



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

EDUARDO JÚNIOR SERRÃO PINTO

**Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou
antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em
eritrócitos de camundongos swiss.**

EDUARDO JÚNIOR SERRÃO PINTO

Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde (PPGCS), da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ensaios Biológicos/Genética.

Orientador: Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto.

Macapá – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.9

P659d Pinto, Eduardo Júnior Serrão.

Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss / Eduardo Júnior Serrão Pinto; orientador, Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto. – Macapá, 2017.

97 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Ciências da saúde - Toxicologia genética. 2. Mutagênese. 3. Teste de micronúcleo. I. Monteiro Neto, Moacir de Azevedo Bentes, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

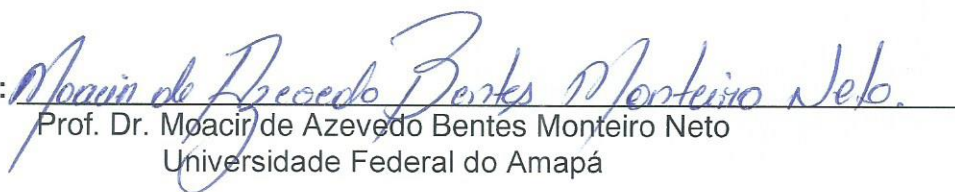
EDUARDO JÚNIOR SERRÃO PINTO

Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss.

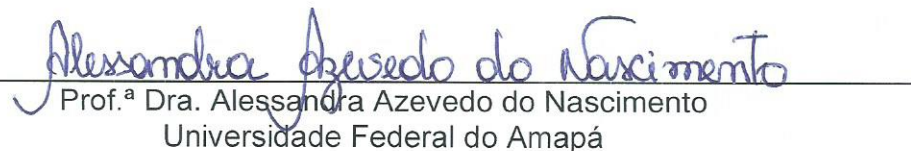
COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA

Aprovado em: 09/02/2017

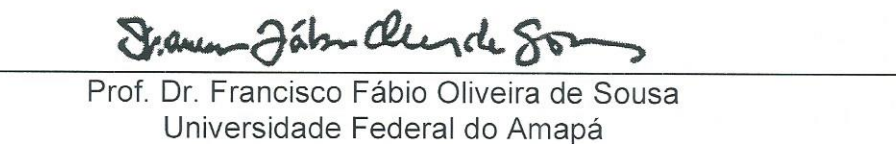
PRESIDENTE:


Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto
Universidade Federal do Amapá

TITULAR 1:


Prof.^a Dra. Alessandra Azevedo do Nascimento
Universidade Federal do Amapá

TITULAR 2:


Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa
Universidade Federal do Amapá

TITULAR 3:


Prof. Dr. Rafael Lima Resque
Universidade Federal do Amapá

Macapá – 2017

DEDICO este trabalho a todos que valorizam e incentivam a pesquisa científica com plantas medicinais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai misericordioso, que abraçou meus sonhos e segurou minha mão durante todo o percurso, me mantendo firme, confiante e com fé.

Aos meus pais, Maria Iranete Ramos Serrão e José Eduardo Serrão Pinto, pela educação, amor e conselhos, que me fizeram ver nos estudos o futuro sonhado. Sendo exemplos de pessoas honestas, meus pontos seguros e referenciais.

Aos meus avós Noêmia Ramos Serrão e Manoel de Brito Serrão, em especial a minha avó, que deixou partido meu coração em maio de 2016, e apesar da luta e tristeza, me mostrou a força e a beleza do amor, saudade eterna, minha linda flor!

A minha família, pelo convívio, pela confiança, apoio de sempre, e pela paciência em reconhecer e superar as dificuldades junto a mim.

Ao meu querido orientador Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto, por acreditar que posso sempre mais, pela parceria e dedicação durante todo o desenvolvimento do trabalho e pela paciência em mostrar o caminho a ser percorrido. Por me aceitar em seu grupo de pesquisa. E por fim, por ser mais que um orientador, um grande amigo.

A pesquisadora Dra. Edilluci do Socorro Tostes Malcher, pelo carinho, pelas dicas e grande colaboração nos procedimentos de extração e determinação da atividade antioxidante.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde – PPGCS, pelas aulas e ensinamentos durante o curso, em especial aos professores Dra. Deyse de Souza Dantas e Dr. Fernando Antonio de Medeiros, pela receptividade e apreço.

Aos meus amigos adquiridos no mestrado, que levarei para o resto da vida, Alan Bruno Aurélio Carneiro (PPGCS), Brenda Fernandes

Conrado (PPGCF) e Ivagner Ferreira Ribeiro (PPGCF), que acompanharam o estudo do início ao fim.

A todos os colegas da turma de mestrado PPGCS/2015.1, pelas experiências compartilhadas e pelas palavras que de alguma forma contribuíram para a realização da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida. E através desta, foi possível o financiamento do estudo.

A Universidade Federal do Amapá, pela oportunidade de cursar um curso de pós-graduação na linha de pesquisa pretendida. Importante para quem sonha em seguir carreira em Docência e Pesquisa.

E por fim ao Grupo de Pesquisas Citogenéticas e Biomoleculares (GPCBIO), grato a todos os participantes.

“Lembre-se de que você mesmo é o melhor secretário de sua tarefa, o mais eficiente propagandista de seus ideais, a mais clara demonstração de seus princípios, o mais alto padrão do ensino superior que seu espírito abraça e a mensagem viva das elevadas noções que você transmite aos outros.

Não se esqueça, igualmente, de que o maior inimigo de suas realizações mais nobres, a completa ou incompleta negação do idealismo sublime que você apregoa, a nota discordante da sinfonia do bem que pretende executar, o arquiteto de suas aflições e o destruidor de suas oportunidades de elevação - é você mesmo”.

Chico Xavier (Você Mesmo)

RESUMO

PINTO, Eduardo Júnior Serrão. Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss. 2017. 97 F. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Amapá – Ap.

A *Bertholletia excelsa* pertence à família das Lecitidáceas, popularmente conhecida como Castanha do Brasil e Castanha do Pará. Sua área de distribuição geográfica estende-se pelos estados do Maranhão, Pará, Acre, Amapá, Roraima e Amazonas, e em países vizinhos como Bolívia, Peru e Guianas. Esta espécie tem sido aplicada no combate das espécies reativas de oxigênio, por sua atividade antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo a determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss. O óleo fixo da *B. excelsa* foi obtido por prensagem hidráulica a frio. Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados o método β -caroteno/ácido linoleico, utilizando as concentrações de 10.000 e 15.000 ppm, e o método de DPPH, sendo empregadas as concentrações de 50.000, 70.000 e 100.000 ppm. Para as análises dos efeitos genotóxico e antigenotóxico foram utilizados camundongos swiss machos e saudáveis com 6-7 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Campinas, sendo seis animais em cada grupo de tratamento. Os grupos do efeito genotóxico foram tratados com as diferentes concentrações de *B. excelsa* (500, 1.000 e 2.000 mg/kg p. c.), controle negativo (água) e solvente dimetilsulfóxido (DMSO 200 μ L) em 0,5 mL por via oral. Para o efeito antigenotóxico os animais foram tratados com as concentrações pré-estabelecidas, seguida de injeção intraperitoneal de doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.) em 0,3 mL. As amostras de sangue periférico foram coletadas 24h e 48h após o tratamento. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) foi obtida a partir da análise de 2.000 PCEMNs/animal e o Índice de Divisão Nuclear foi estabelecido pela contagem de 400 eritrócitos policromáticos PCEs/animal, sendo um total de 2.400 PCEs/grupo. No método β -caroteno/ácido linoleico, foram obtidos os resultados de 92 e 87%, nas concentrações de 10.000 e 15.000, e no método de DPPH, os resultados foram 14,53, 25,57 e 40,33% para as concentrações de 50.000, 70.000 e 100.000. Na comparação entre os grupos tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da *B. excelsa* e os grupos controle negativo e DMSO, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de PCEMNs, demonstrando ausência de efeito genotóxico. Para análise do efeito antigenotóxico foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de PCEMNs, na comparação entre os grupos tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da *B. excelsa* + DXR com o grupo controle positivo, sendo as taxas de redução na frequência de PCEMNs de 52,08 a 67,36% em 24 horas e de 76,78 a 87,89% em 48 horas. Com a análise dos dados, concluiu-se que o óleo fixo da *B. excelsa* não demonstrou efeito genotóxico, entretanto, apresentou efeito antigenotóxico, de acordo com os protocolos e tratamentos executados neste trabalho.

Palavra-Chave: Ciências da saúde - Toxicologia genética; Mutagênese; Teste de micronúcleo.

ABSTRACT

PINTO, Eduardo Júnior Serrão. Determination of antioxidant activity and evaluation of the genotoxic and/or antigenotoxic effect of fixed oil of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) on erythrocytes of swiss mice. 2017. 97 F. Master's Dissertation (Master's Degree in Health Sciences). University Federal of Amapá – Ap.

Bertholletia excelsa belongs to the Lecitidaceae family, popularly known as Brazil nut and Chestnut. Its geographic distribution extends to the states of Maranhão, Pará, Acre, Amapá, Roraima and Amazonas, and in countries Neighbors such as Bolivia, Peru and Guyana. This species has been applied in the fight against reactive oxygen species, due to its antioxidant activity. The present work had as objective the determination of the antioxidant activity and evaluation of the genotoxic and/or antigenotoxic effect of the fixed oil of Chestnut Brazil (*Bertholletia excelsa*) in erythrocytes of swiss mice. The fixed oil of *B. excelsa* was obtained by cold hydraulic pressing. For the determination of the antioxidant activity, the β -carotene/linoleic acid method was used, using the concentrations of 10,000 and 15,000 ppm, and the DPPH method, using concentrations of 50,000, 70,000 and 100,000 ppm. For the analysis of the genotoxic and antigenotoxic effects, healthy Swiss male mice with 6-7 weeks of life were used, from the State University of Campinas, being six animals in each treatment group. The genotoxic effect groups were treated with different concentrations of *B. excelsa* (500, 1,000 and 2,000 mg/kg bw), negative control (water) and dimethylsulfoxide solvent (DMSO 200 μ L) in 0.5 ml orally. For the antigenotoxic effect the animals were treated with the pre-established concentrations, followed by intraperitoneal injection of doxorubicin (DXR, 15 mg/kg b.w.) in 0.3 ml. Peripheral blood samples were collected 24h and 48h after treatment. The frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMNs) was obtained from the analysis of 2000 PCEMNs/animal and the Nuclear Division Index was established by counting 400 polychromatic erythrocytes PCEs/animal, with a total of 2,400 PCEs/group. In the β -carotene/linoleic acid method, the results of 87 and 92% were obtained, in concentrations of 15,000 and 10,000, and in the DPPH method, the results were 14.53, 25.57 and 40.33% for the concentrations Of 50,000, 70,000 and 100,000. In the comparison between the groups treated with the different concentrations of the fixed oil of *B. excelsa* and the negative control and DMSO groups, no statistically significant differences were observed in the frequency of PCEMNs, demonstrating absence of genotoxic effect. In order to analyze the antigenotoxic effect, statistically significant differences were observed in the frequency of PCEMNs in the comparison between the groups treated with the different concentrations of the fixed oil of *B. excelsa* + DXR with the positive control group, being the rates of reduction in the frequency of PCEMNs from 52.08 to 67.36% in 24 hours and from 76.78 to 87.89% in 48 hours. With the analysis of the data, it was concluded that the fixed oil of *B. excelsa* did not show a genotoxic effect, however, it presented an antigenotoxic effect, according to the protocols and treatments performed in this work.

Keywords: Health Sciences - Genetic Toxicology; Mutagenesis; Micronucleus test.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
%	Porcentual
°C	Grau Celsius
AAT	Atividade Antioxidante Total
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BE	<i>Bertholletia excelsa</i>
BHA	Hidroxianisol de Butila
BHT	Hidroxitolueno de Butila
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DXR	Doxorrubicina
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDN	Índice de Divisão Nuclear
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
IP	Intraperitoneal
MN	Micronúcleo
MNs	Micronúcleos
NCE	Eritrócito Normocromático
NUCTECNAL	Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos
O₂	Oxigênio
O₂ ·⁻	Superóxido
OH[·]	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Para Análise
PC	Peso Corpóreo
PCE	Eritrócito Policromático
PCEMN	Eritrócito Policromático Micronucleado
PMs	Plantas Medicinais
RNA	Ácido Ribonucleico
Se	Selênio
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Árvore da Castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>).....	18
Figura 02 - Fruto (ouriço) e B – castanhas com casca da <i>Bertholletia excelsa</i>	19
Figura 03 - Exemplos compostos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal: Flavanóides e ácidos fenólicos.....	26
Figura 04 - Reação do radical DPPH com antioxidante.....	32
Figura 05 - Formação de micronúcleo em células eucarióticas.....	34
Figura 06 - A - Eritrócito Policromático Micronucleado (PCEMN).....	36
Figura 07 - Camundongo Swiss (macho) com 6-7 semanas de vida.....	42
Figura 08 - A e B - Camundongos Swiss (06 machos), por grupo de tratamento.....	43
Figura 09 - Concentrações do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> (Castanha do Brasil), 500, 1.000 e 2.000 mg/kg p.c.....	43
Figura 10 - A – Confecção do esfregaço sanguíneo. B – Secagem do das lâminas com sangue periférico a temperatura ambiente.....	44
Figura 11 - A – Fixação das amostras de sangue periférico utilizando metanol. B e C – Coloração das lâminas fixadas, com o corante	

Giemsa, lavagem para retirar o excesso de corante e secagem a temperatura ambiente.....	45
Figura 12 - A – Eritrócito Normocromático Micronucleado (NCEMN). B – Eritrócito Normocromático (NCE). C – Eritrócito Policromático Micronucleado (PCEMN). D - Eritrócito Policromático.....	46
Figura 13 - Absorbância DPPH nas concentrações 50.000, 70.000 e 100.000 ppm.....	49
Figura 14 - Cromatograma dos ácidos graxos do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> (Castanha do Brasil).....	50
Figura 15 - Cromatograma dos ácidos graxos do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> (Castanha do Brasil).....	50
Figura 16 - A – Eritrócito Policromático (PCE). B - Eritrócito Policromático Micronucleado (PCEMN) C – Eritrócito Normocromático (NCE)....	51
Figura 17 - Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células do sangue periférico em 24 horas de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.....	57
Figura 18 - Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células do sangue periférico em 48 horas de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Composição de Macronutrientes e micronutrientes da Castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>): Centesimal, minerais e vitaminas/100 gramas da parte comestível.....	20
Tabela 02 -	Composição dos ácidos graxos presentes na Castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>) por 100 gramas de parte comestível.....	21
Tabela 03 -	Grupos experimentais e protocolos de tratamento com diferentes concentrações do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> e/ou DXR em 24 e 48 horas.....	44
Tabela 04 -	Atividade antioxidante do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> através do método β -caroteno/ácido linoléico.....	48
Tabela 05 -	Captura do radical livre do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> pelo método DPPH.....	48
Tabela 06 -	Ácidos graxos presentes no óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> por cromatografia gasosa.....	49
Tabela 07 -	Dados individuais das frequências de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (PCEMNs) em sangue periférico (24 horas) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.....	52
Tabela 08 -	Dados individuais das frequências de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (PCEMNs) em sangue periférico (48 horas) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.....	53

Tabela 09 -	Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (PCEMNs) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a tratamento com diferentes doses do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> e/ou doxorrubicina e seus respectivos controles 24 horas pós tratamento.....	55
--------------------	--	----

Tabela 10 -	Frequência de Eritrócitos Plocromáticos Micronucleados (PCEMNs) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a tratamento com diferentes doses do óleo fixo da <i>Bertholletia excelsa</i> e/ou doxorrubicina e seus respectivos controles 48 horas pós tratamento.....	56
--------------------	---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
1.2 <i>Bertholletia excelsa</i>	17
1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	22
1.3.1 Compostos fenólicos	25
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	27
1.5 ANTIOXIDANTES	28
1.5.1 Mecanismos de defesa dos antioxidantes	29
1.5.2 Principais métodos para avaliação da atividade antioxidante “ <i>in vitro</i> ”	31
1.5.2.1 Método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico	31
1.5.2.2 Método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	31
1.6 FATORES GENÉTICOS E AVALIAÇÃO DE AGENTES CITOGENÉTICOS	32
1.6.1 Citotoxicidade	32
1.6.2 Mutagênicidade	33
1.6.3 Genotoxicidade	34
1.6.3.1 Teste do micronúcleo	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO FIXO DA <i>Bertholletia excelsa</i>	38
3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA <i>Bertholletia excelsa</i>	38
3.2.1 Método β -caroteno/ácido linoleico	38
3.2.2 Método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	39
3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	41
3.4 AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS NO DNA	41
3.5 ANIMAIS E TRATAMENTOS	41
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
3.7 TESTE DO MICRONÚCLEO	44
3.8 ANÁLISE DAS LÂMINAS	45

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS	48
4.1 B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO	48
4.2 MÉTODO DPPH	48
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	49
4.4 TESTE DO MICRONÚCLEO E ÍNDICE DE DIVISÃO NUCLEAR	51
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO	70
7 REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso dos bioderivados iniciou há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias, sendo utilizadas pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008).

