

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

BRUNA RANIEL VIEIRA PINTO CABRAL

**EFEITO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA
OU CASTANHA-DO-BRASIL EM RATOS IDOSOS**

ARAÇATUBA – SP
2019

BRUNA RANIEL VIEIRA PINTO CABRAL

**EFEITO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA
OU CASTANHA-DO-BRASIL EM RATOS IDOSOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientador: Profº Dr. Guilherme de Paula Nogueira

**ARAÇATUBA – SP
2019**

C117e	Cabral, Bruna Raniel Vieira Pinto Efeito do consumo de extrato hidrossolúvel de soja ou castanha-do-Brasil em ratos idosos / Bruna Raniel Vieira Pinto Cabral. -- Araçatuba, 2019 70 f. : tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba Orientador: Guilherme de Paula Nogueira 1. Hormônios. 2. Fitoesteróis. 3. Densidade Óssea. 4. Fitoestrógenos. 5. Bertholletia. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EFEITO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA OU CASTANHA-DO-
BRASILEM RATOS IDOSOS

AUTORA: BRUNA RANIEL VIEIRA PINTO CABRAL
ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. GABRIELA DA SILVA FERREIRA
Curso de Nutrição e Educação Física / Centro Universitário Toledo de Araçatuba/SP

Araçatuba, 03 de julho de 2019.

Dedico este trabalho...

A Deus, pela oportunidade e por ter me sustentar até aqui.

*Aos meus amados pais, Reginaldo e Adriana, por todo amor, carinho e
dedicação durante todos esses anos da minha vida.*

*À minha querida irmã Bianca e cunhado Thiago, que mesmo de longe,
estão sempre me dando forças.*

*Ao meu amado esposo Fillipe, por todo amor, companheirismo e apoio
durante os anos que estamos juntos, me incentivando sempre, estando
presente em todas as minhas conquistas.*

*Ao meu filho Bernardo, meu amor, razão da minha vida, motivo pelo qual
tenho vontade de viver e crescer cada vez mais.*

*A minha avó Raquel e madrinha Sandra, que não mediram esforços para
estar comigo nesta jornada.*

Eu amo muito todos vocês, família abençoada!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, Espírito Santo e a Jesus Cristo, por me direcionar a este caminho e por ter colocado nele pessoas tão especiais.

Não posso, nesta etapa da minha vida, deixar de recordar todos aqueles que contribuíram com o seu saber, incentivo e amizade. Para todos, que foram muitos, a minha gratidão!

À UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA (Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba) pela oportunidade de realização do mestrado e a todos os professores e colaboradores que, de alguma forma, fizeram parte desta minha conquista.

Ao meu querido orientador, Prof^o. Guilherme de Paula Nogueira pela oportunidade, paciência e compreensão, por ter confiado em mim e, principalmente, por todo ensinamento dedicado. Admiro-te não só como profissional, mas também como pessoa. Gratidão!

Aos professores que estiveram presentes na banca do meu Exame Geral de Qualificação, Prof^a. Daniela Bernadte Rozza e Prof^a. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, e aos da banca da minha Defesa, Profa. Gabriela da Silva Ferreira e Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles, pelas valiosas contribuições, que serviram para enriquecer o meu trabalho.

Aos meus amigos queridos do laboratório, Ana Flávia, Waneska, Rodrigo, Marcos e a técnica de laboratório Devani Maria Pinheiro, por tudo o que fizeram por mim, pela dedicação depositada neste estudo e, principalmente, pela amizade que construímos.

Aos técnicos Pedro e Adão por toda atenção, disponibilidade e conhecimento.

Aos professores Sueli Antônio Hernandes Chaves Neto por toda atenção, amizade e conhecimento.

A Fernanda Fernandes por todo carinho e experiência que fizeram parte da minha formação acadêmica.

Ao Profº Mário Jefferson Quirino Louzada por sempre estar disponível nos momentos de dúvida, me mostrando o melhor caminho a seguir.

A toda minha família, aos que moram aqui, aos que moram em outras cidades e aos que infelizmente não estão mais aqui, mas estarão para sempre em meu coração e pensamento.

Aos meus pais, minha irmã, meu cunhado, meu esposo e meu filho, pelo amor e compreensão em todos os momentos em que estive ausente durante esta trajetória.

À minha amiga Juliana Sedlacek Bassani, por todo incentivo e amizade.

À minha coordenadora Ariadine Pires, pela compreensão em todas as vezes que precisei estar ausente do trabalho, para dedicar-me ao mestrado.

A todos os amigos que torceram por mim.

“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito.”

Romanos 8:28

CABRAL, B.R.V.P. **Efeito do extrato hidrossolúvel de soja ou castanha-do-Brasil em ratos idosos.** 2019. 70f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

O objetivo foi analisar os efeitos da suplementação do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) ou castanha-do-Brasil nos fêmures de ratos Wistar idosos. Foram utilizados 27 ratos, com 570 dias, distribuídos em 3 grupos: grupo controle (C) (n=8) recebeu dieta padrão; grupo suplementado com extrato hidrossolúvel de soja (S) (n=9) (300 mL/dia); grupo (B) (n=10), oferecida 1 unidade de castanha-do-Brasil ($\pm 3,7$ g) por animal/dia. O experimento teve duração de 30 dias e ao final os ratos foram eutanasiados com 600 dias de idade. Foram analisadas: a massa corporal semanalmente (g), a ingestão de ração (g) e de água (mL) diariamente, foram feitas análises biofísicas, bioquímicas e hormonais das amostras (sangue, fêmur, gordura visceral, testículos e glândulas sexuais acessórias) colhidas no pós-morte. Os animais do grupo S e B consumiram menos ração quando comparados com o C. O grupo S consumiu menos água em relação ao controle. Em relação as concentrações dos hormônios (insulina, leptina, LH, testosterona) entre os grupos, estes não apresentaram diferença estatística significativa. Não houve diferença na densitometria e microtomografia óssea, mas a região da cabeça do fêmur dos ratos do grupo B apresentaram maior resistência ($p=0,04$) (B 151 ± 15 N, C 112 ± 37 N, S 137 ± 37 N). Os fêmures do grupo controle possuíram menor concentração de fosforo ($p=0,03$; $15 \pm 1\%$) comparados com os do S $16 \pm 1\%$ e B $16 \pm 1\%$. Conclui-se que a ingestão de EHS não interferiu no metabolismo ósseo, mas o consumo da castanha-do-Brasil resultou em maior resistência óssea da região da cabeça do fêmur, concentração de fósforo e hipertrofia das glândulas sexuais acessórias.

Palavras-chave: Hormônios. Fitoesteróis. Densidade óssea. Fitoestrógenos. Bertholletia.

CABRAL, B.R.V.P. **Effect of soybean or Brazil nut on old rats**. 2019. 70f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The objective was to analyze the effects of soybean or Brazil nut supplementation on the femurs of elderly Wistar rats. Twenty-seven rats with 570 days of age were used, distributed in 3 groups: control group (n=8, C) with standard diet; group S (n=9) supplemented with soy milk (300 mL/day); group B (n=10), added 1 unit of Brazil nut (± 3.7 g) per animal/day. The experiment lasted for 30 days, and at the end, the rats were euthanized with 600 days of age. Were measured: body mass weekly (g); feed intake (g) and water intake (mL) daily, as well as biophysical, biochemical and hormonal analysis of postmortem samples (blood, femur, visceral fat, testicles and sexual accessories glands) were analyzed. The animals of group S and B consumed less ration when compared to group C. The group S ingested less water compared to the control. Regarding the applications of hormone concentrations (insulin, leptin, LH, testosterone) between groups, these are not relevant. There were no differences on bone densitometry and microtomography but femoral head from the group B rats presented greater shear resistance ($p = 0.04$; B 151 ± 15 N, C 112 ± 37 N, S 137 ± 37 N) than the other groups. Bones from control rats had lower phosphorus concentration ($p=0.03$; $15 \pm 1\%$) compared to S $16 \pm 1\%$ and B $16 \pm 1\%$. It was possible to concluded that soy milk intake did not interfere on the bone metabolism, but the Brasil nut consumption resulted in greater bone strength and phosphorus concentration on the femoral head and accessory sex glands hypertrophy.

Keywords: Hormones. Phytosterols. Bone density. Phytoestrogens. Bertholletia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição Nutricional da Ração Primor[®] MP77.....42

Tabela 2- Composição Nutricional do Extrato Hidrossolúvel de Soja ADES[®]
Zero.....43

Tabela 3- Massa corporal (g) dos ratos idosos, tratados com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) (300mL/dia) ou castanha-do-Brasil (1 unidade/dia/animal) com controle semanal (Média±Desvio Padrão).....44

Tabela 4- Análise da estrutura óssea dos ratos idosos, com 600 dias de idade, tratado com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) (300 mL/dia/animal) ou castanha-do-Brasil (1 unidade/dia/animal) (Média±Desvio Padrão).....45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.2	Revisão de literatura	12
1.2.1	Envelhecimento	12
1.2.2	Densidade mineral óssea.....	12
1.2.3	Fitoestrógenos	14
1.2.4	Soja	14
1.2.5	Castanha-do-Brasil	16
2	CAPÍTULO 1 – EFEITO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA OU CASTANHA-DO-BRASIL EM RATOS IDOSOS.....	20
2.1	Resumo	20
2.2	Abstract	21
2.3	Introdução	22
2.4	Material e métodos	23
2.4.1	Animais.....	23
2.4.2	Grupos experimentais.....	24
2.4.3	Tratamento com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) e castanha-do-Brasil	24
2.4.4	Massa corporal	25
2.4.5	Consumo de ração e ingestão de líquidos e tratamento.....	25
2.4.6	Componentes séricos	25
2.4.7	Pesagem da gordura visceral, testículos e glândulas sexuais acessórias .	27
2.4.8	Densitometria óssea	27
2.4.9	Ensaio mecânico.....	27
2.4.10	Microtomografia óssea.....	27
2.4.11	Quantificação de material mineral ósseo por calcinação.....	28
2.4.12	Análise estatística	28
2.5	Resultados.....	29
2.5.1	Massa corporal, consumo de ração e água.....	29
2.5.2	Massa da gordura visceral, testículos e glândulas sexuais acessórias	29
2.5.3	Componentes séricos	30
2.5.4	Análise da estrutura óssea.....	30
2.6	Discussão e conclusão	31

2.6.1 Análise da estrutura óssea.....	31
2.6.2 Massa corporal, consumo de ração e água.....	33
2.6.3 Componentes séricos	33
2.6.4 Massa da gordura abdominal, testículos e glândulas sexuais acessórias .	34
2.7 Referências bibliográficas	36
APÊNDICE “REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL”	46
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA	55
ANEXO B - NORMAS DA REVISTA.....	56

