.

MICHELS, N. et al. Human microbiome and metabolic health: An overview of systematic reviews. **Obesity Reviews**, v. 23, n. 4, 2022.

MOITA, V. H. C. et al. Supplemental Effects of Functional Oils on the Modulation of Mucosa-Associated Microbiota, Intestinal Health, and Growth Performance of Nursery Pigs. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1591, 2021.

MORAES, P. O. et al. Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p. 5456–5464, 2019.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016.

MUKUDDEN-PETERSEN, J. et al. Effects of a high walnut and high cashew nut diet on selected markers of the metabolic syndrome: a controlled feeding trial. **The British journal of nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1144–1153, 2007.

- NAGPAL, R. et al. Obesity-Linked Gut Microbiome Dysbiosis Associated with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, p. 1–9, 2018.
- NEALE, E. P. et al. The effect of nut consumption on markers of inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ Open**, v. 7, n. 11, p. e016863, 2017.
- NEDIANI, C.; DINU, M. Oxidative Stress and Inflammation as Targets for Novel Preventive and Therapeutic Approaches in Non-Communicable Diseases II. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 824, 2022.
- NETTO CÂNDIDO, T. L. et al. Effect of the ingestion of vegetable oils associated with energy-restricted normofat diet on intestinal microbiota and permeability in overweight women. **Food Research International**, v. 139, p. 109951, 2021.
- NGOWI, E. E. et al. Impact of the factors shaping gut microbiota on obesity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 2131–2147, 2021.
- OJO, O. et al. The Effects of Almonds on Gut Microbiota, Glycometabolism, and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3377, 2021.
- OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M. A.; FIEBICH, B. L. Mechanisms of anti-inflammatory property of Anacardium occidentale stem bark: Inhibition of NF- κ B and MAPK signalling in the microglia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 42–49, 2013.
- OLIVEIRA, A. S. et al. The anti-inflammatory activity of Anacardium occidentale L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 236, p. 345–353, 2019.
- OLIVEIRA, T. M. S.; BRESSAN, J.; PIMENTA, A. M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.; HÉBERT, J. R.; HERMESDORFF, H. H. M. Dietary inflammatory index and prevalence of overweight and obesity in Brazilian graduates from the Cohort of Universities of Minas Gerais (CUME project). **Nutrition**, v. 71, p. 110635, 2020.
- ÖNAL, B. et al. The Anti-Inflammatory Effects of Anacardic Acid on a TNF- α - Induced Human Saphenous Vein Endothelial Cell Culture Model. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 710–719, 2020.
- ONASANWO, S. A. et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of the leaf extracts of Anacardium occidentale in the laboratory rodents. **Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria**, v. 27, n. 1, p. 65–71, 2012.
- OTT, B. et al. Effect of caloric restriction on gut permeability , inflammation markers , and fecal microbiota in obese women. **Scientific Reports**, v. 7, n. August, p. 1–10, 2017.
- PASCUAL, R. W. et al. Diet Quality and Micronutrient Intake among Long-Term Weight Loss Maintainers. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 3046, 2019.
- PIETERS, M. et al. Clustering of haemostatic variables and the effect of high cashew and walnut diets on these variables in metabolic syndrome patients. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 16, n. 6, p. 429–437, 2005.
- PRADO, W. L. Do et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a

- prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378–383, 2009.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2012.
- RAJARAM, S.; CONNELL, K. M.; SABATÉ, J. Effect of almond-enriched high-monounsaturated fat diet on selected markers of inflammation: a randomised, controlled, crossover study. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 6, p. 907–912, 2010.
- RAO, J. et al. Fecal microbiota transplantation ameliorates gut microbiota imbalance and intestinal barrier damage in rats with stress-induced depressive-like behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 11, p. 3598–3611, 2021.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.
- RÉGNIER, M. et al. Gut microbiome, endocrine control of gut barrier function and metabolic diseases. **Journal of Endocrinology**, v. 248, n. 2, p. R67–R82, 2021.
- REHM, C. D.; DREWNOWSKI, A. Replacing American snacks with tree nuts increases consumption of key nutrients among US children and adults: results of an NHANES modeling study. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, p. 17, 2017.
- REICHARDT, N. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **The ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014.
- RICO, R.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. **Food Science and Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 329–338, 2015.
- RIDAURA, V. K. et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. **Science**, v. 341, n. 6150, p. 1241–1244, 2013.
- RINNINELLA et al. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2393, 2019.
- RIVERA-CHÁVEZ, F. et al. Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 4, p. 443–454, 2016.
- ROCHA, D. M. U. P.; CALDAS, A. P. S.; SIMÕES E SILVA, A. C.; BRESSAN, J.; HERMESDORFF, H. H. M. Nut-enriched energy restricted diet has potential to decrease hunger in women at cardiometabolic risk: a randomized controlled trial (Brazilian Nuts Study). **Nutrition Research**, v. 109, p. 35–46, 2023.
- ROCK, C. L. et al. Effects of Pistachio Consumption in a Behavioral Weight Loss Intervention on Weight Change, Cardiometabolic Factors, and Dietary Intake. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2155, 2020.
- ROGERS, M. et al. Weight-loss intervention adherence and factors promoting adherence: a meta-analysis. **Patient Preference and Adherence**, v. 10, p. 1547–1559, 2016.
- ROHR, M. W. et al. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. **Advances in Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 71–91, 2019.
- ROS, E. Health Benefits of Nut Consumption. **Nutrients**, v. 2, n. 7, p. 652–682, 2010.

- ROS, E; HU, F. B. Consumption of Plant Seeds and Cardiovascular Health. **Circulation**, 30 jul. 2013. v. 128, n. 5, p. 553–565.
- ROSAS, M. et al. The Effects of Mixed Nut Consumption on the Microbiome in Healthy Adults. **Current Developments in Nutrition**, v. 4, n. Sup_2, p. 1580–1580, 2020.
- ROSS, L. J. et al. Effectiveness of dietetic consultation for lowering blood lipid levels in the management of cardiovascular disease risk: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition & Dietetics**, v. 76, n. 2, p. 199–210, 2019.
- ROTHWELL, J. et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. 2013. Disponível em: <<http://phenol-explorer.eu/credits>>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- RULL, A. et al. Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism. **Mediators of Inflammation**, p. 11, 2010.
- SABATÉ, J. Nut consumption and body weight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 647S-650S, 2003.
- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SCHWARZ, B. T. et al. LIGHT Signals Directly to Intestinal Epithelia to Cause Barrier Dysfunction via Cytoskeletal and Endocytic Mechanisms. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2383–2394, 2007.
- SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. R60, 2011.
- SIEGFRIED, R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. E. HPLC-Methode zur Bestimmung organischer Säuren in Silagen (A HPLC method to determine organic acids in silages). **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, p. 298–304, 1984.
- SILVA, A. C. T. Da et al. Nuts and Cardiovascular Diseases: Focus on Brazil Nuts. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 32, n. 3, 2019.
- SILVA, A. DA.; FELÍCIO, M. B.; CALDAS, A. P. S.; HERMSDORFF, H. H. M.; BERSCHFERREIRA, A. C.; TORREGLOSA, C. R.; SHIVAPPA, N.; HÉBERT, J. R.; WEBER, B.; BRESSAN, J. Pro-inflammatory diet is associated with a high number of cardiovascular events and ultra-processed foods consumption in patients in secondary care. **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 11, p. 3331–3340, 2021.
- SILVA, A. DA.; SILVEIRA, B. K. S.; FREITAS, B. V. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Effects of regular Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) consumption on health: An updated systematic review of clinical trials. **Foods**, v. In press, 2022.
- SILVEIRA, B. K. S.; OLIVEIRA, T. M. S.; ANDRADE, P. M.; HERMSDORFF, H. H. M.; ROSA, C. O. B.; FRANCESCHINI, S. C. C. Dietary Pattern and Macronutrients Profile on the Variation of Inflammatory Biomarkers: Scientific Update. **Cardiology Research and Practice**, v. 2018, p. 1–18, 2018.
- SILVEIRA, B. K. S.; NOVAES, J. F.; REIS, N. A.; CAPOBIANGO, A. M.; VIEIRA, S. A.;

HERMSDORFF, H. H. M. “ Traditional ” and “ Healthy ” Dietary Patterns Are Associated with Low Cardiometabolic Risk in Brazilian Subjects. **Cardiology Research and Practice**, 2018.