O Brasil é considerado uma rica fonte de produtos terapêuticos, pois apresenta ampla diversidade em seus biomas (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008; GOMES e BANDEIRA, 2012). A medicina popular do país é considerada um reflexo das interações culturais entre índios, negros e portugueses com a natureza, essa relação permitiu a disseminação da sabedoria herdada quanto ao uso e cultivo de diversas espécies vegetais (LORENZI e MATOS, 2002; ALMASSY et al., 2005; LIPORACCI e SIMÃO, 2013).

A riqueza da flora brasileira e a sua ampla utilização de Plantas Medicinais (PM's) pela população acarreta em uma ascensão dos estudos científicos acerca do assunto (FERREIRA, 1998). Isto se deve ao desenvolvimento constante da fitoterapia, principalmente da fitoterapia racional, ou seja, a forma científica de utilização e emprego dos fitoterápicos por parte dos profissionais da área da saúde (CARVALHO, 2005).

A seleção de uma planta para estudo farmacológico é um passo muito importante. A escolha pode ser feita de várias maneiras através do uso tradicional, da composição química, da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério. A estratégia mais comum é o uso das fontes naturais na medicina popular, que é conhecida como etnofarmacologia (RATES, 2001; CARLINI, 2003; ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

A busca da população por estas plantas incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos. Buscando minimizar a falta de informações sobre plantas medicinais. Equipes multidisciplinares de pesquisadores, com o apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), investigam

melhores condições para manter a qualidade, a eficácia e a segurança desses medicamentos (CUNHA et al., 2003; SOARES et al., 2006), as principais ciências envolvidas são a botânica, química, farmacologia, antropologia, agronomia e a biotecnologia (RATES, 2001; CUNHA et al., 2003).

O interesse por estes estudos surgiu principalmente devido às populações acreditarem que os fitoterápicos são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são aparentemente eficazes nos casos onde a medicina tradicional não alcançou resultados esperados, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas que avaliam a eficácia e a segurança (CALIXTO, 2000; CARVALHO et al., 2008).

Entretanto, muitas plantas estudadas demonstraram que são capazes de atuar em áreas como o comportamento, humor, pensamento e sensações, mas, o entendimento de seus mecanismos de ação, segurança e eficácia são um desafio para os pesquisadores (CARLINI, 2003; CARLINI et al., 2006). Por esse motivo, o uso de plantas medicinais de forma indiscriminada ou negligenciada pode ser potencialmente agressivo, devendo-se ter cautela quanto aos riscos de toxidez (VEIGA JÚNIOR et al., 2005) o que torna tais estudos relevantes para dados científicos, além de servir como respaldo ao uso popular.

Essas espécies vegetais podem ser utilizadas de diversas maneiras e com diferentes propósitos, seja *in natura*, com partes inteiras ou sob a forma para preparação de chás, pulverizada, extratos brutos, frações enriquecidas, extratos padronizados, tinturas, extratos fluidos, pós, comprimidos e cápsulas (RATES, 2001).

1.2 *Bertholletia excelsa*

Nos últimos anos, as sementes, nozes e castanhas comestíveis de plantas têm recebido atenção especial de pesquisadores uma vez que são fontes naturais de vitaminas, minerais, proteínas e ácidos graxos essenciais. O que vem sendo demonstrado pelo estudo de seus compostos bioativos, que podem trazer benefícios significativos à saúde humana através do seu consumo de forma regular (JIANG et al., 2006; ROS e MATAIX, 2006; JENKINS et al., 2008; ROS, 2009; COSTA et al., 2010; FREITAS e NAVES, 2010; JOHN e SHAHIDI, 2010).

As principais sementes comestíveis nativas comercializadas no Brasil são a Castanha de Caju (*Anacardium occidentale* L.) e a Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) (Chaves et al., 2004). Tendo esta última a seguinte classificação botânica: **Classe:** Equisetopsida C. Agardh; **Subclasse:** Magnoliidae Novák ex Takht.; **Super-ordem:** Asteranae Takht.; **Ordem:** Ericales Bercht. & J. Presl.; **Família:** Lecythidaceae A. Rich.; **Gênero:** *Bertholletia* Bonpl.; *Bertholletia excelsa* Bonpl. (TROPICOS, 2016).

O gênero *Bertholletia* é derivado do nome do químico Berthollet (1748-1822), sendo a espécie descrita por Bonpland, em 1807, que propuseram a denominação *excelsa* pelo fato da espécie destacar-se frondosamente acima do dossel (BRAGA, 2007).

A *Bertholletia excelsa* popularmente conhecida como Castanha do Brasil, Castanha da Amazônia e Castanha do Pará, é uma espécie arbórea de grande porte, podendo medir de 50 a 60 metros de altura (Figura 01) (CAVALCANTE, 1972) e é considerada uma espécie nativa da Amazônia (CAVALCANTE, 1991; MULLER, 1995).



Figura 01: Árvore da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Fonte:** EMBRAPA,

É uma árvore de tronco escuro, liso com ramos apenas próximos da extremidade; as flores são brancas e grandes; o fruto é globoso (ouriço), chegando a

pesar 1,5Kg e abriga de 12 a 22 sementes, que são as castanhas (Figura 02) (CAVALCANTE, 1972).

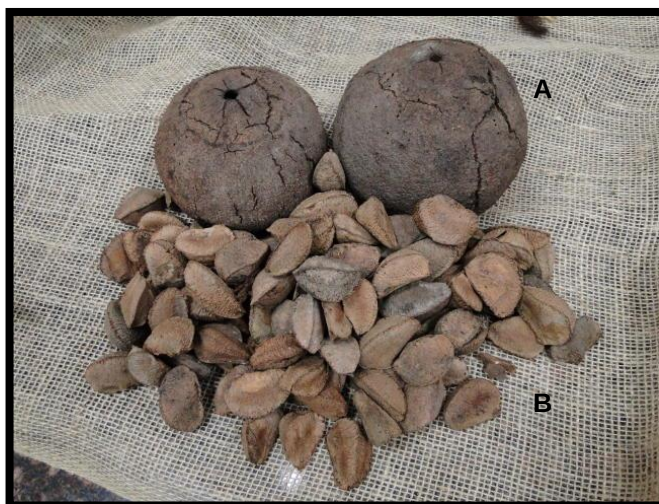


Figura 02: A - Fruto (ouriço) e B – castanhas com casca da *Bertholletia excelsa*. **Fonte:** EMBRAPA, 2017.

Sua área de distribuição geográfica estende-se pelos Estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima e Amazonas (ARAÚJO, 1986), e em países vizinhos como Venezuela, Bolívia, Peru, Colômbia e Guianas (BRASIL, 2000; PACHECO e SCUSSEL, 2006, 2011; MANFIO et al., 2012a, 2012b).

Em estudo realizado por Balbi et al., (2014) e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – Taco (2006), quanto a sua composição química, apresentaram o teor de proteínas de $14,28g \pm 0,08$ e 14,50% em 100 g de amostra.

É possível que ocorra algumas variações na composição, decorrentes de diferenças climáticas, práticas agrícolas, características genéticas da planta e solo, onde pode haver predominância de um ou outro mineral que a planta pode absorver em maior ou menor quantidade (FREITAS e NAVES, 2010; SILVA et al., 2010).

Além disso, deve ser levado em conta o fator oxidação que, embora essa reação em geral se inicie na fração lipídica, eventualmente outros componentes desse alimento sem casca podem ser afetados, como as vitaminas, pigmentos e proteínas. Estas últimas devido ao comprometimento de alguns aminoácidos, entre eles a lisina, considerado de grande reatividade (ARAÚJO, 2004).

Destacando ainda a composição em ferro, cálcio, zinco e selênio, pela importância dos dois primeiros na prevenção de carências nutricionais de relevância

em saúde coletiva, e pelas funções enzimáticas e reguladoras do zinco e do selênio, como parte do sistema de defesa antioxidante do organismo (FREITAS e NAVES, 2010).

Além desses minerais, é importante ressaltar o alto teor de potássio e a reduzida concentração de sódio, cuja composição pode favorecer o controle hidroeletrolítico e da pressão arterial, contribuindo assim para a manutenção da saúde (MANN, 2002). Dentre os minerais, o fósforo é o componente mais abundante em sementes da Castanha do Brasil, seguido pelo potássio, magnésio e cálcio (Tabela 01) (SILVA et al., 2010).

Tabela 01: Composição de Macronutrientes e micronutrientes da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*): Centesimal, minerais e vitaminas/100 gramas da parte comestível.

COMPONENTES		VALOR	
Macronutrientes (g)	Lipídeos	63,50	
	Carboidratos	15,10	
	Proteínas	14,50	
	Fibra Alimentar	7,90	
Micronutrientes (mg)	Minerais	Fósforo	853
		Potássio	651
		Magnésio	365
		Cálcio	146
		Zinco	4,20
		Ferro	2,30
		Cobre	1,70
		Manganês	1,10
		Sódio	1,00
		Selênio	0,425

Continua...

Vitaminas	Tocoferol $\beta + \gamma$	14,10
	Ácido Ascórbico	10,00
	Tocoferol α	2,50
	Niacina	1,70
	Tocoferol δ	1,60
	Tiamina	1,09
	Piridoxina	0,44
	Riboflavina	0,12
	Retinol	0,07

Fonte: Lima & Gonçalves, 1997; IBGE, 1999; TACO, 2006; Balbi et al., 2014.

Os efeitos do consumo regular das amêndoas de Castanha do Brasil para a saúde são sugeridos por sua constituição em macro e micronutrientes, com grande destaque para o selênio, apresentado na (Tabela 01), agregado ao alto nível de proteína rica em aminoácidos sulfurados, que têm grande afinidade com o selênio, formando um complexo de alta biodisponibilidade, o que favorece sua atuação funcional. Sua composição em ácidos graxos essenciais (Tabela 02), com ênfase aos ômega (6 e 9), seus níveis de tocoferol, fitosterol, compostos fenólicos, dentre outros fatores, têm sido reportados como potencialmente benéficos à manutenção da saúde (YANG, 2009).

Tabela 02: Composição dos ácidos graxos presentes na Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) por 100 gramas de parte comestível.

	ÁCIDOS GRAXOS	VALOR (g)
Saturados	Esteárico (18:0)	6,14
	Araquídico (20:0)	0,16
	Palmítico (16:0)	0,04
	Mirístico (14:0)	0,04
	Behênico (22:0)	0,03

Continua...

	Oleico (18:1)	27,14
Monoinsaturados	Palmitoléico (16:1)	0,18
	Elaídico (20:1)	0,04
Poliinsaturados	Linoleico (18:2n-6)	20,97
	Alfa-linolênico (18:3 n-3)	0,04

Fonte: TACO, 2006.

1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como cosméticos, alimentos, agroquímicos, e também, para fins medicinais (NOVAIS, 2003; RODRIGUES et al., 2006).

Plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de outras plantas e de predadores de uma maneira geral. Estas defesas são de natureza química e, normalmente, envolvem substâncias do metabolismo secundário (CROTEAU et al., 2000; PINTO et al., 2002).

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO e TORRES, 2007).

Além disso, as plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, estão intimamente associados ao processo de defesa das plantas (SIMÕES, 2001; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, os metabólitos secundários possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos

metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações em determinados grupos de plantas (BERG e LUBERT, 2008).

Exercem várias ações, tais como atividade antioxidante (SOARES, 2002), modulação de enzimas de destoxificação, estimulação do sistema imunitário, atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e/ou anticarcinogênica (SAURA-CALIXTO e GOÑI, 2009).

Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, pela imensa atividade farmacológica que possuem, além de atuarem na química medicinal (YUNES et al., 2001). Sendo boa parte de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários são divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos (Quadro 01) e componentes contendo nitrogênio (SHAHIDI, 1997; CROTEAU et al., 2000; SHAHIDI e NACZK, 2003; SHAHIDI e HO, 2005; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Quadro 01: Metabólitos secundários presentes na Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*).

COMPOSTOS	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
Ácido Cítrico	Antioxidante.	Food Ingredients Brasil, 2014.
Ácido Gálico	Anti-inflamatória; antimelanogênico; antitumoral; indução de apoptose; antimutagênica; interferência no ciclo celular; antioxidante.	D'Archivio et al., 2007; Kim, 2007; Martins et al., 2011.
Derivado de Ácido Gálico	Antimetastática; antimutagênico; antioxidantes; antiradicalar; inibição das enzimas do citocromo P-450; inibir a cadeia respiratória do <i>T. cruzi</i> ; ação antimicrobiana.	Boyd et al., 1981; Letelier et al., 1990; Apostolides et al., 1997.

Ácido Protocatecuico	Antioxidante; ação anti-inflamatória antibacteriana; antiviral; analgésica; anticancerígena; antidiabética.	Lee et al., 2002; Shi et al., 2006; Lin et al., 2009; Tanaka et al., 2011; Kakkar & Bais, 2014.
Ácido Vanílico	Utilizado em doenças respiratórias, tratamento de feridas, abscesso e irritação de pele; atividade anti-edematogênica; ação antimicrobiana antinociceptiva; anti-inflamatória.	Swiatek, 1973; Fontenele et al., 2003; Monteiro et al., 2007; Leal et al., 2011; Morucci et al, 2012; Castor, 2013.
Ácido Elágico	Antioxidante; Ação quimioprotetora.	Losso et al., 2004; Adams et al., 2006; Heber, 2008.
Catequina	Antioxidante; anticarcinogênica; anti-inflamatória; sequestro de radicais livres; inibidores de peroxidação; ação quimioprotetora.	Nishida, 1994; Schmitz et al., 2005.
Derivados da Catequina	Antioxidante, sequestro de radicais livres; bloqueio da produção de óxido nítrico.	Lin & Lin, 1997; Henning et al., 2004.
Myricetina-3-O-rhamnósido	Antioxidante; antimutagênica.	Calomme et al., 1996; Yagi et al., 2002; Edenharder & Grunhage; 2003; Kilani et al., 2005
Quercetina	Efeito ansiolítico; prevenção contra doenças neurodegenerativas; stress oxidativo; anticarcinogênica; redução da pressão arterial; antioxidante.	Weiss et al., 1988; Salgueiro et al., 1997; Goutman et al., 2003; Heo & Lee, 2004; Materska, 2008; Murakami et al., 2008; Perez-Vizcaino & Duarte, 2010.
Taxifolina	Ação quimiopreventiva; antifúngica; anticolinesterásica; antiradicalar.	Lee et al., 2007; Sendra et al., 2007; Junior et al., 2008.

1.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas. Possuem estrutura variável e englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, e estão presentes em vegetais na forma livre ou complexadas a açúcares e proteínas (BRAVO, 1998; CROFT, 1998; ALMEIDA et al., 2006; PIANTINO, 2008).

São considerados potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais. Possuem característica de pigmento, que confere a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário. São encontrados naturalmente em frutas, verduras, cerveja, vinho e soja (SATUÉ-GARCIA et al., 1997; HOPIA e HEINONEM, 1999; GONÇALVES, 2008; SILVA et al., 2010).

Dentre os metabólitos secundários vegetais encontrados estão os compostos fenólicos, sendo sua maioria, pelo menos em parte, derivados da fenilalanina, um produto da rota do ácido chiquímico (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos são originados no metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para várias funções como: propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), crescimento, processos germinativos da semente, defesa contra pragas, além disso, se formam em condições de estresse, como: infecções, ferimentos, radiações UV, entre outras (BRAVO, 1998; DORMAN et al., 2003; NACZK e SHAHIDI, 2004; TAYZ e ZEIGER, 2004; LIU e YAO, 2007).

Existe uma grande variedade de compostos fenólicos, classificados em dois grandes grupos, flavanóides e ácidos fenólicos. Os flavanóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado, diferenciam-se em flavanóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavanóides. Pode-se observar a estrutura química de alguns flavanóides comumente em origem vegetal (KARAKAYA, 2004).

Os ácidos fenólicos são compostos benzenóicos e cinâmicos, conhecidos como ácidos fenólicos, contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais: aldeídos, álcoois ou ácidos (Figura 03) (MANACH et al., 2004).