1 INTRODUÇÃO GERAL

O ritmo do envelhecimento da população humana mundial está aumentando e espera-se que em 2050 o número de pessoas com mais de 60 anos chegue a 2 bilhões, em contraponto com os 900 milhões registrados em 2015.¹ Recentemente a Organizações das Nações Unidas (ONU) propôs um projeto, o qual chamou de Agenda 2030, que é composto por objetivos e metas a serem atingidos até meados de 2030. Dentre os objetivos, destacam-se a promoção da saúde física e mental, o bem-estar e o aumento da expectativa de vida para todos.²

Levando em conta que o avanço da idade pode ocorrer alterações hormonais e na composição corporal, ou seja, no envelhecimento musculoesquelético, este atrai interesses da saúde pública, e está associado ao alto risco de quedas e perda de autonomia em idosos.³⁻⁴ Esta condição é, portanto, correlacionada com alta morbidade e taxas de atenção à saúde.³

A diminuição da densidade mineral e o enfraquecimento da arquitetura estrutural óssea são fatores de risco da osteoporose tanto em mulheres como em homens, sendo que nas mulheres ocorrem com maior frequência devido a deficiência do 17 β -estradiol, e nos homens com a diminuição da concentração da testosterona, podendo provocar alterações na composição corporal e predispor à fragilidade músculo-esquelética com fraturas osteoporóticas.⁵⁻⁹

Diante do exposto, as isoflavonas, principalmente a daidzeína e genisteína, que são “semelhantes ao estrógeno endógeno” e denominadas fitoestrógenos receberam atenção na literatura médica e científica pela possibilidade de atuar na prevenção e tratamento do enfraquecimento dos ossos. As isoflavonas encontram-se nas leguminosas, principalmente na soja e castanha-do-Brasil.¹⁰ Este estudo foi desenvolvido com o intuito de contribuir para os benefícios destes alimentos à saúde humana.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Envelhecimento

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) define envelhecimento como “um processo sequencial, individual, acumulativo, irreversível, universal, não patológico, de deterioração de um organismo maduro, próprio a todos os membros de uma espécie, de maneira que o tempo o torne menos capaz de fazer frente ao estresse do meio-ambiente e, portanto, aumente sua possibilidade de morte”.¹¹

O envelhecimento faz parte da realidade da maioria das sociedades. Estima-se que para o ano de 2050 existirão cerca de 2 bilhões de pessoas com mais de 60 anos no mundo, e a maioria vivendo em países em desenvolvimento.¹²

O avanço da idade interfere em alguns indicadores de saúde, especialmente na composição orgânica, que envolve o aumento da gordura corporal, diminuição da massa magra, da densidade óssea e diminuição na concentração de testosterona na andropausa em homens, e do estradiol na menopausa em mulheres.¹²⁻¹⁵

O hipogonadismo parcial do envelhecimento em homens é conhecido como andropausa, *Androgen Decline in the Aging Male* (ADAM) ou, deficiência androgênica no envelhecimento masculino (DAEM).¹⁶ É caracterizada pela redução da concentração de testosterona e a partir dos 40 anos de idade, a concentração reduz cerca de 0,3% anualmente, e após os 75 anos, os homens possuem em média 66% da quantidade de testosterona do que aos 25 anos de idade.¹⁷

1.2.2 Densidade mineral óssea

O tecido ósseo tem como principal função a sustentação do esqueleto e está predisposto a fraturas quando sua resistência diminui com o avanço

da idade. As fraturas são possíveis de acontecer em qualquer pessoa, em especial frente a grandes traumas. Entretanto existem doenças em que a fragilidade óssea está aumentada, como por exemplo na osteoporose, que tem alta prevalência na população mundial e, portanto, recebe atenção na literatura científica.¹⁸⁻¹⁹

Neste contexto, a mensuração de massa óssea tem sido o método mais utilizado para diagnóstico da osteoporose, pois trabalhos populacionais demonstraram elevada correlação entre resistência óssea e quantidade de matriz mineralizada, caracterizada pela densidade mineral óssea (DMO), podendo ser avaliada pela absorciometria por raios X de dupla energia (DXA).^{18,20}

A remodelação óssea é um fenômeno que ocorre ao longo de toda a vida, sendo fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. Nele a reabsorção óssea é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados pelas células do tecido ósseo, que incluem os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação ósseas são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea.²¹

Desde o nascimento até os 40 anos em humanos, a massa óssea é constantemente aumentada sendo dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos ao corpo humano, onde a formação óssea é maior que a reabsorção óssea. Após os 40 anos, normalmente ocorre uma diminuição da massa óssea de 0,5 a 1 % ao ano, sendo que em mulheres no período pós-menopausa essa perda aumenta em mais 2% ao ano. Portanto, as mulheres após os 50 anos de idade estão predispostas à osteoporose. Atualmente estima-se que uma em cada três mulheres deve sofrer algum tipo de fratura relacionada à esta doença, dentre elas as fraturas vertebrais e colo de fêmur.²² A osteoporose também pode afetar os homens, embora as fraturas sejam menos comuns. Segundo a Fundação Internacional de Osteoporose (IOF), 1 em cada 5 homens com mais de 50 anos terá uma

fratura relacionada à osteoporose, devido à perda óssea e diminuição da absorção de cálcio. A testosterona é responsável por modular a remodelação óssea, diretamente ou após aromatizada à estradiol, ativando os receptores de esteróides sexuais nas células ósseas. Além disso, a testosterona aumenta a massa muscular, que pode ter efeitos positivos indiretos na massa óssea.²³

1.2.3 Fitoestrógenos

As plantas produzem diversas substâncias provenientes dos processos metabólicos primários do carbono incluindo carboidratos, proteínas, gorduras e metabólitos secundários, destacando-se os flavonoides. Esse metabólito secundário possui baixa massa molar e diversas funções na planta, principalmente, de defesa contra predadores e patógenos. Quando ingeridos podem ter tanto efeitos benéficos quanto prejudiciais ao ser humano.²⁴

As isoflavonas, também chamadas de isoflavonóides pertencem à família dos polifenóis, com propriedade antioxidante. Essas substâncias são referenciadas como fitoestrógenos e apresentam estrutura química semelhante aos estrógenos humanos, tal como o 17 β -estradiol, por serem ligantes β , diminuir atividade de radicais livres, serem protetores cardíacos e diminuir a oxidação do LDL colesterol.²⁵⁻²⁶ Esses compostos se encontram de forma natural em leguminosas e são especialmente abundantes nos grãos de soja e castanhas. Quando consumidos estes alimentos e seus derivados, as isoflavonas presentes são hidrolizadas no intestino por glicosidases intestinais, liberando as agliconas, daidzeína, genisteína e gliciteína, além do enterodiol e enterolactona, que são as formas biologicamente ativas, e atuarão no organismo humano.²⁶

1.2.4 Soja

A soja, *Glycine max*, é uma das mais importantes culturas na economia mundial, pois seus grãos são usados pela agroindústria na produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal, além da indústria química e de alimentos. Em 2014, liderou as exportações do Brasil com 14% sobre o total exportado, e está presente nos três países que mais exportam.²⁷⁻²⁸

A utilização de alimentos derivados de soja tem aumentado em diversas regiões do Ocidente, onde o consumo do grão de soja é incipiente.²⁹ Os Estados Unidos são os maiores produtores de soja, seguidos por Brasil, Argentina e China. Estes quatro países são responsáveis por aproximadamente 90% de sua produção mundial.³⁰

A soja é uma leguminosa de característica peculiar, uma vez que, ao contrário dos feijões, que não apresentam gordura, na soja aproximadamente 40% das calorias provêm deste macronutriente.³¹ Possui 35% de carboidratos, sendo representados pelo amido e fibras, insolúvel: celulose e hemicelulose e solúvel: pectinas e oligossacarídeos, como a estaquiose, rafinose e verbascose.³²⁻³³ As fibras insolúveis da soja não são digeridas no trato gastrointestinal humano e atuam normalizando a mobilidade intestinal, reduzindo o risco de constipação e diverticulite. As fibras solúveis atuam diferentemente das insolúveis, contribuindo para o controle da insulinemia de pacientes com diabetes tipo II e sobre a redução dos níveis sanguíneos de LDL-colesterol.³⁴

A soja é considerada uma fonte de proteína completa, uma vez que contém todos os aminoácidos essenciais e é nutricionalmente equivalente à proteína animal.³⁵ Tem sido utilizada na produção de diversos alimentos industrializados, tais como: produtos cárneos, produtos de panificação, molhos e sopas, devido ao baixo custo e as suas propriedades físicoquímicas.³⁶

Os lipídios presentes em quantidade elevada na soja são substâncias com baixa solubilidade em água e que quando hidrolisadas na digestão fornecem ao organismo ácidos graxos que ajudam na absorção das vitaminas A, D, E e K, além de protegerem e isolarem órgãos e tecidos.³⁷

O grão de soja é rico em fitosteróis na forma de isoflavonas, as quais se relacionam quimicamente com os hormônios esteroides do corpo, além disso, o consumo diário da leguminosa tem sido associado à prevenção e ao tratamento de disfunções como hipertensão, hipercolesterolemia e osteoporose.³⁸⁻⁴⁰ As isoflavonas são compostos químicos fenólicos que pertencem à classe dos fitoestrógenos, devido a sua estrutura química ser bastante semelhante ao estrógeno humano e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Estas se comportam como estrógenos verdadeiros, ligados aos receptores de estrógeno, mas não são capazes de causar os mesmos efeitos colaterais. As isoflavonas apresentam um efeito de equilíbrio nos níveis de estrógenos endógenos, que são benéficos durante toda a vida da mulher.³⁸⁻³⁹

Nos últimos anos, o extrato hidrossolúvel de soja (EHS), popularmente conhecido como “leite” de soja importante na alimentação de pessoas intolerantes a lactose, ganhou destaque comercial, pois pode ser utilizado para substituir o leite de vaca. Segundo o Instituto Nacional de Doenças Digestivas, Renais e Diabetes (EUA) cerca de 75% da população mundial é intolerante à lactose, no entanto, considerando-se apenas a quantidade de proteínas, essa seria uma boa substituição, porém, o teor de cálcio presente no EHS é deficiente, sendo o leite de vaca a principal fonte desse mineral. Analisando-se a quantidade de isoflavonas presente no EHS, observaram menor concentração (2,8mg/100g) de daidzeína e (5,1mg/100g) de genisteína, do que na proteína isolada de soja (30,8mg/100g) de daidzeína e (57,3mg/100g) de genisteína.^{39, 41}