SILVEIRA, B. K. S.; SILVA, A. DA.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Effect of chronic consumption of nuts on oxidative stress: a systematic review of clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–12, 2020.

SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, G.; REYES-ROMERO, M. A. Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

SINGH, R. K. et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 73, 2017.

SIRACUSA, R. et al. The Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Anacardium occidentale L. Cashew Nuts in a Mouse Model of Colitis. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 834, 2020.

SMITH, K. B.; SMITH, M. S. Obesity Statistics. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 43, n. 1, p. 121–135, 2016.

SOMMER, F. et al. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 630–638, 2017.

SOUZA, N. C. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Anacardium occidentale Leaf Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–8, 2017.

STANISLAWSKI, M. A. et al. The Gut Microbiota during a Behavioral Weight Loss Intervention. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3248, 2021.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 2007.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. A Follow-up Study of the Chronic Kidney Disease Patients Treated with Brazil Nut: Focus on Inflammation and Oxidative Stress. **Biological Trace Element Research**, v. 163, n. 1–2, p. 67–72, 2015.

STOCKLER-PINTO, M. M. B. et al. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) Improves Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in Hemodialysis Patients. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, n. 1, p. 105–112, 2014.

SU, C. et al. Microbial community structure of the bovine rumen as affected by feeding cashew nut shell liquid, a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent. **Animal Science Journal**, v. 92, n. 1, 2021.

SUGIZAKI, C.; NAVES, M. Potential Prebiotic Properties of Nuts and Edible Seeds and Their Relationship to Obesity. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1645, 2018.

SUN, Lijuan et al. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. **Protein & Cell**, v. 9, n. 5, p. 397–403, 2018.

SUNG, B. et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the

inhib. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4880–4891, 2008.

TBCA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2022.

TACO, **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) – UNICAMP. 4a ed. Campinas, São Paulo. 2011.

TANG, W. et al. Modulation of the Gut Microbiota in Rats by Hupan Qingzhi Tablets during the Treatment of High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–14, 2018.

TAYLOR, C. L. Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion - Nuts and Coronary Heart Disease (Docket No 02P-0505). **U.S. Food & Drug Administration**, 2003.

TEIXEIRA, T. F. S.; COLLADO, M. C.; FERREIRA, C. L.L.F.; BRESSAN, J.; PELUZIO, M. C. G. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. **Nutrition Research**, v. 32, n. 9, p. 637–647, 2012.

TEIXEIRA, T. F. S.; SOUZA, N. C.S.; CHIARELLO, P. G.; FRANCESCHINI, S. C.C.; BRESSAN, J.; FERREIRA, C. L.L.F.; PELUZIO, M. C. G. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 735–740, 2012.

TILVES, C. et al. A behavioral weight-loss intervention, but not metformin, decreases a marker of gut barrier permeability: results from the SPIRIT randomized trial. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 3, p. 655–660, 2022.

TONG, L. et al. Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 2016.

TREMMEL, M. et al. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TWARDOWSKA, A. et al. Preventing Bacterial Translocation in Patients with Leaky Gut Syndrome: Nutrition and Pharmacological Treatment Options. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3204, 2022.

UKHANOVA, M. et al. Effects of almond and pistachio consumption on gut microbiota composition in a randomised cross-over human feeding study. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 12, p. 2146–2152, 2014.

USUDA, H.; OKAMOTO, T.; WADA, K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 14, 2021.

VACCA, M. et al. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 573, 2020.

VIEIRA, A. M. et al. Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with monensin or functional oils in response to challenge by *Eimeria* spp. **PLOS ONE**, v. 15, n. 8,

p. e0237118, 2020.

VIEIRA, A. M. et al. Effect of functional oils or probiotics on performance and microbiota profile of newly weaned piglets. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19457, 2021.

VIRDIS, A. Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 23, n. 2, p. 83–85, 2016.

WANG, C.-S.-E. et al. VSL#3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 37, p. 4254–4262, 2018.

WANG, J. et al. Mixed Tree Nut Snacks Compared to Refined Carbohydrate Snacks Resulted in Weight Loss and Increased Satiety during Both Weight Loss and Weight Maintenance: A 24-Week Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1512, 2021.

WANG, Shu et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2014.

WANG, Yajie et al. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104248, 2020.

WEBER, C. R. et al. Epithelial Myosin Light Chain Kinase Activation Induces Mucosal Interleukin-13 Expression to Alter Tight Junction Ion Selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 16, p. 12037–12046, 2010.

WEN, X. et al. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 298, 2022.

WHO. World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases**. p. 176. 2014.

WHO, World Health Organization. **BMI classification**. 2017. Disponível em: <<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

WHO, World Health Organization. Fact sheets: **Obesity and Overweight**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

XU, Q. et al. Propionate Ameliorates Alcohol-Induced Liver Injury in Mice via the Gut–Liver Axis: Focus on the Improvement of Intestinal Permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 6084–6096, 2022.

YANG, Jun. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573–1580, 2009.

YANG, S.-C. et al. High Fat Diet with a High Monounsaturated Fatty Acid and Polyunsaturated/Saturated Fatty Acid Ratio Suppresses Body Fat Accumulation and Weight Gain in Obese Hamsters. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1148, 2017.

YE, R. et al. Trace Element Selenium Effectively Alleviates Intestinal Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11708, 2021.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017.

ZENG, Q. et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

ZHAO, L. et al. A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4644–4656 2017.

ZMORA, N. et al. The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 506–521, 2017.

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido (ESTUDO 1)

ESTUDO
castanhas brasileiras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Folha 1/2)

Você está sendo convidada com voluntária a participar da pesquisa “Efeito do Consumo de um mix de Castanhas sobre a redução do Peso e Composição Corporal, Apetite, Ingestão Alimentar, Reguladores Metabólicos e Marcadores Genéticos”. Todas as informações necessárias sobre a pesquisa encontram-se descritas abaixo e caso existam dúvidas, favor esclarecê-las antes da assinatura do presente termo.

Título do projeto de pesquisa: Efeito do Consumo de um mix de Castanhas sobre a redução do Peso e Composição Corporal, Apetite, Ingestão Alimentar, Reguladores Metabólicos e Marcadores Genéticos.

Pesquisadores responsáveis: Professores Josefina Bressan (coordenadora) e Helen Hermana Miranda Hermsdorff

1. Objetivos do estudo

Avaliar o efeito de um acompanhamento nutricional com dieta restritiva, associada ou não a uma suplementação de castanhas (castanha de caju e/ou castanha-do-Brasil), sobre a perda de peso, ingestão alimentar, marcadores bioquímicos e parâmetros comportamentais em mulheres adultas com excesso de peso.