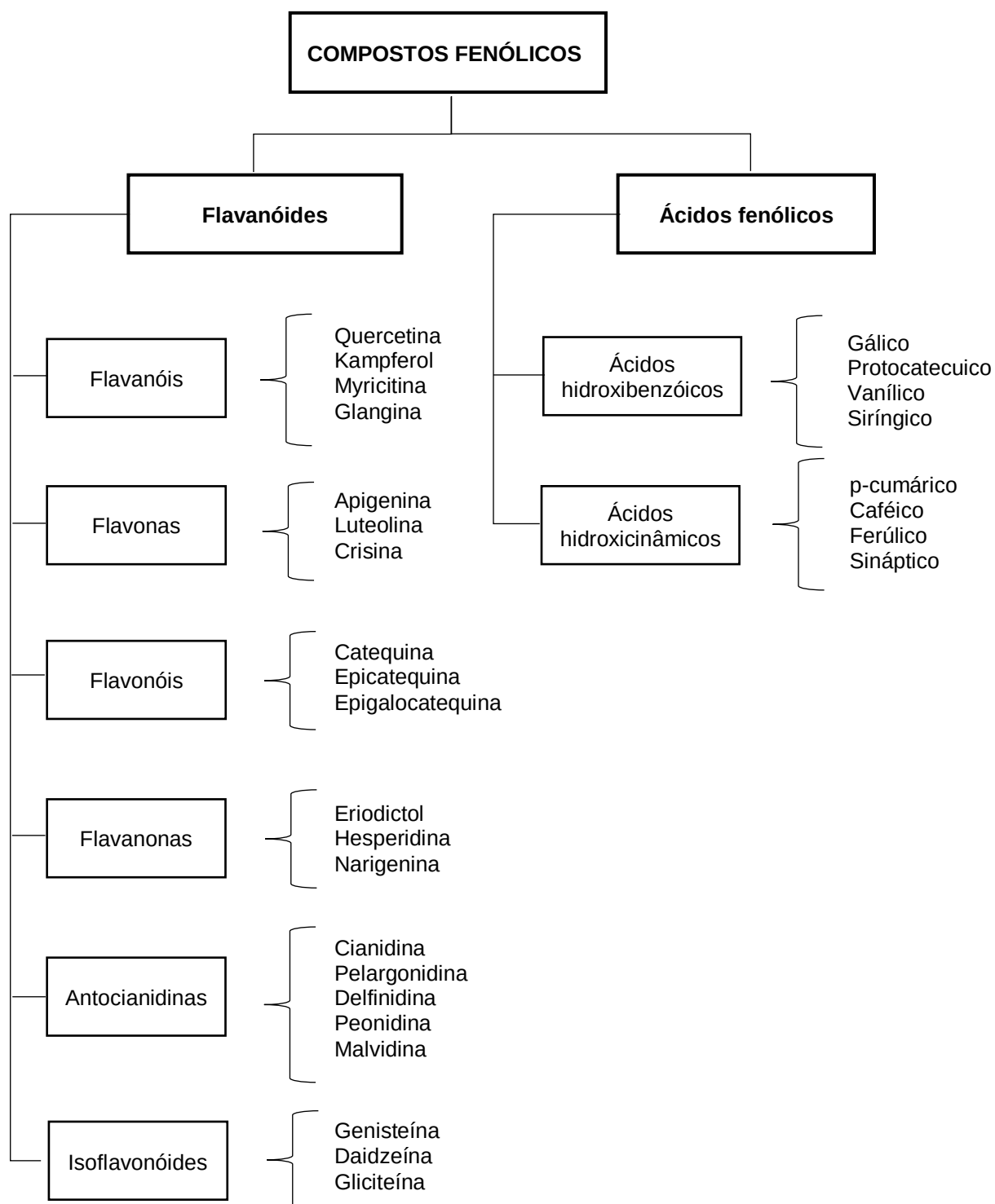


Figura 03: Exemplos compostos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal: Flavanóides e ácidos fenólicos. **Fonte:** Karakaya, 2004.

1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Sendo que uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, que são denominadas de espécies reativas do oxigênio (ERO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002).

As ERO podem provocar danos teciduais (KINNULA et al., 1995) e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007).

As ERO são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa, caracterizadas por grande instabilidade e por isso elevada reatividade, tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (KOURI e DONANGELO, 2003).

Vários estudos têm indicado o papel-chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I (ATOUI et al., 2005; SOUSA et al., 2007).

Quando em excesso, podem gerar o estresse oxidativo (EO) quando ocorre um desequilíbrio entre sistemas pró oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004), causando danos teciduais. A produção de radicais livres ocorre naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição à fatores exógenos (BIANCHI e ANTUNES, 1999; BARREIROS et al., 2006).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997).

Entre as principais formas reativas de oxigênio o O_2^- apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o $OH^\bullet$ mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

A principal via de metabolismo do oxigênio no organismo envolve a sua completa redução em água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria. Se houver, ao longo da cadeia respiratória, redução do oxigênio com número menor de elétrons, haverá produção de ERO, como o superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$), o peróxido de hidrogênio ($O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) e a hidroxila ($H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^\bullet + OH^-$) (DAMASCENO et al., 2002; ANDRADE JUNIOR et al., 2005). Entre todos os radicais livres gerados em organismos vivos, as ERO representam a classe mais importante (VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo provoca uma alteração dos lipídeos conhecida como peroxidação lipídica, além de danos oxidativos no DNA e proteínas (grupos carbonilas e sulfidrilas) (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010), desempenhando um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN et al., 1998).

As espécies reativas do oxigênio inibem a enzima que edita e corrige o RNA transportador, para formar a sequência correta de aminoácidos da proteína, o que resultando em uma síntese de proteínas anômalas (LING e SÖLL, 2010). Além disso, os radicais livres oxidam os aminoácidos cisteína e metionina, provocando sérias alterações na estrutura e função das proteínas (ZHANG, 2010).

Os danos ao DNA incluem a formação de adutos ou ligações cruzadas de DNA e suas proteínas, bem como modificações das bases nitrogenadas que provocam alterações nas hélices de DNA, o que pode mudar a expressão gênica e favorecer a patogenia de doenças crônicas (LEE et al., 2004).

1.5 ANTIOXIDANTES

O uso empírico de compostos naturais é muito antigo. Desde há muito tempo que as populações utilizam métodos caseiros para preservar da rancificação de carne,

pescado e outros alimentos ricos em gordura (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009).

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (KRINSKY, 1994; PIETTA, 2000; HALLIWELL, 2001; LIMA et al., 2010).

Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem respaldar científico quanto a segurança para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (RICE-EVANS et al., 1996; TAKEMOTO et al., 2009).

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos. O tocoferol, por ser um dos melhores antioxidantes naturais é amplamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados. A legislação brasileira permite a adição de 300 mg/kg de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (RAMALHO e JORGE, 2006).

O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena. De acordo com Sousa et al. (2007), denominam-se antioxidantes, as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (BARREIROS et al., 2006).

1.5.1 Mecanismos de ação dos agentes antioxidantes

Quanto ao mecanismo de proteção, os antioxidantes atuam em diferentes níveis de proteção no organismo. Os antioxidantes primários atuam impedindo a formação dos radicais livres, sendo capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo ataque sobre lipídios, aminoácidos, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA. Como exemplo destes antioxidantes: vitaminas C, E, A, os flavonóides e carotenóides (BRAVO, 1998; BIANCHI e ANTUNES, 1999; ABRAHÃO et al., 2010).

Os antioxidantes secundários atuam bloqueando a reação em cadeia, através da captura de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcóxila. Nesta classe estão os antioxidantes sintéticos e os compostos fenólicos (LIMA, 2008).

O mecanismo antioxidante desenvolvido pelos seres humanos contra os radicais livres, inclui a produção endógena de antioxidante (produzido pelo corpo humano), tais como: as enzimas (glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase e a superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial) e outros antioxidantes provenientes da dieta, exógenos (ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides, compostos fenólicos e demais metabólitos secundários vegetais, zinco, cobre, selênio e magnésio) e os antioxidantes não enzimáticos (glutathione, ácido lipóico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina, ceruloplasmina). Juntos promovem reciclagem e reações de regeneração que otimizam a proteção contra os radicais livres (PIETTA, 2000; SHAHIDI e HO, 2007).

As reações de radicais livres com a timina do DNA produzem quebras unifilamentares do DNA, e tais danos estão implicados tanto na morte celular como na transformação maligna das células (carcinogênese). O DNA mitocondrial também pode ser afetado (OLSZEWER, 2008).

Estudos indicam que os radicais livres agem acelerando o processo degenerativo e a perda da estabilidade celular, provocando situações adversas ao organismo e seus tecidos, favorecendo a perda da homeostasia do meio interno (OLSZEWER, 2005).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento, pelas doenças autoimunes e doenças infecciosas e/ou inflamatórias e pelas doenças degenerativas. Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (ATOUI et al., 2005; ABRAHÃO et al., 2010).

Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (LIMA et al., 2012).

Tais antioxidantes exógenos são muito diversos, sendo comumente encontrados em vegetais, as vitaminas C e E, os carotenóides, os flavonóides e os compostos fenólicos (OU et al., 2002).

Vegetais *in natura*, como frutos, legumes, folhosos em geral e condimentos, contêm numerosos fitoquímicos, destacando-se os compostos fenólicos, os compostos nitrogenados, os carotenóides, o ácido ascórbico e os tocoferóis. Muitos desses compostos apresentam significativa atividade antioxidante e estão associados à menor incidência e menor mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis, sobretudo o câncer, em seres humanos (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007).

1.5.2 Principais métodos para avaliação da atividade antioxidante “*in vitro*”

1.5.2.1 Método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

O método de oxidação do beta caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está baseado na descoloração (oxidação) do beta caroteno induzida por produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A descoloração ocorre em função das estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoleico, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoleico, prologando o período de formação dos radicais (HUANG e WANG, 2004).

1.5.2.2 Método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

No método do DPPH, o antioxidante reage com o radical DPPH, convertendo-o em sua forma reduzida. Inicialmente a solução metanólica de DPPH possui coloração violeta, tornando-se amarelada durante a reação, sendo o grau deste descoramento um indicador da habilidade deste antioxidante em sequestrar o radical livre (MELO et al., 2006).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

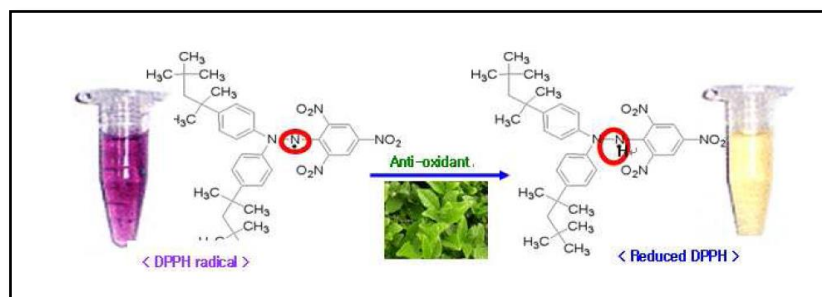


Figura 04: Reação do radical DPPH com antioxidante. **Fonte:** Natural Solution, 2017.

Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA et al., 1999). O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento (SANTOS et al., 2007).

Sendo utilizado para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA et al., 2007), fenilpropanoides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA et al., 2007), cumarinas (VOGEL et al., 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (KIM e THOMAS, 2006), antocianinas, antocianidinas (DE LIMA et al., 2007; LEJA et al., 2007), carotenoides (AJILA et al., 2007), rutina, kampferol (SILVA et al., 2005).

1.6 FATORES GENÉTICOS E AVALIAÇÃO DE AGENTES CITOGENÉTICOS

1.6.1 Citotoxicidade

As substâncias presentes no ambiente que sejam potencialmente danosas ao organismo humano caso sejam assimiladas, ou até mesmo as substâncias sintéticas farmacológicas antes de chegarem ao comércio, necessitam de investigação quanto

ao nível de risco que possam apresentar. Ao longo dos anos, vários modelos de testes têm sido desenvolvidos como métodos de avaliação. Os ensaios usualmente utilizados detectam o potencial risco citotóxico/genotóxico no organismo. A citotoxicidade é basicamente medida pela taxa de crescimento celular (DE FIGUEREDO, 2014).

A toxicidade é relacionada com a detecção, composição química e ação biológica de substâncias tóxicas, a toxicidade de uma substância pode ser considerada como a capacidade de ser prejudicial, causando danos graves ao organismo (BARROS e DAVINO, 2003).

A via de administração, duração e frequência de exposição são os fatores mais importantes que influenciam a toxicidade ao organismo mesmo ele, sendo encontrado no interior das células, não está livre de sofrer constantes alterações e mutações (RABELLO-GAY, 1991).

1.6.2 Mutagenicidade

A mutação é definida como qualquer alteração no DNA, podendo ser súbita e herdável, uma vez ocorrida, é mantida e transmitida às moléculas-filhas na estrutura do material genético, e na maioria das vezes, pode desenvolver uma série de problemas maléficos, mas para a sobrevivência da espécie, a mutação também é uma fonte de variabilidade genética dos seres vivos, decorrente de modificações estruturais no material genético (ALMEIDA e XAVIER, 2005; SILVA et al., 2011).

As mutações são divididas basicamente em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA do indivíduo e as cromossômicas, são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas por análises citogenéticas celulares, onde essas alterações cromossômicas podem ser reparadas pela própria célula, sem tantos danos maiores ao indivíduo (LUCIO NETO, 2011).

Podem ser observadas através da formação de micronúcleos (Figura 05) que são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma, se manifestam em células por divisão, formados a partir dos resultados de quebras cromossômicas,

formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose. (MILLER, 1973; FENECH, 1993; DA COSTA e MENK, 2000; MENEGUETTI, 2011).

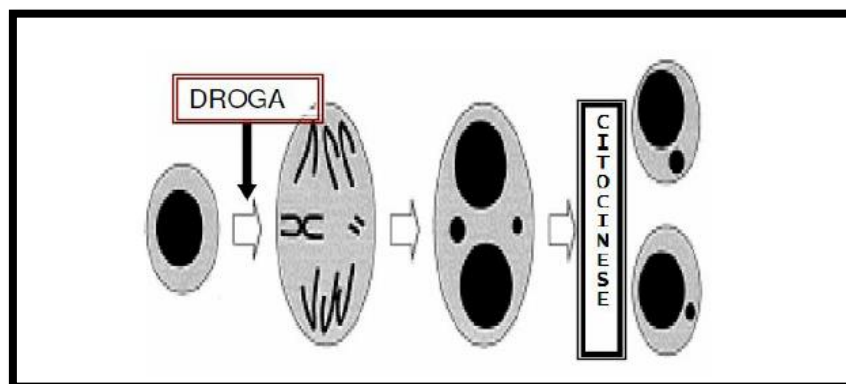


Figura 05: Formação de micronúcleo em células eucarióticas. **Fonte:** Silva et al., 2011.

1.6.3 Genotoxicidade

O efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxico em populações humanas que estão expostos ocupacionalmente e acidentalmente ou por estilo de vida tem sido uma preocupação crescente (MALUF e ERDTMANN, 2000), o que pode causar danos.

Se o sistema de reparo celular dos indivíduos expostos não detectar os danos causados pelos agentes genotóxicos (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000), este pode ser visualizado através da formação de micronúcleos.

O teste de micronúcleos detecta mutagênese em organismos eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico. Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, podendo os micronúcleos ser avaliados para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de teste com roedores e plantas (SILVA et al., 2011).

Para que o micronúcleo seja visualizado é necessária uma divisão celular após a ocorrência mutagênica, sendo, necessário fazer o cultivo celular, ou usar células que estão se multiplicando constantemente, como a medula óssea, que

posteriormente podem ser visualizadas em amostras de sangue periférico (VILLELA e LAU, 2003).

1.6.3.1 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo foi relatado pela primeira vez em 1970 por Boller e Schmid e posteriormente foi usado por Heddle em 1977 (EVANS, 1997).

O micronúcleo, um ou mais por células, é um núcleo adicional, separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular e é composto por cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que sobram de outros cromossomos após a conclusão da mitose e/ou meiose. Os micronúcleos resultam de mudanças estruturais espontâneas ou experimentalmente induzidas no cromossomo, ou através de erros de fusão celular. São, portanto, excluídos dos novos núcleos que são reformados em telófase (YAMAMOTO e KIKUCHI, 1980; HAYASHI et al., 2000; RAMÍREZ e SALDANHA, 2002).

O teste de micronúcleo apresenta as seguintes características básicas: o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos (Figura 06), que são células anucleadas; estes eritrócitos têm um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele apresente deve ter sido gerado como resultado de danos cromossomos induzidos recentemente; os micronúcleos são facilmente identificados e a sua distribuição é bem definida; e a frequência de micronúcleos induzidos em eritrócitos policromáticos é dependente do tempo de amostragem (HAYASHI et al., 1989).

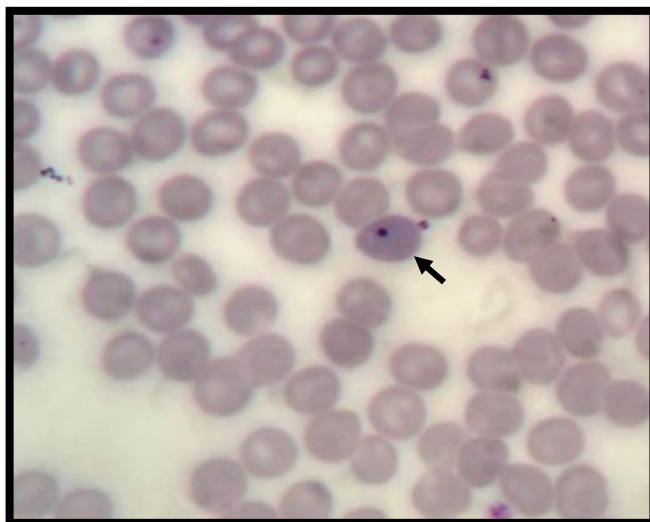


Figura 06: A - Eritrócito Policromático Micronucleado (PCEMN). **Fonte:** Própria.

Em 1999, na Conferência Internacional em Harmonização (*International Conference in Harmonization*, 1999) o teste de micronúcleo foi recomendado e suas diretrizes para análise genotóxica *in vivo*, foram estabelecidas. Não podendo ser descartada a necessidade do controle positivo como um componente importante na interpretação dos dados analisados em laboratório (HAYASHI et al., 1989).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinação da atividade antioxidante e avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico do óleo fixo da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) em eritrócitos de camundongos swiss.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFIOS

- Determinação da ação antioxidante do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* pelo método β -caroteno/ácido linoléico e DPPH•.
- Quantificação os ácidos graxos presentes no óleo fixo da *Bertholletia excelsa* por cromatografia gasosa.
- Verificação da frequência de micronúcleos por célula dos camundongos swiss tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da *Bertholletia excelsa*, comparando com os controles negativo, positivo e solvente, para avaliação do efeito genotóxica, e associadas com doxorrubicina, para avaliação do efeito antigenotóxica.
- Determinação da citotoxicidade do óleo fixo da *Bertholletia excelsa*, através do Índice de Divisão Nuclear (IDN).

