

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS OBTIDOS
A PARTIR DE RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS**

RODRIGO OTÁVIO SILVA DE SOUZA

**MANAUS
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

RODRIGO OTÁVIO SILVA DE SOUZA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS OBTIDOS A
PARTIR DE RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

**MANAUS
2014**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE
RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS**

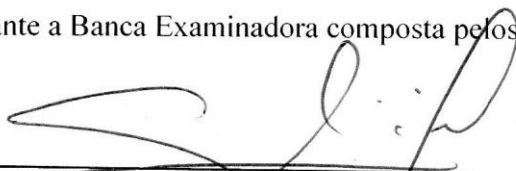
RODRIGO OTÁVIO SILVA DE SOUZA

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, Linha de pesquisa: Avaliação da eficácia e segurança de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos. Aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

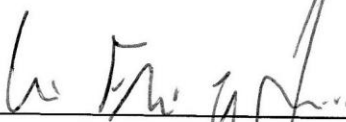


Prof. Dra. Marne Vasconcellos
Coordenadora – UFAM

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos professores



Prof. Dr. Emerson Silva Lima – Presidente
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFAM



Prof. Dr. Valdir Florêncio Velga Junior - Membro
Instituto de Ciências Exatas - ICE - UFAM



Prof. Dra. Marize Campos Valadares – Membro
Faculdade de Farmácia – UFG

Manaus, 14 de Abril de 2014

Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Souza, Rodrigo Otávio Silva de

S729p

Potencial antioxidante extratos obtidos a partir de resíduos de frutos amazônicos / Garce Rente dos Santos. - 2014.

93f. il. pt./br.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

1. Antioxidantes 2. Composição química 3. Frutas composição I. Lima, Emerson Silva (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(2007) 581.19(811)(043.3)(043.3)

À Deus, ao meu pai, à minha mãe,
irmãs, ao meu filho e meus amigos.
Pela força inestimável que vocês
deram para a realização deste
trabalho

AGRADECIMENTO

À Deus pela força inestimável;

Ao meu orientador pelo acompanhamento e apoio constante;

Aos meus familiares e amigos pelo apoio;

Aos meus colegas de instituição que auxiliaram na realização deste trabalho

A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

Aos meus colegas de turma pela oportunidade caminharmos juntos dividindo alegres e tristeza. Vocês deixaram saudades!

AGRADEÇO

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos principais compostos fenólicos	6
Figura 2 - Estrutura química do α -tocoferol (vitamina E)	7
Figura 3 - Estrutura química do α -caroteno	8
Figura 4 - Principais antioxidantes sintéticos utilizados pelas indústrias	9
Figura 5 - Reação do ácido gálico com molibdênio	19
Figura 6 - Mecanismo de reação do método de capacidade antioxidante pelo DPPH	20
Figura 7- Mecanismo reacional do método de inibição do ânion radical superóxido	22
Figura 8 - Estrutura química do 4-hidroxinonenal	25
Figura 9 - Reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico	26
Figura 10 - Mecanismo de interconversão da glutathiona	28
Figura 11 – Delineamento experimental ou plano de execução do trabalho	31
Figura 12 - Curva da inibição dos radicais DPPH pelos extratos secos dos resíduos da açai (A), tucumã (B), castanha (C) e padrão ácido gálico (D).	42
Figura 13 .Curva da inibição dos radicais ABTS pelos extratos secos dos resíduos da açai (A), tucumã (B), castanha (C) e padrão ácido gálico (D).	43
Figura 14. Curva da inibição do ânion superóxido pelos extratos secos dos resíduos da açai (A), tucumã (B), castanha (C) e padrão ácido gálico (D).	44
Figura 15. Ensaio de viabilidade de celular em linhagem e fibroblastos MRC-5 dos extratos de resíduos do açai (A), Tucumã (B) e Castanha (C).	45
Figura 16. Ensaio da atividade antioxidante celular em linhagem de fibroblastos MRC-5 dos extratos de resíduos do açai (A), Tucumã (B) e Castanha (C) em comparação com a quercetina.	47
Figura 17. Quantificação de TBARs no plasma de camundongos intoxicados com CCL ₄ e suplementados com o extrato dos resíduos de açai. Nível de significância de 95% (P < 0,05)**	49

- Figura 18. Marcadores antioxidantes plasmático de camundongos suplementados com o extrato seco dos resíduos do açaí nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzido ao estresse oxidativo por CCl₄. SOD: Superóxido dismutase; COT: Capacidade oxidante total; SH: Tióis totais; CAT: Capacidade antioxidante total. 52
- Figura 19. Marcadores bioquímico hepáticos de camundongos suplementados com extrato seco dos resíduos do açaí nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzido ao estresse oxidativo por CCl₄. TGP: Transaminase glutâmica pirúvica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 53
- Figura 20. Quantificação de TBARs no plasma de camundongos intoxicados por CCl₄ e suplementados com o extrato dos resíduos de tucumã. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 54
- Figura 21. Marcadores antioxidantes plasmático de camundongos suplementados com o extrato seco dos resíduos do tucumã nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. SOD: Superóxido dismutase; COT: Capacidade oxidante total; SH: Tióis totais; CAT: Capacidade antioxidante total. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 56
- Figura 22. Marcadores bioquímico hepáticos de camundongos suplementados com extrato seco dos resíduos do tucumã nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse por CCl₄. TGP: Transaminase glutâmica pirúvica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 57
- Figura 23. Quantificação de TBARs no plasma de camundongos intoxicados por CCl₄ e suplementados com o extrato dos resíduos da castanha do Brasil. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 58
- Figura 24. Marcadores antioxidantes plasmático de camundongos suplementados com o extrato seco dos resíduos da castanha do Brasil nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. SOD: Superóxido dismutase; COT: Capacidade oxidante total; SH: Tióis totais; CAT: Capacidade antioxidante total. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 60
- Figura 25. Marcadores bioquímico hepáticos de camundongos suplementados com extrato seco dos resíduos da castanha do Brasil nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. TGP: Transaminase glutâmica pirúvica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética. Nível de significância de 95% (P < 0,05)** 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela referencial das propriedades biológicas do açai	31
Tabela 2 - Tabela referencial das propriedades biológicas do Tucumã	33
Tabela 3 - Teores de fenóis e flavonóides e capacidade antioxidante dos resíduos do açai, tucumã, castanha do Brasil.	48
Tabela 4. Teores de fenóis e flavonóides totais dos extratos de resíduos de açai, tucumã e castanha do Brasil.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

α – Alfa

ApoE – Apolipoproteína E

Anti-PLA – Antifosfolipase A

ABTS - 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)

BHA – Hidroxibutilanisol

BHT – Hidrobutiltolueno

β - Beta

COX – ciclooxigenase

CI₅₀ – Concentração inibitória 50%

CCl₄ – Tetracloroeto de carbono

CO₂ – Gás carbônico

δ – Delta

DCFH-DA – diacetato de diclorofluoresceína

DFC – Diclofluoresceína

DPPH - 1,1- Difenil-2-picril-hidrazil

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Eq. Trolox – Equivalente trolox

γ – Gama

GSH – Glutaciona reduzida

GSSH – Glutaciona oxidada

GPx – Glutaciona Oxidada

GR – Glutaciona redutase

g – gramas

Hb - Hemoglobina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HNE – Hidroxinonenal