2. Dos procedimentos para a coleta de dados:

Local de execução: A pesquisa será desenvolvida no Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC) do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Voluntários: Mulheres adultas (20 a 55 anos) com excesso de peso ($\geq 27 \text{ kg/m}^2$, $\geq 32\%$ gordura corporal e perímetro da cintura $\geq 80 \text{ cm}$), que estão a procura de acompanhamento nutricional para emagrecimento e que apresentem alteração na pressão arterial ($\geq 130/\geq 85 \text{ mmHg}$ ou anti-hipertensivo), na glicemia ($\geq 100 \text{ mg/dL}$ ou medicação hipoglicemiante) ou triglicérides ($\geq 150 \text{ mg/dL}$ ou medicação).

Coleta de dados: Todos os voluntários do estudo responderão a questionários estruturados contendo perguntas sobre história clínica e socioeconômica, hábitos alimentares, nível de atividade física, comportamental frente ao alimento, e qualidade do sono. O acompanhamento terá duração de 8 semanas e a coleta dos dados será realizado no início, durante, e ao final do estudo. Durante esse período o voluntário seguirá uma dieta individualizada com ou sem redução de 500 calorias, a qual poderá ou não ser acompanhada da ingestão de 45g de uma mistura de castanhas fornecida semanalmente pelos pesquisadores. Os parâmetros avaliados serão: peso, altura, gordura corporal, gasto de energia, análises sanguíneas completas e atividade de genes relacionados com inflamação, estresse oxidativo e metabolismo. Para a avaliação dos dados, será necessário coletar amostras de sangue e urina, no início e ao final do estudo. Durante esse período de acompanhamento nutricional, os voluntários serão orientados a manter o nível de atividade física habitual e a não ingerir bebida alcoólica.

Da utilização e armazenamento dos dados: Os dados coletados serão arquivados no laboratório de realização da pesquisa assegurando-se a privacidade dos participantes e ficarão à disposição da equipe envolvida no projeto. Estes dados poderão ser utilizados para a publicação de trabalhos científicos e outros materiais, sendo assegurado o sigilo dos voluntários. Além disso, os mesmos serão divulgados apenas de forma agregada na forma de gráficos e/ou tabelas em veículos acadêmicos.

3. Dos benefícios para os indivíduos

Todos participantes incluídos na pesquisa terão seu estado nutricional avaliado e receberão acompanhamento nutricional por 8 semanas, exceto em caso de desistência, visando a perda de peso e a promoção da sua saúde. Além disso, os participantes do estudo terão acesso aos seus dados de avaliação antropométrica, composição corporal e bioquímicos.

4. Dos potenciais riscos para os indivíduos

Não existem riscos para a saúde dos participantes, pois os procedimentos invasivos serão realizados por pessoas treinadas, minimizando ao máximo eventuais desconfortos. A coleta de sangue será realizada por um técnico em enfermagem, utilizando apenas materiais descartáveis, sendo possível uma sensação incômoda ou dolorida na hora de inserir a agulha e formação de hematomas no local da entrada da agulha algumas horas após o teste. No caso de eventuais complicações no momento da punção venosa, serão prestados os primeiros socorros no local pelo técnico em enfermagem e, caso aja necessidade, o voluntário será encaminhado para a Divisão de Saúde e receberá os cuidados necessários. Ainda, os alimentos fornecidos no estudo terão boa procedência e qualidade e serão bem acondicionados visando manutenção da qualidade nutricional e microbiológica.

A equipe de trabalho não se responsabiliza por informações não prestadas pelo avaliado, que possam interferir na sua saúde. O voluntário também terá direito à indenização caso ocorram danos não previstos na pesquisa.

5. Da assistência

Durante a pesquisa, os voluntários receberão avaliações nutricionais completas de maneira individualizada, como avaliações da perda de peso e composição corporal.

ESTUDO
castanhas brasileiras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Folha 2/2)

6. Das despesas

A participação como voluntário na presente pesquisa não resultará em qualquer ônus. Além disso, não haverá nenhuma forma de contrato de trabalho ou remuneração para com as voluntárias.

7. Da garantia de recusar, desistir ou revogar o consentimento

A participação no estudo é voluntária e você pode recusar-se a participar ou pode se retirar do estudo a qualquer momento sem justificativa ou penalização desde que formalizem por escrito.

Eu, _____,

fui informada dos objetivos da pesquisa "Efeito do Consumo de um mix de Castanhas sobre a redução do Peso e Composição Corporal, Appetite, Ingestão Alimentar, Reguladores Metabólicos e Marcadores Genéticos", de maneira clara e detalhada, e esclareci as minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Nome do pesquisador Responsável: _____

Endereço: Av. P.H. Rolfs s/n. Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC), Departamento de Nutrição e Saúde, Centro de Ciências Biológicas II, sala 50, 6º andar. Campus Universitário. Viçosa/MG.

Telefone: (31) 3988-3388

E-mail: castanhasbrasileiras@gmail.com

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres

Humanos Universidade Federal de Viçosa

Edifício Arthur Bernardes, piso inferior

Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário

Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31)3899-2492

Email: cep@ufv.br

www.cep.ufv.br

Viçosa, _____ de _____ de 20_____

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

Termo de consentimento livre e esclarecido (ESTUDO 2)

ESTUDO castanhas brasileiras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FOLHA 1/4)

A Sra. está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Efeito do consumo diário de castanha-do-Brasil (*BERTHOLETIA EXCELSA H.B.K*) sobre redução do peso e composição corporal, metabolismo energético, apetite, ingestão alimentar, reguladores metabólicos e marcadores genéticos”. Nesta pesquisa nós pretendemos avaliar o efeito de uma dieta reduzida em calorias associada ou não ao consumo diário de amêndoas de castanha-do-Brasil sobre a perda de peso e regulação metabólica em mulheres adultas com excesso de peso e risco cardiometabólico. O motivo que nos leva a estudar a castanha-do-Brasil é o grande valor nutricional desse alimento e seus prováveis benefícios para a saúde.

Esse estudo terá duração de 8 semanas e a coleta dos dados será realizada ao início, durante e ao final do estudo. Ao longo desse período a Sra. seguirá uma dieta reduzida em calorias acompanhada da ingestão de castanha-do-Brasil, a qual será fornecida quinzenalmente pelos pesquisadores. Além disso, enquanto participar do estudo a Sra. deverá manter o nível de atividade física habitual e evitar o consumo de bebida alcoólica.

Ao iniciar e ao finalizar sua participação no estudo, a Sra. deverá comparecer ao laboratório em duas ocasiões. Na primeira será realizado o teste de permeabilidade intestinal e na segunda as demais avaliações do estudo. Em ambos os dias será necessário a realização de jejum noturno de 10-12 horas. Nas noites anteriores à realização do jejum, a Sra. deverá consumir um jantar padrão (sanduíche e suco), fornecido pelos pesquisadores. No dia do teste de permeabilidade intestinal, a Sra. comparecerá ao laboratório em jejum, onde fará a ingestão de uma bebida contendo açúcares. Em seguida, deverá permanecer no laboratório por um período de 4 horas, durante o qual serão coletadas amostras de urina em um frasco apropriado. Ao final do teste, será fornecido um almoço e a Sra. será liberada para suas atividades habituais.

No segundo dia de testes, a Sra. também deverá comparecer ao laboratório após jejum (10-12 horas) e fará a ingestão de uma bebida contendo amêndoa de castanha-do-Brasil. Em seguida, permanecerá no laboratório por cerca de 6 horas, e após, também receberá um almoço fornecido pelos pesquisadores. Nesse dia será realizado a avaliação do peso, altura, gordura corporal, gasto de energia e coleta de amostras de urina durante o período de permanência no laboratório e de sangue (20 ml) em jejum e 1, 2 e 4 horas após o desjejum. Nessa ocasião, como parte dos procedimentos da pesquisa, a Sra. responderá a questionários estruturados contendo perguntas sobre sua história clínica e socioeconômica, hábitos alimentares, nível de atividade física, comportamento frente ao alimento e qualidade do sono, com tempo e aplicação previsto em 1 hora. Ademais, as amostras de fezes deverão ser entregues ao início e ao final do estudo, em um dia de sua escolha. A partir dos dados e amostras coletadas durante o estudo, serão realizadas análises sanguíneas completas, avaliação de micro-organismos intestinais e atividade de genes relacionados com inflamação, estresse oxidativo e metabolismo.