1.2.5 Castanha-do-Brasil

A *Bertholletia excelsa* é uma árvore de grande porte, muito abundante no norte do Brasil e na Bolívia, cujo fruto contém a castanha, que é a semente popularmente conhecida como castanha-do-Brasil. Algumas características deste fruto é que leva cerca de 14 meses para ocorrer a sua

maturação, este possui casca dura e lenhosa, pesa até dois quilos e contém oito a vinte sementes triangulares de até dois centímetros de largura e cinco centímetros de comprimento.⁴²

O processo de colheita da castanha-do-Brasil geralmente é realizado por catadores florestais, que são moradores locais e sua comercialização é uma das principais fontes de renda das comunidades indígenas e ribeirinhas.⁴² As castanheiras podem crescer até 60 m de altura e 100-180 cm diâmetro. Os bosques ocupam mais de 320 milhões de hectares distribuídos entre o Brasil, a Bolívia e o Peru, embora o Brasil tenha a maior área, a Bolívia é atualmente a principal produtora de castanha-do-Brasil em todo o mundo (41,6% da produção total), seguido pelo Brasil (35,4%) e pelo Peru (32%).⁴³

As castanhas em geral têm alto teor de gordura e proteína, o que contribui para a alta densidade energética. No entanto, o perfil de macronutrientes leva a altos níveis de saciedade⁴⁴⁻⁴⁵, logo a ingestão de castanhas não está associada ao aumento de peso corporal.⁴⁰⁻⁴¹ A castanha-do-Brasil tem aproximadamente 700 kcal a cada 100 gramas e apresenta menor teor de carboidratos que outras nozes, já o teor de fibra é 7,7 g a cada 100 g.⁴⁶ Estas são boas fontes de lipídios e consideradas benéficas para a saúde devido a alta presença de conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e baixa concentração de ácidos graxos saturados (SFAs).⁴⁶⁻⁴⁷

Além disso, as castanhas contêm ampla gama de oligoelementos em grandes quantidades e seus efeitos estão relacionados à benefícios para a saúde, podendo prevenir deficiências nutricionais. A castanha-do-Brasil possui maior concentração de magnésio, cobre e zinco quando comparada a outras nozes. O conteúdo destes micronutrientes podem variar de acordo com as características do clima e do solo, como a fertilização que influencia nos níveis de absorção de nutrientes pela planta.⁴⁸⁻⁴⁹ Estudos associaram o consumo de castanhas com a melhor adequação da ingestão de nutrientes, além de enriquecer a qualidade da dieta dos humanos.⁵⁰⁻⁵¹

De fato, a modelagem de padrões alimentares usada para avaliar o impacto nutricional da substituição dos lanches por refeições com ingestão de castanhas revelou que a substituição de snacks sólidos por nozes reduz as calorias vazias, promove a ingestão de perfil de gordura mais favorável e aumenta o consumo de magnésio em quase 30%.⁵²

A castanha-do-Brasil tem a maior concentração de selênio de todas as castanhas comestíveis, sendo, portanto, considerada a mais importante fonte de alimentos concentrados do mineral. De acordo com os resultados de Rehm⁵⁴, uma unidade de castanha-do-Brasil pode conter até 400 µg de selênio, enquanto outras castanhas contêm menos de 1 µg.⁵³ Além disso, estas são fonte alimentar de fitoquímicos, como por exemplo os fenólicos, flavonóides, tocoferol, lignanas e fitoesteróis. Estes compostos bioativos estão relacionados à capacidade antioxidante e foram associados a efeitos benéficos para a saúde humana.⁵⁵⁻⁵⁶

Os compostos fenólicos pertencem a classe mais concentrada de compostos bioativos em castanha-do-Brasil, e são encontrados livremente ou em formas esterificadas ou ligadas.⁵⁷⁻⁵⁸ Dados sobre a concentração fenólica em castanha-do-Brasil ainda são limitados e os estudos existentes são escassos, além de não identificarem a origem dessas nozes.³² Estudos que avaliaram compostos fenólicos e a atividade antioxidante da castanha-do-Brasil, comparando amostras da castanha inteira com o miolo e a casca marrom, os principais compostos identificados foram os fenólicos nas formas livres e nas ligadas foram o ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido protocatecuico e catequina. A pele marrom continha maior concentração desses fenólicos em comparação com a castanha inteira e o miolo. Em relação a outros fitoquímicos como os flavonoides e lignanas, os dados disponíveis variam significativamente, e essa discrepância pode ser devido às características do clima e do solo.^{45,59-60}

Yang⁴⁸ pesquisou o conteúdo de fitoesteróis em óleo de castanha-do-Brasil e encontrou 1,930 µg de fitosteróis por grama de óleo, dos quais 1,325,4µg/g eram de β-sitosterol, 26,9 µg/g de campesterol e 577,5 µg/g de

estigmasterol. Já em outro estudo, os tocoferóis totais (α , γ , e δ -tocoferóis) presentes na castanha foram quantificados e apresentaram 152,8 $\mu\text{g/g}$ de tocoferóis totais. Esses tocoferóis são responsáveis pelas atividades antioxidantes relacionadas aos mecanismos de proteção das membranas celulares dos compostos oxidáveis do citoplasma celular. Sua estrutura e facilidade de interação com membranas celulares fazem desta substância um antioxidante mais eficiente em relação aos hidrossolúveis, contribuindo eficazmente no combate ao estresse oxidativo.^{48,61-63}

Considerando que os indivíduos idosos podem apresentar diminuição da massa óssea por meio da diminuição na concentração de esteroides, acredita-se que a suplementação com fitoestrógenos pode suprir essa deficiência, e conseqüentemente, diminuir o avanço da perda óssea em ratos machos idosos.

2 CAPÍTULO 1 – EFEITO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA OU CASTANHA-DO-BRASIL EM RATOS IDOSOS

2.1 Resumo

O objetivo foi analisar os efeitos da suplementação do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) ou castanha-do-Brasil nos fêmures de ratos Wistar idosos. Foram utilizados 27 ratos, com 577 dias, distribuídos em 3 grupos: grupo controle (C) (n=8) recebeu dieta padrão; grupo suplementado com extrato hidrossolúvel de soja (S) (n=9) (300 mL/dia); grupo (B) (n=10), oferecida 1 unidade de castanha-do-Brasil ($\pm 3,7$ g) por animal/dia. O experimento teve duração de 30 dias e ao final os ratos foram eutanasiados com 600 dias de idade. Foram analisadas: a massa corporal semanalmente (g), a ingestão de ração (g) e de água (mL) diariamente, foram feitas análises biofísicas, bioquímicas e hormonais das amostras (sangue, fêmur, gordura visceral, testículos e glândulas sexuais acessórias) colhidas no pós-morte. Os animais do grupo S e B consumiram menos ração quando comparados com o C. O grupo S consumiu menos água em relação ao controle. Em relação as concentrações dos hormônios (insulina, leptina, LH, testosterona) entre os grupos, estes não apresentaram diferença estatística significativa. Não houve diferença na densitometria e microtomografia óssea, mas a região da cabeça do fêmur dos ratos do grupo B apresentaram maior resistência ($p=0,04$) (B 151 ± 15 N, C 112 ± 37 N, S 137 ± 37 N). Os fêmures do grupo controle possuíram menor concentração de fosforo ($p=0,03$; $15 \pm 1\%$) comparados com os do S $16 \pm 1\%$ e B $16 \pm 1\%$. Conclui-se que a ingestão de EHS não interferiu no metabolismo ósseo, mas o consumo da castanha-do-Brasil resultou em maior resistência óssea da região da cabeça do fêmur, concentração de fósforo e hipertrofia das glândulas sexuais acessórias.

Palavras-chave: Hormônios. Fitoesteróis. Densidade óssea. Fitoestrógenos. Bertholletia.

EFFECT OF SOYBEAN OR BRAZIL NUT ON OLD RAT

2.2 Abstract

The objective was to analyze the effects of soybean or Brazil nut supplementation on the femurs of elderly Wistar rats. Twenty-seven rats with 570 days of age were used, distributed in 3 groups: control group (n=8, C) with standard diet; group S (n=9) supplemented with soy milk (300 mL/day); group B (n=10), added 1 unit of Brazil nut (± 3.7 g) per animal/day. The experiment lasted for 30 days, and at the end, the rats were euthanized with 600 days of age. Were measured: body mass weekly (g); feed intake (g) and water intake (mL) daily, as well as biophysical, biochemical and hormonal analysis of postmortem samples (blood, femur, visceral fat, testicles and sexual accessories glands) were analyzed. The animals of group S and B consumed less ration when compared to group C. The group S ingested less water compared to the control. Regarding the applications of hormone concentrations (insulin, leptin, LH, testosterone) between groups, these are not relevant. There were no difference on bone densitometry and microtomography but femoral head from the group B rats presented greater shear resistance ($p = 0.04$; B 151 ± 15 N, C 112 ± 37 N, S 137 ± 37 N) than the other groups. Bones from control rats had lower phosphorus concentration ($p=0.03$; $15 \pm 1\%$) compared to S $16 \pm 1\%$ and B $16 \pm 1\%$. It was possible to concluded that soy milk intake did not interfere on the bone metabolism, but the Brazil nut consumption resulted in greater bone strength and phosphorus concentration on the femoral head and accessory sex glands hypertrophy.

Keywords: Hormones. Phytosterols. Bone density. Phytoestrogens. Bertholletia.