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

LPS – Lipopolissarídeo

MDA – Malondialdeído

M.M – Massa molecular

Mn - Magnésio

MRC -5 – Linhagem de fibroblasto fetal humano

Mol – mol/L

NaCl – Cloreto de sódio

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo

NBT - Azul de nitrotetrazólio

NO – óxido nítrico

NF-κβ – Fator nuclear kappa beta

O₂ – Oxigênio

O₂^{•-} - Ânion superóxido

PBS – Solução de tampão fosfato

PG – Propileno glicol

PMS - Fenazina metassulfato

PHGSH-Px - Fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase

pH – Potencial hidrogeniônico

RAW – Linhagem leucêmicas macrófagos monocíticas de ratos

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

Se - Selênio

TBAR – Radicais reativos ao ácido tiobarbitúrico

TGO – Transaminase glutâmica oxilacética

TGP - Transaminase glutâmica pirúvica

TBA – Ácido Tiobarbitúrio

TBHQ - Butilhidroquinona

TEAC – Capacidade antioxidante equivalente trolox

TRIS-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico

TNF- α – Fator de necrose tumoral - alfa

UV – Ultravioleta

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Resíduos como fonte alternativa de antioxidantes	3
2.2 Antioxidantes Naturais e sintéticos	4
2.3 Frutos amazônicos como fonte de antioxidantes.....	11
2.4 Ensaio para avaliação da atividade antioxidante	18
2.5 Marcadores bioquímicos do dano oxidativo.....	25
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Obtenção dos resíduos dos Frutos	31
4.1.2 Preparação dos extratos	31
4.2 Delineamento Experimental.....	32
4.3 Dosagem de Fenólicos totais.....	32
4.4 Dosagem de Flavonóides Totais.....	33
4.5 Ensaio de varredura do radical DPPH	33
4.6 Ensaio de varredura do radical ABTS.....	34
4.7 Ensaio de varredura do radical anion radical Superóxido	35
4.8 Teste de viabilidade celular	35
4.9 Teste de Atividade antioxidante em célula	36
4.10 Ensaio de atividade antioxidante in vivo	37
4.11 Dosagens de Parâmetros bioquímicos.....	38
4.12 Capacidade oxidante total.....	38
4.13 Quantificação de tióis totais	39

4.14	Quantificação de TBARs.....	39
4.15	Ensaio da atividade do superóxido dismutase.....	40
4.16	Capacidade antioxidante total	40
4.19.	Análise estatística	41
5.0	RESULTADOS	42
6.0	DISCUSSÃO	62
7.0	CONCLUSÃO.....	73
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMO

Os antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos com a capacidade de inibir a ação dos radicais livres prevenindo o desenvolvimento de doenças de origem metabólica. Nos últimos anos, estudos na área de antioxidantes têm o seu foco voltado a esclarecer a aplicação destes em modelos de doenças humanas ou animais. Os frutos amazônicos são conhecidos pelo seu alto teor de compostos antioxidantes e os resíduos que são descartados no beneficiamento destes frutos podem ser utilizados para como matérias-primas pelas indústrias de alimentos e cosméticos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de resíduos de frutos amazônicos consumidos pela população no Amazonas. Resíduos de açaí (*Euterpe Oleracea*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) foram selecionados e, a partir destes, obtidos os extratos com várias proporções de solvente etanol:água. Ensaio antioxidante *in vitro* como atividade varredora de radicais livres DPPH[•], ABTS^{•-}, O₂^{•-} e a quantificação de fenóis totais, bem como teste antioxidante em células MRC-5 foram realizados para caracterizar a capacidade antioxidante dos extratos. Após isso, testes *in vivo*, utilizando camundongos, foram realizados mediante a indução de estresse oxidativo por dano hepático causado por CCl₄. Nos animais foram avaliados parâmetros bioquímicos de lesão hepática e marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante. Os resultados obtidos mostraram que os extratos dos resíduos de açaí (37,25 ± 1,87%) e tucumã (20,99 ± 0,81%) são ricos em composto fenólicos. Entretanto, a castanha apresentou um teor de somente 4,44±0,22% de fenólicos. Observou-se que o açaí e tucumã apresentaram uma atividade varredora de radicais DPPH[•] (9,56±0,46 e 21,77±1,46 µg/mL) e ABTS^{•-} (17,88±0,49 e 37,25±0,52 µg/mL) Mas, foram necessário concentração de CI₅₀ maiores que 50 µg/mL para inibir o ânion radical O^{•-}. As concentrações de 100 µg/mL foram citotóxicas para células, porém a castanha, na mesma concentração, não afetou a viabilidade celular. O tratamento do dano hepático em camundongos, com os extratos, foi significativo (p < 0,05) diminuindo o estresse oxidativo induzido pelo CCL₄. O perfil dos marcadores antioxidante foi melhorado nos grupos tratados e capacidade antioxidante foi elevada em relação ao grupo basal. Apesar disso, foi observado que a dose de 400 mg/mL teve um efeito pro-oxidante. Todos os extratos apresentaram uma atividade hepatoprotetora reduzindo a concentração plasmática de transaminases. O extrato da castanha foi a mais efetiva em relação a esta atividade. Os extratos secos derivados de resíduos destes frutos mostraram potencial antioxidante *in vitro e in vivo*, bem como atividade hepatoprotetora. Portanto, estes resultados segurem que estes extratos possuem compostos que podem ser empregados em indústrias locais de cosméticos ou ser utilizados como nutracêuticos em indústrias alimentícias.

Palavras chaves: Antioxidante, resíduos, estresse oxidativo, biomarcadores

ABSTRACT

Antioxidants are natural or synthetic compounds with the ability to inhibit the action of free radicals providing protection against the development of diseases metabolic origin. In last years, studies on antioxidants area have their focus to clarify the application of these models to human or animal diseases. Amazonian fruits are known for their high content of antioxidant compounds and residues that are discarded in the processing of these fruits can be used as raw materials for the food and cosmetics industries. In this context, the aim of this study was to determine the antioxidant potential of extracts obtained from residues of Amazonian fruits consumed by the population in the Amazon. Acai, Brazil nut and tucumã residues were selected and of these extracts, with various proportions of ethanol:water, were obtained dried extract. Antioxidant activity *in vitro* as free radical DPPH[•], ABTS[•] O₂[•] scavengers and quantification of totals phenolics and flavonóides, as well as antioxidant testing in MRC -5 cells was performed to characterize the antioxidant capacity of the extract. After that, *in vivo* tests using mice have been performed by inducing CCl₄ – induced liver damage. The biochemical parameters of liver injury in animals and biochemical markers of oxidative stress and antioxidant capacity were evaluated. The results showed that extracts of acai residues (37,25 ± 1.87 %) and tucumã (20.99 ± 0.81 %) are rich in phenolic compounds. However, Brazil nut showed a content only 4,44 ± 0.22 % of phenolic . It have been observed which acai tucumã and showed a scavenger activity in DPPH[•] (9,56 ± 0.46 and 21,77 ± 1.46 mg/mL) and in ABTS[•] (17,88 ± 0.49 and 37,25 ± 0.52 mg/mL). However, were required greater concentration IC₅₀ 50 mg / mL to inhibit anion radical O₂[•]. The concentrations of 100 µg/mL were cytotoxic to cells. Despite this, the Brazil nut at the same concentration was not toxic, allowing cellular viability. Treatment of liver damage in mice with the extracts was significant (p < 0.05) decreasing oxidative stress induced by CCl₄. The profile of antioxidant markers was improved in the treated groups and antioxidant capacity was increased in concerning baseline group. However, it was observed that a dose of 400 mg / mL had a pro-oxidant effect. All extracts showed a hepatoprotective activity reducing the plasma concentration of transaminase. The Brazil nut extract was more effective regarding this activity. The dried extracts derived of these fruits waste showed antioxidant potential *in vitro* and *in vivo* as well as hepatoprotective activity. Therefore, this results suggest which these extracts have compounds which can be employed by local industries, cosmetic or can be used as nutraceutical in the food industry.

Key words: Antioxidants, residues, oxidative stress, biomarkers

1. INTRODUÇÃO

A atual tendência de consumo de alimentos não processados tem sido motivada pela conscientização dos efeitos benéficos à saúde humana da ingestão frequente de alimentos naturais. Isto aumentou a demanda por frutas e vegetais e, conseqüentemente, elevou a quantidade de resíduos orgânicos descartados no meio ambiente. Diante deste cenário, buscam-se alternativas sustentáveis para controlar ou atenuar os impactos gerados por estes resíduos no meio ambiente.

Um das alternativas seria explorar o seu potencial econômico, tornando-os produtos aproveitáveis e desejáveis para indústria. Como exemplo de indústria que poderiam aproveitar os resíduos pode-se citar as alimentícia humana e animal, cosmética e farmacêutica.