ESTUDO
castanhas brasileiras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FOLHA 2/4)

Todos procedimentos invasivos indispensáveis ao estudo serão realizados por profissionais treinadas, minimizando ao máximo eventuais riscos e desconfortos. A coleta de sangue será realizada por um técnico em enfermagem, utilizando apenas materiais descartáveis, sendo possível uma sensação incômoda ou dolorida na hora de inserir a agulha e formação de hematomas no local da entrada da agulha algumas horas após o teste. O técnico em enfermagem será orientado a ser o mais preciso possível para evitar estes incômodos. No caso de eventuais complicações no momento da punção venosa, serão prestados os primeiros socorros no local pelo técnico em enfermagem e, caso haja necessidade, a Sra. será encaminhada para a Divisão de Saúde para demais cuidados. O uso da bioimpedância elétrica para avaliação da gordura corporal é desaconselhado a pessoas que possuam marca-passos ou quaisquer aparelhos eletrônicos semelhantes, pinos, placas metálicas e gestantes. Na ausência dessas restrições, a realização do exame de bioimpedância elétrica não está associada a prejuízos à saúde. Durante a realização das sessões de calorimetria indireta (Deltatrac) para avaliação do gasto de energia, a Sra. deverá permanecer deitada em decúbito dorsal (de costas) em uma maca, por um período de 20 minutos/sessão, movendo-se o mínimo possível. Esse procedimento será realizado em uma sala fechada, com temperatura controlada, e será permitido assistir televisão, caso a Sra. deseje. Os alimentos fornecidos no estudo serão elaborados com matéria prima de boa procedência e qualidade, os quais serão bem acondicionados visando manutenção da qualidade nutricional e microbiológica.

Para evitar qualquer tipo de constrangimento no momento da aferição das medidas e preservar a sua privacidade a avaliação antropométrica será realizada em uma sala fechada, silenciosa, por um profissional treinado. Durante a aplicação dos questionários, a Sra. poderá deixar de responder a uma ou a um conjunto de perguntas caso sinta-se constrangida, sem que isso traga qualquer alteração na relação de tratamento por parte dos pesquisadores. Da mesma forma, as amostras biológicas de fezes e urina serão coletadas e entregues em frascos adequados, fornecidos pelos pesquisadores, e sem identificação nominal.

Quanto aos benefícios, a Sra. terá seu estado nutricional avaliado e receberá um plano alimentar individualizado, visando a redução de peso corporal. Além disso, tanto o consumo de castanhas quanto a dieta restrita em calorias estão associados a benefícios à saúde. Ainda, a Sra. terá acesso aos seus dados de avaliação antropométrica, composição corporal e exames bioquímicos. Ao final do estudo, a Sra. receberá um novo plano alimentar individualizado, visando a manutenção de hábitos alimentares saudáveis e a adequação dos marcadores bioquímicos que se apresentarem fora dos níveis de normalidade.

Para participar deste estudo a Sra. não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da

ESTUDO
castanhas brasileiras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FOLHA 3/4)

pesquisa, a Sra. tem assegurado o direito à indenização. A Sra. tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que a Sra. é atendida pelos pesquisadores. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. A Sra. não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC - UFV)” e a outra será fornecida à Sra.

Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de “cinco anos” após o término da pesquisa. Depois desse tempo, os mesmos serão destruídos.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, contato _____, fui informada dos objetivos da pesquisa **“Efeito do consumo diário de castanha-do-Brasil (*BERTHOLETIA EXCELSA H.B.K*) sobre redução do peso e composição corporal, metabolismo energético, apetite, ingestão alimentar, reguladores metabólicos e marcadores genéticos”** de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo o em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Pesquisadores Responsáveis:

Dra. Josefina Bressan – (31) 36125220
Dra. Helen Hermana Miranda Hermsdorff – (31) 36125220
Alessandra Silva – (32) 984547578
Brenda Kelly Souza Silveira – (31) 36125220

Endereço: Av. P.H. Rolfs s/n. Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC), Departamento de Nutrição e Saúde, Centro de Ciências Biológicas II, sala 50, 6º andar. Campus Universitário. Viçosa/MG.

Telefone: (31) 36125220

E-mail: castanhasbrasileiras@gmail.com

ESTUDO
castanhas brasileiras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FOLHA 4/4)

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, a Sra. poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Universidade Federal de Viçosa
Edifício Arthur Bernardes, piso inferior
Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário
Cep: 36570-900 Viçosa/MG
Telefone: (31) 3612-2316
E-mail: cep@ufv.br
www.cep.ufv.br

Viçosa, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM PRESENCIAL

ESTUDO
castanhas brasileiras

QUESTIONÁRIO: TRIAGEM PRESENCIAL (Folha 1/3)

I. IDENTIFICAÇÃO	
Data de aplicação: ___/___/___	Pesquisador responsável: _____
Nome: _____	Data de nascimento: ___/___/___
Idade: _____	Se idade < 20 anos ou > 55 anos, exclusão
E-mail: _____	Endereço: _____
Complemento: _____	CEP: _____ Fone: () _____ / () _____

II. ANTROPOMETRIA E COMPOSIÇÃO CORPORAL		
Peso usual (kg): _____	Peso (kg): _____	Ganho/perda 5% peso (3 m): () NÃO () SIM - exclusão
Altura (m): _____	IMC (kg/m ²): _____	27 kg/m ² < IMC: () NÃO () SIM - exclusão
PC umbilical (cm): _____	PQ (cm): _____	PC < 80 cm: () NÃO () SIM - exclusão
PPescoço (cm): _____		
Gordura (%): _____	Gordura (kg): _____	GC < 32 %: () NÃO () SIM - exclusão
TMB (Kcal/dia): _____	MM (kg): _____	
Água (L): _____	Água (% peso): _____	

III. PRESSÃO ARTERIAL E EXAMES BIOQUÍMICOS		
PAS (mmHg): _____	PAD (mmHg): _____	>130 e/ou >85 mmHg ou medicação: () NÃO () SIM - tem fator de risco
Medicamento para HAS: () NÃO () SIM		
Glicemia (mg/dL): _____	Hipoglicemiante: () NÃO () SIM Insulina: () NÃO () SIM - exclusão	>100 mg/dL ou hipoglicemiante ou DM2: () NÃO () SIM - tem fator de risco
DM: () NÃO () SIM, tipo 1 - exclusão () SIM, tipo 2		
Triglicérideo (mg/dL): _____	Medicamento (sinvastatina): () NÃO () SIM	≥150 mg/dL ou medicamento: () NÃO () SIM - tem fator de risco

Apresenta excesso de peso mais um fator de risco adicional?

() **NÃO - EXCLUIR** () CONFIRMAR, solicitar exames, e continuar triagem

IV. HISTÓRIA CLÍNICA

	Você / a sra. fuma ou já fumou?
	() Não fumante
1.	Ex Fumante há: () mais de 1 ano () < 1 ano - exclusão () Fumante - exclusão
2.	Você é atleta, pratica crossfit ou faz atividade física intensa/vigorosa: () NÃO () SIM - exclusão
3.	Você é gestante ou está amamentando ou está na menopausa: () NÃO () SIM - exclusão
4.	Você planeja engravidar num futuro próximo (nos próximos 3 meses): () NÃO () SIM - exclusão
5.	Você tem algum problema de dentição ou mastigação (próteses, aparelho): () NÃO () SIM - exclusão
6.	Atualmente, você faz uso de algum medicamento (incluindo anticoncepcionais)? Qual (is)? Liste também os medicamentos utilizados no último mês.