2.3 Introdução

Durante o processo de senescência, há um aumento da incapacidade funcional, o que induz maior risco de quedas e fraturas, além de predispor os idosos ao aumento da morbimortalidade. Esses eventos adversos à saúde podem estar relacionados, em parte, à perda progressiva de tecido muscular e ósseo, por sarcopenia e osteoporose. Prevê-se que a prevalência dos dois distúrbios cresça devido ao aumento da expectativa de vida, responsável por importantes questões de saúde pública e custos significativos com a saúde.¹⁻²

O envelhecimento masculino possui como principal sinal decorrente da andropausa a diminuição da massa e forma óssea, que podem ter associação com a diminuição dos níveis de testosterona, decorrente da disfunção dos testículos pelas células de *Leydig*, que por sua vez, sofrem redução de massa e desempenho das células restantes e redução da circulação sanguínea dos testículos. Em relação ao envelhecimento da mulher quando presente no período da menopausa, seus hormônios reprodutivos, no caso os estrógenos são secretados em menor quantidade, o que pode levar ao aumento de enfraquecimento dos ossos.³⁻⁴

Neste contexto, a utilização de fitoestrógenos dietéticos têm recebido atenção crescente, pois seus efeitos têm impacto na saúde humana, devido à sua estrutura, funcionalidade e semelhança com o 17 β -estradiol. Vários estudos relataram sobre o efeito para a saúde humana, como por exemplo, a prevenção e o tratamento da osteoporose.⁵⁻⁶ As terapias fitoterápicas mais comumente usadas podem incluir suplementos de fitoestrógenos e alimentos com fontes de isoflavonas, que são semelhantes a estrógenos, que por esta razão são considerados fitoestrógenos. Estes são amplamente distribuídos nas castanhas e principalmente na soja, tendo como fitoativos de ação mais significativa a genisteína e a daidzeína, subtipos de isoflavonóides com ações semelhantes às do estrogênio.⁷

A soja, *Glycine max*, é uma leguminosa presente em alguns alimentos processados, dentre eles, o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) e outros derivados.⁸ Os grãos de soja são considerados sementes ricas em proteínas, fonte de cálcio e fonte alimentar de isoflavonas, destacando-se a daidzeína (2.8mcg/100g) e a genisteína (5.1mcg/100g), que desempenham papel importante na prevenção de sintomas de menopausa e osteoporose.⁷ Existem trabalhos na literatura que mostram que as isoflavonas promovem melhora na qualidade óssea em mulheres naturalmente menopausadas, porém não há informações envolvendo a andropausa.¹⁰

A *Bertholletia excelsa*, nativa da Amazônia, é uma árvore cujo fruto contém a castanha, que é a sua semente, denominada de castanha-do-Brasil. Esta castanha tem em sua composição grande quantidade de gordura e proteína, que contribuem para a alta densidade energética, de magnésio, cobre, zinco e isoflavonas, e em maior quantidade a daidzeína (6mcg/100g) e genisteína (85mcg/100g).^{5,11-12}

Em função da necessidade de buscar estratégias para a manutenção da qualidade de vida do homem na andropausa, a busca de práticas alimentares acessíveis há a hipótese de que a suplementação com fitoestrógenos irá suprimir a deficiência hormonal minimizando a perda óssea. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a ação da dieta suplementada com leite de soja ou castanha-do-brasil em parâmetros bioquímicos e biofísicos da mineralização óssea de ratos Wistar com idade avançada.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Animais

O experimento foi composto por 30 animais, sendo que três destes morreram de forma natural, totalizando 27 ratos machos da raça *Rattus novogicus albinus* (Wistar), com 570 dias de idade e médias de massas

corporais de $0,585 \pm 0,03$ kg no grupo controle (C), $0,598 \pm 0,04$ kg no grupo suplementado com Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS) (S) e $0,608 \pm 0,03$ kg no grupo suplementado com castanha-do-Brasil (B), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Araçatuba) e escolhidos de forma aleatória.

Os animais foram mantidos em gaiolas com ambiente climatizado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12/12 horas, durante o período experimental de 30 dias, no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP.

O protocolo experimental obedeceu aos princípios éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) – Protocolo 00418-2017 (ANEXO A).

2.4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (C) continha $n=8$, grupo EHS (S) $n=9$ e o grupo castanha-do-Brasil (B) $n=10$, mantidos em caixas com 2 animais por caixa, e apenas no grupo S, uma gaiola continha apenas um animal.

2.4.3 Tratamento com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) e castanha-do-Brasil

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) utilizado neste tratamento foi da marca ADES® zero açúcar (Tabela 1), o mesmo lote (ADD 10 1067192) foi utilizado até o final do tratamento.

A castanha-do-Brasil utilizada foi da marca Now Real Food®, o mesmo lote NOW-07022 foi utilizado em todo tratamento.

Para o grupo S foi ofertado 300 mL/dia de EHS¹³, que continha 3,75g de extrato de soja em cada 150mL, sendo que o consumo deste alimento foi observado pessoalmente todos os dias até a ingestão final. Para o grupo

B foi oferecido separadamente e individualmente 1 unidade de castanha, crua e sem sal, em média de 3,7 g/unidade/dia¹⁴ e o consumo foi acompanhado até a ingestão total da castanha.

2.4.4 Massa corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada uma vez por semana utilizando-se balança digital Toledo® modelo 9094 por 4 semanas.

2.4.5 Consumo de ração e ingestão de líquidos e tratamento

Para os 3 (três) grupos, C, S e B foi ofertado bebedouro de água (500 mL/dia) e ração que era ofertada na tampa da caixa (Primor® MP77; 300 g/dia para cada animal) (Tabela 2).

O consumo de ração foi calculado pela diferença entre o oferecido e a sobra. O mesmo foi feito no controle da ingestão de água e do EHS. As sobras foram desprezadas, fazendo-se a reposição de ração, água e EHS.

Após quatro semanas todos os valores de consumo foram analisados, obtendo-se a média semanal do consumo por animal.

2.4.6 Componentes séricos

Ao término do tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação, sem medicação previa para evitar alterações nos parâmetros avaliados.

O soro foi separado do sangue em Centrífuga Fanem, modelo 206 Excelsa Baby I, a rotação foi de 3.500 rpm/10 minutos, na temperatura de 2°C. O soro foi fracionado e armazenado a -80°C para determinação das concentrações de testosterona, hormônio luteinizante (LH), leptina, insulina, cálcio, fósforo e atividade da fosfatase alcalina. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A concentração do cálcio iônico foi determinada por espectrofotometria utilizando o Kit marca Labtest® (Calcio Liquiform).

O fósforo foi quantificado pelo método espectrofotométrico¹⁵, utilizando kits comerciais, marca Labtest® (Fosforo UV Liquiform).

A atividade da fosfatase alcalina foi mensurada por espectrofotometria¹⁵, utilizando kit comercial Labtest®.

A quantificação de insulina foi feita com o kit comercial *Milipore's Porcine Insulin Radioimmunoassay* (RIA). Em todos os ensaios realizou-se a dosagem em duplicata do Controle Alto (3,125 uU/mL) e do Controle Baixo (100 uU/mL).

A leptina foi quantificada por radioimunoensaio "in house" adaptado.¹⁷ Em todos os ensaios foi realizada a quantificação em duplicata de Controle Alto (27,476 ng/ml) e de Controle Baixo (1,743 ng/ml). O coeficiente de variação inter (CA:11,61% CB: 23,14%) e intra-ensaio (CA: 9,84% CB: 23,94%) foi calculado a partir da variação dos controles e limites de detecção, obtendo os valores da quantificação de 0,79 e 2,22 ng/ml, respectivamente.

O mesmo foi realizado para a detecção das concentrações de LH obtidas por radioimunoensaio adaptado.¹⁸ Em todos os ensaios realizou-se a dosagem de duas concentrações de Controle Alto (5,258 ng/mL) e duas de Controle Baixo (1,991 ng/mL). Também foi calculado o coeficiente de variação inter (CA: 15,55% CB: 20,41%), intraensaio (CA: 23,29% CB: 25,60%) a partir da variação dos controles e dos limites de detecção e de quantificação, que foram de 0,72 e 0,94 ng/mL, respectivamente.

Para quantificação de testosterona foi utilizado o kit comercial *Immulite 1000 Total Testosterone* (cod. LKTW1), que consiste em um ensaio imunoenzimático de competição com emissão de quimiluminescência como sinal, sendo este avaliado em um analisador automático modelo *Immulite 1000*. As amostras foram quantificadas com Controle Alto (7,33%) e de Controle Baixo (2,03%).

2.4.7 Pesagem da gordura visceral, testículos e glândulas sexuais acessórias

Após a eutanásia, foram extraídos a gordura visceral, os testículos e as glândulas sexuais acessórias, que depois de limpos foram pesados em uma Balança Mettler Toledo® (AG 104, precisão de 0,1 mg).

2.4.8 Densitometria óssea

A avaliação densitométrica foi realizada após a eutanásia dos animais, conforme descrito no artigo de Stringhetti-Garcia¹⁹, os fêmures foram desarticulados e dissecados, em seguida, as imagens foram capturadas por absorciometria de raio X de dupla energia (DXA) por meio do densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR.

Posteriormente, as imagens iniciais e finais foram manualmente contornadas para obtenção dos valores de área (cm²), conteúdo mineral ósseo – CMO (g) e densidade mineral óssea – DMO (g/cm²).

2.4.9 Ensaio mecânico

Os fêmures foram submetidos ao ensaio mecânico destrutivo de flexão em três pontos em máquina universal EMIC®, modelo DL 3000 (Departamento de Materiais Dentários da FOA/UNESP-Araçatuba).¹⁹

2.4.10 Microtomografia óssea

A microtomografia óssea foi realizada na FOA/Unesp por meio de microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea.¹⁹ O fêmur foi posicionado craniocaudalmente para análise. A região de interesse de osso trabecular foi manualmente interpolada, resultando em 100 slides (fatias) abaixo da placa de

crescimento, com resolução de 12x12x12 μm . Os parâmetros analisados para o osso trabecular foram: BV/TV (%) – volume ósseo trabecular como porcentagem do volume tecidual; Tb.Th (μm) – espessura trabecular e Tb.N (1/mm) – número de trabéculas por milímetro de tecido. Para o osso cortical foram: Po.N (mm^3) – números de poros fechados e Po (%) – porcentagem de poros fechados.

2.4.11 Quantificação de material mineral ósseo por calcinação

A quantidade de material mineral foi avaliada colocando-se os ossos em estufa durante 24 horas a uma temperatura de 100°C para a remoção da umidade, até ter o peso contínuo. Em seguida, os ossos foram levados para mufla a 600°C, onde permaneceram por 6 horas, obtendo-se as cinzas. Após resfriamento em dessecador, as massas das cinzas foram avaliadas utilizando-se balança de precisão (0,0001g). Após calcinados, os ossos foram macerados em cadinho com pistilo. O pó das cinzas dos ossos foi pesado (1,2 mg) em balança de precisão Balança Mettler Toledo® (AG 104, precisão de 0,1 mg), e diluídas em 800 μL HCL e neutralizadas em 700 L NaOH. Subsequente as soluções foram diluídas na proporção 1:5 em água deionizada. O teor de cálcio foi determinado com o kit da marca Bioclin para cálcio (Arsenazo III), enquanto que a concentração de fósforo foi determinada com o kit comercial da marca Bioclin (Fosforo Color). Os valores de absorbância foram dados pelo leitor de microplacas Power Wave 340, Biotek®. O grau de mineralização foi estimado pela razão entre a massa de cinzas e massa óssea seca.