Vários pesquisadores têm voltado os seus esforços para estudar propriedades químicas e nutricionais dos resíduos de frutos, encontrando quantidades notáveis de conteúdo energético, proteico e antioxidante contribuindo de forma significativa para a nutrição de ruminantes, por exemplo (NETO *et al.*, 2000). Resíduos de alguns frutos como uva, pêsego e oleaginosas apresentam uma atividade antioxidante semelhante ou superior à sua polpa. Então, realizaram-se muitos trabalhos de caracterização do potencial antioxidante e quantificação de compostos responsáveis por esta atividade.

Com descoberta destes compostos, torna-se possível a sua aplicação em produtos alimentícios como barras de cereais, ração para animais bem como a sua inclusão como matéria-prima na indústria de cosméticos (CATENEO *et al.*, 2008).

Na Amazônia, esta iniciativa vem sendo adotada por alguns pesquisadores com o intuito de tornar os resíduos dos frutos amazônicos aproveitáveis para indústria local. Os primeiros trabalhos nesta área tiveram como objetivo a utilização de resíduos de

frutos oleaginosos como o tucumã com a finalidade de utilizá-lo para fabricação de biocombustíveis. Esta motivação deve-se que as oleaginosas amazônicas tem um ótimo rendimento na extração, mesmo aplicando método rústicos como a prensagem (NETO *et al.*, 2000).

A partir desta iniciativa, teve-se a ideia de estudar o potencial nutricional e antioxidante destes resíduos utilizando como base o conhecimento que os frutos amazônicos são grande fontes de compostos fenólicos com elevado potencial antioxidante.

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial antioxidante de resíduos de frutos amazônicos com o intuito de agregar valor comercial. Isto poderá ajudar a conscientizar a população da importância sobre o aproveitamento destes resíduos agregando uma iniciativa ambiental e, ao mesmo tempo, torná-los uma alternativa de matéria-prima para indústrias alimentícias, cosmética e farmacêutica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos como fonte alternativa de antioxidantes

Resíduos são resultados de processos de diversas atividades da comunidade, sendo de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e ainda da varrição pública e apresentam-se nos estados sólido, gasoso e líquido (OLINTO *et al.*, 2012). Os resíduos sólidos se diferenciam do lixo porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que deve apenas ser descartado. Os resíduos possuem valor econômico agregado, por possibilitarem a utilizar todo potencial do fruto no próprio processo produtivo (DEMAJORIVIC, 1995; ASCARI *et al.*, 2012).

Os resíduos têm sido o motivo preocupação para a indústria, pois quando não são conduzidos para a alimentação animal ou utilizados como adubos, são descartados, poluindo o meio ambiente (BALASTRO *et al.*, 2011). Portanto, busca-se o aproveitamento biotecnológico dos resíduos por eles conterem muitas substâncias de alto valor biológico, como compostos antioxidantes, convertendo – os em produtos com valor econômico agregado (SOUSA E CORREA, 2012).

Muitos estudos foram realizados em torno da aplicação biotecnológica de resíduos utilizando os compostos antioxidantes destes subprodutos para formulação de produtos alimentícios como farinha e barras cereais (BALASTRO *et al.*, 2011). Babbar *et al.* (2011) avaliaram capacidade antioxidante de fenólicos extraídos de resíduos de frutos de importância comercial na Índia e observaram elevado poder antioxidante podem utilizá-los como nutracêuticos. Aplicação de tecnologias adequadas de extração pode ser um dos fatores cruciais para o aproveitamento de resíduos que não eram visto como matéria-prima pelas indústrias. Algo verificado por Kiassos *et al.* (2012), onde

utilizaram técnicas de extração para extrair compostos fenólicos em resíduos da cebola, com base na caracterização destes compostos, extraídos destes resíduos, propuseram a sua utilização como matéria – prima para indústria alimentícia. Portanto, a utilização dos resíduos como fonte alternativa de compostos antioxidantes é um meio de agregar valor comercial e, conseqüentemente, dar um destino final para os mesmo evitando que eles sejam descartados na natureza (KHIARI *et al.*, 2009).

2.2 Antioxidantes Naturais e sintéticos

Nos últimos anos, estudos na área de estresse oxidativo tiveram o seu foco voltado a esclarecer a importância dos radicais livres no processo patológico de síndromes como câncer, aterosclerose, inflamação e diabetes (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Inúmeras evidências levam a crer que estas espécies químicas possuem um papel fundamental no desenvolvimento destas doenças (SOUZA *et al.*, 2010). Os radicais livres podem de origem endógena, nos processos metabólicos, mais especificamente na respiração celular (CERUTTI, 1994; BIANCHI E ANTUNES, 1999). As mais importantes reações de radicais livres em meio biológico envolvem o oxigênio molecular e seus derivados, bem como metais de transição (DE ZWART *et al.*, 1999). A produção contínua de radicais livres ativa um mecanismo chamado de defesa antioxidante, que limita a ação destes radicais sobre as biomoléculas (SIES, 1993; WISEMAN *et al.*, 1995). Neste mecanismo envolvem-se compostos antioxidantes que vão desde enzimas até pequenas moléculas obtidas na dieta (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os antioxidantes podem ter origem natural ou sintética, sendo introduzidos em vários tipos de alimentos e bebidas com a finalidade de suplementação, bem como

manutenção de algumas características organolépticas de alimentos (WEIJL *et al.*, 1997; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Dentre os antioxidantes naturais, se encontram três classes de compostos com maior potencial antioxidante e são amplamente distribuídos na natureza: os compostos fenólicos, carotenóides e tocoferóis (RICE-EVANS, 1996; LIU, 2004).

Os compostos fenólicos assumem um papel de destaque, uma vez que estes compostos exercem várias funções biológicas e despertam interesse por suas diversas propriedades de interesse farmacológico (ANGELO & JORGE, 2007). Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário e exercem funções fisiológicas essenciais (TSIMIDOU *et al.*, 1992; SOARES, 2002). Esta classe é importante pelas suas propriedades antioxidantes, antiinflamatória, antimicrobiana e os fenólicos de maior importância são flavonóides, antocianinas, taninos (MIDDLETON *et al.*, 2000; ESCRICHI *et al.*, 2014).

Os Flavonóides são polifenóis biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e da via do acetato. A estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo flavano e contém de quinze átomos de carbono condensados em três anéis (C6-C3-C6) (DI CARLO *et al.*, 1999) (Figura 1). Plantas medicinais e condimentares que contêm flavonóides são usadas há milhares de anos na medicina popular (SOOBRAATTEE *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2008). No entanto, ainda são pouco utilizados na terapia convencional, embora possuam inúmeras propriedades farmacológicas e sejam eficazes na prevenção de doenças degenerativas originadas do estresse oxidativo (MIDDLETON *et al.*, 2000; LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006).

Os taninos são fenólicos hidrossolúveis de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência e podem ser utilizados para curtimento de couro (RIBÉREAU-GAYON, 1974; COVINGTON, 1997). Esta classe de fenólicos é

conhecida por contém grupos hidroxil que permite a formação de ligações estáveis com proteínas, formando complexos (ANDREO & JORGE, 2006).

Os taninos classificam-se em dois grupos, baseados em sua constituição estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (DA SILVA, 1999; SANCHES *et al.*, 2005). Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, esterificado com açúcares (HAGERMAN *et al.*, 1965; SANTOS *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 2005). Os condensados são constituídos por oligômeros de taninos, sendo os elagitaninos o principal representante deste grupo.

As aplicações biológicas dos taninos estão relacionadas com suas propriedades adstringentes, efeitos antidiarréico e antiséptico (KOLECKAR *et al.*, 2008). A capacidade de precipitar proteínas destes compostos confere efeito antifúngico e no processo de cicatrização de feridas e queimaduras podem auxiliar na formação de uma camada protetora sobre tecidos epiteliais lesionados (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

As antocianinas são pigmentos vegetais responsáveis pelas cores laranja, azul, roxa e variadas tonalidades de vermelho encontrada em flores, frutos, folhas, caules e tubérculos (JORDHEIM *et al.*, 2007). São compostos solúveis em água e sensíveis às altas temperaturas e são caracterizadas pelo núcleo flavílico que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio (LOPEZ *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou, uma vez que têm demonstrado que os mesmo possuem elevada capacidade antioxidante e fotoprotetora (KÄHKÖNEN & HEINONEN, 2003; LOPES *et al.*, 2007).