ESTUDO
castanhas brasileiras

QUESTIONÁRIO: TRIAGEM PRESENCIAL (Folha 2/3)

14. Atualmente, você faz uso de algum medicamento (incluindo anticoncepcionais)? Qual (is)? Liste também os medicamentos utilizados no último mês.				
Medicamentos	Posologia		Tempo de uso	Razão para o uso
	Dosagem	Frequência		
15. Você / a sra. já apresentou ou têm alguma das seguintes doenças?				
Doenças/Alterações	NÃO	SIM (exclusão)		
Alergia (ex. cutânea, respiratória, alimentar, outras)				
Anorexia/Bulimia				
Bronquite/Asma				
Câncer				
Doença cardiovascular (ex. ataque cardíaco, derrame, insuficiência coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, AVC, infarto agudo do miocárdio, etc)				
Doença celíaca, doença intestinal crônica, alterações no TGI (ex. retirada de vesícula)				
Doença renal				
Doenças/ alterações neurológicas ou psiquiátricas (ex. esquizofrenia, transtorno de ansiedade, depressão)				
Hipoglicemia				
HIV/Aids				
Tireoidopatias (ex. hipo ou hipertireoidismo)				
Outras doenças crônicas (que afetem o estudo)				
V. HISTÓRIA DIETÉTICA				
16. Você apresenta alergia, intolerância ou aversão a alimentos como, castanhas, leite e derivados, como creme de leite, macarrão e outros: () NÃO () SIM - exclusão				
17. Você pratica algum tipo de restrição alimentar de cunho religioso (promessa): () NÃO () SIM - exclusão				
18. Você consome castanhas: : () NÃO () SIM, esporadicamente () SIM, todos os dias (>30g) - exclusão				
19. Você está seguindo alguma dieta, restrição ou faz acompanhamento nutricional: () NÃO () SIM - exclusão				
20. Você faz uso de suplemento (vitaminas, minerais, ômega 3, proteína ou outros?): () NÃO () SIM - exclusão				
21. Qual quantidade e frequência do consumo de bebidas alcólicas?				
Bebida	Unidade (s)	Frequência	g álcool	
Cerveja				
Cachaça/Caipirinha				
Vinho				
Whisky				
Vodka				
Outro? Qual?				
() Consumo de álcool < 23g/dia () Consumo de álcool >= 23g/dia - exclusão				

ESTUDO
castanhas brasileiras

QUESTIONÁRIO: TRIAGEM PRESENCIAL (3/3)

22.	Indique as horas do dia em que você consome refeições e lanches. Coloque a letra R para refeições e L											
AM (manhã e início da tarde)												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
PM (dia e noite)												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
II. DADOS SOCIOECONÔMICOS E DEMOGRÁFICOS												
3. Escolaridade:												
<input type="checkbox"/> Analfabeto - exclusão				<input type="checkbox"/> Sabe ler e escrever								
<input type="checkbox"/> Fundamental Incompleto				<input type="checkbox"/> Fundamental Completo								
<input type="checkbox"/> Médio Incompleto				<input type="checkbox"/> Médio Completo					<input type="checkbox"/> Técnico			
<input type="checkbox"/> Superior Incompleto				<input type="checkbox"/> Superior Completo								
<input type="checkbox"/> Pós-graduação Incompleto				<input type="checkbox"/> Pós-graduação Completo								
<input type="checkbox"/> Profissão: _____												
I Raça												
<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Preta <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Outro												
2. Estado civil:												
<input type="checkbox"/> Solteira <input type="checkbox"/> Casada ou união estável <input type="checkbox"/> Divorciada <input type="checkbox"/> Viúva												
4. Renda Familiar												
<input type="checkbox"/> R\$ 2.811,01 – 4.685,00 (3 a 5 salários)												
<input type="checkbox"/> Até R\$ 937,00 (1 salário)				<input type="checkbox"/> R\$ 4.685,01 – 9.370,00 (5 a 10 salários)								
<input type="checkbox"/> R\$ 937,01 – 1.874,00 (1 a 2 salários)				<input type="checkbox"/> R\$ 9.370,01 – 18.740,00 (10 a 20 salários)								
<input type="checkbox"/> R\$ 1.874,01 – 2.811 (2 a 3 salários)				<input type="checkbox"/> R\$ 18.740,01 ou mais (> 20 salários)								
Quantas pessoas vivem na sua casa (incluindo o voluntário)? _____												

APÊNDICE 3 – MODELOS DE CARDÁPIOS DO GRUPO INTERVENÇÃO COM CASTANHAS BRASILEIRAS

ESTUDO
castanhas brasileiras

PLANO ALIMENTAR

Cardápio 01

Valor calórico total: 1800 Kcal

Nome: _____

REFEIÇÃO	ALIMENTOS	MEDIDA CASEIRA	QUANTIDADE
Café da manhã	iogurte desnatado	1 pote	90 g
	Granola	1 colher de sopa rasas	10 g
	Mamão	1 fatias P	100 g
	Torrada	2 unid	12 g
Colação	Mix de castanhas:		
	Castanha-do-brasil	1 pacote	15 g
	Castanha de caju		30 g
Almoço	Arroz branco cozido	3 colheres de sopa Ch	75 g
	Feijão carioca cozido	1 concha M rasa	80 g
	Carne bovina magra, grelhada	1 bife M	100 g
	Abóbora cabotina cozida	3 colheres de sopa Ch	108 g
	Alface lisa crua	3 folhas M	30 g
	Beterraba cozida	3 fatias P	18 g
	Tomate	2 fatias P	20 g
	Melancia	1 fatia P	100 g
Lanche da tarde	Café ou chá adoçado com adoçante	1 xícara de café	60 mL
	Pão de forma	2 fatias	50 g
	Requeijão light	1 colher de sopa Ch	30 g
	Maçã	1/2 unid P	45 g
Jantar	Sanduíche de frango:		
	Pão de forma integral	2 fatias	50 g
	Peito de frango	1 filé M	100 g
	Óleo (preparo do frango)	1 colher de sopa rasa	5 g
	Requeijão light	1 1/2 colheres de sopa Ch	45 g
	Cenoura crua ralada	3 colheres de sopa Ch ralada	36 g
	Tomate	2 fatias P	20 g
	Alface	4 folhas M	40 g
Suco de fruta, sem açúcar	1 de copo P	150 mL	

ESTUDO
castanhas brasileiras

PLANO ALIMENTAR

Cardápio 02

Valor calórico total: 1800 Kcal

Nome: _____

REFEIÇÃO	ALIMENTOS	MEDIDA CASEIRA	QUANTIDADE
Café da manhã	Bolo de trigo simples	1 fatia M	50 g
	Suco de laranja natural	1 copo americano Ch	165 mL
	Queijo ricota	1 fatia P	20 g
Colação	Mix de castanhas:		
	Castanha-do-brasil	1 pacote	15 g
	Castanha de caju		30 g
Almoço	Arroz branco cozido	3 colheres de sopa Ch	100 g
	Feijão carioca cozido	1 concha M rasa	80 g
	Porco, lombo, assado	1 bife M	100 g
	Couve manteiga refogado	2 colheres de sopa Ch	40 g
	Alface americana crua	2 folhas M	20 g
	Tomate cru	3 fatias M	45 g
	Beterraba crua ralada	2 colheres de sopa Ch	32 g
	Maçã	1 unid. P	
Lanche da tarde	Café ou chá adoçado com adoçante	1 xícara de chá	200 mL
	Requeijão light	1 colher de sopa rasa	15 g
	Biscoito cream-cracker	5 unidades	37,2 g
	Melão	1 fatia G	115g
Jantar	Pão de forma integral	3 fatias	75 g
	Atum conserva em óleo	5 colheres de sopa Ch	80 g
	Requeijão light	1 colher de sopa Ch	30 g
	Cenoura crua ralada	4 colheres de sopa Ch	48 g
	Tomate	4 fatias M	60 g
	Alface	2 folhas M	20 g
	Goiaba vermelha	1 unidade M	170 g