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO FIXO DA *Bertholletia excelsa*

O óleo fixo da *Bertholletia excelsa* foi gentilmente cedido pelo Laboratório do Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos - NUCTECNAL, do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA.

As castanhas foram adquiridas na feira livre de Macapá, no período de maio de 2015 e transportadas ao laboratório do NUCTECNAL do IEPA. Onde foram quebradas manualmente e suas amêndoas posteriormente desidratadas em estufa Quimis®, a temperatura de 50°C por 10 horas para o processamento do óleo fixo. As amêndoas foram prensadas em prensa hidráulica Marconi® para obtenção do óleo fixo, que foi armazenado em frasco âmbar para análises subsequentes.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA *Bertholletia excelsa*

3.2.1 Método β -caroteno/ácido linoleico

A técnica utilizada foi adaptada por Rufino et al, (2007a).

A partir do óleo fixo obtido, foram preparadas em tubos de ensaio, no mínimo três diluições diferentes. Misturou-se 0,4 mL de cada diluição do extrato com 5 mL da solução sistema. Como controle foi utilizado 0,4 mL da solução de Trolox com 5 mL da solução sistema β -caroteno/ácido linoleico, homogeneizou-se os tubos de ensaio em agitador e manteve-se em banho-maria a 40°C. Foi realizada a primeira leitura (470 nm) após 2 minutos de efetuada a mistura e depois em intervalos de 15 minutos até 120 minutos. Sendo o espectrofotômetro calibrado com água destilada.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorbância do sistema sem antioxidante (Eq. 1) foi considerada como 100% de oxidação.

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}$$

(Eq.1)

O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação (Eq. 2), subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Eq. 3). Verificou-se a ação antioxidante da amostra (Castanha do Brasil), comparando-a com a atividade do antioxidante sintético (Trolox).

$$\% \text{ Oxidação} = \frac{[(\text{Redução Abs})_{\text{amostra}} \times 100]}{(\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}}$$

(Eq.2)

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação})$$

(Eq.3)

3.2.2 Método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Foi utilizada a técnica adaptada por Rufino et al, (2007b).

A partir do óleo fixo obtido, preparou-se em tubos de ensaio no mínimo três diluições diferentes. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM) e homogeneizou-se em agitador de tubos. Utilizou-se 0,1 mL da solução controle (álcool metílico, acetona e água) com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizou-se. Foi utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As

leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC_{50} foi feita após a estabilização da absorbância (tempo EC_{50}).

Após a leitura, substituiu-se (Eq. 4) o valor correspondente a metade da absorbância inicial do controle pelo y da equação da curva do DPPH para encontrar o consumo em μM DPPH.

Equivalência de controle e DPPH

$$Y = ax - b \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

Y = Absorbância inicial do controle / 2 (item determinação da atividade antioxidante total).

x = resultado em μM DPPH.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo Y e diluição (mg/L) no eixo X e determinou-se a equação da reta (Eq. 5). Para calcular a AAT foi substituído a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH pelo y (Eq. 5) e encontra-se o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}).

Cálculo do EC_{50}

$$Y = - ax + b \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

Y = Absorbância inicial do controle / 2 (item determinação da atividade antioxidante total).

x = EC_{50} (mg/L).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os procedimentos para quantificação dos ácidos graxos foram realizados na Universidade Federal do Pará – UFPA.

Obtiveram-se extratos da amostra *in natura*, triturada com celite e eluída com coluna, utilizando hexano como solvente extrator. A obtenção dos ésteres metílicos foi realizada com metóxido de sódio/metanol e em seguida trifluoreto de boro/metanol em banho-maria.

A composição em ácidos graxos foi determinada através de análise cromatográfica dos ésteres metílicos através de cromatografia gasosa, em cromatógrafo da marca Sinc (MALCHER, 2011).

3.4 AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS NO DNA

O quimioterápico doxorrubicina (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP) foi utilizado como indutor de micronúcleos em células de sangue periférico (controle positivo). O indutor foi dissolvido em água destilada e administrado intraperitonealmente (0,3 mL/animal). A concentração de DXR (15 mg/kg peso corpóreo, p.c.) foi estabelecida de acordo com a literatura (FRANKE et al., 2005; VENKATESH et al., 2007).

3.5 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos machos Swiss com 6-7 semanas de vida e aproximadamente 25 g de peso corpóreo (p.c.) (Figura 07), provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A pesquisa foi conduzida de acordo com os

protocolos aceitos internacionalmente para o uso e cuidado de animais de laboratório. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* à ração e água. Os protocolos de tratamentos realizados neste trabalho foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, e aceitos sob o número de Protocolo n. 020/2015.



Figura 07: Camundongo Swiss (macho) com 6-7 semanas de vida. **Fonte:** Própria.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dez grupos, contendo seis camundongos em cada grupo de tratamento, conforme a (Figura 08) e (Tabela 03). As concentrações utilizadas do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* (BE) foram selecionadas de acordo com o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA de 2013, sendo as doses de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg p.c. (Figura 09), administradas por gavagem (0,5 mL) para observação do processo genotóxico.

Para a avaliação antigenotóxica, imediatamente após a administração do óleo fixo da BE, os animais foram tratados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DXR (0,3 mL/25 g p.c.).

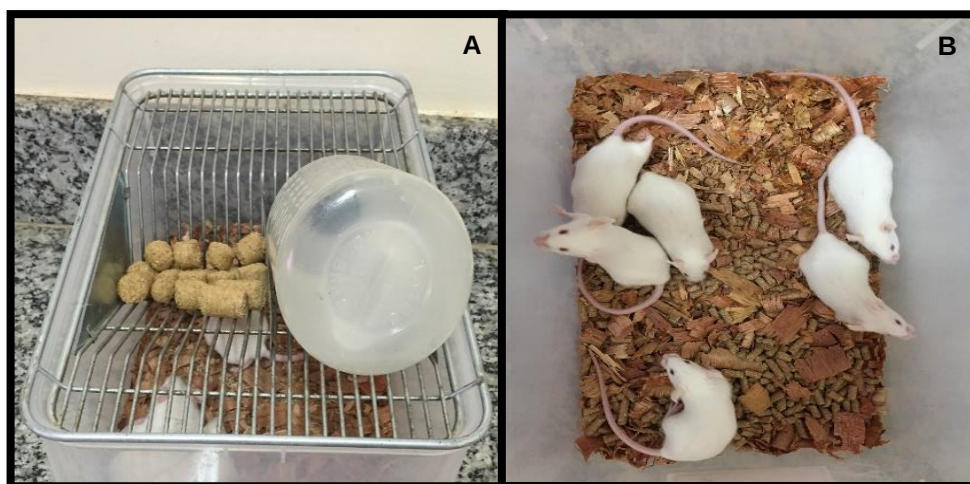


Figura 08: A e B - Camundongos Swiss (06 machos), por grupo de tratamento. **Fonte:** Própria.



Figura 09: Concentrações do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* (Castanha do Brasil), 500, 1.000 e 2.000 mg/kg p.c. **Fonte:** Própria.

O grupo solvente foi tratado por gavage (0,5 mL/25 g p.c.) com 200 µl de demetilsulfóxido (DMSO), mesma concentração que os animais do grupo tratado com maior dose de óleo fixo 2.000 mgBE/kg p.c. receberam. As amostras de sangue periférico dos grupos tratados foram coletadas da veia caudal após 24 e 48 horas da injeção i.p. de DXR.

Tabela 03: Grupos experimentais e protocolos de tratamento com diferentes concentrações do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* e/ou DXR em 24 e 48 horas.

Tratamento	Grupo ^a	Dose
Controle Negativo (Água)	1 ^a	-
DMSO	2 ^a	200 µL
BE I	3 ^a	500 mg/kg p.c.
BE II	4 ^a	1.000 mg/kg p.c.
BE III	5 ^a	2.000 mg/kg p.c.
DXR	6 ^a	15 mg/kg p.c.
DMSO + DXR	7 ^a	Como em (2) e (6)
BE I + DXR	8 ^a	Como em (3) e (6)
BE II + DXR	9 ^a	Como em (4) e (6)
BE III + DXR	10 ^a	Como em (5) e (6)

DMSO, dimetilsulfóxido; BE, *Bertholletia excelsa*; DXR, doxorubicina.

^a Cada grupo de tratamento apresentou seis animais.

3.7 TESTE DO MICRONÚCLEO

Para obtenção de PCEMNs em amostras de sangue periférico de camundongos Swiss, foi realizada o método descrito por MacGregor et al., (1980), com modificações, sendo consideradas as seguintes etapas:

- Cortou-se a ponta da cauda dos animais e gotejou-se o sangue diretamente sobre as lâminas secas, previamente limpas com metanol, com uma lamínula fez-se o esfregaço e o material foi seco a temperatura ambiente (Figura 10);



Figura 10: A – Confecção do esfregaço sanguíneo. B – Secagem das lâminas com sangue periférico a temperatura ambiente. **Fonte:** Própria.

- Após a secagem do material a temperatura ambiente, este foi fixado em metanol por 5 minutos (Figura 11);
- Após a fixação, as lâminas foram secas em temperatura ambiente;
- No dia seguinte, as lâminas foram coradas com Giemsa (Figura 11) diluído de acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, do Ministério da Saúde de 2009, sendo 0,75 g (Giemsa em pó), 35 mL (Glicerol PA) e 65 mL (Álcool Metílico PA), utilizando a proporção de 1:10 (Giemsa/Água Tamponada), por 20 minutos;
- Após a coloração, as lâminas foram lavadas para retirada do excesso de corante (Figura 11);
- As lâminas foram secas a temperatura ambiente, e posteriormente lidas em microscópio óptico, na objetiva de imersão (100x).

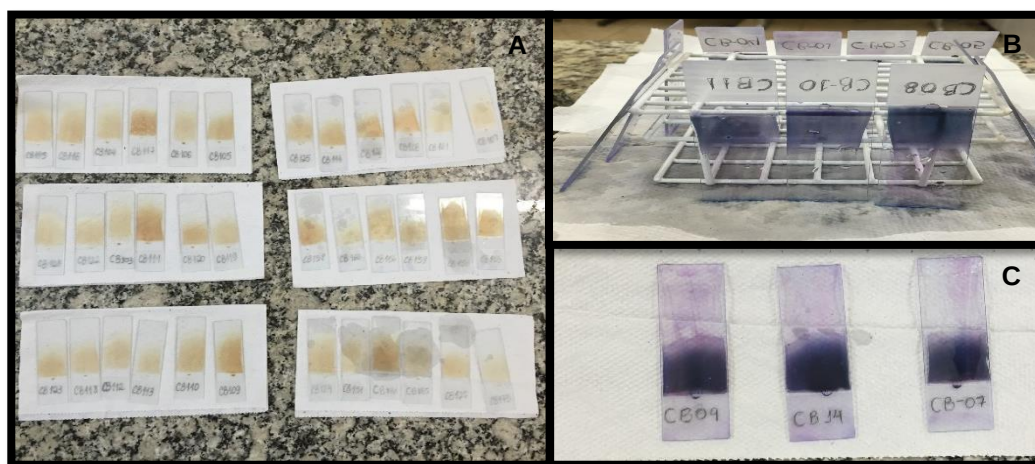


Figura 11: A – Fixação das amostras de sangue periférico utilizando metanol. B e C – Coloração das lâminas fixadas, com o corante Giemsa, lavagem para retirar o excesso de corante e secagem a temperatura ambiente. **Fonte:** Própria.

3.8 ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas de todos os animais (grupos tratados, controle negativo e controle positivo) foram codificadas e analisadas dentro de um curto espaço de tempo, por teste cego, de modo a eliminar erros de análise. A análise foi feita por mais de um observador, e seguiu um sistema balanceado, isto é, o número igual de células foi analisado em lâminas diferentes, em cada animal do estudo, por cada observador. O principal resultado do teste é a frequência de PCE que contém pelo menos um micronúcleo (frequência de PCE micronucleados) (RIBEIRO, 2003).

As lâminas foram, primeiramente, analisadas em aumento médio (20 a 40x) para encontrar campos com boa qualidade técnica, onde as células estejam bem espalhadas, não danificadas e coradas apropriadamente. Após localizar esse campo, o observador procedeu a análise das células para a presença do micronúcleo, usando um aumento de 100x (objetiva de imersão).

Para a determinação de frequência de PCEMNs, 2.000 PCEs por animal foram analisadas nas amostras de sangue periférico em 24 e 48 horas, em microscopia de luz sob imersão (Figura 12). Um total de 400 eritrócitos por animal foram analisados para calcular o IDN ($\text{PCE}/\text{PCE} + \text{NCE}$) em cada amostra de sangue periférico a fim de se determinar a citotoxicidade dos tratamentos (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

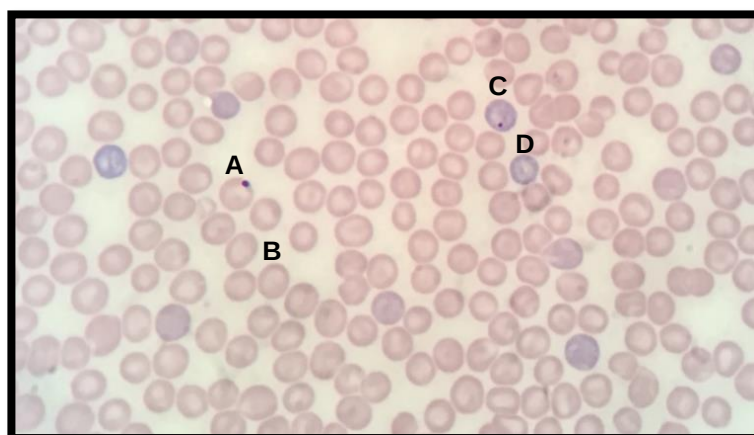


Figura 12: A – Eritrócito Normocromático Micronucleado (NCEMN). B – Eritrócito Normocromático (NCE). C – Eritrócito Policromático Micronucleado (PCEMN). D - Eritrócito Policromático. **Fonte:** Própria.

A porcentagem de redução na frequência de PCEMNs foi calculada de acordo com Waters et al., (1990), como descrito a seguir:

$$\% \text{ Redução} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

onde A é o grupo tratado com DXR (controle positivo), B, o grupo tratado com o óleo fixo da BE + DXR, e o C, o grupo tratado com água (controle negativo).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ANOVA) para experimentos inteiramente aleatórios, com o cálculo da estatística F e de seus respectivos “*p*-value”. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamento foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

A pesquisa da atividade antioxidante do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* realizada pelo método β -caroteno/ácido linoléico, foi realizada utilizando duas concentrações para o óleo fixo: 10.000 e 15.000 ppm, os resultados encontram-se na (Tabela 04).

Tabela 04: Atividade antioxidante do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* através do método β -caroteno/ácido linoléico.

Concentração (PPM)	Óleo fixo da BE (%)
10.000	92,00
15.000	87,00

4.2 MÉTODO DPPH

A tabela 05 e figura 13, referem-se aos valores obtidos pelo método de captura de radical livre DPPH para o óleo fixo da *Bertholletia excelsa*, foram estudadas 3 concentrações para o óleo fixo: 50.000, 70.000 e 100.000 ppm.

Tabela 05: Captura do radical livre do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* pelo método DPPH.

Concentração (PPM)	Óleo fixo da BE (%)
50.000	14,53
70.000	25,57
100.000	40,33

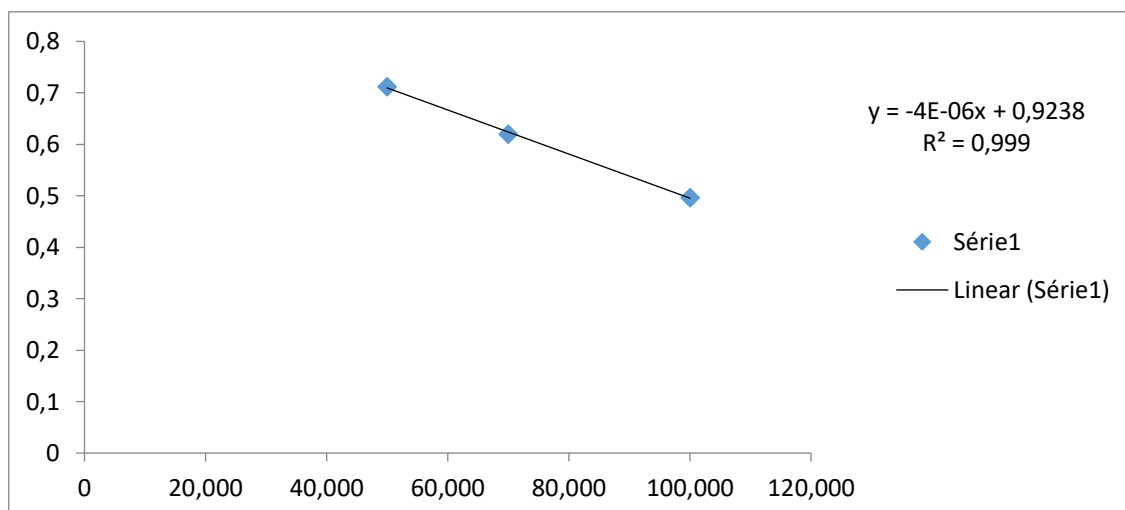


Figura 13: Absorbância DPPH nas concentrações 50.000, 70.000 e 100.000 ppm.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

A quantificação dos ácidos graxos do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* demonstrou o valor de lipídios total igual a 32,50%, frente a este resultado a castanha é considerada um alimento com elevado valor de lipídios. Sendo observada uma variação entre 9,22 a 37,13% do valor de lipídeos total, onde os ácidos graxos mais representativos foram o linoléico e o oléico, respectivamente, apresentados na (Tabela 06), observa-se ainda, que na mesma há predominância de ácidos graxos insaturados. Sendo os cromatogramas da quantificação dos ácidos graxos do óleo fixo da BE demonstrados nas figuras 14 e 15.