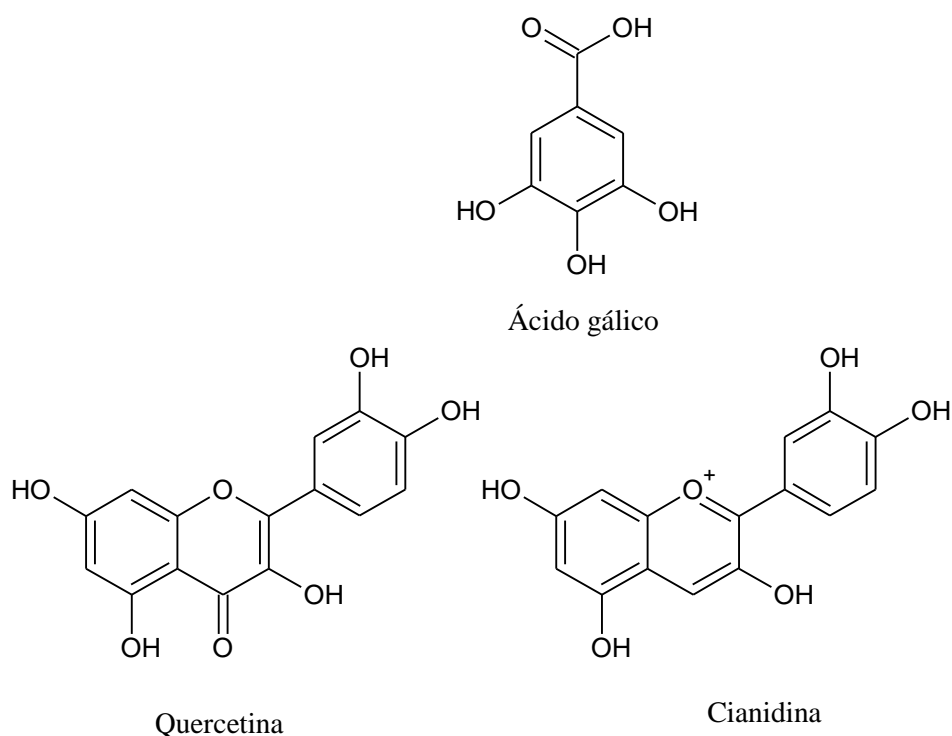


Figura 1. Estrutura química dos principais compostos fenólicos

Os tocoferóis são encontrados em frutos oleaginosos. As principais fontes são os óleos vegetais (PACKER *et al.*, 2001). O termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar os diferentes tocoferóis, nomeados em α , β , γ e δ (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

A estrutura dos tocoferóis consiste de um núcleo cromanol com uma cadeia alifática lateral. (MUNTEANU *et al.*, 2004). Estas substâncias agem como doadores de hidrogênio para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar (BARREIROS *et al.*, 2006). Entre os compostos da vitamina E, o α -tocoferol é apontado como sendo o mais potente em ação antioxidante. Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade superior do α -tocoferol em prevenir a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). (THOMAS E STOCKER, 1975; PARKS *et al.*, 1998; YOSHIDA *et al.*, 2003; MASUCHI *et al.*, 2008) (Figura 2)

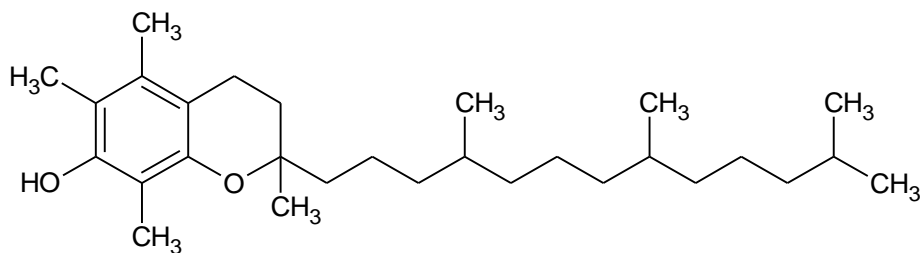


Figura 2. Estrutura química do α -tocoferol (vitamina E)

Os carotenóides, semelhantes aos tocoferóis, são abundantes em óleo de frutas oleaginosas e são conhecidos pela sua propriedade provitamínica A. Atualmente, o enfoque se ampliou para outras atividades biológicas que os carotenóides podem exercer, por exemplo, atividade antioxidante, fotoprotetora e anticâncer (CARDOSO, 1997; GOMES, 2007). Existem na natureza mais de 600 carotenóides, os quais estão divididos em dois grupos: Os carotenos, que apresentam somente hidrocarbonetos e xantofilas, que em suas estruturas contém grupos oxigenados (HAEGELE *et al.*, 2000; HORST & LAJOLO, 2012)

Entre os carotenos, os representantes de maior destaque são os isômeros β e α -carotenos responsável pela cor alaranjada de frutos amazônicos como tucumã (FRASER *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2008). Estes carotenos são conhecidos por serem precursores da vitamina A, um nutriente importante para o desenvolvimento dos tecidos epiteliais e para o funcionamento do ciclo de regeneração visual dos fotorreceptores (OLSON, 1969; BURRI, 1997; AMBROSIO *et al.*, 2006). Além disso, eles são capazes de prevenir danos celulares; diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular, assim reduzindo os riscos de deleção genômica (MALDONADO-ROBLEDO *et al.*, 2003), também exercem uma ação antioxidante em células pulmonares expostas a nitrosaminas provenientes do tabaco (BESTWICK *et al.*, 2000; LOWE *et al.*, 1999).

O alfa-caroteno é descrito como supressor de tumores na pele, no pulmão, no fígado e no cólon demonstrando, inclusive, uma atividade de supressão superior ao β -caroteno (NISHINO *et al.*, 2000; DONALDSON, 2004; GOMES, 2007). Este caroteno age ativando a finalização do ciclo de multiplicação celular, de forma análoga à ação da proteína p53. (MURAKOSHI *et al.*, 1983; NISHINO *et al.*, 2000; DONALDSON, 2004). (Figura 3)

Os carotenóides xantófilos apresentam atividade anticarcinogênica e já foram descritas ações supressoras e antimetastásicas. Além de exercem excelente atividade antioxidante (NISHINO *et al.*, 2002; LIU, 2004).

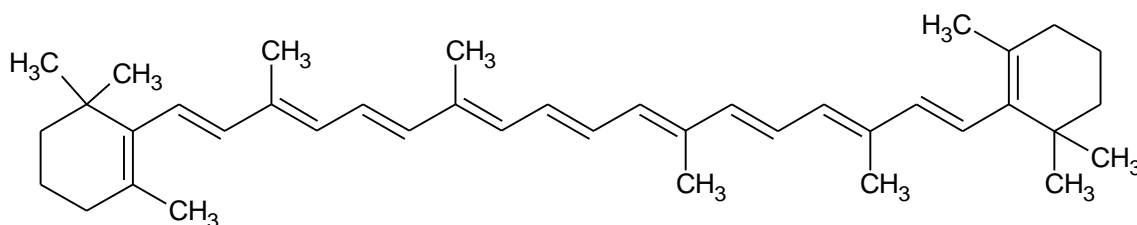


Figura 3. Estrutura química do α -caroteno

Os antioxidantes sintéticos são amplamente aplicados na indústria química de alimentos e na medicina, sendo que os principais antioxidantes utilizados são BHA, BHT, PG, TBHQ. (SIES, 1993) (Figura 4). A tecnologia de antioxidante data dos anos 40, quando os primeiros estudos com antioxidantes mostraram o potencial antioxidante dos ésteres de galato (ROBARDS & DILLI, 1987). Estes compostos sintéticos foram desenvolvidos para estabilizar alimentos em conserva ricos em lipídeos com a finalidade de evitar a rancidez (WONG *et al.*, 2006). Estes antioxidantes são lipossolúveis e de lenta metabolização no organismo e possuem várias atividades biológicas, sendo a principal a atividade antioxidante. Esta atividade é potencializada quando estes compostos estão combinados com outros antioxidantes como α -tocoferol,