APÊNDICE 4 – CÁLCULO AMOSTRAL

Cálculo amostral do estudo 1: O tamanho amostral foi calculado conforme proposto por Mera; Thompson; Prasad (1998), adotando-se um poder estatístico de 80% ($\alpha \leq 0,05$). Foram selecionadas as duas medidas mais utilizadas em estudos de intervenção que avaliam a perda de peso em populações com risco cardiovascular: IMC e o perímetro da cintura (PC). Nesse sentido, considerou-se uma diferença esperada de 4% no IMC e 2% no PC. Foram utilizados como referência os valores de *baseline* do estudo “Effects of Daily Consumption of Cashews on Oxidative Stress and Atherogenic Indices in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, Controlled-Feeding Trial” (DARVISH DAMAVANDI et al., 2019), conforme apresentado a seguir:

Fórmula proposta por Mera; Thompson; Prasad (1998):

$$N = \frac{2 \times (t_{\alpha/2} \times DP)^2}{E^2}$$

$t_{\alpha/2}$ = Valor da tabela de distribuição t (two-tailed), segundo o grau de liberdade

DP = desvio padrão

E = diferença que se deseja detectar no estudo

Estimativa do n amostral:

$$GL = n-1 \rightarrow GL = 43-1 \rightarrow GL = 42$$

$t_{\alpha/2}$ considerando um poder estatístico de 80% (nível $\alpha \leq 0,05$) e 21 GL= 1,323

$$DP = 3,1$$

Considerando uma diferença de 4% no IMC: $39 \times 0,04 = 1,56$

$$n = \frac{2 \times (1,323 \times 3,1)^2}{(1,56)^2} \rightarrow n = \frac{2 \times (16,81)}{2,43} \rightarrow n = 13,8 \sim 14 \text{ voluntários por grupo}$$

Aplicando-se 30% de perdas no seguimento = **mínimo 18 voluntários por grupo**

O mesmo cálculo foi efetuado para o perímetro da cintura (PC), considerando-se uma diferença esperada de 2% e DP = 3,7. Desse modo:

$$n = \frac{2 \times (1,323 \times 3,7)^2}{(2,0)^2} \rightarrow n = \frac{2 \times (23,96)}{4,0} \rightarrow n = 11,9 \sim 12 \text{ voluntários por grupo}$$

Aplicando-se 30% de perdas no seguimento = **mínimo 16 voluntários por grupo**

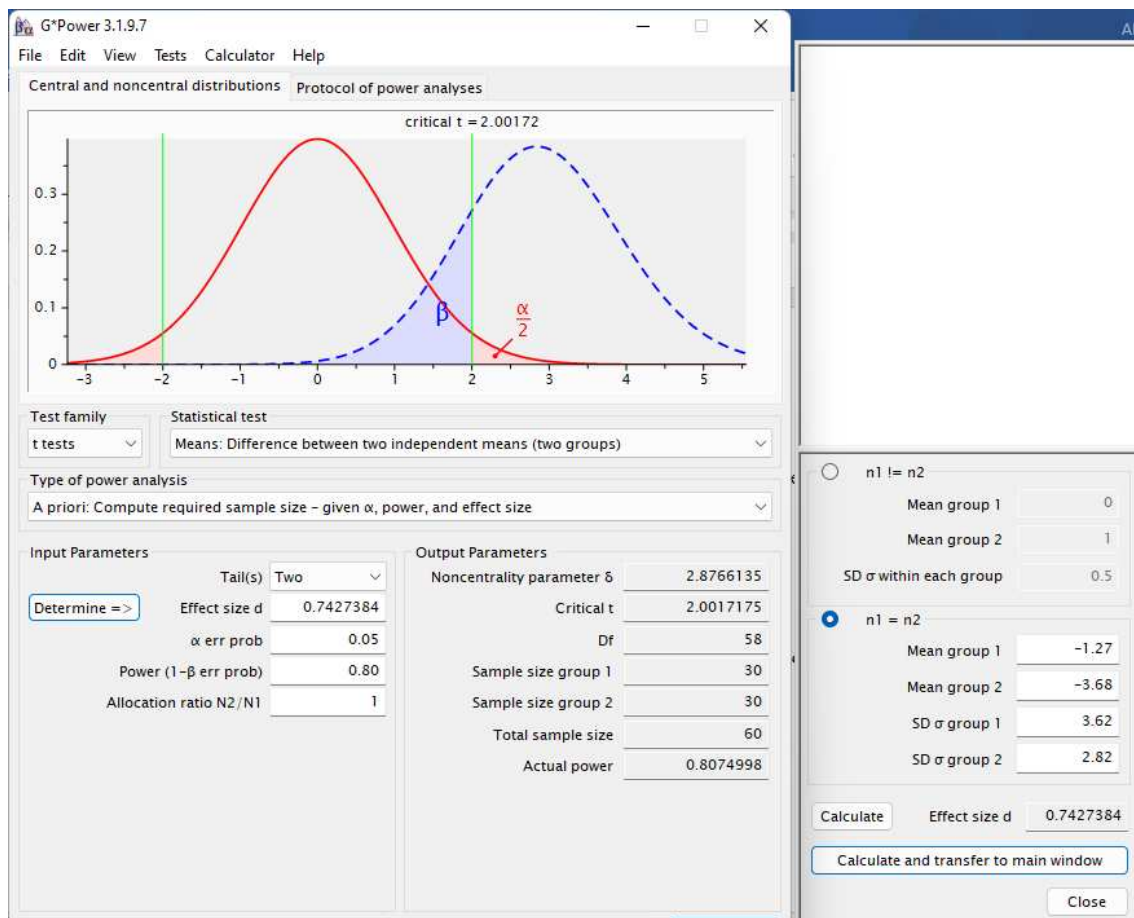
Portanto, considerou-se o maior valor necessário pra que se observe mudanças nos desfechos selecionados, o que significa a inclusão de pelo menos 18 participantes por grupo.

Cálculo amostral do estudo 2: De acordo com o cálculo amostral, cada grupo devia conter, no mínimo, 30 participantes. Esse valor foi definido com base no cálculo amostral, utilizando o software GPower v. 3.1.9.7, e adotando-se um poder estatístico de 80% ($\alpha \leq 0,05$), a fim de identificar diferença na média entre dois grupos independentes. Consideramos a perda de peso como desfecho primário e utilizamos como referência as diferenças na perda de peso encontradas no estudo “*The effect of almonds on anthropometric measurements and lipid profile in overweight and obese females in a weight reduction program: A randomized controlled clinical trial*” (ABAZARFARD; SALEHI; KESHAVARZI; 2014)

Perda de peso controle = -1,27 (SD 3,62) kg, n do grupo = 50

Perda de peso grupo intervenção = -3,68 (SD 2,82), n do grupo = 50

Desse modo, seriam necessárias 30 participantes por grupo.