Tabela 06: Ácidos graxos presentes no óleo fixo da *Bertholletia excelsa* por cromatografia gasosa.

Ácidos Graxos	Nº de Carbono	Porcentual (%)
Ácido Linoléico	(18:2n-6)	37,13
Ácido Oléico	(18:1)	36,92
Ácido Palmítico	(16:0)	16,73
Ácido Estearico	(18:0)	9,22
		100

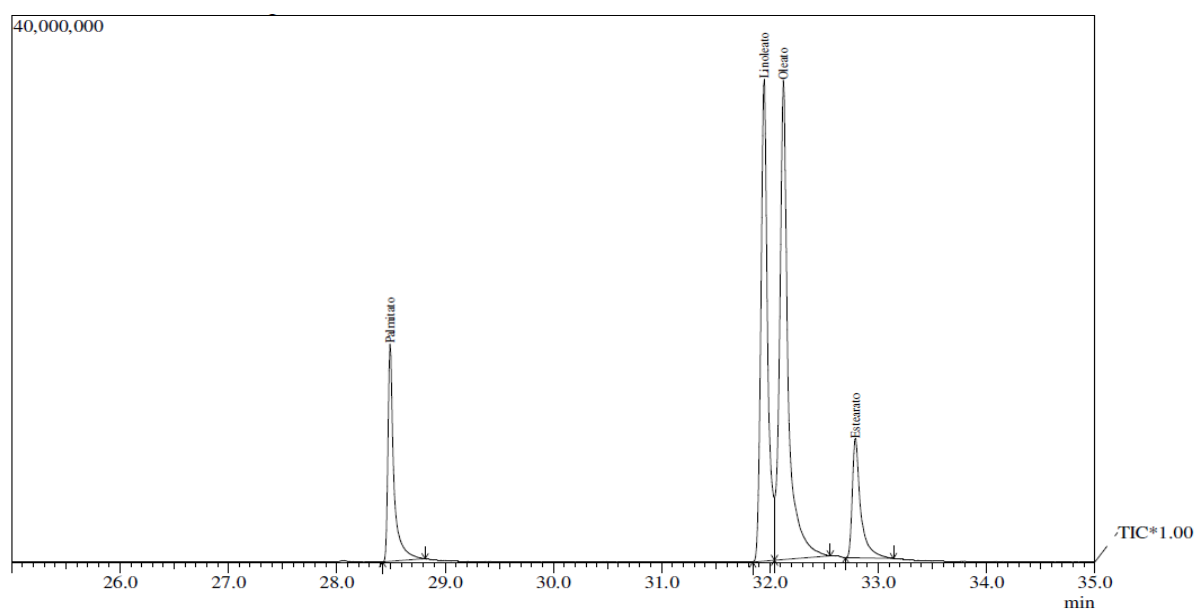


Figura 14: Cromatograma dos ácidos graxos do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* (Castanha do Brasil).

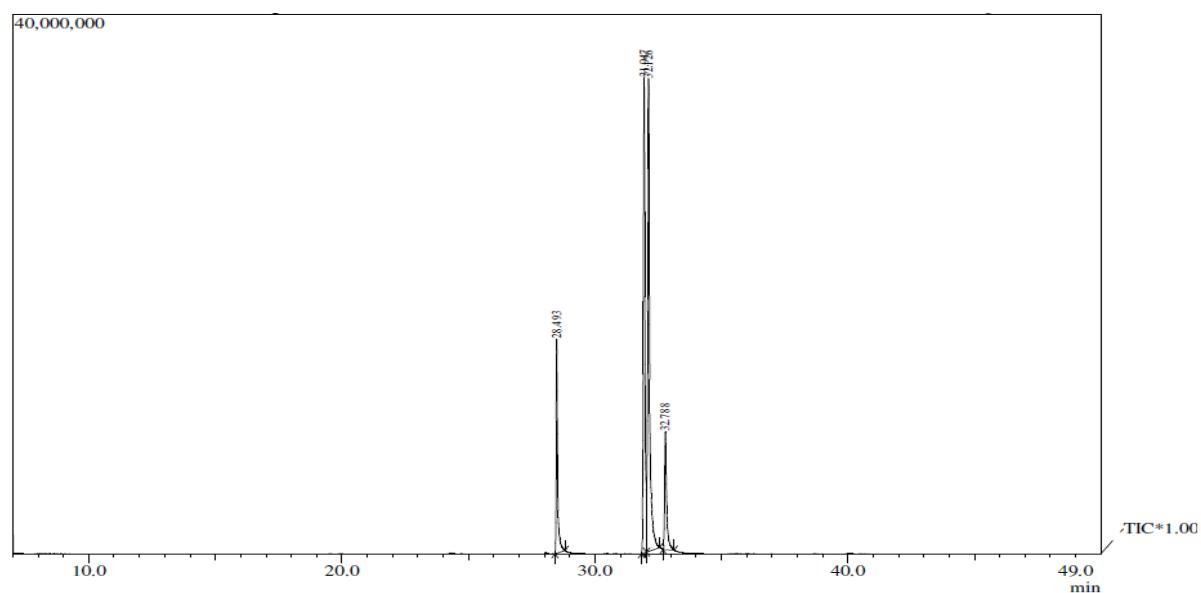


Figura 15: Cromatograma dos ácidos graxos do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* (Castanha do Brasil).

4.4 TESTE DO MICRONÚCLEO E ÍNDICE DE DIVISÃO NUCLEAR

Após análise das amostras de sangue periférico dos camundongos Swiss tratados com as três concentrações do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* (BE I 500, BE II 1.000 e BE III 2.000 mg/kg p.c.), por via oral, em 24 e 48 horas, cada animal experimental foi codificado, minimizando assim, o risco de influência das dosagens dos grupos sobre os analisadores.

O método de Giemsa foi utilizado para coloração das lâminas, onde as células utilizadas foram os eritrócitos policromáticos, células jovens, que se coram de azul de metileno, diferenciando-se assim, das células mais maduras e antigas presentes na corrente sanguínea, os eritrócitos normocromáticos, conforme (Figura 16).

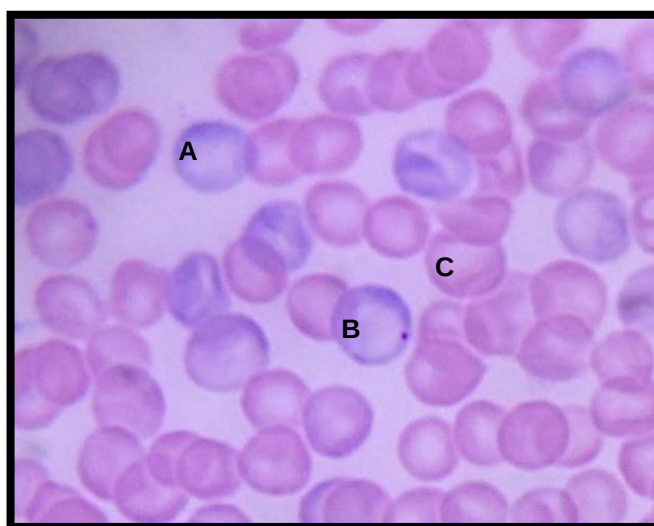


Figura 16: A – Eritrócito Policromático (PCE). B - Eritrócito Policromático Micronucleado (PCEMN) C – Eritrócito Normocromático (NCE). **Fonte:** Própria.

As lâminas foram lidas por mais de um observador em um sistema balanceado, sendo confeccionadas duas lâminas por animal, onde foram lidos 1.000 PCEs/lâminas e verificou-se a presença de PCEMNs. O número de PCEMNs e PCEs/1000 em 24 e 48 horas, estão dispostos na (Tabela 07) e (Tabela 08), respectivamente.

Tabela 07: Dados individuais das frequências de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (PCEMNs) em sangue periférico (24 horas) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.

Tratamentos (mg/kg p.c.)	Animais	Nº	PCEMNs/2.000
Controle	M1	06	0.30
	M2	07	0.35
	M3	06	0.30
	M4	06	0.30
	M5	08	0.40
	M6	07	0.35
DMSO	M1	09	0.45
	M2	10	0.50
	M3	10	0.50
	M4	10	0.50
	M5	09	0.45
	M6	09	0.45
BE I	M1	10	0.50
	M2	10	0.50
	M3	10	0.50
	M4	09	0.45
	M5	09	0.45
	M6	09	0.45
BE II	M1	07	0.35
	M2	11	0.55
	M3	09	0.45
	M4	11	0.55
	M5	09	0.45
	M6	08	0.40
BE III	M1	09	0.45
	M2	09	0.45
	M3	09	0.45
	M4	09	0.45
	M5	09	0.45
	M6	10	0.50
DXR	M1	30	1.50
	M2	30	1.50
	M3	30	1.50
	M4	30	1.50
	M5	33	1.65
	M6	31	1.55
DMSO + DXR	M1	25	1.25
	M2	25	1.25
	M3	26	1.30
	M4	28	1.40
	M5	25	1.25
	M6	26	1.30
BE I + DXR	M1	19	0.95

	M2	19	0.95
	M3	18	0.90
	M4	19	0.95
	M5	17	0.85
	M6	17	0.85
BE II + DXR	M1	16	0.80
	M2	17	0.85
	M3	15	0.75
	M4	15	0.75
	M5	15	0.75
	M6	14	0.70
BE III + DXR	M1	15	0.75
	M2	15	0.75
	M3	14	0.70
	M4	14	0.70
	M5	15	0.75
	M6	14	0.70

M, macho. Foram analisadas 2.000 células por animal.

Tabela 08: Dados individuais das frequências de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (PCEMNs) em sangue periférico (48 horas) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.

Tratamentos (mg/kg p.c.)	Animais	Nº	PCEMNs/2.000
Controle	M1	08	0.40
	M2	07	0.35
	M3	06	0.30
	M4	06	0.30
	M5	07	0.35
	M6	06	0.30
DMSO	M1	07	0.35
	M2	08	0.40
	M3	08	0.40
	M4	09	0.45
	M5	08	0.40
	M6	08	0.40
BE I	M1	09	0.45
	M2	07	0.35
	M3	09	0.45
	M4	08	0.40
	M5	08	0.40
	M6	07	0.35
BE II	M1	08	0.40
	M2	07	0.35
	M3	08	0.40
	M4	07	0.35
	M5	08	0.40
	M6	09	0.45

BE III	M1	07	0.35
	M2	07	0.35
	M3	08	0.40
	M4	08	0.40
	M5	09	0.45
	M6	07	0.35
DXR	M1	48	2.40
	M2	49	2.45
	M3	49	2.45
	M4	51	2.55
	M5	50	2.50
	M6	49	2.45
DMSO + DXR	M1	45	2.25
	M2	46	2.30
	M3	45	2.25
	M4	45	2.25
	M5	45	2.25
	M6	46	2.30
BE I + DXR	M1	18	0.90
	M2	16	0.80
	M3	18	0.90
	M4	16	0.80
	M5	17	0.85
	M6	17	0.85
BE II + DXR	M1	15	0.75
	M2	14	0.70
	M3	16	0.80
	M4	16	0.80
	M5	15	0.75
	M6	15	0.75
BE III + DXR	M1	12	0.60
	M2	11	0.55
	M3	13	0.65
	M4	12	0.60
	M5	12	0.60
	M6	11	0.55

M, macho. Foram analisadas 2.000 células por animal.

Na verificação do índice de divisão nuclear (IDN), no tratamento de 24 horas, não foi observada diferença entre os grupos tratados com as concentrações do óleo fixo da BE, DMSO e seus respectivos controles, demonstrando ausência de citotoxicidade.

A diferença de frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs), no tratamento de 24 horas, entre os grupos controle negativo e DMSO, não foram estatisticamente significativas, bem como, quando os dois grupos

anteriores foram comparados com os grupos que receberam as três concentrações do óleo fixo da BE (500, 1.000 e 2.000 mg/kg p.c.), demonstrando ausência de efeito genotóxico.

Nos grupos tratados para análise do efeito antígenotóxico em 24 horas (óleo fixo da BE e/ou DXR), houve uma redução significativa cerca de 52,08 a 67,36% na frequência de PCEMNs quando comparado com o grupo tratado somente com DXR (Tabela 09).

Tabela 09: Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (PCEMNs) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a tratamento com diferentes doses do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* e/ou doxorubicina e seus respectivos controles 24 horas pós tratamento.

Tratamentos (mg/kg p.c.)	IDN média±DP ^a	PCEMNs média±DP ^b	PCEMNs/ 1.000 PCEs ^b	Redução (%)
Controle	0.09 ± 0.55	6.50 ± 0.55	3.25	-
DMSO	0.09 ± 0.75	7.00 ± 0.63	3.50	-
BE I	0.10 ± 0.75	7.17 ± 0.98	3.58	-
BE II	0.09 ± 0.75	6.83 ± 0.41	3.42	-
BE III	0.09 ± 0.55	6.83 ± 0.75	3.42	-
DXR	0.09 ± 0.75	30.83 ± 1.17 ^c	15.42	-
DMSO + DXR	0.09 ± 0.82	26.67 ± 1.21 ^{c,d}	13.33	-
BE I + DXR	0.12 ± 0.75	18.00 ± 0.89 ^{c,d}	9.00	52.08
BE II + DXR	0.12 ± 0.84	14.67 ± 1.03 ^{c,d}	7.33	63.88
BE III + DXR	0.11 ± 0.75	14.50 ± 0.55 ^{c,d}	7.25	67.36

^a Valores das médias ± DP. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2.400 células por grupo de tratamento.

^b 2.000 eritrócitos policromáticos foram analisados por animal, sendo 12.000 por grupo de tratamento.

^c Significativamente diferente do grupo controle (negativo) ($P < 0.05$).

^d Significativamente diferente do grupo DXR ($P < 0.05$).

Na análise do tratamento de 48 horas após administração das diferentes concentrações do óleo fixo da BE e/ou DXR, a diferença na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e índice de divisão nuclear (IDN), entre os grupos controle negativo e DMSO, não foram estatisticamente significativas, bem como, quando os dois grupos anteriores foram comparados com os grupos que

receberam as três concentrações do óleo fixo da BE (500, 1.000 e 2.000 mg/kg p.c.), demonstrando ausência de efeito genotóxico.

Nos grupos tratados para análise do efeito antigenotóxico em 48 horas (óleo fixo da BR e/ou DXR), houve uma redução significativa cerca de 76,78 a 87,89% na frequência de PCEMNs quando comparado com o grupo tratado somente com DXR (15 mg/kg p.c.) (Tabela 10).

Tabela 10: Frequência de Eritrócitos Plocromáticos Micronucleados (PCEMNs) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos a tratamento com diferentes doses do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* e/ou doxorrubicina e seus respectivos controles 48 horas pós tratamento.

Tratamentos (mg kg ⁻¹ p.c.)	IDN Média + DP ^a	PCEMNs Média + DP ^b	PCEMNs / 1000 PCEs ^b	Redução (%)
Controle	0.09 ± 0.75	5.83 ± 1.17	2.92	-
DMSO	0.10 ± 0.75	6.83 ± 0.41	3.42	-
BE I	0.10 ± 0.84	6.50 ± 0.55	3.25	-
BE II	0.09 ± 0.75	6.50 ± 0.55	3.25	-
BE III	0.09 ± 0.55	6.00 ± 0.89	3.00	-
DXR	0.10 ± 0.75	49.33 ± 1.03 ^c	24.67	-
DMSO + DXR	0.09 ± 0.82	45.33 ± 0.52 ^{c,d}	22.67	-
BE I + DXR	0.12 ± 0.75	16.00 ± 0.89 ^{c,d}	8.00	76.78
BE II + DXR	0.12 ± 0.84	14.50 ± 0.55 ^{c,d}	7.25	80.46
BE III + DXR	0.13 ± 0.75	11.67 ± 0.52 ^{c,d}	5.83	87.89

^a Valores das médias ± DP. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2.400 células por grupo de tratamento.

^b 2.000 eritrócitos policromáticos foram analisados por animal, sendo 12.000 por grupo de tratamento.

^c Significativamente diferente do grupo controle (negativo) ($P < 0.05$).

^d Significativamente diferente do grupo DXR (positivo) ($P < 0.05$).

Os resultados obtidos através da análise do sangue periférico de camundongos Swiss tratados com as três concentrações do óleo fixo da BE em 24 (Figura 17) e 48 horas (Figura 18), não demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparados com os grupos DMSO (200 µL) e controle negativo (água) demonstrando ausência de efeito genotóxico.

Porém, foi observada diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos BE I, BE II e BE III com o grupo positivo (DXR, 15 mg/kg p.c.), demonstrando

assim, que as três concentrações do óleo fixo da BE associados a DXR, apresentaram potente efeito antígeno-tóxico, ficando entre 52.08 a 67.36 e 76.78 a 87.89% em 24 (Figura 17) e 48 horas (Figura 18), respectivamente.