por exemplo (ROBARDS & DILLI, 1987). Relata-se que Ingestões diárias destes compostos orgânicos conferem proteção contra vários tipos de xenobióticos bem como inibem a carcinogênese em variados tecidos (YU *et al.*, 2000; VANDGHANOONI *et al.*, 2013). Vandghanooni e colaboradores (2013) observaram que o BHT inibiu o crescimento de células cancerosas e estimulou a apoptose das mesmas pela fragmentação do DNA. Entretanto, as altas concentrações podem causar toxicidade, sendo os metabólitos, gerados na metabolização, responsáveis por intoxicações em humanos. Em um estudo realizado por Chen e colaboradores, foi observado que em altas concentrações o BHT promoveu mutagenicidade e os metabólitos reativos de antioxidantes sintéticos causaram toxicidade aguda em pulmões de camundongos (CHEN *et al.*, 1992).

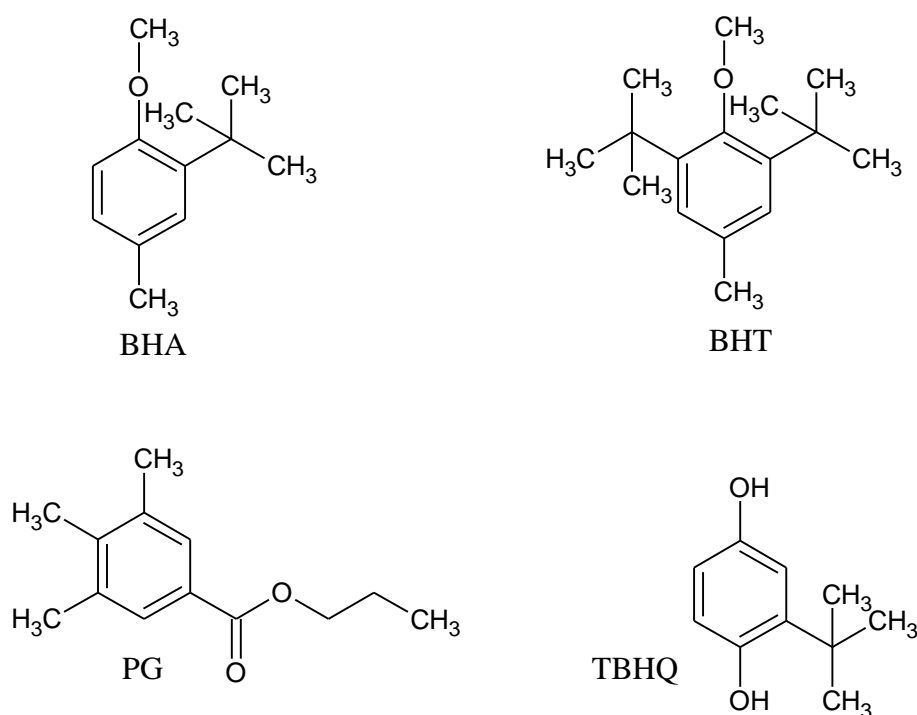


Figura 4 – Principais antioxidantes sintéticos utilizados pelas indústrias

2.3 Frutos amazônicos como fonte de antioxidantes

Castanha do Brasil (Bertholletia Excelsa)

A castanha é uma semente da castanheira do Pará, pertencente à família das Lecitidáceas e foi descrita em 1808 por Humbolt e Bonpland. É uma espécie arbórea de grande porte, podendo medir de 50 a 60 m de altura e é considerada uma espécie nativa da Amazônia (CAVALCANTE, 1991; MULLER, 1995). Seu tronco é escuro, liso com ramos próximos da extremidade; as flores são brancas e grandes. O fruto é globoso (ouriço), chegando a pesar 1,5 Kg e abriga de 12 a 22 sementes, que são as castanhas (CAVALCANTE, 1972). Sua área de distribuição geográfica estende-se pelos Estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima e Amazonas, e em países vizinhos como Venezuela, Bolívia, Peru, Colômbia e Guianas (BRASIL, 2000).

A Castanha do Brasil é um alimento muito apreciado pelo seu sabor, e ainda apresenta qualidades nutricionais importantes. A amêndoa é constituída por 60 a 70% de lipídios, expressivamente de ácidos graxos poliinsaturados, e de 15 a 20% de proteína de boa qualidade biológica, além de fonte de selênio, cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas do complexo B (SOUZA *et al.*, 2004; YANG, 2009).

Estudos clínicos indicaram que o consumo de frequente de castanha diminui o risco de desenvolver doença coronariana. Strunz et al (2008) verificaram que consumo de castanha aumentou a concentração de colesterol HDL, que é bom indicador para proteção contra aterosclerose. Em pacientes em hemodiálise, a suplementação de selênio, através da ingestão de castanha, elevou a concentração plasmática deste mineral e, conseqüentemente, aumentou a síntese de glutathiona peroxidase, bem como elevou quantidade de eritrócitos. Assim, indicando que a ingestão diária pode melhorar as defesas antioxidantes destes pacientes (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por Stockler-Pinto et al (2012), em modelo experimental semelhante ao realizado em 2010, concluiu que o consumo de uma castanha por dia é suficiente para elevar e manter a concentração de selênio e glutatona em pacientes em hemodiálise.

Uma revisão feita por Carvalho et al (2012) relata que a castanha pode reduzir o processo inflamatório devido aos fitoesteróis presentes na semente. Os efeitos benéficos são atribuídos à ação sinérgica entre seus ácidos graxos poliinsaturados e outros compostos bioativos existentes nesta amêndoa. Vários trabalhos, realizados recentemente (Tabela 1), sugerem que os compostos antioxidantes e antiinflamatórios da castanha estão fortemente relacionados a um efeito favorável na redução do risco de ocorrência de doenças cardiovasculares (ROS; YANG, 2009).

Tabela 1. Atividades biológicas da Castanha do Brasil (*Bertholletia Excelsa*).

Cominetti et al., 2011	A ingestão de uma unidade de castanha aumentou a concentração de Se. e melhorou a atividade da GPx em mulheres obesas com o polimorfismo na Gpx-1 Pro198Leu.
Filogônio et al., 2011	O óleo mineral da castanha reduziu, de forma significativa, a formação de biofilme dental, sendo mais eficaz que o óleo mineral.
Maranhão et al., 2011	A ingestão de Castanha melhorou o perfil lipídico e a função microvascular em adolescentes obesos. Atribuiu-se este efeito à sua alta concentração de ácidos graxos insaturados
Cominetti et al., 2012	Em mulheres obesas, observou-se que a ingestão de castanha elevou a concentração de HDL e, conseqüentemente, o perfil lipêmico.
Stockler – Pinto et al., 2014	Em paciente em hemodiálise houve uma melhora significativa nas concentrações de glutatona e o decréscimo do 8 – isoprosteno, 8 OHdG, e citocinas inflamatórias, após a ingestão de castanha
Colpo et al., 2014	O consumo regular de castanha do Brasil diminuiu os marcadores inflamatórios como COX's, IL – 1 e TNF - α .

Açaí (*Euterpe oleracea*)

O açaí, (*Euterpe oleracea* Mart.), é uma palmeira nativa da região norte com ocorrência nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e no Amapá, sendo frequente em solos alagados e várzeas (LORENZI *et al.* 1996). Pode atingir a altura de até 25 m, possui caule de 15 a 25 cm de diâmetro e ocorre geralmente formação touceiras com várias estipes. Sua madeira é utilizada para construções rústicas (CALBO & DE MORAIS, 2000). Os frutos são um tipo de baga com o diâmetro de até 1,5 cm. Antes da maturação possuem uma coloração rosada, chegando à maturação ganha um tom mais enegrecido (LORENZI *et al.*, 1992).