11. ARTIGOS CIENTÍFICOS E PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO TEMA DA TESE

1. Artigo de Revisão 1 (Qualis A1, fator de impacto 3,549)

CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1828262>



REVIEW



Effect of chronic consumption of nuts on oxidative stress: a systematic review of clinical trials

Brenda Kelly Souza Silveira , Alessandra da Silva , Helen Hermana Miranda Hermsdorff , and Josefina Bressan

Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

ABSTRACT

Nuts consumption has been associated with a protective effect against cardiovascular diseases and oxidative stress-related disorders. We aimed to perform a systematic review with clinical trials to assess the impact of chronic nuts consumption on oxidative stress and the possible mechanisms involved. Studies were identified by searching in three electronic databases: PubMed/MEDLINE, Scopus, and LILACS, and selected following PRISMA guidelines. Two authors perform searching and data extraction. A total of 16 articles were included (12 randomized clinical trials and 4 one or two-arm clinical trials). Nut doses were generally high (> 30 g/d), except for Brazil nuts (5–13 g/d). The follow-up time ranges between four weeks and six months, and the oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) was the most assessed biomarker. Eight articles reported improvement in oxidative stress biomarkers after nuts supplementation. Pathways regulated by selenium (e.g. glutathione peroxidase activity and nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) regulation), mono-unsaturated fatty acids (e.g. reduction of LDL oxidation), and bioactive compounds (e.g. antioxidant activity) were described as mechanisms involved in these beneficial effects. No studies reported harmful effects of nut consumption, even in high doses. The chronic consumption of nuts seemed to be effective to change some oxidative stress biomarkers, however, this topic remains controversial because the benefits depends on nut type, nut dose, and population characteristics.

KEYWORDS

Health; humans; antioxidants; oxidized LDL; selenium; functional foods

Introduction

Oxidative stress is involved in genesis and progression of chronic diseases, such as obesity, diabetes, and cardiovascular diseases (WHO 2018). The oxidative status is characterized by excessive reactive oxygen species (ROS) with an imbalance between oxidants and antioxidants compounds (Farzaei et al. 2018). Excessive ROS production starts harmful effects in cellular membranes, signaling proteins, and even DNA. A defense system of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), protect human cells from ROS-induced damage (Pizzino et al. 2017).

The redox balance is controlled by several defense systems. For this reason, a lot of biomarkers are used to investigate oxidative stress outcomes (Frijhoff et al. 2015; Marrocco et al. 2017). In this regard, there is no better biomarker, because each one represents a different system, which may difficult to infer about oxidative stress extent (Frijhoff et al. 2015). For example, GPx, CAT and SOD are antioxidant enzymes. The ox-LDL is produced by reaction with free radicals and plays a role in atherosclerosis triggering (Kattoor, Kanuri, and Mehta 2019). The deoxyguanosine

(8-OHdG) is a biomarker of DNA damage (Stockler-Pinto et al. 2014). In summary, multiple biomarkers should be assessed to better understanding of redox balance.

In turn, foods rich in nutrients and bioactive compounds with antioxidant properties can improve defenses against oxidative stress and reduce the incidence of related diseases. Nuts, for example, are a good source of monounsaturated fatty acids (MUFA), tocopherol, minerals, polyphenols, phytosterols, and many phytochemicals that may synergically prevent an oxidative state (López-Uriarte et al. 2010). Nuts in a Mediterranean diet context are associated with a protective effect against cardiovascular diseases and oxidative stress disorders (Bulló, Lamuela-Raventos, and Salas-Salvado 2011; Sureda et al. 2016), and their consumption is recommended in dietary guidelines worldwide (López-Uriarte et al. 2010).

However, the effect of nuts intake on oxidative stress in humans is not well established, and no study has systematically reviewed this theme. Besides, the mechanisms by which nuts, and nutrients can act against oxidative stress are poorly studied. Therefore, we aimed to perform a systematic review of clinical trials to assess the effect of chronic nuts

CONTACT Josefina Bressan jbrrm@ufv.br Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Avenue PH Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil.

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1828262>

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

2. Artigo de revisão 2 (parceria com EMBRAPA, Qualis A1, fator de impacto 9.231)

Food Chemistry xxx (xxxx) 131207



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Review

Selenium in Brazil nuts: An overview of agronomical aspects, recent trends in analytical chemistry, and health outcomes

Daniel B. Alcântara^{b,3}, Ana P. Dionísio^{a,2}, Adriana G. Artur^{c,4,5}, Brenda K.S. Silveira^{d,5}, Amanda F. Lopes^{b,9}, Jhonyson A.C. Guedes^{b,10}, Lícia R. Luz^{b,11}, Ronaldo F. Nascimento^{b,8}, Gisele S. Lopes^{b,7}, Helen H.M. Hermsdorff^{d,6}, Guilherme J. Zocolo^{a,1,*}

^a Embrapa Agroindústria Tropical, Dra Sara Mesquita St., 2270, 60511-110 Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Soil Science, Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

^d Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keyword:
Brazil nuts
Extraction methods
Liquid chromatography
Se deficiency
Selenomethionine
Selenoproteins

ABSTRACT

Se is an essential element in mammals. We review how its bioavailability in soil and the ability of plants to accumulate Se in foods depends on the soil Se profile (including levels and formats), besides to describe how the various selenoproteins have important biochemical functions in the body and directly impact human health. Owing to its favorable characteristics, the scientific community has investigated selenomethionine in most nut matrices. Among nuts, Brazil nuts have been highlighted as one of the richest sources of bioavailable Se. We summarize the most commonly used analytical methods for Se species and total Se determination in nuts. We also discuss the chemical forms of Se metabolized by mammals, human biochemistry and health outcomes from daily dietary in-

Abbreviations: 8-*epi*-PGF₂α, 8-*epi*-prostaglandin F₂α; 8-OH-dG, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; AAS, atomic absorption spectroscopy; AFS, atomic fluorescence spectrometry; ALT, alanine aminotransferase; AOP, antioxidant potential; APDC, ammonium pyrrolidine dithiocarbamate; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction; DNA, deoxyribonucleic acid; DTT, dithiothreitol; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FPG, fasting plasma glucose; FT3, triiodothyronine; GPX, glutathione peroxidase; GSH-PX, reduced glutathione peroxidase; HDL, high-density lipoproteins; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; HPLC-ICP-MS, high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-AES, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES, inductively coupled plasma optical emission spectrometry; IL, interleukin; LCAT, lecithin-cholesterol acyltransferase; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; LDL, low-density lipoprotein; LOD, limit of detection; M, men; MCI, mild cognitive impairment; MDA, malondialdehyde; MSA, methanesulfonic acid; Nfr2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NF-κB, nuclear factor kappa B; NQO1, NAD(P) H:quinone oxidoreductase 1; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; ox-LDL, oxidized LDL; PGE2, prostaglandin E₂; PON 1, paraoxonase 1; PVP, polyvinylpyrrolidone; RBCV, red blood cell velocity; Se, selenium; SeCys, selenocysteine; SelP, selenoprotein P; SeMet, selenomethionine; SOD, superoxide dismutase; SPE, solid-phase extraction; TAC, total antioxidant capacity; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; TLR, toll-like receptors; TNF, tumor necrosis factor

* Corresponding author.

E-mail address: guilherme.zocolo@embrapa.br (G.J. Zocolo).

¹ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8835-0184>.

² ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4282-6383>.

³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6547-1389>.

⁴ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6009-2750>.

⁵ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3339-3747>.

⁶ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4441-6572>.

⁷ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1295-6339>.

⁸ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6393-6944>.

⁹ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9495-1207>.

¹⁰ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8317-9338>.