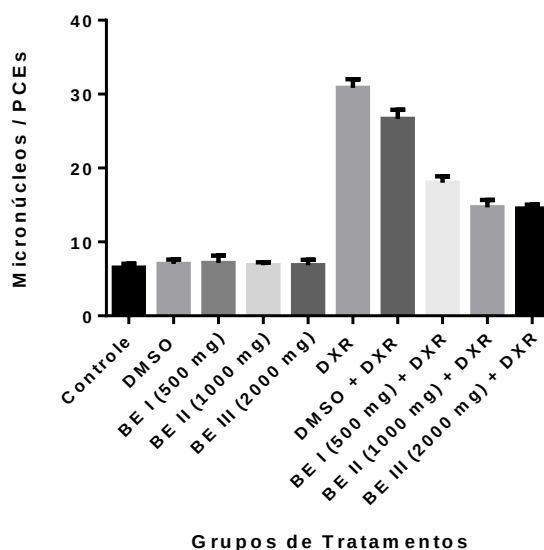


Figura 17: Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células do sangue periférico em 24 horas de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.

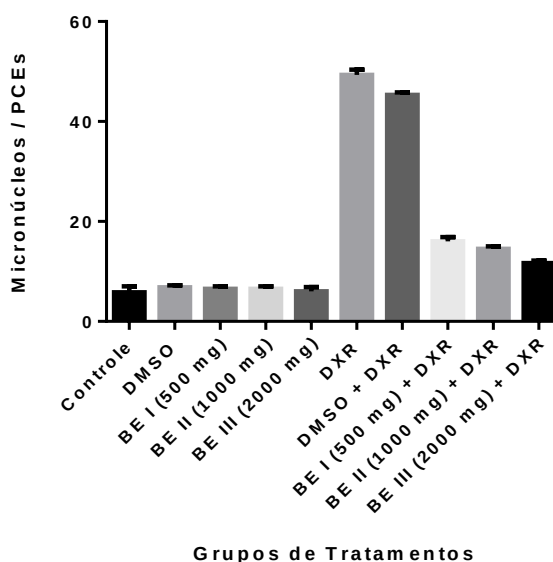


Figura 18: Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células do sangue periférico em 48 horas de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da BE e/ou DXR, e seus respectivos controles.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Estudos com produtos naturais, vem se destacando atualmente por possuírem composição química rica em substâncias biologicamente ativas, desempenhando excelente papel como produtos funcionais, além de serem eficazes no combate de patologias, e principalmente na prevenção de doenças crônico degenerativas, como por exemplo, o câncer.

Apesar do intenso consumo das espécies vegetais nas mais diversas formas de processos extrativos, seja como chás, garrafadas, óleos ou emplastros, pouco ainda se sabe sobre a toxicologia das espécies utilizadas (ALONSO, 2008; BELCAVELO et al., 2012), o que tem despertado a atenção para estudos toxicológicos de tais espécies, que visam assegurar seu uso e comprovar que não causam danos aos organismos expostos.

A medicina popular ainda tem sido o principal critério para seleção das plantas medicinais a serem estudadas, aliada com sua rica composição química em compostos fenólicos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos, das mais diversas plantas, para as mais diversas doenças (ARGENTA, 2011).

Se referindo ao Brasil, em especial a região amazônica, a maioria das plantas medicinais não possuem estudos científicos completos. Algumas espécies possuem um ou dois estudos nas áreas de: botânica, fitoquímica, farmacológica ou toxicidade aguda (BOCHNER et al. 2012; BALBINOT et al. 2013).

Dados recentes demonstraram que cerca de 99% das plantas medicinais endêmicas do Brasil ainda não têm seus princípios ativos identificados (FÃO et al., 2012), o que reforça a carência de estudos científicos sobre suas propriedades, ressaltando o território brasileiro, que é considerado como um dos mais ricos em sua flora, o que representa alto potencial farmacológico ainda não estudado.

A metodologia para extração dos bioderivados, deve ser selecionada, levando em consideração a composição química da espécie que será utilizada. Pois, os extratos obtidos de plantas são, normalmente, misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais (MIYAKE, 2016).

Deste modo, a extração por prensagem hidráulica é um método que, por não utilizar solvente ou algum tipo de gás, o produto pode ser obtido com suas propriedades naturais preservadas. No entanto, normalmente é realizada em combinação com a extração por solvente, pela sua menor eficiência na retirada de óleo, a menos que seja aplicada alta pressão (MORETTO e FETT, 1998), metodologia esta aplicada neste estudo.

Sobre a sua composição lipídica, a importância do conteúdo dos ácidos graxos presentes na BE foi constatada em De Souza Ferreira et al., (2006), que relataram no óleo bruto haver 85% insaturados, sendo destes 34% representado pelo ácido graxo poli-insaturado linoleico e 51% pelo ácido graxo monoinsaturado oléico; e 13% em ácidos graxos saturados representam 13% da composição do óleo.

O complexo lipídico composto pela fração graxa do extrato da BE promove um sensorial agradável e suave por apresentar composição rica em ácidos graxos essenciais, tendo um amplo aproveitamento pelas indústrias de cosméticos (PASTORE et al., 2007).

A cromatografia gasosa tem como objetivo geral viabilizar a separação, identificação e quantificação rápida do maior número de constituintes em misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos (DESTY, 1965), sendo esta metodologia empregada no presente estudo para a quantificação dos ácidos graxos do óleo fixo da BE.

Os três principais ácidos graxos presentes no reino vegetal são o palmítico, o oleico e o linoleico, acompanhados algumas vezes do ácido esteárico e linolênico (GUNSTONE, 2005), o que se assemelha com o presente estudo que apresentou 37,13% (Ácido Linoleico), 36,92% (Ácido Oleico), 16,73% (Ácido Palmítico) e 9,22% (Ácido Esteárico).

O óleo fixo da BE apresenta uma rica composição em lipídeos, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, como o selênio (Se), sendo este último encontrado em altos níveis e responsável por sua atividade antioxidante (KORNSTEINER et al., 2006; VENKATACHALAM e SATHE, 2006; SANTOS, et al., 2010).

O Se é considerado um dos mais importantes antioxidantes, atuando sobre as alterações fisiológicas e metabólicas, no retardo ou prevenção dos processos naturais de oxidação orgânica. Sendo o mesmo, essencial, e quando associado a vitamina E, figura entre os mais importantes antioxidantes orgânicos. Porém, ele não é um

antioxidante “puro”, mas sim um componente das enzimas antioxidantes, as selenoenzimas, como a glutathione peroxidase, selenoproteína P. e a tioredoxina redutase (BROOKS et al., 2001; CALVO et al., 2002; PATRICK, 2004).

Sua atuação orgânica na manutenção da normalidade funcional do sistema imune e manutenção da glândula tireoide é reportada como fator importante na ação anti-carcinogênese nos mecanismos de quimioprevenção. Além dos processos patológicos preexistentes, podendo atuar na redução dos níveis de colesterol, Alzheimer, dentre outras afecções crônico-degenerativas. Estas funções têm sido atribuídas à sua atuação antioxidante, sobre a proliferação celular o que induz o processo de apoptose. Essas etapas podem facilitar a reestruturação do DNA pela ativação da proteína p53 e componentes das selenoenzimas (JIANG et al., 2001; SEO et al., 2002; VENKATESWARAN et al., 2004; YANG, 2009).

Diversos benefícios deste micromineral são relatados, entre eles o retardo do envelhecimento, o combate a tensão pré-menstrual, a preservação da elasticidade dos tecidos e a prevenção de câncer, baseado em seus efeitos preventivos nos processos metabólicos degenerativos dos organismos (CHUNHIENG, 2004; SEIFRIED et al., 2007). Em homens, pode aumentar a potência e o interesse sexual e suprir a carência gerada quando o Se é perdido o sêmen (DE SOUZA et al., 2004; THOMSON et al., 2008).

Sendo o seu consumo em uma quantidade de 100µgSe por dia, durante três meses, eficiente tanto quanto a selenometionina na elevação plasmática do selênio e da glutathione, o que reforça o potencial antioxidante da *Bertholletia excelsa* (THOMSON et al., 2008).

Desta forma, o Se exerce o papel de um importante centro redutor, principalmente na neutralização dos radicais livres, pois apresenta ações de proteção contra doenças cardiovasculares, proteção celular em relação ao câncer e potencialização do sistema imune por meio da manutenção da integridade das células imunocompetentes (DELILBASI et al., 2002; RAFFERTY et al., 2003).

Além de ser considerada um alimento rico em ácidos graxos e selênio, a BE apresenta em sua composição química uma grande variedade de compostos fenólicos, que são encontrados em níveis expressivos, estes compostos desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, a poluição ambiental e substâncias químicas presentes nos alimentos. Atuam também como agentes terapêuticos em um elevado número de patologias.

Estes compostos não podem ser sintetizados pelo nosso organismo, sendo representativos da parte não energética da dieta humana (GONÇALVES, 2008).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado correlação entre o aumento do consumo de compostos fenólicos com ação antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003) e a redução do risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (COOK e SAMMAN, 1996; RICE-EVANS et al., 1996). Os antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que em algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos, os que são provenientes da dieta, como: vitaminas C e E, os compostos fenólicos, e os carotenóides, podem impedir a carcinogênese pela sua atividade antioxidante. (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio, esta, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (RICE-EVANS et al., 1996). Alimentos que apresentam esta atividade, são considerados elementos importantes que não devem faltar na dieta diária, pois a geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais, sendo formados em um cenário de reações de óxido-redução, provocando essas reações ou delas resultando. Podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (OKEZIE, 1998).

Essas reações ocorrem no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) sendo sua ação, relacionada com seu local de formação (MANACH et al., 2004).

Dentre os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio estão relacionadas à gênese de tumores em diferentes níveis, podendo promover o desenvolvimento do câncer por vários mecanismos: alteração na proliferação celular; diminuição da afinidade da enzima polimerase; inativação de enzimas responsáveis pela degradação de carcinógenos potentes; união de produtos finais da peroxidação lipídica à molécula de DNA, criando lesões mutagênicas; e ataque direto ao DNA (HALLIWELL, 1996; MIN e ELEBER, 2008).

A observação de bases de DNA modificadas (como: hidroxitimidina e hidroxiguanina) depois da exposição de células a situações de estresse oxidativo, tem

sido evidenciada em estudos. Essa modificação nas bases do DNA pode ter como resultado mutações, deleções ou amplificações do material genético como primeiros passos para a formação do câncer (DIPLOCK et al., 1998; TIWARI, 2004; MIN e EBELER, 2008). Os antioxidantes têm a capacidade de sequestrar os radicais livres garantindo a integridade celular, protegendo suas micro e macromoléculas. Assim, substâncias capazes de atuarem como antioxidantes são importantes para ajudar a inibir o processo da carcinogênese (SUN et al., 2004).

Além da atividade antioxidante direta, pesquisas têm destacado múltiplas funções e mecanismos importantes relacionados as habilidades dos compostos fenólicos de se ligarem a receptores celulares e a transportadores de membranas, de influenciarem a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular (MANACH et al., 2005).

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres (ALVES et al., 2007; NEVES et al., 2008). Diferentes autores vêm empregando o mesmo método para avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, tendo-se observado resultados semelhantes e significativos (LIMA et al., 2006; ROESLER et al., 2007; NUNES et al., 2008; AYRES e CHAVES, 2010).

Para se avaliar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nos vegetais Melo et al. (2006), avaliaram a capacidade antioxidante de quinze hortaliças comercializadas na cidade de Recife, utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico e o sistema DPPH. Todas as hortaliças investigadas demonstraram capacidade antioxidante, sendo estas metodologias empregadas no presente estudo.

A metodologia utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico, apesar dos inconvenientes como interferência de substâncias oxidantes ou redutoras no ensaio é amplamente usada, pois uma vez que não necessita de elevadas temperaturas durante sua execução, permite a determinação do poder antioxidante em produtos termossensíveis (SILVA, 2008).

As polpas e extratos de frutas que exibem capacidade de proteção (inibição de oxidação) acima de 70% são consideradas excelentes antioxidantes; de 50 a 70% possuem ação antioxidante moderada e abaixo de 50% possuem baixa capacidade de proteção (DE ALMEIDA-MELO et al., 2008), o presente estudo avaliou a atividade

de proteção/inibição de oxidação do óleo fixo da BE, sendo os resultados obtidos de 92 e 87% para as concentrações de 10.000 e 15.000 ppm, respectivamente, demonstrando excelente atividade antioxidante.

O efeito protetor do óleo fixo da BE observado no presente estudo, pode estar relacionado a concentração de selênio presente em sua composição química, este micromineral atua como antioxidante exógeno promovendo juntamente com o ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides, compostos fenólicos, zinco, cobre e magnésio a reciclagem e reações de regeneração que otimizam a proteção contra radicais livres (SHAHIDI e HO, 2007).

As enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione S-transferase são as principais enzimas envolvidas nos sistemas de proteção endógena, chamados de reserva antioxidante do organismo (DRÖGE, 2002). Essas enzimas desempenham um papel importante na proteção das células contra genotoxicidade e carcinogenicidade química por sequestrar ERO. Participando no processo de destoxificação de xenobióticos, sequestram radicais livres e peróxidos, protegendo, assim, as células e órgãos contra a ação de agentes genotóxicos e carcinógenos (ASHOKKUMAR e SUDHANDIRAN, 2008).

O método DPPH tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de frutas. Pois este método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos, e por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas, como ocorre com o método ABTS (ABTS - 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), além de facilitar seu uso (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998; LIMA, 2008). Sendo constatado que há uma correlação bastante positiva entre a capacidade antioxidante de uma fruta e sua quantidade de polifenol (DE ALMEIDA-MELO et al., 2008).

A determinação da atividade antioxidante total (AAT) pela captura do radical livre DPPH, os extratos do óleo fixo da BE foram acompanhados em três concentrações 50.000, 70.000, e 100.000 ppm, de forma que pudessem reagir com o radical livre (DPPH), os resultados obtidos foram de 14,53, 25,57 e 40,33% para sequestro de DPPH, respectivamente, nas condições do presente estudo. O que chegou próximo do indicado, que seria 50% da captura do radical livre DPPH, reforçando a necessidade de mais estudos com concentrações maiores.

Além disso, a composição de extratos naturais inclui componentes químicos com atividades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas. Dessa forma, é muito importante a inclusão da abordagem genotóxica em avaliações toxicológicas dos compostos terapêuticos (FERREIRA et al, 2008).

Para estudos de genotoxicidade, existem guias de referências que padronizam os procedimentos, como: dosagem máxima, tempo de experimento, modelo animal, quantidade de animais por grupo testado, grupos de tratamento, vias de administração, coleta, análise das amostras obtidas, além da forma de eutanásia e descarte dos animais. Todas estas etapas são eticamente seguidas, tendo como órgão norteador o Conselho Nacional de Cuidados Éticos com Animais de Experimentação – CONCEA.

As autoridades reguladoras da Europa, EUA e Japão recomendam que estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade sejam realizados previamente ao pedido de aprovação de comercialização de produtos farmacêuticos (BONASSI, 2007), para que se possa ter respaldo quanto à segurança, qualidade e eficácia dessas novas moléculas, frente a um organismo vivo.

A mutagenicidade é o efeito tóxico que danifica, especificamente, o material genético presente na célula, acarretando uma mudança no DNA ou no próprio cromossomo e essa mutagenicidade, se tratando de uma substância química pode ser avaliada por diversos modos de ação, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação do DNA durante a respiração celular; interferência da divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta, presença de anormalidades e micronúcleos nas células (MACHADO, 2013).

Sendo assim, ensaios de atividade biológica são de fundamental importância na triagem de estudo de um vegetal, dentre os ensaios, os toxicológicos complementam os ensaios biológicos (MACIEL et al., 2002), entre eles, estão os ensaios citogenéticos, como ensaio cometa e o teste do micronúcleo que são indispensáveis na avaliação de futuros fitoterápicos.

O teste do micronúcleo tem sido utilizado como uma metodologia para testar a genotoxicidade de muitos produtos químicos, avaliando a capacidade de uma substância de quebrar cromossomos ou afetar a formação de placa metafásica e/ou fuso mitótico, ambos capazes de levar à distribuição desigual de cromossomos

durante a divisão celular. Os micronúcleos são facilmente visualizados em amostras de eritrócitos, sendo um forte indicativo de aberrações cromossômica (FLORES e YAMAGUCHI, 2008).

Este método é um ensaio citogenético que realiza a identificação de danos cromossômicos, visualizando a presença ou ausência de micronúcleos (NORPPA e FALCK, 2003). Podem ser utilizados vários tipos de células, quando o objetivo for a monitorização da população de dano genético, e o rastreio de produtos químicos com potencial genotóxico. Sendo este teste utilizado no referido estudo.

Gerando resultados com forte apoio estatístico, por este motivo, é usado como uma ferramenta de triagem para determinar a segurança de substâncias e classificar os agentes como cancerígenos ou não cancerígenos. Sua facilidade de execução levou a sua adoção generalizada em todo o mundo como um teste padrão de genotoxicidade para monitorizar a segurança de agentes para uso na população humana. Sendo os testes de genotoxicidade importantes para avaliar a toxicidade celular e identificar potenciais agentes cancerígenos e mutagênicos (MACGREGOR et al., 1987).

Em relação ao sistema-teste *in vivo*, ratos e camundongos têm sido amplamente utilizados como modelos animais para avaliação de genotoxicidade *in vivo* de produtos químicos (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Atualmente o teste do micronúcleo em roedores é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes genotóxicos recomendados para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado (KRISHNA e HAYASHI, 2000; RIBEIRO, 2003; CAMMERER et al., 2007), por este motivo a espécie de camundongos Swiss foi selecionada como modelo animal na presente pesquisa.