2.4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média e desvio padrão. Realizou-se o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, além da Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis bioquímicas e biofísicas e

o Tukey como pós-teste para a comparação dos três tratamentos. Para análise do consumo de ração, água e peso dos animais utilizou-se a ANOVA medidas repetidas, sendo considerado $P < 0,05$ para significância e $P < 0,1$ para tendência.

2.5 Resultados

2.5.1 Massa corporal, consumo de ração e água

Após os 30 dias a massa corporal (g) dos animais não variou entre as semanas e entre os grupos ($p=0,59$) (C= $610 \pm 0,04$ g; S= $610 \pm 0,04$ g e B= $628 \pm 0,03$ g) (Tabela 3).

Houve diferença no consumo de ração entre as semanas de tratamento nos grupos C (1ª $35 \pm 5,82$ g/dia; 2ª $39,10 \pm 2,65$ g/dia; 3ª $37,36 \pm 4,35$ g/dia; 4ª $36 \pm 4,35$ g/dia), S (1ª $27,3 \pm 3,88$ g/dia; 2ª $29,26 \pm 2,81$ g/dia; 3ª $31,91 \pm 3,09$ g/dia; 4ª $30,33 \pm 3,14$ g/dia) e B (1ª $27,29 \pm 3,85$ g/dia; 2ª $26,12 \pm 2,75$ g/dia; 3ª $28,51 \pm 2,97$ g/dia; 4ª $25,28 \pm 3,01$ g/dia) ($p= 5,6E-07$; $p= 2,0E-12$ e $p= 1,7E-12$, respectivamente), já entre os grupos S e B observou-se menor consumo quando comparados ao grupo C em todas as quatro semanas de tratamento ($p= 5,0E-30$; $p= 3,0E-66$, $p= 1,0E-49$ e $p=5,0E-46$).

A oferta de EHS no grupo S aumentou o consumo a ingestão de líquido (ml) ao longo do tempo: grupo S ($p=6,00E-08$; 1ª $188,8 \pm 8,33$; 2ª $186,51 \pm 5,51$; 3ª $187,51 \pm 6,00$; 4ª $186,03 \pm 6,30$ mL/dia) quando comparados com o grupo C (1ª $70,89 \pm 9,20$; 2ª $72,59 \pm 9,49$; 3ª $73,84 \pm 9,29$; 4ª $70,71 \pm 13,58$ mL/dia) e B (1ª $72,93 \pm 9,31$; 2ª $73,70 \pm 6,83$; 3ª $76,21 \pm 7,24$; 4ª $74,79 \pm 7,19$ mL/dia).

2.5.2 Massa da gordura visceral, testículos e glândulas sexuais acessórias

Ao final do tratamento nos animais do grupo B houve tendência ($p=0,06$) de aumento da massa da gordura visceral, comparado com o grupo C e S, ($C= 15,8\pm4,1g$, $S= 14,2\pm6,5g$ e $B= 19,8\pm5,0g$). Não houve diferença do peso dos testículos entre os grupos ($p= 0,52$; $C= 4,11\pm0,93g$, $S= 4,10\pm0,82g$ e $B= 3,78\pm0,41g$). Porém, o peso das glândulas sexuais acessórias (glândulas vesiculares e bulbouretrais somadas) foi maior ($p=0,02$) no grupo B ($C= 1,6\pm0,3g$, $S= 1,7\pm0,4g$ e $B= 2,1\pm0,4g$) que nos demais grupos.

2.5.3 Componentes séricos

As concentrações de cálcio ($p= 0,66$; $C= 10,7\pm0,6$ mg/dL, $S= 10,4\pm0,7$ mg/dL e $B= 10,4\pm0,3$ mg/dL), fósforo ($p= 0,87$; $C= 8,3\pm0,8$ mg/dL, $S= 7,9\pm1,9$ mg/dL e $B= 8,0\pm1,1$ mg/dL) e atividade da fosfatase alcalina (U/mL) não diferiram entre os grupos ($p= 0,60$; $C= 81,4\pm34,1$, $S= 91,9\pm31,3$ e $B= 96,2\pm25,0$).

As concentrações de insulina ($p= 0,58$; $C=6,85\pm0,68$ uU/ml, $S= 8,8\pm3,3$ uU/mL e $B= 8,8\pm4,3$ uU/mL), leptina ($p= 0,59$; $C= 1,2\pm0,7$ uU/mL, $S= 1,3\pm0,1$ uU/mL e $B= 1,5\pm0,5$ uU/mL), hormônio luteinizante (LH) ($p= 0,53$; $C= 0,5\pm0,2$ ng/mL, $S= 0,6\pm0,1$ ng/mL e $B= 0,6\pm0,1$ ng/mL) e o testosterona ($p= 0,60$; $C= 1,4\pm1,1$ ng/mL, $S= 0,9\pm0,5$ ng/mL e $B= 0,7\pm0,5$ ng/mL) não diferiram entre os grupos.

2.5.4 Análise da estrutura óssea

Não houve diferença na densitometria mineral óssea (DMO) do fêmur entre os grupos. A resistência na região da cabeça do fêmur foi maior no grupo B do que no grupo C e do grupo S. Em relação a rigidez do fêmur não teve diferença entre os grupos (Tabela 4).

Não houve diferença na porcentagem de volume ósseo (BV/TV) ($p= 0,82$; $C= 75,5\pm7,7\%$, $S= 75,8\pm3,8\%$ e $B= 79,7\pm10\%$), na espessura (Tb.Th) ($p=0,74$; $C= 0,2\pm0,01$ mm, $S= 0,2\pm0,00$ mm e $B= 0,2\pm0,02$ mm) e no

número de trabéculas (Tb.N) ($p= 0,16$; $C= 4,5\pm0,24$, $S= 4,2\pm0,17$ e $B= 4,0\pm0,35$) quando os ossos trabeculares foram avaliados por microtomografia. Na avaliação do osso cortical não teve diferença no número de poros (Po.N) ($p= 0,58$; $C= 0,67\pm1,15$, $S= 0,7\pm1,2$ e $B= 1,7\pm1,5$) e na porcentagem de poros (Po) ($p= 0,74$; $C= 0,18\pm0,01\%$, $S= 0,05\pm0,1\%$ e $B= 0,2\pm0,3\%$) entre os grupos.

A porcentagem de cálcio no osso tendeu ser maior nos grupos S (7%) e B (11%) quando comparados com o grupo C. A concentração de fósforo do grupo B foi maior (7%) que nos grupos C e S. Quanto ao grau de mineralização dos fêmures, houve tendência a ser maior no grupo B quando comparados com os grupos C e S (Tabela 4).

2.6 Discussão e conclusão

2.6.1 Análise da estrutura óssea

Diferente do esperado, a suplementação com extrato hidrossolúvel de soja e castanha-do-Brasil não interferiu na DMO do fêmur de ratos idosos. O consumo de uma unidade de castanha-do-Brasil pelos ratos teve média de 3,7g/dia, sendo equivalente a 33 unidades para o humano. Há poucos estudos sobre a avaliação do efeito da ingestão de EHS na densitometria óssea em ratos naturalmente envelhecidos. No entanto, a exposição neonatal à genisteína e daidzeína, isoflavonas da soja aumentou a densidade mineral óssea e força na vértebra lombar na idade jovem, sugerindo que as isoflavonas tiveram função semelhante ao estrogênio endógeno sobre o desenvolvimento ósseo em camundongos fêmeas.²⁰ O consumo de soja na dieta estimulou o crescimento ósseo tanto em ratas ovariectomizadas quanto intactas; a suplementação com as isoflavonas da soja produziu maior DMO e melhor estrutura tanto do fêmur quanto das vértebras lombares.²¹⁻²⁴ Suplementos de proteína de soja com altos teores de isoflavonas provocaram a diminuição de perda óssea em mulheres na

pós-menopausa.²⁵ As isoflavonas da soja previniram a perda óssea osteoporótica em mulheres, reduzindo a reabsorção óssea e promovendo a formação óssea.²⁶

No estudo de cisalhamento foi possível observar que a força máxima da cabeça do fêmur foi maior no grupo B em relação aos outros grupos, mas não houve diferença na força máxima de cisalhamento no terço médio entre os grupos. A rigidez tanto da cabeça do fêmur, quanto do terço médio não diferiu entre os grupos. As variáveis do ensaio mecânico (EMIC) fornecem informações sobre as propriedades dinâmicas e estão relacionadas a resistência óssea.²⁷, sendo esta última relacionada com a concentração de cálcio e fósforo para uma boa resposta óssea às homeostases mineral e esquelética.²⁸

Além disso, a suplementação com EHS ou castanha-do-Brasil provocou uma tendência de aumento na porcentagem de cálcio nas cinzas dos fêmures que foi determinante para DMO e força óssea.²⁹ Em humanos a suplementação com genisteína promoveu a mineralização óssea aumentando o cálcio, fosforo e magnésio além de ajustar a calcitonina sérica para prevenção da osteoporose.³⁰

Apesar das suplementações no presente estudo não alterarem a microarquitetura trabecular e cortical, outro estudo com camundongos machos de 13 semanas de idade apresentaram aumento na BV/TV, Tb.N e DMO.³¹ Observou-se que a exposição precoce com daidzeína nos camundongos fêmeas melhorou a conectividade trabecular, incluindo o aumento de Tb.N, o que favoreceu a prevenção da osteoporose, reduzindo a porosidade óssea e aumentando o suporte estrutural dos ossos.²⁰

Mesmo não havendo estudos associando a ingestão da castanha-do-brasil com biomarcadores ósseos, foi possível observar que o consumo em curto prazo (4 semanas) não interferiu na DMO, mas melhorou a resistência da região da cabeça do fêmur de ratos machos idosos, sendo esta observação confirmada pelo aumento na concentração de fósforo e tendência de aumento no percentual de cálcio nos ossos.

2.6.2 Massa corporal, consumo de ração e água

Não houve influência do consumo de EHS ou de castanha na massa corporal (g) dos animais entre os grupos. Entretanto, os animais dos grupos S consumiram menos ração e água, porém ao incluir o consumo de EHS como sendo água, a quantidade de ingestão de líquidos no grupo S foi maior que os grupos C e B. Esse excesso pode ser explicado pela elevada palatabilidade do EHS. A redução na ingestão de alimentos também foi observada por Anderson³², em homens jovens suplementados com proteína de soja.