Sua polpa é utilizada para a fabricação de licores, doces e sucos. As folhas são usadas para a cobertura de casas e na confecção de chapéus. A importância econômica desta espécie deve-se pelo palmito, utilizado para importação. Estima-se que no Brasil 95% do palmito produzido no país seja extraído do açazeiro (MENEZES NETO *et al.*, 1995; MENEZES *et al.*, 2005).

O Brasil se posiciona como o maior produtor e exportador de açaí, sendo o estado do Pará responsável pela maior produção, chegando à produz 180 mil litros/dia. A expansão da exportação do açaí, já atinge os mercados da Europa, Sudoeste da Ásia, América do Norte, Japão e China (SOUTO, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MENDES, 2003).

Sua polpa tem sido objeto de alguns estudos em função de seu valor nutritivo e sensorial (SOUTO, 2001; MENEZES *et al.*, 2005), sendo inclusive considerada como um alimento nutracêutico por conter elevado teor de antocianinas; pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela cor avermelhada (BOBBIO *et al.*, 2000; MENEZES *et al.*, 2005).

As antocianinas tornaram-se conhecidas por suas diversas propriedades farmacológicas, propriedades medicinais, incluindo anticarcinogênica, antiinflamatória e antimicrobiana, além de prevenir a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (KUSKOSKI *et al.*, 2006; ALASALVAR *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostram que o açaí possui uma notável atividade antioxidante, principalmente contra as espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, peroxila, quando mesurado a sua capacidade de absorver radicais de oxigênio (SCHAUSS *et al.*, 2006; HOGAN *et al.*, 2010). Os efeitos benéficos do açaí estão relacionados à sua abundância de composto fenólicos. Em face deste potencial, aumenta o interesse em investigar a sua propriedade antioxidante (HOGAN *et al.*, 2010).

Os compostos polifenólicos presentes no extrato do açaí tiveram uma expressiva supressão na proliferação de células leucêmicas através da ativação da via das caspases numa dose tempo dependente (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006). Outro estudo similar relata que frações polifenólicas não antocianínicas inibiram a proliferação de adenocarcinomas do colon (PACHECO *et al.*, 2008). Resultados similares também foram encontrados por Del Pozo-insfran *et al.* (2006), onde os polifenólicos nas suas formas glicosídicas e agliconadas reduziram a proliferação de células leucêmicas pela ativação da caspase 3 e 8.

Em estudo de avaliação da atividade antiproliferativa e antioxidante, Hogan *et al.*, (2010) observaram que extratos antocianínicos do açaí numa concentração de 200 µg/mL reduziam para 32% a viabilidade celular de carcinoma cerebral de ratos e a dose de 50 µg/mL interferiam nas características morfológicas celulares induzindo o aparecimento de células com núcleos menos denso e de aparências apoptóticas. Em testes antioxidantes, estes extratos tiveram grande capacidade de inibir os radicais

livres, deu-se destaque à capacidade de varrer as espécies radicais de oxigênio (TERAO, 2009).

Rufino *et al.*, (2010) relatou que as fibras e o óleo do açaí tem um potencial antioxidante a ser explorado. O óleo extraído neste estudo apresentou capacidade antioxidante maior que o óleo de oliva, levando em consideração os conteúdos de ácidos graxos. As fibras possuíam um elevado conteúdo de taninos condensados, assim contendo uma considerável capacidade antioxidante. O autor acredita que associação fibra-polpa é determinante para elevada capacidade antioxidante do açaí.

Em trabalho realizado por Souza *et al.* (2010) avaliou os efeitos da suplementação com açaí sobre marcadores do estresse oxidativo e no perfil lipêmicos em ratos hipercolesterolêmico. Não houve diminuição da atividade destes marcadores no estresse renal, entretanto a suplementação foi eficiente na diminuição da concentração de proteínas carboniladas. A dieta proporcionou o decréscimo do colesterol LDL, por consequência, diminuiu o índice aterogênico e a concentração enzimas marcadoras do estresse oxidativo como a superóxido dismutase foram reduzidas.

A fração etanólica do açaí teve efeito na produção de óxido nítrico em macrófagos ativados de linhagem RAW inibindo a ação da iNOS. Acredita-se que o mecanismo seja pela redução da expressão da atividade da iNOS, realizados pelos flavonóides presente nas frações da folha e do fruto. O composto mais ativo a inibição do iNOS foi cianidina-O-gangliosídeo, a fração pura reduziu em 30% a expressão de proteínas iNOS (MATHEUS *et al.*, 2006).

Schauss *et al.* (2006) verificou atividade dos bioativos do açaí. Estes bioativos elevou atividade fagocíticas dos macrófagos apresentando potente atividade imunostimuladora, inibiu os efeitos do LPS na produção de óxido nítrico indicando

atividade antiinflamatória, assim podem ser utilizada para desordens alérgicas e autoimune (SHIN *et al.*,2004) e estes bioativos inibiram seletivamente as cicloxigenases, mas sendo seletivas à COX-1.

Tabela 2. Tabela referencial das propriedades biológicas do açaí.

Referência	Propriedade biológica
Coisson <i>et al.</i>, 2005	Suco de açaí apresentou uma capacidade antioxidante com valores próximos de 95% de inibição
Schauss <i>et al.</i>, 2006	Extratos liofilizados da polpa e casca mostraram elevada capacidade antioxidante frente ao ânion radical superóxido, peroxil, peroxinitrito, bem como atividade antiinflamatória pela inibição da COX-1 e COX-2.
Del Pozo-Insfran <i>et al.</i>, 2006	Polifenólicos extraído da polpa do açaí reduziu a proliferação de células leucêmica HL-60 através pela ativação da via as caspase -3.
Matheus <i>et al.</i>, 2006	Extratos da folha, das flores e do fruto do açaizeiro mostraram um potencial inibitório na produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 pela redução do expressão da iNOS
Ribeiro <i>et al.</i>, 2010	Suco de açaí apresentou atividade protetora contra a aterosclerose em animais deficiente em ApoE pela modulação de citocinas pro-inflamatória e redução da peroxidação lipídica.
Hogan <i>et al.</i>, 2010	Extratos de açaí ricos em antocianinas exerceram capacidade antiproliferativa pela ativação da apoptose. O composto responsável por está atividade foi a cianidina.
Souza <i>et al.</i>, 2010	A suplementação de açaí teve um efeito impactante nas concentrações de biomarcadores de estresse oxidativo em ratos hipercolesterolêmicos, bem como induziu a elevação do HDL plasmáticos melhorando o perfil lipêmico destes animais.
Barcellos <i>et at.</i>, 2010	Extrato do açaí administrado em camundongos em dose até 1000 mg/kg não tiveram efeito tóxico e redução concentração de triglicerídeos sugerindo um potencial nutracêutico para o tratamento de hipertrigliceridemia.

Kang et al., 2011	Um flavonóide desconhecido isolado do açaí, a vilutina, apresentou uma forte capacidade inibitória da ativação NF- κ B em células - RAW BLUE, sendo o CI ₅₀ próximo 2,0 μ M.
Xie et al., 2011	Suco de açaí apresentou atividade protetora contra a aterosclerose em animais deficiente em ApoE pela modulação de citocinas pro-inflamatória e redução da peroxidação lipídica.
Gordon et al., 2012	Ao longo do amadurecimento do fruto do açaí, a concentração de compostos fenólicos aumenta influenciando sua a atividade antioxidante.

Tucumã (Astrocaryum aculeatum)

O tucumã é fruto pertencente à família das palmeiras (*Astrocaryum aculeatum*). Os frutos e as sementes são utilizados na alimentação humana e de animais, as folhas e estipes na construção de casas pelas populações do interior da Amazônia (MIRANDA, 2001) Esta espécie é comumente encontrada na região amazônica e pode alcançar de 10 a 15 m de altura com 15 a 20 cm de diâmetro (CLEMENT, *et al.*, 2005), cresce próximo de rios em terra firme . Tem a característica de florescer e frutificar durante quase todo o ano (CAVALCANTE, 1991).