De acordo com MacGregor (1980) e Hayashi (2000), o recomendado é utilizar pelo menos quatro animais por grupo de tratamento para as análises. O presente estudo analisou seis animais por grupo de tratamento. Sendo que em estudos de toxicidade/genotoxicidade aguda, são utilizadas diferentes doses chegando a 2.000 mg/Kg. A dose é administrada uma única vez, e o animal é observado por um período de 15 dias. Posteriormente é verificado se houve morte (VALADARES, 2007), sendo o método de eutanásia e descarte dos animais o passo seguinte. O que se assemelha com o presente estudo que observou os animais 15 dias antes do início dos testes e

15 dias após a finalização do estudo, e os procedimentos de eutanásia e descarte foram realizados de acordo com os protocolos do CONCEA.

É importante ressaltar que o potencial de muitos compostos naturais de modular os efeitos genotóxicos de xenobióticos tem sido identificado utilizando-se este teste como parâmetro de análise (AZEVEDO et al., 2003). Deste modo, o teste do micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico é satisfatório para a detecção de agentes capazes de induzir ou evitar danos cromossômicos, podendo assim ser utilizado nos ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade (GRAWE, 2005).

Para a avaliação dos efeitos genotóxico e antigenotóxico do óleo fixo da BE no presente ensaio, foram analisadas células de sangue periférico, dado a relevância desse tecido como alvo de agentes mutagênicos (CEMELI et al., 2009).

As características básicas do teste do micronúcleo são: o efeito do agente químico é observado em PCEs que tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele tenha pode ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; a frequência de micronúcleo induzido em PCEs é dependente do tempo de amostragem (RIBEIRO, 2003).

As vantagens do teste de micronúcleo em relação a outros testes usados para diagnosticar doenças e monitorar contaminantes ambientais incluem a análise simplista, alta sensibilidade de detecção e precisão das perdas cromossômicas e eventos de não disjunção, a capacidade de medir o comprimento e a progressão da divisão nuclear e a capacidade de detectar eventos de reparação e excisão (MACGREGOR et al., 1987).

Neste teste, as doses e o período de amostragem têm papel importante. Geralmente, sendo pelo menos três doses testadas (SATO et al., 1995), no presente estudo as doses de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg p.c., foram selecionadas de acordo com o *Guideline* da ANVISA (2013), para estudos de genotoxicidade, sendo estas doses utilizadas quando não se tem estudos para ensaios correspondentes na literatura.

A via de administração por gavagem é indicada como a via normalmente utilizada para administração da substância-teste, sendo que as demais vias como injeções intraperitoneais e intravenosa, podem ser aceitas quando o seu uso for justificado

(HAYASHI et al., 2000). No presente trabalho, as diferentes concentrações do óleo fixo da BE foram administradas por gavagem, por se tratar da via a qual o homem faz o consumo da mesma. Entretanto, os animais receberam o tratamento com a DXR pela via intraperitoneal, uma vez que esse modo de administração permite uma grande exposição das células do sangue periférico à substância (PRESTON et al., 1987).

A DXR é um antibiótico do tipo antraciclina usado como agente antitumoral contra leucemias, linfomas e vários tumores sólidos, tendo também uma ampla variedade de efeitos tóxicos, incluindo cardiotoxicidade, citotoxicidade e a indução de aberrações cromossômicas (JUNG e RESZKA, 2001), pois sua estrutura química pode se ligar ao ferro e assim formar complexos com o DNA, induzindo a quebra da dupla fita (ELLIOTT et al., 1984), podendo também sofrer redução de um a dois elétrons e produzir compostos reativos que danificam macromoléculas e membranas lipídicas (INJAC e STRUKELJ, 2008).

Sua toxicidade pode ser causada de maneiras diferentes: a sua porção agliconada planar pode inserir-se entre pares de bases adjacentes do DNA, que provoca rupturas em uma única ou na dupla fita de DNA, modificando a capacidade de helicases nucleares para dissociar a fita dupla de DNA e a enzima topoisomerase II, atuando como agressor para esta enzima (INJAC e STRUKELJ, 2008).

Este antibiótico é capaz de produzir radicais livres, sendo este o seu principal mecanismo responsável pela sua toxicidade (QUILIS et al., 2002), o que resulta em um estresse oxidativo, causando danos no DNA, que podem se transformar em mutações e posterior processo carcinogênico (PAN et al., 2008). A redução da genotoxicidade da DXR observada no presente estudo quando associada as concentrações do óleo fixo da *Bertholletia excelsa* pode ser devida, em parte, a atividade do óleo fixo da BE em sequestrar radicais livres.

Minutos após a sua administração, a droga é removida do plasma e encontrada no núcleo celular, onde se coloca entre pares de bases dos ácidos nucléicos e exerce um efeito antimitótico. A DXR foi utilizada como indutor de MNs, sendo frequentemente empregada em testes de mutagenicidade como controle positivo (ANTUNES e TAKAHASHI, 1998; TAVARES et al., 1998).

A citotoxicidade, de forma geral, é diretamente proporcional à concentração da amostra e ao tempo de exposição (KUMAR et al., 2009). Sendo a peroxidação lipídica

a principal responsável por alterações funcionais e estruturais da membrana plasmática, resultando, geralmente, em morte celular (PERCÁRIO, 2010), no presente estudo foram observados 400 PCEs por animal, tendo um total de 2.400 PCEs por grupo de tratamento, para a análise do IDN, após análise, não foram observadas alterações na proliferação celular, demonstrando ausência de efeito citotóxico nos protocolos de tratamento empregados no referido estudo. Um fator que pode ter contribuído para tal dado, foram os resultados obtidos quanto a proteção/inibição de oxidação do óleo fixo da BE, de 92 e 87%, nas concentrações 10.000 e 15.000 ppm, respectivamente.

Nos testes utilizando amostras de sangue periférico, comparando experimentos com 24, 48 e 72 horas após tratamento, o pico máximo é alcançado em 48 horas. Entretanto, para algumas substâncias e doses, o pico de resposta parece preceder o tempo de exposição de 48 horas (SATO et al., 1995). No presente ensaio, as frequências de PCEMNs, em todos os tratamentos com DXR, foram mais elevadas nas amostras de sangue periférico de 48 horas, do que nas de 24 horas.

Alguns modelos de estudos toxicológicos *in vivo* abordam ensaios de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, onde este deve abordar mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade e indução de dependência (VILAS BOAS, 2006), o que enquadrado o presente estudo.

Os resultados para verificação de efeito genotóxico em 24 e 48 horas constatarem a ausência deste efeito, quando comparadas as três concentrações utilizadas BE I (500 mg), BE II (1.000 mg) e BE III (2.000 mg) e o grupo DMSO com o grupo controle negativo.

Porém, quando comparadas as três concentrações do óleo fixo da BE associadas com grupo DXR, somente com o grupo DXR, foi constatado um notável efeito antígeno-tóxico cerca de 52,08 a 67,36%, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre as doses BE I e BE II, e BE I e BE III em 24 horas, demonstrando efeito dose-resposta.

Para os resultados de 48 horas, a taxa de redução variou entre 76,78 a 87,89%, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre todas as doses administradas do óleo fixo da BE associadas com DXR, quando comparadas somente

com o grupo DXR, demonstrando efeito dose-resposta, de acordo com os protocolos executados no presente estudo.

O efeito antigenotóxico observado através das taxas de redução na frequência de micronúcleos em células de sangue periférico utilizando o óleo fixo da BE associado a DXR em 24 e 48 horas, corrobora com estudo realizado por Li et al. (2004) com 586 casos de câncer de próstata e 577 controles, os resultados indicaram uma associação inversa estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de selênio pré-diagnóstico e o risco de câncer de próstata avançado, concluindo que altos níveis de selênio no plasma foram associados com um risco reduzido para todos os tipos de câncer de próstata.

Assim, o óleo fixo da *Bertholletia excelsa*, mostrou não ser genotóxico, nas concentrações utilizadas neste estudo no sistema-teste *in vivo*, porém, apresentou efeito antigenotóxico utilizando o mesmo sistema-teste e concentrações.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

As conclusões sobre a obtenção do óleo fixo da *Bertholletia excelsa*, determinação da atividade antioxidante e avaliação dos efeitos genotóxico e antigenotóxico, estão descritas a seguir:

- Utilizando o método β -caroteno/ácido linoleico nas concentrações de 10.000 e 15.000 ppm, os resultados obtidos foram de 92 e 87%, demonstrando excelente atividade antioxidante.

- Para o método DPPH, nas concentrações utilizadas de 50.000, 70.000 e 100.000 ppm, o óleo fixo apresentou os resultados 14,53, 25,57 e 40,33% de captura do radical livre, sugerindo assim, que mais estudos com concentrações acima de 100.000 ppm devem ser realizados.

- Na quantificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa o presente estudo apresentou 37,13% (Ácido Linoleico), 36,92% (Ácido Oleico), 16,73% (Ácido Palmítico) e 9,22% (Ácido Esteárico).

- Para a análise do teste do micronúcleo em células de sangue periférico, a frequência de PCEMNs dos grupos tratados com as diferentes concentrações do óleo fixo da BE em 24 e 48 horas quando comparados com os grupos controle negativo e DMSO, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, constatando ausência de efeito genotóxico.

- Para a análise do efeito antigenotóxico, quando comparadas as diferentes concentrações do óleo fixo da BE + DXR, com o grupo controle positivo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, sendo as taxas de redução de 52,08 a 67,36%, além de efeito dose-resposta entre as doses BE I e BE II, e BE I e BE III em 24 horas. Nas análises das amostras de sangue periférico de 48 horas, as taxas de redução foram de 76,78 a 87,89%, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre todas as doses administradas do óleo fixo da BE + DXR, demonstrando efeito dose-resposta.

- Na análise de IDN, os resultados obtidos entre todos os grupos tratados, não foram observadas diferenças quanto proliferação celular, demonstrando ausência de efeito citotóxico.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. D. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.
- ADAMS, L. S.; SEERAM, N. P.; AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; SAND, D.; HEBER, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 980-985, 2006.
- ÁJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. 105, 982-988. 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. supl, p. 678-689, 2006.
- ALMASSY JÚNIOR, A. A.; LOPES, R. C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, p. 233, 2005.
- ALMEIDA, N.; XAVIER, J. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus novergicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. 5(2), 2005.
- ALMEIDA, J. M. D.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/Ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452. Abr. jun. 2006.
- ALONSO, J. R. **Fitomedicina: um curso para profissionais da área da saúde**. [s.l.]: Pharmabooks, 2008.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. Diálogos e ciência – **Revista da Rede Ensino FTC**, 5(12): 7-8, 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, Vol. 33, No. 10, 2202-2210. 2010.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. D.; SOUZA, R. B. D.; SANTOS, S. A. D.; ANDRADE, D. R. D. Oxygen free radicals and pulmonary disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Brasília, v. 2, 31 de janeiro de 2013.

APOSTOLIDES, Z.; BALENTINE, D. A.; HARBOWY, M. E.; HARA, Y.; WEISBURGER, J. H. Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 389, n. 2, p. 167-172, 1997.

ARAÚJO, A. P.; JORDY FILHO, S.; FONSECA, W. N. A vegetação da Amazônia brasileira. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, 1984, Belém. **Anais. Belém: EMBRAPA-CPATU**, p. 135 - 152, 1986.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2004.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.

ASHOKKUMAR, P.; SUDHANDIRAN, G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 590-597, 2008.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

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

AYRES, M. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos as folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, 33(1): 141-145, 2010.

BALBI, M. E.; PENTEADO, P. T. P.; CARDOSO, G.; SOBRAL, M. G.; SOUZA, V. R. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.): Chemical composition and its health benefits. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 2, 2014.

BALBINOT, S.; VELASQUEZ, P. G.; DÜSMAN, E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro–Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 632-638, 2013.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga S, Camargo MMA & Batistuzzo JAO. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 57-68. 2003.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R.; ANDRADE, M.; BATITUCCI, M. C. Citotoxicidade e danos induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on Line**, v. 10, no. 3, p. 140-145. 2012.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E. S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. 2012.

BONASSI, S. A.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 625–631; 2007.

BOYD, S. A.; SOMMERS, L. E.; NELSON, D. W. Copper (II) and iron (III) complexation by the carboxylate group of humic acid. **Soil Science Society of America Journal**, v. 45, n. 6, p. 1241-1242, 1981.

BRAGA, E. T. M. Diversidade morfológica e produção de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (Lecythidaceae) no sudeste do estado do Acre. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 23 a 28 de setembro de 2007, Caxambu – MG. 2007.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia. **Estudo de mercado de matéria-prima: corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bio-inseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica)**. Belém, p. 207, 2000.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.

BROOKS, J. D.; METTER E. J.; CHAN, D. W.; SOKOLL, L.J.; LANDIS, P.; NELSON, W.G.; MULLER, D.; ANDRES, R.; CARTER, H. B. Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. **The Journal of Urology**, v. 166, p. 2034 – 2038, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 - 189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131 - 134, 2005.

CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIETINEK, A.; BERGHE, D.V. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. **Planta Medica**, 62, 222–226. 1996.

CALVO, A.; XIAO, N.; KANG, J.; BEST, C. J.; LEIVA, I.; EMMERT-BUCK, M. R.; JORCYK, C.; GREEN, J. E. Alterations in gene expression. Profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. **Cancer Research**, v. 62, n. 5, p. 325 – 335, 2002.

CAMMERER, Z.; ELHAJOUJI, A.; KIRSCH-VOLDERS, M.; SUTER, W. Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 129-134, 2007.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 501-512, 2003.

CARLINI, E. A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16: 690-695. 2006.

CARVALHO, J. C. T. **Formulário Médico-farmacêutico de fitoterapia**. 1º ed. Alfenas: Ciência Brasilis, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18: 314-319. 2008.

CASTOR, L. R. G. **Propriedades químicas e farmacológica da apocinina, vanilina e ácido vanílico**. Tese de Doutorado. 2013, 137 f. Botucatu – SP. 2013.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi, ESALQ/USP, p. 84, 1972.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: CEJUP, p. 279, 1991.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the Comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 51-67, 2009.

CHAVES, M. H.; BARBOSA, A. S.; MOITA NETO, J. M.; AUED-PIMENTEL, S.; LAGO, J. H. G. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St Hill et Nauda. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 404-408, 2004.

CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4318-4322, 2004.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.

COOK, N. C.; SAMMAN, St. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, Toronto, v. 43, n. 6, p. 1-4, 2010.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 435-442, 1998.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. New York: **American Society of Plant Physiologists**, p. 1250-1318. 2000.

CUNHA, P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2003.

D'ARCHIVIO, M.; Filesi, C.; Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-61, 2007.

DA COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. **Biomonitoramento de mutagênese ambiental**. Projeto Genoma do Câncer, p. 24, 2000.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. D. M. P.; RUDGE, M. V. C. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3, p. 235-244, 2002.

DE ALMEIDA MELO, E.; MACIEL, M. I. S.; DE LIMA, V. L. A. G.; DO NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. Physis: **Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, 2014.

DE LIMA, A. A.; SUSSUCHI, E. M.; DE GIOVANI, W. F. Eletrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica Chemica Acta**. 80, 29-34. 2007.

DE SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

DE SOUZA FERREIRA, E.; DA SILVA SILVEIRA, C.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. **Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK).** 2006.

DELILBASI, C.; DEMIRALP, S. TURAN, B. Effects of selenium on the structure of the mandible in experimental diabetics. **Journal of Oral Science**, v. 44, n. 2, p. 85-90, 2002.

DESTY, D. H.; **Advances in Chromatography**. 1, 852. 1965.

DORMAN, H. D.; KOŞAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Evaluation of the antioxidant activity using the b-carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EDENHARDER, R.; GRUNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroxide in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, 540, 1 - 18. 2003.

ELLIOTT, J. F.; LIN, Y.; MIZEL, S. B.; BLEACKLEY, R. C.; HARNISH, D. G.; PAETKAU, V. Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. **Science**, 226, 1439-1 441. 1984.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [Internet]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestorcastanha-do-brasil> Abertura. Acessado em 02 de janeiro de 2017.

EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the *in vitro* micronucleus test: a personal view. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1, p. 5-10, 1997.

FAO, W. F. P. IFAD. 2012. **The state of food insecurity in the world**, p. 1-63, 2012.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, 285:35-44, 1993.

FERREIRA, S. H. (Org.). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 131, 1998.

FERREIRA, G. F.; REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, A. M.; CAMPOS, J. A. D. B.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SANTOS, R. A.; BASSI, C. L.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogynenitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantiapallida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.1A.p. 61-67, Jan./Mar. 2008.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, U. M. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. **Journal of Health Research**, v. 1, n. 3, p. 337-40, 2008.

FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R. A.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic and chemical constituents from *Amburama cearensis*. **Phytotherapy Research**, v.17, p.335-340, 2003.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos**. Food Ingredients Brasil. n. 30. 2014.

FRANKE, S. I. R.; PRÁ, D.; SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ in mouse blood cells *in vivo*. **Mutation Research**, v. 583, p. 75-84, 2005.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

GOMES, T.B.; BANDEIRA, F.P.S.F. Uso e diversidade de plantas em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Botânica Brasilica**, v.26, n.4, p. 796-809, 2012.