A suplementação com castanha também reduziu o consumo de ração quando comparado ao controle. Provavelmente as proteínas, fibras e lipídeos presentes nas oleaginosas aumentam a saciedade.³³

As castanhas são ricas em lipídios, principalmente em MUFAs (Ácidos graxos monossaturados) e PUFA (Ácidos graxos poliinsaturados), além de possuírem alta densidade energética. Apesar da elevada composição calórica, o consumo de castanhas por curto período não aumentou a massa corporal dos ratos. Em estudo com adolescentes obesas a ingestão de castanha não alterou a massa corporal, a circunferência da cintura e o IMC, devido ao possível estímulo na saciedade.³⁴⁻³⁵

2.6.3 Componentes séricos

A atividade da fosfatase alcalina e as concentrações de cálcio e fósforo no soro não diferiram entre os grupos, sugerindo que esses marcadores bioquímicos de formação óssea não foram alterados. Há relato de que as isoflavonas impactam o metabolismo ósseo estimulando a atividade osteoblástica.³⁶ Provavelmente os fitoestrógenos auxiliaram na degeneração óssea, mas não aumentaram a formação de tecido ósseo,

considerando ainda se tratar de ratos idosos. Não foram encontrados estudos relacionados à formação óssea associada a castanha-do-Brasil.

Apesar de não ter diferença estatisticamente significativa, a concentração de insulina do grupo S foi 29% acima do grupo C. Há relatos de que a alimentação com proteína de soja melhorou a tolerância à glicose, à sensibilidade e à insulina em ratos machos.³⁷ Mas o consumo de castanha por 16 semanas não influenciou a homeostase da glicose em adolescentes.³³

No presente estudo não houve diferença estatística significativa na concentração do LH entre os grupos, mas os ratos do grupo B possuíram concentração de testosterona 46% acima do grupo C. Em humanos os baixos níveis de testosterona podem provocar risco de osteoporose e fratura.³⁸⁻³⁹ E em camundongos machos, a alimentação dietética de isoflavonas também reduziu a concentração plasmática de testosterona.⁴⁰

2.6.4 Massa da gordura abdominal, testículos e glândulas sexuais acessórias

A massa de gordura abdominal do grupo B teve tendência a ser maior em 25%, quando comparada ao grupo C. Estudo com ratos machos gerados de ratas com restrição de proteína e que receberam soja ou caseína após o nascimento mostraram que a dieta com soja reduziu o percentual de gordura, comparado com a caseína. Na dieta de soja os animais consumiram a mesma quantidade de dieta daqueles alimentados com caseína.⁴¹

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação aos pesos dos testículos entre os grupos tratados e o controle, confirmando o mesmo achado em estudo com suplementação com soja por nove semanas em camundongos machos, sendo que o peso médio dos testículos não se alterou quando comparado ao controle.⁴¹

Conclui-se que a ingestão de extrato hidrossolúvel de soja ou castanha-do-Brasil não alterou a massa corporal, os componentes e as

concentrações dos hormônios plasmáticos. O consumo de EHS não interferiu no metabolismo ósseo, mas o consumo da castanha resultou em maior força óssea da cabeça do fêmur, concentração de fósforo no fêmur e provocou hipertrofia das glândulas sexuais acessórias nos ratos com idade avançada, porém ainda são necessários mais estudos com castanha-do-brasil para entender os mecanismos biológicos e bioquímicos pelos quais os fitoestrógenos exercem função na estrutura mineral óssea.

2.7 Referências bibliográficas

- 1- Anton SD, Woods AJ, Ashizawa T, Barb D, Buford TW, Carter CS, et al. Successful Aging: Advancing the Science of Physical Independence in Older Adult. *Ageing Res Rev* 2015; 24:304-327.
- 2- Landi F, Liperoti R, Russo A, Giovanninni S, Tosato M, Capoluongo E, Bernabei R, et al. Sarcopenia as a risk factor for fall in elderly individual: Result from the iLSIRENTE study. *Clinical Nutrition* 2012; 31: 652-658.
- 3- Rohden F. “O homem é mesmo a sua testosterona”: promoção da andropausa e representações sobre sexualidade e envelhecimento no cenário brasileiro. *Horizontes Antropológicos* 2011;17:161-196.
- 4- Antunes S, Marcelino O, Aguiar T. Fisiopatologia da menopausa. *Ver Prot Cclin Geral* 2003; 19:353-357.
- 5- Kuhnle GGC, Aquila CD, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen content of beverages, nuts, seeds and oils. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2008; 56: 7311-7315.
- 6- Dang ZC, Lowik C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Endocrinology and Metabolism* 2005; 16: 207-213.
- 7- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, daidzein, and their glycoside conjugates: antitumor isoflavonoids in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 1961-1967.
- 8- Deliza R, Serna SS, Germani R, Benassi VT, Cabral LC. The effects of colored textured soybean protein (TSP) on sensory and physical

- attributes of ground beef patties. *Journal of Sensory Studies* 2002; 17:121-133.
- 9- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012;355: 192-200.
- 10- Abdi F, Alimoradi Z, Haqi P, Mahdizad F. Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: a systematic review of randomized, controlled trials. *Climacteric* 2016; 6: 535-545.
- 11- Kornsteiner M, Wagner KH, & Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 2006;98(2): 381-387.
- 12- Lima RMB, & de Souza CR. Recomendação de espaçamento para produção de madeira de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. et Bonpl.) para plantios em áreas alteradas no Amazonas. In E. A. Ocidental (Ed.), *Embrapa Amazônia Ocidental Library* 2014. Manaus, Brazil: Embrapa Amazônia Ocidental.
- 13- Andrade CMF, Oliveira LCN, Louzada MJ. Análise do consumo de extrato hidrossolúvel de soja na qualidade do tecido ósseo de ratos jovens adultos. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva* 2018;12: 688-698.
- 14- Hong MY, Groven S, Marx A, Rasmussen C, Beidler J. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Hypolipidemic Effects of Mixed Nuts in Atherogenic Diet-Fed Rats. *Molecules* 2018; 23: 1-13.
- 15- Daly JA, Ertingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "Centrifichem". *Clin Chem* 1972; 18:263.

- 16- Roy AV. Clin Chem 1970; 16:431.
- 17- Beltran MP. Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos Taurus indicus*). 2011. 106 f. Tese de Doutorado (Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.
- 18- Bolt DJ, Rollins R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. Journal of Animal Science 1983; 56: 146-154.
- 19- Stringhetta-Garcia CT, Singulani MP, Santos LF, Louzada MJQ, Nakamune ACS, Chaves-Neto AH, Rossi AC. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. Bone 2016; 85: 45-54.
- 20- Kaludjerovic J, Ward WE. Neonatal exposure to daidzein, genistein, or the combination modulates bone development in female CD-1 mice. J Nutr 2009;139: 467-473.
- 21- Piekarz AV, Ward WE. Effect of neonatal exposure to genistein on bonemetabolism in mice at adulthood. Pediatr Res 2007;61: 48-53.
- 22- Chen JR, Singhal R, Lazarenko OP, Liu X, Hogue WR, Badger TM, et al. Short term effects on bone quality associated with consumption of soy protein isolate and other dietary protein sources in rapidly growing female rats. Exp Biol Med 2008; 233(11):1348–58.
- 23- Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ, Heubi JE. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced

- by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(5):1072–1079.
- 24- Yang L, Graef GL, Nielsen FH, Johson LK, Cao J. Soy proteins is beneficial but high-fat diet and voluntary running are detrimental to bone estructure in mice. *Nutrition Research* 2015; XX: 1-9.
- 25- Taku K, Melby MK, Takebayashi J, et al. Effect of soy isoflavone extract supplements on bone mineral density in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pacific J Clin Nutr* 2010;19:33–42.
- 26- Chi X-X, Zhang T. The effects of soy isoflavone on bone density in north region of climacteric Chinese women. *J Clin Biochem Nutr* 2013;53:102–7.
- 27- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14: 595-608.
- 28- Ferretti M, Cavani F, Roli L, Checchi M, Magarò MS, Bertacchini, *et al.* Interaction among Ccalcium Diet Content, PTH (1-34) Treatment and Balance of Bone Homeostasis in Rat Model: The Trabecular Bone as Keystone. *Int J Mol Sci* 2019; 11:20-23.
- 29- Hunt JR, Hunt CD, Zito CA, Idso JP, Johnson LK. Calcium requirements of growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are similar. *J Nutr* 2008;138:1462–8.
- 30- Wang ZL, Sun JY, Wang DN, Xie YH, Wang SW, Zhao VW. Pharmacological studies of the large-scaled purified genistein from Huaijiao (*Sophora japonica*-Leguminosae) on anti-osteoporosis. *Phytomedicine. Int J Phytother Phytopharmacol* 2006;13:718–723.

- 31- Maranhão PA, Kraemer-Aguiar LG, Oliveira CL, Kuschnir MCC, Vieira YR, Souza MGC, et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutrition & Metabolism*, 2011, 32:8.
- 32- Anderson GH, Tecimer SN, Shah D, Zafar TA: Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *J Nutr* 2004, 134:3011-3015.
- 33- Mattes RD, Dreher ML. Nuts and healthy body weight maintenance mechanisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2010; 19: 137-141.
- 34- Brennan AM, Sweeney LL, Liu X, Mantzoros CS: Walnut consumption increases satiation but has no effect on insulin resistance or the metabolic profile over a 4-day period. *Obesity (Silver Spring)*. 2010, 18: 1176-1182.
- 35- Brynin, R. Soy and its isoflavones: a review of their effects on bone density. *Altern. Med. Rev.* 2002; 7: 317-327.
- 36- Whitten, P.L.; Patisaul, H.B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 5–20.
- 37- Camacho EM, Huhtaniemi IT, O'neil TW, Finn JD, Pye SR; Lee DM, et al. Age-associated changes in hypothalamic-pituitary-testicular function in middle-aged and older men are modified by weight change and lifestyle factors: longitudinal results from the European Male Ageing Study. *Eur J Endocrinol* 2013; 168: 445–455.

- 38- Sogaard AJ, Holvik K, Omsland TK, Tell GS, Dahl C, Schei B, et al. Abdominal obesity increases the risk of hip fracture. A population-based study of 43,000 women and men aged 60–79 years followed for 8 years. *J Int Med* 2015; 277: 306–317.

- 39- Cline JM, Franke AA, Register TC, Golden DL, Adams MR. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicol Pathol* 2004; 32:91-99.

- 40- Cheim LMG, Oliveira EA, Arantes VC, Veloso RV, Reis MAB, Gomes-da-Silva MH. Effect of nutritional recovery with soybean flour diet on body composition, energy balance and serum leptin concentration in adult rats. *Nutrition & Metabolism* 2009; 6: 1-9.

- 41- Mehrdad M, Messripour M, Khorami H. Effect of soybean on male reproductive physiology in mice. *International Conference on Life Science and Technology* 2011; 3: 15-18.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Composição Nutricional da Ração Primor® MP77.