Os frutos, normalmente elipsoides e alaranjados, quando maduros, apresentam de 3 a 5 cm de comprimento. A polpa tem 2 a 4 mm de espessura, de consistência pastoso-oleosa apresenta uma característica fibrosa (GUEDES *et al.*, 2005). Da polpa e semente podem ser extraídos diferentes tipos de óleos comestíveis e que, também, podem ser utilizado para formulações em cosméticos e produção do biodiesel (YUYAMA *et al.*, 2008).

A sua composição constitui em média 46% de umidade, 5% de proteínas, 30 lipídios, 9% de fibras e 3% de minerais (MORAIS *et al.*, 2001). O tucumã apresenta

elevada concentração de caroteno, uma provitamina A que quando ingerida se converte em vitamina A. O consumo de 30g da polpa do tucumã supre três vezes a necessidade diária de vitamina A de criança e representaria uma dose para um homem adulto (MARINHO & CASTRO, 2002; SCHWARTZ E CARLE., 2013).

Tabela 3. Tabela referencial das propriedades biológicas do gênero *astrocaryum*

Referência	Propriedade biológica
Bernard <i>et al.</i>, 2001	Os frutos do <i>A. vulgare</i> tiveram uma forte ação inibitória sobre a atividade anti-PLA exercendo uma atividade antiofídica.
Baurin <i>et al.</i>, 2002	<i>A. vulgare</i> inibiu cerca 16% a atividade da tirosinase de fungos.
Barreto <i>et al.</i>, 2009	Os frutos do <i>A. vulgare</i> tiveram uma forte ação inibitória sobre a atividade anti-PLA exercendo uma atividade antiofídica.
De souza <i>et al.</i>, 2010	O <i>A. vulgare</i> teve uma atividade antioxidante próximo de 150 equivalente trolox, mas não teve uma boa atividade inibitória sobre a α -amilase e α -glicosidase.
Bony <i>et al.</i>, 2012	O óleo extraído da <i>Astrocaryum vulgare</i> melhorou a produção de citocinas inflamatórias e aumento a migração de células em modelo de choque endotóxico em ratos com inflamação pulmonar. Acredita-se que os fitoesteróis, carotenóides e tocoferóis contidos no óleo exerceram esta ação.

2.4 Ensaios para avaliação da atividade antioxidante

A mensuração da atividade antioxidante refere-se a estudar o potencial antioxidante ou presença de compostos antioxidantes em uma amostra. Os ensaios podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. Entretanto, os primeiros são limitados e não há

similaridade com sistemas biológicos (HUANG *et al.*, 2005). Todavia, estes ensaios podem nortear os experimentos em *in vivo*, uma vez que se sabe com segurança o potencial antioxidante da amostra analisada. (GHISELLI *et al.*, 2000).

Os métodos empregados na avaliação da atividade antioxidante se diferem em relação aos seus mecanismos de reação, espécies-alvo e as condições reacionais, bem como a forma que os resultados são expressos. Porém não há uma universalidade no procedimento metodológico, tornando necessário avaliar a atividade antioxidante por vários métodos, assim juntando os resultados como quebra cabeça (HALLIWELL *et al.*, 1995; MA HALLIWELL E WHITEMAN, 2004; PRIOR *et al.*, 2005). As metodologias de avaliação utilizadas podem ser classificadas em duas categorias: (1) baseadas na reação de transferências de elétrons, nesta categoria encontram-se o método de quantificação de fenóis Folin-Ciocalteu, quantificação de flavonóides, DPPH e ABTS e (2) baseado na transferência de átomos de hidrogênio como método de inibição do anion radical superóxido (HUANG *et al.*, 2005)

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação do complexo ácido fosfotungstico-fosfomolibdico com os compostos fenólicos. O molibdênio se encontra no estado de oxidação VI (amarelo) neste complexo, mas na presença de compostos fenólicos, que são desprotonados devido ao meio alcalino, é convertido para o estado de oxidação V formando um complexo azulado com tungstênio (ABDILLE *et al.*, 2005; DASTMALCHI *et al.*, 2007). A intensidade da coloração determina concentração de fenóis presentes no amostra (SINGLETON & ORTHOFER., 1999; HUANG *et al.*, 2005) Atualmente, este método é um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante. No entanto, este método não é específico para compostos fenólicos, não podendo descartar a possibilidade de o molibdênio ser reduzidos por

outros compostos antioxidantes como ácido ascórbico, por exemplo (PRIOR *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

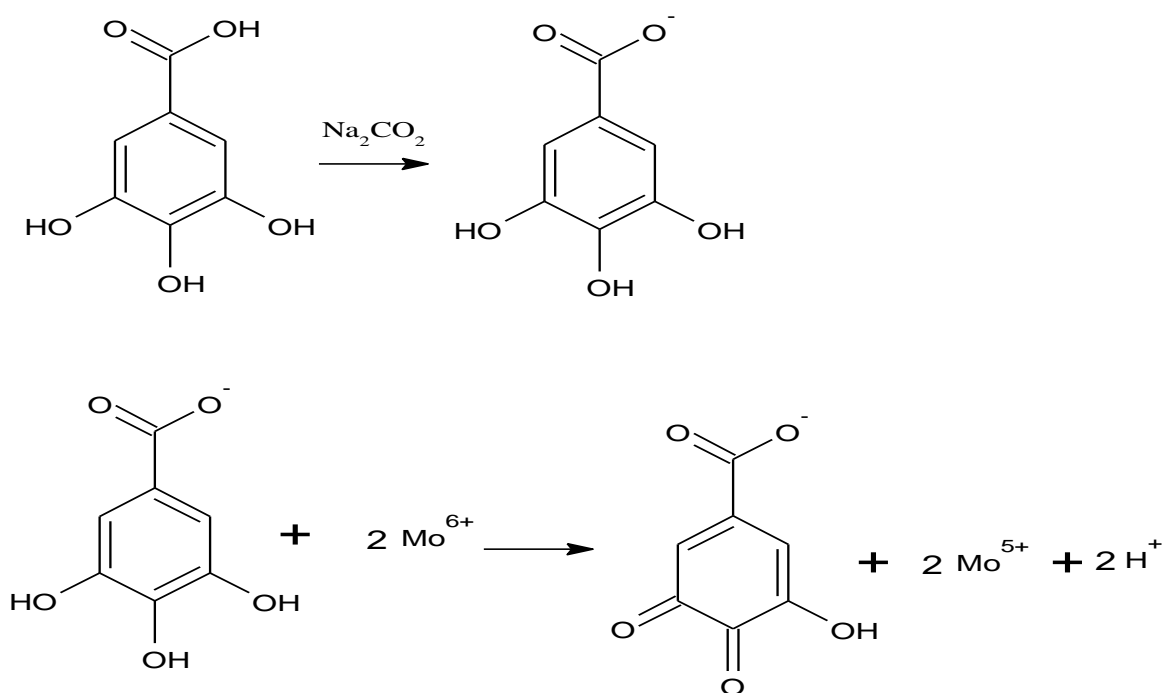


Figura 5. Reação do ácido gálico com molibdênio (OLIVEIRA *et al.*, 2009)

O 1,1- Difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) é um radical estável e inicialmente era usado para avaliar a capacidade antioxidante de flavonas (COTELLE *et al.*, 1996). A redução do DPPH é um indicativo da atividade antioxidante que monitorado mediante a descoloração e tem sua absorvância no comprimento de 515 nm (BRAND-WILLIAN *et al.*, 1995). O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, sendo que a mesmo acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações com hidrogênio (Figura 6). O método é influenciado pelo solvente e pelo pH das reações, em contrapartida é considerado fácil e útil para análise de substâncias puras e misturas complexas (DKHAR E SHARMA, 2010).