GONÇALVES, Any Elisa de Souza Schmidt. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutos e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina c**. Tese de Doutorado. 88 f. São Paulo. 2008.

GOUTMAN, J. D.; WAXWMBERG, M. D.; DONATE-OLIVER, F.; POMATE, P. E.; CALVO, D. J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABBA (A) and GABBA (C) receptors, **European Journal of Pharmacology**, v.14,p-79-87, 2003.

GRAWE, J. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 291, p. 69-83. 2005.

GUNSTONE, F. D. **Vegetable oils**. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 2005.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **The chemistry of free radicals and related 'reactive species'**. Free radicals in biology and medicine, v. 3, p. 1-7, 1999.

HALLIWELL, B. **Free radicals and other reactivities species in disease**. In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. p. 17. 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HAYASHI, M. S.; SUTOU, H.; SHIMADA, S.; SATO, Y. F. SASAKI AND A. WAKATA. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. **Mutation Research**. 223, 329-344. 1989.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I.-D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: Aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. A report from the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35, 234–252. 2000.

HEBER, D. **Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins**. Cancer Letters, v. 269, n. 2, p. 262-268, 2008.

HENNING, S. M.; NIU, Y.; LEE, N. H.; THAMES, G. D.; MINUTTI, R. R.; WANG, H.; GO, V. L.; HEBER, D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1558-1564, 2004.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamina C against oxidative stress-induced neurodegeneration, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(25):7514-7, 2004.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; LEGARRETA, I. G. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v. 81, n. 2, p. 410-417, 2009.

HOPIA, A.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 1, p. 139-144, 1999.

HUANG, L. H.; WANG, B. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58:4993-7. 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estudo nacional da despesa familiar: tabela de composição de alimentos**. 5. ed. Rio de Janeiro. 137 p. 1999.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

JENKINS, D. J.; KENDALL, C. W.; MARCHIE, A.; JOSSE, A. R.; NGUYEN, T. H.; FAULKNER, D.; LAPSELY, K.G.; BLUMBERG, J. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 138, n. 5, p. 908-13, 2008.

JIANG, C.; WANG, Z.; GANTHER, H.; LU, J. Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. **Cancer Research**, n. 61, p. 3062 – 3070, 2001.

JIANG, R.; JACOBS, D. R.; MAYER-DAVIS, E.; SZKLO, M.; HERRINGTON, D.; JENNY, N. S.; KRONMAL, R.; GRAHAM BARR, R. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 163, n. 3, p. 222–31, 2006.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, Shanghai, v. 2, n. 3, p. 196-209, 2010.

JUNG, K.; RESZKA, R. Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 49, n. 1, p. 87-105, 2001.

JÚNIOR, G. M. V.; JÚNIOR, O. F.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. **Potencial atividade antifúngica, anticolinesterásica e anti-HIV de taxifolina, isolada de *Casearia gossypiosperma***. Anais da Sociedade Brasileira de Química. 2008.

KAKKAR, S.; BAIS, S. **A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential**. ISRN Pharmacology. 9 pages. 2014.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KILANI, S.; BEN AMMAR, R.; BOUHLEL, I.; ABDELWAHED, A.; HAYDER, N.; BEM CHIBANI, J.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 20, 478 - 484. 2005.

KIM, K. W.; THOMAS, R. L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. 2006.

KIM, J.Y.; Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 30(6), 1052-1055, 2007.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D.; RAIVIO, K. O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. Laboratory investigation. **A Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 73, n. 1, p. 3, 1995.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K-H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food chemistry**, v. 98, n. 2, p. 381-387, 2006.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinc, oxidative stress and physical activity. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 155-166, 2000.

KUMAR, M. R.; AITHAL, K.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO, B. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicol In Vitro**. v.23, n.2, p.242-250, 2009.

LEAL, L. K. A. M.; PIERDONÁ, T. M.; GÓES, J. G. S.; FONSÊCA, K. S.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburama cearensis* A. C Smith. **Phytomedicine**, v.18, p. 230-233, 2011.

LEE, M. J.; CHOU, F. P.; TSENG, T. H.; HSIEH, M. H.; LIN, M. C.; WANG, C. J. Hibiscus Protocatechuic Acid or Esculetin Can Inhibit Oxidative LDL Induced by Either Copper Ion or Nitric Oxide Donor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(7):2130-2136. 2002.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LEE, S. B.; CHAN, K. H.; SELENAGE, D.; SOLONGO, A.; NHO, C. W. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 30, 1074. 2007.

LETELIER, M. E.; RODRIGUEZ, E.; WALLACE, A.; LORCA, M.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; ALDUNATE, J. *Trypanosoma cruzi*: a possible control of transfusion-induced Chagas' disease by phenolic antioxidants. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 4, p. 357-363, 1990.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYŻGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKOŃSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 237-240, 2007.

LI, H.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. L.; MORRIS, J. S.; WILLETT, W. C.; GAZIANO, J. M.; MA, J. A prospective study of plasma selenium levels and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 96, n. 9, p. 696 - 703, 2004.

LIMA J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Quantificação de tocoferóis em óleo de milho, soja, castanha-do-pará e castanha de caju por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. 8: 65-73. 1997.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVEA, C. M. C. P. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(4): 531-536, 2006.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2008. 186 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, A. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; ABRAHÃO, S. A.; DUARTE, S. M. S.; PAULA, F. B. A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e

torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 20-24, 2010.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; GUIMARAES, P. L.; BATISTA, L. R.; NELSON, D. L. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 89, 523-528. 2012.

LIN, Y. L.; LIN, J. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. **Molecular pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 465-472, 1997.

LIN, C. Y.; HUANG, C. S.; HUANG, C. Y.; YIN, M. C. Anticoagulatory, Antiinflammatory and Antioxidative Effects of Protocatechuic Acid in Diabetic Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57(15):6661-6667. 2009.

LING, J.; SÖLL, D. Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, p. 4028-4033, 2010.

LIPORACCI, H. S. N.; SIMÃO, D. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 529-540, 2013.

LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 732-737, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, p. 544, 2002.

LOSSO, J. N.; BANSODE, R. R.; TRAPPEY, A.; BAWADI, H. A.; TRUAX, R. *In vitro* anti-proliferative activities of ellagic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 11, p. 672-678, 2004.

LUCIO NETO, M. P. **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagência do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2, 4-diona em células eucariotas**. 120 p. 2011. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)—Universidade Federal do Piauí. 2011.

MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 2, n. 4, p. 509-514, 1980.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.

MACHADO, A. T. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório-RS-Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa***. 2013. Monografia (Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALCHER, E. T.; CARVALHO, J. C. T. The influence of seasonality on the anthocyanin concentrations in the açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) from the brazilian amazon. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 1, p. 224-32, 2011.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Evaluation of occupational genotoxic risk in a Brazilian hospital. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 485-488, 2000.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 230S-242S, 2005.

MANN, J. Cardiovascular diseases. In: Mann J, TRUSWELL A. S. **Essentials of human nutrition** [Internet]. 2th ed. New York: Oxford University Press; 2002. Disponível em: <http://www.doadmc.pk/e-books/nutrition/Essentials-of-Human-Nutrition.pdf>. Acessado em 02 de novembro de 2016.

MANFIO, D.; BEIRAO, L. H.; DAMIAN, C.; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) brown skin characterization – a waste product generated from shelled dry nut factories of Amazon region. **Agricultural Science Research Journal**. J 2:253–60, 2012a.

MANFIO, D.; RODRIGUES, N. F.; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) selenium distribution and physical chemical characteristics of shell, brown skin and edible from two Amazon regions. **Asian Journal of Agriculture and Development**. 2: 287–93, 2012b.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZAVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3ª ed. São Paulo: GUANABARA KOOGAN. 2007.

MATERSKA, M. Quercetin and its derivatives: Chemical Structure and Bioactivity. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, Vol. 58, Nº. 4, pp.407-413, 2008.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife 26(3):639-644, jul-set. 2006.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; PELLEZ, D. C.; SOUZA, N. C.; RAMOS, L. J. **Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari - Rondônia, Brazil**. X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), São Pedro – SP, 2011.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, n. 1, p. 329-340, 2004.

MILLER, R.C. **The Micronucleus Test as an *in vivo* Cytogenetic Method**. Environmental Health Perspectives. Institute for Medical Research Camden, New Jersey, 1973.

MIN, K.; ELEBER, S. E. Flavonoid affects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p. 94-104. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2ed. 2009.

MIYAKE, T. **Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais**.

Disponível em: <http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2016.

MONTEIRO, M. V.; MELO LEITE, A. K.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; NUNES, D. C. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidants effects of the essential oil of *Lippia sidoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p.378-382, 2007.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de oleos e gorduras vegetais na industria de alimentos**. Livraria Varela. São Paulo, 1998.

MORUCCI, F.; LOPEZ, P.; MIÑO, J.; FERRARO, G.; GORZALCZNANY, S. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.401-406, 2012.

MULLER, C. H.; FIGUEIREO, F. J. C.; CARVALHO, J. E. U. **Características comparativas entre frutos e sementes de Castanha-do-Brasil**. Belém: EMBRAPA-CPATU, p. 21, 1995.

MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAQ, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer Letter**, 269, 315-325, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NATURAL SOLUTION. Disponível em: <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>. Acessado em 01 de janeiro de 2017.

NEVES, L. C.; ALENCAR S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2(15), 2008.

NISHIDA, H.; OMORI, M.; FUKUTOMI, Y.; NINOMIYA, M.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; MORIWAKI, H.; MUTO, Y. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. Jpn. **Journal of Cancer Research**, v. 85, p. 221-225, 1994.

NORPPA, H.; FALCK, G. C.-M. What do human micronuclei contain?. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 221-233, 2003.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 5-8, 2003.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 718-723, 2008.

OKEZIE, I. A. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212. 1998.

OLSZEWER, Efrain; OLSZEWER, M. **Combate as leis do envelhecimento**. Osasco, SP: Novo Século, Edit, 2005.

OLSZEWER, E. **Radicais livres**. Olszewer E. Clínica ortomolecular. 2a ed. São Paulo: Roca, p. 3-8, 2008.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 3122-3128. 2002.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha do Brasil – da floresta tropical ao consumidor (Brazil nuts – from the rainforest to the consumers)**. Editograf: Florianópolis, p. 176, 2006.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Selenium and aflatoxins in Brazil nuts**. INTECH Open Access Publisher, 2011.

PAN, M. H.; GHAI, G.; HO, C. T. Food bioactives, apoptosis, and cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 1, p. 43-52, 2008.

PASTORE, F. J.; ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C. Plantas da Amazônia para a produção cosmética: uma abordagem química- 60 espécies do extrativismo florestal não madeireiro da Amazônia [Internet]. Brasília. 2007. Disponível em: http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2202/Technical/2.2%20Plantas%20da%20amaz%C3%B4nia%20para%20produ%C3%A7%C3%A3o%20cosm%C3%A9tica.pdf. Acessado em 17 de dezembro de 2016.

PATRICK, L. Selenium biochemistry and cancer; a review of the literature. **Alternative Medicine Review**, v.9, p. 239 – 258, 2004.

PERCÁRIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. Campinas. **Revista de Nutrição**, 23(2):259-267. 2010.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**, 478–494, 31, 2010.

PIANTINO, C. R. **Extração de compostos fenolicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico**. [s.n.]. 2008.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; & LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 1998.

PRESTON, R. J.; DEAN, B. J.; GALLOWAY, S.; HOLDEN, H.; MCFEE, A. F.; SHELBY, M. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 157-165, 1987.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTIONO, M. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, 180, 79–95. 2002.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; NETO, R. M. (Ed.). **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Sociedade Brasileira de Genética. Revista Brasileira de Genética, 1991.

RAFFERTY, T. S.; BECKETT, G. J.; WALKER, C.; BISSET, Y. C.; MCKENZIE, R. C. Selenium protects primary human keratinocytes from apoptosis induced by exposure to ultraviolet radiation. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 294-300, 2003.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genetics and Molecular Research**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, p.57-69, 2001.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ed. ULBRA, 2003.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 1, p.123-127, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(1): 53-60, 2007.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 96, n. 2, p. 29–35, 2006.

ROS, E. Nuts and novel biomarkers os cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 89, p. 1649-1656, 2009.

RUFINO, M. S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; FILHO, J. M.; MOREIRA, A. V. B. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no Sistema β -caroteno/ÁcidoLinoléico**. ISSN 1679-6532. Fortaleza, n.126, p. 2. Junho. 2007a.

RUFINO, M. S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. ISSN 1679-6532. Fortaleza, n.127, p. 2. Junho. 2007b.

SALGUEIRO, J. B.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, M. B.; IZQUIERDO, I.; MEDINA. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.58, p.887-891, 1997.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; LEMOS, B. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of cofee (*Coffea arabica*). **QuímicaNova**, São Paulo, v.30, n.3, p.604-610, maio/jun. 2007.

SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. D. R. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-6, 2010.

SATO, S-I.; TAKETOMI, M.; NAKAJIMA, M.; KITAZAWA, M.; SHIMADA, H.; ITOH, S.; HAYASHI, M. Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in periphera blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS· MMS. **Mutation Research/DNAging**, v. 338, n. 1-6, p. 51-57, 1995.

SATUÉ-GARCIA, M. T.; HEINONEN, I. M.; FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 3362–3367. 1997.

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioac

tive compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 145-152, 2009.

SCHMITZ, W.; SAITO, A. Y.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, H. O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SENDRA, J. M.; SENTANDREU, E.; NAVARRO, J. L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 5512. 2007.

SEO, Y. R.; KELLEY, M. R.; SMITH, M. L. Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 99, 14548 – 14553, 2002.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. **The American Oil Chemists Society**, 1997.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC press, 2003.

SHAHIDI, F.; HO, C-T. (Ed.). Phenolic compounds in foods and natural health products. **American Chemical Society**, 2005.

SHAHIDI, F.; HO, C-T. (Ed.). Antioxidant measurement and applications. **American Chemical Society**, 2007.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015-3025, 2006.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. 22, 1999.

SILVA, B. S.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidante characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**. 90, 157-167. 2005.

SILVA, W. S. **Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira**. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Ceará. 2008.

SILVA, R.F., ASCHELI, J.L.R., SOUZA, J.M.L. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. **Ciência e Agrotecnologia**. 34(2):445-50. 2010.

SILVA, F. C.; BARROS, M. A. B; VIANA, R. R; ROMÃO, N. F.; OLIVEIRA, M. S.; MENEGUETTI, D. U. O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, 2(1):13-22, 2011.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p. 2007.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, 2002.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16: 447-454. 2006.

SOUSA, J. P.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

SWIATEK, L. Phenolics acids of underground parts of *Scrophularia nodosa* L. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 25, p.461-464, 1973.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **Núcleo de estudos e pesquisa em alimentação**. Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO [Internet]. 2ªed. Campinas; 2006. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/Contar/taco_versao2.pdf. Acessado em 15 de outubro de 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Photosynthesis: the light reactions. **Plant Physiology**, v. 4, 2006.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. D. Validação de metodologia para determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189-1194, 2009.

TANAKA T, TANAKA T, TANAKA M. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**. 3(1):27-33. 2011.

TAVARES, D. C.; CECCHI, A. O.; ANTUNES, L. M.; TAKAHASHI, C. S. Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 153-161, 1998.

THOMSON, C. D.; CHISHOLM, A.; MCLACHLAN, S. K.; CAMPBELL, J. M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258628>. 87 (2): 379-84. Acessado em 09 de novembro de 2016.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; SASAKI, Y. F.; ROJAS, E.; RYU, J-C.; SASAK, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TROPICOS [Internet]. Disponível em <https://http://www.tropicos.org/Name/17900013>. Acessado em 20 de dezembro de 2016.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464 – 471, 2008.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

VENKATESH, P.; SHANTALA, B.; JAGETIA, G. C.; RAO, K.; BALIGA, M. S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: A Micronucleus Study. **Integrative Cancer Therapies**, v.6, p.42-53, 2007.

VENKATESWARAN, V.; FLESHNER, N. E.; KLOTZ, L. H. Synergistic effect of vitamin E and selenium in human prostate cancer cell lines. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 7, n. 7, p. 54 – 56, 2004.

VILAS BOAS, O. M. G. C. **Farmacologia**. Alfenas: 2006 [Internet]. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/53304325/1/Historia-da-Farmacologia>. Acessado em 11 de outubro de 2016.

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. D. **Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental**. Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, JAP Genética Toxicológica. Porto Alegre: Editora Alcance, p. 145-163, 2003.

VOGEL, H.; GONZÁLEZ, M.; FAINI, F.; RAZMILIC, I.; RODRÍGUEZ, J.; SAN MARTÍN, J.; URBINA, F. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-species known as bailahuen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 97-100, 2005.

ZHANG, Y.; YANG, L.; ZU, Y.; CHEN, X.; WANG, F.; LIU, F. Oxidative stability of sun flower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 656-662, 2010.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57 – 85, 1990.

WEISS, R. B.; GREENE R. F.; KNIGHT, R. D.; COLLINS, J. M.; PELOSI, J. J.; SULKES, A. C. G. A. Phase I and clinical pharmacology study of intravenous flavone acetic acid. **Cancer Research** ;48:5878-5882, 1988.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. **Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective**. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 987p. 2007.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, SM.; KHALIFA, T. I. Antioxidant, free radical scavenging and antiinflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. **Planta Medica**, 68, 957–960. 2002.

YAMAMOTO, KOICHI I.; YASUMOTO, KIKUCHI. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 71, n. 1, p. 127-131, 1980.

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

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.