Informações Nutricionais	
Magnésio	0,006 mg
Ferro	180 mg
Cobre	30 mg
Zinco	110 mg
Manganês	110 mg
Iodo	1 mg
Selênio	0,2 mg
Cobalto	2 mg
Vitamina A	25.577 UI
Vitamina D3	4.000 UI
Vitamina E	82 mg
Vitamina K	6,40 mg
Ácido Fólico	13 mg
Biotina	0.16 mg
Colina	2.800 mg
Niacina	220 mg
Pantotenato de cálcio	90 mg
Tiamina	11 mg
Riboflavina	12 mg
Piridoxina	vit. B6
	HCl
Antioxidante	200 mg
Ácido propiônico	1.486 mg
Carboidratos	55%
Umidade máxima	13%
Proteína bruta (min.)	23%
Extrato etéreo (min.)	4%
Matéria fibrosa (max.)	7%
Matéria mineral	
(max.)	10%
Cálcio (min.)	1,10%
Cálcio (máx.)	1,30%
Fósforo (min.)	0,85%

Fonte: Fornecidos pelo Fabricante, Primor®, via email.

Tabela 2- Composição Nutricional do Extrato Hidrossolúvel de Soja ADES® Zero.

Informações nutricionais		
Porção de 200 mL (1copo)		%VD*
	59 kcal - 247	
Valor energético	KJ	4%
Carboidratos, dos quais:	2,4 g	1%
Lactose	0 g	**
Açúcares	0,7 g	**
Proteínas	5,2 g	7%
Gorduras totais, das quais:	3,1 g	6%
Gorduras saturadas	0,4 g	2%
Gorduras trans	0 g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,6 g	**
Gorduras poliinsaturadas	1,8 g	**
Colesterol	0 mg	**
Fibra alimentar	1,9 g	8%
Sódio	166 mg	8%
Cálcio	166 mg	24%
Zinco	1,1 mg	16%
Vitamina E	1,5 mg	15%
Vitamina B2	0,39	30%
Vitamina B6	0,20 mg	15%
Vitamina A	90 µm	15%
Ácido fólico	36 µm	15%
Vitamina D	2,0 µm	40%
Vitamina B12	0,96	40%

Fonte: Site do fabricante,
<http://www.adess.com.br/produtos/detalhe/644889/adess-original>

Tabela 3- Massa corporal (g) dos ratos idosos, tratados com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) (300mL/dia) ou castanha-do-Brasil (1 unidade/dia/animal) por 30 dias com controle semanal (Média±Desvio Padrão).

Grupos	Massa corporal (g)/Dias de idade					p value
	570d	577d	584d	591d	600d	
Controle (n=8)	585±0,03	570±0,04	590±0,03	610±0,04	600±0,03	0,405
EHS (n=9)	598±0,04	589±0,05	593±0,06	610±0,04	610±0,04	0,918
Castanha-do-Brasil (n=10)	608±0,03	613±0,03	618±0,03	628±0,03	629±0,03	0,750
p value	0,514	0,14	0,4	0,59	0,56	

*ANOVA – Não houve diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$)

*Semanas de tratamento identificadas com as idades dos animais.

Tabela 4- Análise da estrutura óssea dos ratos idosos, aos 600 dias de idade, suplementados por 30 dias com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) (150 mL/dia/animal) ou castanha-do-Brasil (1 unidade/dia/animal) ou sem tratamento (Média±Desvio Padrão).

Grupo	Dados Biofísicos							
	DMO(g/cm ²)	Fmax-c (N)	R-c (10 ³ N/m)	Fmax-tm (N)	R-tm (10 ³ N/m)	% Cinzas	% Cálcio	% Fósforo
Controle	0,382±0,02	112,16±37,09 ^a	329,56±132,38	194,72±37,85	325,53±71,87	54,8±4,15 ^a	27,45±1,45	14,72±1,02 ^a
EHS	0,386±0,05	136,94±36,92 ^a	358,82±51,03	202,58±24,95	371,42±75,63	56,7±1,60 ^a	30,31±3,55	15,69±1,02 ^a
Castanha-do-Brasil	0,380±0,03	151,05±14,53 ^b	366,95±69,66	185±47,93	386,73±60,63	57,76±1,52 ^b	30,55±2,69	16,16±1,18 ^b
p value	0,90	0,04	0,66	0,62	0,18	0,072	0,051	0,03

*ANOVA - Houve diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0.05) – letras minúsculas= diferença estatística entre os grupos.

** DMO (g/m²)= densitometria óssea; Fmax-c (N)= força máxima da cabeça do fêmur; R-c (10³N/m)= rigidez da cabeça do fêmur; Fmax-tm (N)= força máxima do terço médio da tíbia; R-tm (10³N/m)= rigidez do terço médio da tíbia; % Cinzas= porcentagem de cinzas; % Cálcio= porcentagem de Cálcio e % Fósforo= porcentagem de fósforo (%),

APÊNDICE “REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL”

1- Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). No Dia Internacional da Pessoa Idosa, OPAS chama atenção para envelhecimento saudável. <>. Acesso 06 de junho de 2019.

2- Nações Unidas Brasil. <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso 06 de junho de 2019.

3- Anton SD, Woods AJ, Ashizawa T, Barb D, Buford TW, Carter CS, et al. Successful Aging: Advancing the Science of Physical Independence in Older Adult. *Ageing Res Rev* 2015; 24:304-327.

4- Walston J, Hadley EC, Ferrucci L, Guralnik JM, Newman AB, Studenski SA, et al. Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology an etiology: summary from American Geriatrics Society/National Institute on Aging Reaserch Conference on Frailty in Older Adults. *J Am Geriatric* 2006; 54:991–1001.

5- Byun JS, Lee SS. Effect of soybeans and sword beans on bone metabolism in a rat model of osteoporosis. *Ann Nutr Metab* 2010; 56:106-112.

6- Branca F, Lorezento S. Health effects of Phytoestrogens. *Forum Nutr* 2005; 57:100-11.

7- Mauras N, Hayes V, Welch S, Rino A, Helgeson K, Dokler M, et al. Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1886 –1892.

- 8- Katznelson L, Rosenthal DI, Rosol MS, Anderson EJ, Hayden DL, Schoenfeld DA, et al. Using quantitative CT to assess adipose distribution in adult men with acquired hypogonadism. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170:423– 427.
- 9- Kannus P, Parkkari J, Sievanen H, Heinonen A, Vvuori I, Jarvinen M. Epidemiology of hip fractures. *Bone* 1996; 18:57S– 63S.
- 10- Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Phytoestrogens¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; 83: 297-303.
- 11- Organização Mundial da Saúde. Envelhecimento ativo: uma política de saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2005.
- 12- Ministério da Saúde (BR). Cadernos de atenção básica nº 19: Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. Brasília: MS; 2006.
- 13- Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR; Baltimore Longitudinal Study of Aging. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:724-731.
- 14- Khosla S, Riggs BL, Robb RA, Ccamp JJ, Achenbach SJ, Oberg AL, et al. Relationship of volumetric bone density and structural parameters at different skeletal sites to sex steroid levels in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5096–103.
- 15- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:576–81.

- 16- Morales A, Lunenfeld B. International Society for the Study of the Aging Male. Investigation, treatment and monitoring of lateonset hypogonadism in males. Official recommendation of ISSAM. International Society for the study of the Aging Male. Aging Male 2002;74-86
- 17- Bonaccorsi AC. Andropausa: Insuficiência Androgênica Parcial do Homem Idoso. Uma Revisão. Arq Bras Endocrinol Metab, 2001;45: 123-134.
- 18- Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res 1994; 9:1137–1141.
- 19- Kanis JA, On behalf of the WHO Scientific Group. Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. In: Technical Report. University of Sheffield. UK WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases 2007.
- 20- Samelson EJ, Christiansen BA, Demissie S, et al. QCT measures of bone strength at the thoracic and lumbar spine: the Framingham Study. J Bone Miner Res 2012;27:654-663.
- 21- Hanley DA. Biochemical markers of bone turnover. The osteoporosis. Cambridge: University Press 2000; 1:239-52.
- 22- Radominski SC, Pinto-Neto AM, Marinho RM, Costa-Paiva LHS, Pereira F, Urbanetz AA, et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa. Rev. Bras. Reumatol 2004; 426-34.
- 23- Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. Nat. Rev. Endocrinol 2013; 9: 699–712.

- 24- Embrapa: importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/QueirozNogueira_Scramin_importanciaID-5nX98pWTxk.pdf. Acesso 07 de junho de 2019.
- 25- Esteves EA, Bressan J, Monteiro R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Rev. Nutr* 2001; 14: 43-52.
- 26- Alasalvar C, Bolling BW. Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. *Br J Nutr* 2015; 113: S68-78.
- 27- Dall'Agnol A. Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições. Embrapa 2016; 1-73.
- 28- Freitas MCM. Cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *Enciclopédia biosfera*, 2011; 7: 1-12.
- 29- FAO. Soymilk and related products. FAO Agricultural Services 1994; 97.
- 30- USDA – United States Department of Agriculture. USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of foods. <<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>>. Acesso em: 07 de junho de 2019.
- 31- Wu Z, Rodgers RP, Marshall AG. Characterization of vegetable oils: detailed compositional fingerprints derived from electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 5322-5328.

- 32- Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1994; 34: 31-67.
- 33- Karr-Lilienthal LK, Kadzere CT, Grieshop CM, Fahey Jr GC. Chemical and Nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Science* 2005; 97: 1-12.
- 34- Chang YK. Alimentos funcionais e aplicação tecnológica: padaria da saúde e centro de pesquisas em tecnologia de extrusão. *Embrapa Soja* 2001;1: 41-45.
- 35- Friedman M, Brandon DL. Review: nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 1069-1086.
- 36- Genovese MI, Lajolo FM. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2001; 21:86-93.
- 37- MASUCHI MH, CELEGHINI RMS, GONÇALVES LAG, GRIMALDI R. Quantificação de TBHQ (Terc Butil Hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. *Química nova* 2008; 31: 1053-1057.
- 38- Penha LAO, Fonseca ICB, Mandarino JM, Benassi VT. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 2007; 25: 91-102.
- 39- Lima ECS, Cardoso MH. Bebida de Soja (Glycine Max) e Acerola (Malpighia Punicifolia) enriquecida com cálcio. *Alimentos e Nutrição* 2012; 23: 549-553.