¹¹ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3206-7109>.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131207>

Received 19 March 2021; Received in revised form 30 August 2021; Accepted 20 September 2021
0308-8146/© 2021

3. Artigo de revisão 3 (Qualis A2, fator de impacto 5.561)



Review

Effects of Regular Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Consumption on Health: A Systematic Review of Clinical Trials

Alessandra da Silva ¹, Brenda Kelly Souza Silveira ¹, Brenda Vieira Machado de Freitas ¹, Helen Hermana M. Hermsdorff ^{1,2}  and Josefina Bressan ^{1,*} 

¹ Laboratory of Energy Metabolism and Body Composition, Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil

² Institute of Public Policies and Sustainable Development, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil

* Correspondence: jbrm@ufv.br; Tel.: +55-31-3612-5220

Abstract: The Brazil nut (BN) is a promising food due to its numerous health benefits, but it is still necessary to systematically review the scientific evidence on these benefits. Thus, we examined the effects of regular BN consumption on health markers in humans according to the health state (with specific diseases or not) of the subjects. PubMed, Embase®, and Scielo databases were used to search for clinical trials. The PRISMA guideline was used to report the review, and the risk of bias for all studies was assessed. Twenty-four studies were included in the present review, of which fifteen were non-randomized. BNs were consumed in the context of a habitual free-living diet in all studies. Improvement in antioxidant status through increased levels of selenium and/or glutathione peroxidase activity in plasma, serum, whole blood, and/or erythrocytes was observed in all studies that evaluated antioxidant status, regardless of the health state of the sample. In addition, healthy subjects improved lipid markers and fasting glucose. Subjects with obesity had improvement in markers of lipid metabolism. Subjects with type 2 diabetes mellitus or dyslipidemia improved oxidative stress or DNA damage. Subjects undergoing hemodialysis benefited greatly from BN consumption, as they improved lipid profile markers, oxidative stress, inflammation, and thyroid function. Older adults with mild cognitive impairment improved verbal fluency and constructional praxis, and controversial results regarding the change in a marker of lipid peroxidation were observed in subjects with coronary artery disease. In conclusion, the benefits of BN consumption were found in different pathways of action and study populations.

Keywords: functional foods; metabolic risk factors; nuts; nutrition; oilseeds; selenium



Citation: da Silva, A.; Silveira, B.K.S.; de Freitas, B.V.M.; Hermsdorff, H.H.M.; Bressan, J. Effects of Regular Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Consumption on Health: A Systematic Review of Clinical Trials. *Foods* **2022**, *11*, 2925. <https://doi.org/10.3390/foods11182925>

Academic Editor: Abishek Santhakumar

Received: 29 July 2022

Accepted: 13 September 2022

Published: 19 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

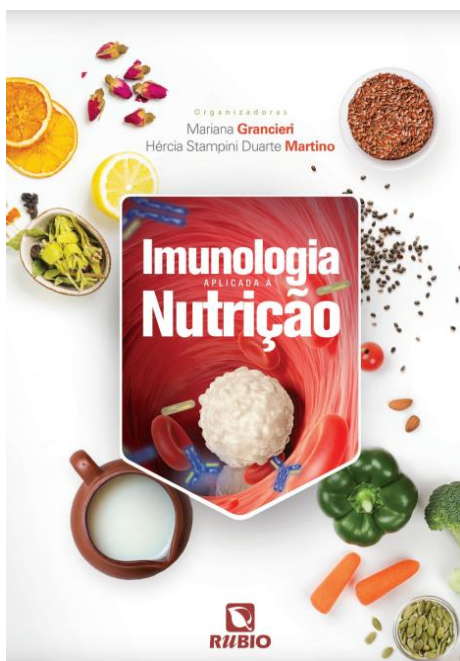


Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The Brazil nut (BN) (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is an edible seed of the Brazil nut tree native to the Amazonia biome. According to data provided by International Nut & Dried Fruit (INC), Bolivia is the main producer of BNs, followed by Peru and Brazil. The world consumption of BNs, considering a total supply of BNs minus ending stock, was 26,250 tons in 2020/2021 [1]. Like other nuts such as walnuts, hazelnuts, macadamia, pistachios, and almonds, several bioactive compounds are also present in BNs [2]. Unsaturated fats, minerals, vitamins, fibers, and phytochemicals give nuts potential and recognized beneficial health effects [3]. The BN contains smaller amounts of protein compared to plant-based protein sources such as tropical vegetables; however, in 100 g of BNs, 14.3 g is from protein. Although small doses of BNs are recommended daily due to the selenium (Se) content (depending on the growing area, one unit is sufficient to reach the recommended daily intake of Se), BNs can be a potential alternative source of protein in diets [4]. However, unlike other nuts, the BN is the richest source of selenium (Se), a key element in forming antioxidant defense systems, modulation of the immune system, and helping to prevent ageing-related diseases [5].

4. Capítulo de livro



CAPÍTULO 15

Efeito do Consumo de Oleaginosas e Sementes no Sistema Imune

Brenda Kelly Souza Silveira
Alessandra da Silva
Helen Hermana Miranda Hermsdorff
Josefina Bressan

INTRODUÇÃO

As oleaginosas, em geral, se destacam pelo seu alto conteúdo de ácidos graxos (AG), tais como os monoinsaturados (AGMI), especialmente o ácido oleico, e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), com efeitos sobre a saúde humana. Além disso, são fontes de vitaminas, minerais e compostos bioativos com capacidade antioxidante e importantes para adequada função imune, tais como tocoferol, selênio, zinco, polifenóis etc.¹ Algumas amêndoas oleaginosas ou sementes se destacam por um nutriente específico. Por exemplo, a castanha-do-brasil é a principal fonte de selênio, enquanto as nozes possuem o maior conteúdo de AGPI.^{2,3}

De modo geral, os nutrientes e compostos bioativos das oleaginosas e sementes podem modular o sistema imune por diferentes mecanismos, a saber: 1) por mecanismos inatos (atividade e polarização de macrófagos em M1 ou M2, neutrófilos, células *natural killer* (NK), eosinófilos etc.); 2) por mecanismos adaptativos (função dos linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos e produção de anticorpos); 3) pela manutenção de barreiras físicas (permeabilidade intestinal, pele, mucosas etc.); 4) pela modulação da microbiota intestinal; e 5) pelo controle da inflamação e do estresse oxidativo.⁴

Nesse contexto, tem-se recomendado o consumo de oleaginosas e sementes para melhorar a qualidade da dieta e ofertar nutrientes importantes para a função imune.⁵ Atualmente, os estudos

realizados com castanhas e sementes, em sua maioria, investigam seus efeitos no perfil lipídico, modulação da microbiota, estresse oxidativo e inflamação, com foco na interação imunometabólica que permeia as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), portanto, esses aspectos serão mais abordados neste capítulo. Poucos ensaios clínicos investigaram o efeito das castanhas e sementes na defesa contra infecções; entretanto, podemos inferir que o efeito positivo sobre o perfil metabólico e as defesas antioxidantes contribui para melhor desempenho dessa função.

Assim, este capítulo apresentará brevemente e relação entre sistema imune e doenças crônicas, bem como tratará das características e propriedades das oleaginosas, que as fazem alimentos capazes de modular a resposta imune, desde uma resposta aguda desencadeada por patógenos até ao estado inflamatório crônico subclínico, relacionado ao risco cardiometabólico.

SISTEMA IMUNE E DOENÇAS CRÔNICAS

Além de atuar na defesa contra microrganismos e agressores externos, o sistema imune também influencia a saúde metabólica. A dieta, as características genéticas e a saúde intestinal são consideradas reguladoras dessa interação imunometabólica.⁶ Essas relações são bem observadas em pessoas obesas, pois o acúmulo excessivo de gordura corporal acompanha o aumento na secreção de adipocinas e citocinas inflamatórias,