- 40- Silva MS, Naves MMV, Oliveira RB, Leite OSM. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2006; 26:571-576.
- 41- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012;355: 192-200.
- 42- Ribeiro MBN, Jerozolinski A, de Robert P, Salles NV, Kayapó B, Pimentel T P, Magnusson WE. Anthropogenic landscape in southeastern Amazonia: contemporary impacts of low-intensity harvesting and dispersal of Brazil nuts by the Kayapó Indigenous people. *PLoS ONE* 2014; 9: e102187.
- 43- IndexBox. World: Brazil Nuts – Market Report. Analysis and Forecast to 2020.<http://www.indexbox.co.uk/news/Globalization-on-the-Brazil-Nut-Market/>. Acesso 07 de junho de 2019.
- 44- Tan SY, Mattes RD. Appetitive, dietary and health effects of almonds consumed with meals or as snacks: a randomized, controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2013; 67:1205-1214.
- 45- Zaveri S, Drummond S. The effect of including a conventional snack (cereal bar) and a nonconventional snack (almonds) on hunger, eating frequency, dietary intake and body weight. *J Hum Nutr Diet* 2009; 22: 461-468.
- 46- Flores-Mateo G, Rojas-Rueda D, Basora J, Ros E, Salas-Salvado J. Nut intake and adiposity: meta-analysis of clinical trials. *Am J Clin Nutr* 2013; 97:1346-1355.

47- Shang X, Scott D, Hodge A, English DR, Giles GG, Ebeling PR, Sanders KM. Dietary protein from different food sources, incident metabolic syndrome and changes in its components: An 11-year longitudinal study in healthy community-dwelling adults. *Clin Nutr* 2017; 36: 1540-1548.

48- Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology* 2009; 42: 1573-1580.

49- Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts implications for cardiovascular health. *Br J Nutr* 2006; 96: S29-35.

50- De Lima RMB, De Souza CR. Recomendação de espaçamento para produção de madeira de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. et Bonpl.) para plantios em áreas alteradas no Amazonas. In E. A. Ocidental (Ed.), *Embrapa Amazônia Ocidental Library*. Manaus, Brazil: Embrapa Amazônia Ocidental 2014.

51- Silva RF, Ascheri JLR, Souza JML. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. *Ciênc Agrotec* 2010; 34: 445-450.

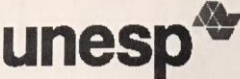
52- O'Neil CE, Keast DR, Nicklas TA, Fulgoni VL. Out-of-hand nut consumption is associated with improved nutrient intake and health risk markers in US children and adults: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Nutr Res* 2012;32: 185-194.

53- O'Neil CE, Nicklas TA, Fulgoni VL. Tree nut consumption is associated with better nutrient adequacy and diet quality in adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2010. *Nutrients* 2015; 7: 595-607.

- 54- Rehm CD, Drewnowski, A. Replacing American snacks with tree nuts increases consumption of key nutrients among US children and adults: results of an NHANES modeling study. *Nutr J* 2017; 16: 17-31.
- 55- Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA 2011; 4. Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO. Campinas. <http://www.unicamp.br/nepa/taco/home.php?ativo=home> Acesso 10 de junho de 2019.
- 56- Bradley WB, McKay DL, Blumberg J. The phytochemical composition and antioxidante actions of tree nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2010; 19: 117-123.
- 57- USDA National Nutrient Database. USDA Food Composition Databases. Release 28. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>. Acesso 10 junho de 2019.
- 58- Bahadoran Z, Golzarand M, Mirmiran P, Saadati N, Azizi F. The association of dietary phytochemical index and cardiometabolic risk factors in adults: Tehran Lipid and Glucose Study. *J Hum Nutr Diet* 2013; 26: 145-53.
- 59- Bolling BW, Chen CY, McKay DL, Blumberg JB. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr Res Ver* 2011; 24: 244-275.
- 60- John JA, Shahidi F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *J Funct Foods* 2010; 2: 196-209.

- 60- Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 9966-9977.
- 61- Fogaça FHS. Efeito do tocoferol no desempenho e na estabilidade lipídica da Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). 2005. 79f. (Mestrado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- 62- Costa PA, Ballus CA, Teixeira-Filho J, Godoy HT. Phytosterols and tocoferol content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International* 2010;13: 1603-1603.
- 63- Pereira EC. Efeitos da sinvastatina, α -tocoferol e L- arginina sobre os inibidores endógenos da oxido nítrico sintase, metabolitos do óxido nítrico e tióis em pacientes hipercolesterolêmicos. 2002. 122 f. (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo-São Paulo.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito do consumo do extrato hidrossolúvel de soja e da castanha-do-pará em parâmetros biofísicos nos ratos Wistar idosos"**, Processo FOA nº 00418-2017, sob responsabilidade de Guilherme de Paula Nogueira apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Junho de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 20 de Julho de 2017.

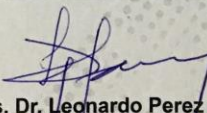
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Agosto de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of soybean and Brasil nut consumption on biophysical parameters in elderly Wistar rats"**, Protocol FOA nº 00418-2017, under the supervision of Guilherme de Paula Nogueira presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 14, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 20, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 20, 2017.



Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B - NORMAS DA REVISTA

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research publishes original research articles of outstanding scientific significance. Manuscripts must be submitted in English. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research clearly demonstrates its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

Authorship requirements

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
- Wrote the paper, or reviewed successive versions.
- Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the Acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

Cover Letter

It is important that you include a cover letter with your manuscript. Take the time to consider why this manuscript is suitable for publication in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Why will your paper inspire the other members of your field, and how will it drive research forward? Please explain this in your cover letter.

The cover letter should also contain the following information:

- Title of article.
- Name(s) of all author(s).

- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, fax number and e-mail of author to whom correspondence should be sent.
- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to another journal, include comments from the peer reviewers and indicate how the authors have responded to these comments.
- Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated) and that written informed consent was obtained from all participants. This information must also be cited in the Material and Methods section of the manuscript.

Text format

- The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file created with MS Word as a ".doc", ".docx" or ".rtf" document.
- Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title and limit their use in the abstract and text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources:

- Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 8th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006. <http://www.scientific-styleandformat.org/Home.html>
- Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

- Writing scientific articles like a native English speaker: top ten tips for Portuguese speakers. *Clinics* (Sao Paulo). Mar 2014; 69(3): 153-157. doi: 10.6061/clinics/2014(03)01. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935133/>

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

The writing style should be concise and accessible. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in American English. As a step towards overcoming language barriers, we encourage authors to seek the assistance of professional services available on the site.

Footnotes

Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the abstract and the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the abstract, text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of SI units.

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than 5×10^{-3} M or 0.005 M

Species names (e.g., *Homo sapiens*), genes, mutations, genotypes, and alleles should be italicized. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

The Recommended International Non-Proprietary Name (rINN) of drugs should be provided.

Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper, Short Communication, Review Article, Overview, Concepts and Comments, or Case Report.

Full-length paper

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study; and a discussion placing the results in the context of published literature.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (without exceptions)

Short communication

A short communication is a report on a single subject, which should be concise but definitive. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces

Most articles published in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research will be organized into the following sections:

- Title, Authors, Affiliations, Abstract, Key words, Running Title, Author for Correspondence and email address
- Introduction
- Material and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Tables with a short descriptive title and footnote legends
- Figures with a short descriptive title, descriptive legends and uniformity in format

Continuous page numbers are required for all pages including figures. There are no specific length restrictions for the overall manuscript or individual sections. However, we urge authors to present and discuss their findings concisely. We recognize that some articles will not be best presented in our research article format. If you have a manuscript that would benefit from a different format, please contact the editors to discuss this further.

Title Page

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example: **Single-step purification of crotapotin and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**

Authors and Affiliations

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, City, State, Country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example:

A.S. Aguiar¹, A.R. Melgarejo¹, C.R. Alves² and S. Giovanni-De-Simone^{2,3}

¹Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil

²Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

Abstract

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts in a single paragraph. The abstract should not exceed 250 words.

The abstract should briefly and clearly present the objective, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

Please see <http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html> for suggestions on writing a good abstract

Key Words

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see [http://www.scielo.br/bjmbr;articles search/subject](http://www.scielo.br/bjmbr;articles%20search/subject)) to index published articles.

Running title

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

Corresponding author

One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list is accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed in the Acknowledgments section.

Provide the name and email address of the author to whom correspondence should be sent.

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

Material and Methods

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

Results

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of

the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplementary files; these are published online linked to the article. The Results section should be written in past tense. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section.

Discussion

The purpose of the Discussion is to identify new and relevant results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all of the results should not be repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments section, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged in this section (agency and grant number).

Figures

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi). Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure Preparation when preparing your figures for production.

Preparing figure files for submission

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of color figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

Supported file type

The following file format can be accepted: TIFF (suitable for images) – with 600 dpi.

Micrographs should be treated like photographs with the following additional guidelines

- Electron micrographs must contain a magnification bar with its equivalence in micrometers. This information can be found on all micrographs together with the magnification size.
- Details of any stains used and the method of preparation the sample should be given in the figure legend or in the Material and Methods section.
- Detailed information about the microscope used should be included in the Material and Methods section.
- The type of camera, photographic software and details of any subsequent image manipulation should be included in the Material and Methods section.

Tables

- Tables must be submitted in Word (.doc) or Excel (.xls), not as an image.
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Tables in Excel must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7). Where there are 3 or more sequential citations, they should be given as a range (4-9).

Because all references will be linked electronically (doi), if possible, to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, **list the first 6 authors followed by et al.**, Title of article, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages, The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details.

Please use the following style for the reference list:

Published Papers. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. *Arch Dis Child* 2008; 93: 464-468.
Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1627-1633.

Article accepted for publication but not yet published. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

Internet Communication. Ensure that URLs are active and available. Provide DOI, if available.

Developmental toxicology. <http://www.devtox.org/nomenclature/organ.php>. Accessed April 10, 2015.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

Audiovisual Material.

Physician's Desk Reference (PDR). Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Computer Program

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

Book, Whole. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), *Cytokines, stress and immunity*. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

National Heart Lung and Blood Institute. *Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report*. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

Thesis

Joselevitch C. *Visão no ultravioleta em Carassius auratus (Ostariophysi, Cypriniformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais*. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Conference, Symposium Proceedings. Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers". Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list. (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results). It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

Author Instructions

Please make sure you have read through these instructions carefully before beginning the submission process. Please go to www.bjournal.com.br at the right-hand corner of the home page and click on SUBMIT A MANUSCRIPT and follow the directions. If you need further assistance, please contact the Journal Staff directly (bjournal@terra.com.br -> bjournal@terra.com.br). Manuscript preparation instructions can be found at <http://www.bjournal.com.br>.

Submission Process

The seven steps of the submission process are: Type, Title & Abstract; Attributes; Authors & Institutions; Recommended reviewers; Details & Comments; File upload; Review & Submit. The steps each contain sub-steps that can be accessed by clicking on their respective tabs.