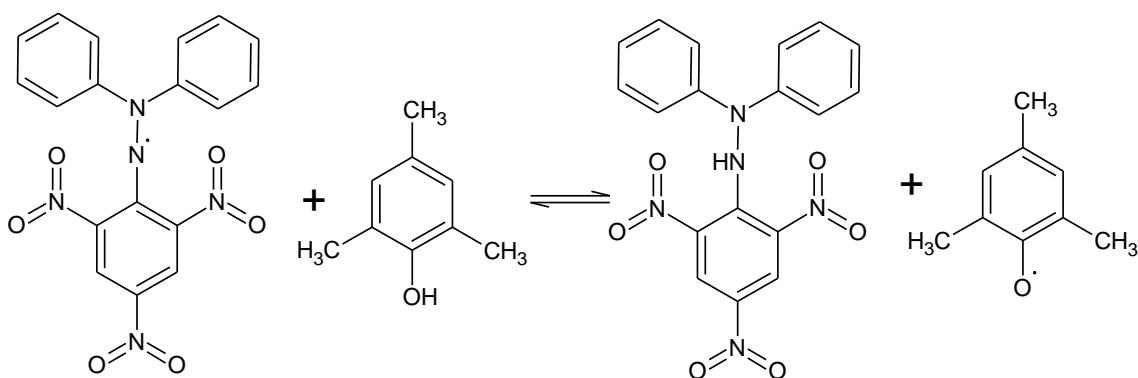


Figura 6. Mecanismo de reação do método de capacidade antioxidante pelo DPPH

A capacidade antirradical total, também conhecido pela sigla CAT se baseia na inibição dos efeitos oxidante do radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) ($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$, M.M. 548,7 g/mol, ABTS⁺•), que apresenta absorvância característica primária em 415 nm e absorções secundárias em 660, 734 e 820 nm. A determinação pode ser por fluorescência, quimiluminescência e absorvância (PRIOR *et al.*, 2005; THOMAS *et al.*, 2013).

No método original havia a ativação de metamioglobina como peroxidase, na presença de ABTS. O complexo perferril da hemeproteína produziria o cátion radical ABTS⁺⁺ de cor azul esverdeada. A adição desse radical ao meio contendo antioxidantes permite avaliar, através do grau de descoloração, a capacidade antioxidante de um determinado composto. Alguns autores sugerem a oxidação química do ABTS por meio da utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O percentual de inibição de ABTS⁺⁺ é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do trolox, o teste é denominado como TEAC e expresso como unidades equivalentes de trolox que correspondem a 1,0 mmol/L. Esse método é aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008).

Outro radical que pode ser inibido *in vitro* é o anion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Os ensaios que o envolviam, anteriormente, utilizavam a enzima superóxido dismutase (SOD) responsável por catalisar conversão do $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio e água (VALKO, 2010). Entretanto, essa técnica não era simples e seus custos eram elevados. Ewing e Janero desenvolveram uma técnica de ensaio que sintetizava o $O_2^{\cdot-}$ de modo indireto, tornando-o mais econômico e rápido (EWING & JANERO, 1995) (Figura 5)

A reação se inicia com adição de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) à mistura de PMS (fenazina metassulfato) e NBT (azul de nitrotetrazólio), leva a formação do $O_2^{\cdot-}$. Os ânions formados reduzem o NBT para a formazana e o antioxidante, quando adicionado ao meio, é capaz de competir com o NBT pelo ânion radical superóxido gerado, diminuindo, a redução do NBT e, conseqüentemente, a formação de formazana (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

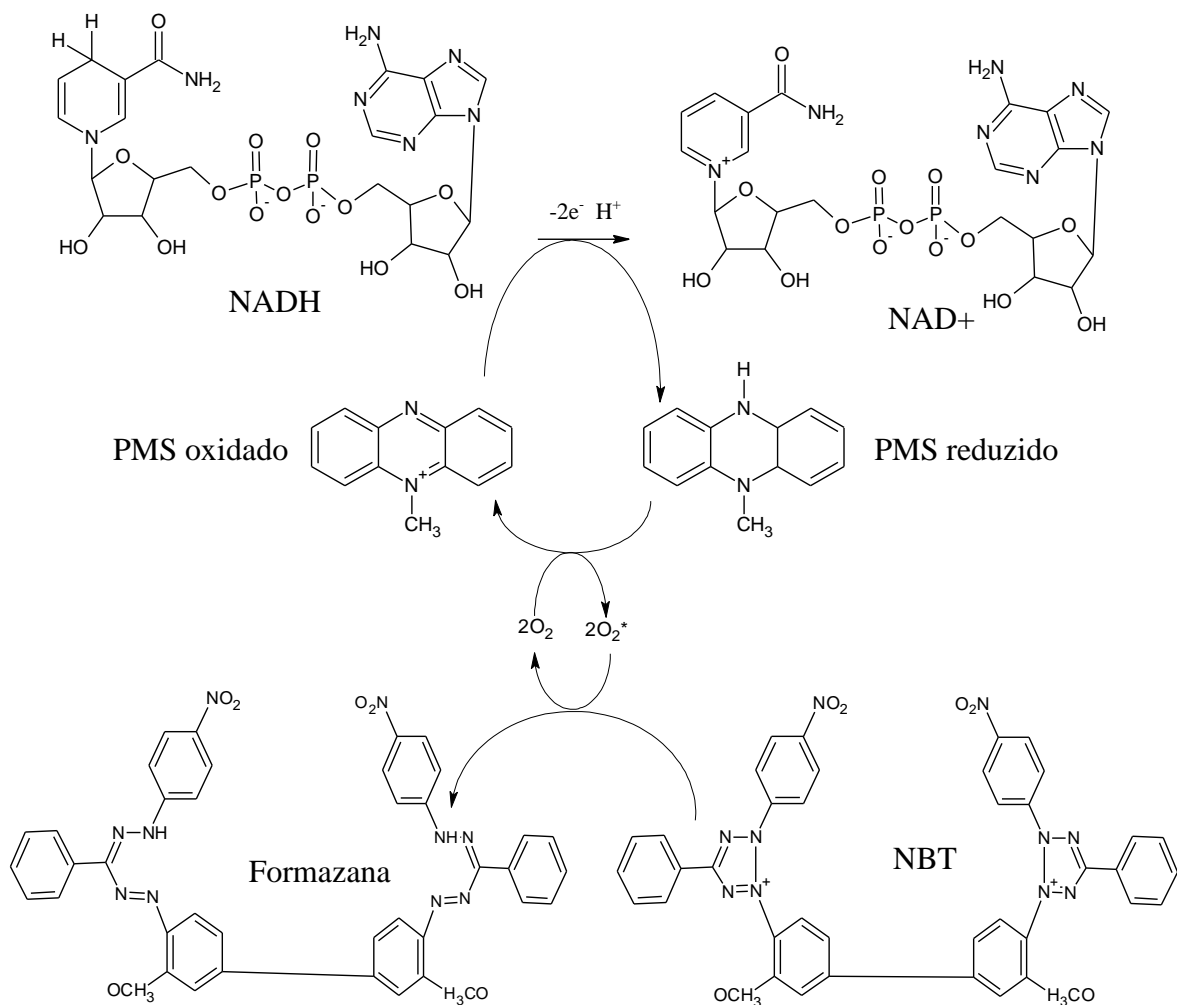


Figura 7. Mecanismo reacional do método de inibição do anion radical superóxido (OLIVEIRA *et al.*, 2009)

Embora existam ensaios químicos que possam avaliar a atividade antioxidante de compostos (FUKOMOTO & MAZZA 2000). Estes ensaios não representam as condições biológicas e celulares necessárias para obter as informações mais precisas em torno dos mecanismos de reatividade dos antioxidantes.

A avaliação da capacidade antioxidante em animais, em geral, é de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para realização dos experimentos (SOARES *et al.*, 2002). Porém, há a vantagem de obter dados precisos

sobre a atividade estudada diretamente de um sistema biológico, ou seja, o animal em experimento.

A capacidade antioxidante *in vivo* é determinada por muitos fatores que deve ser levado em consideração. Um destes fatores é biodisponibilidade (NIKI *et al.*, 2005).

Os compostos antioxidantes podem ser absorvidos, transportados, distribuídos e retidos nos fluídos biológicos, células e tecidos. A biodisponibilidade de vários antioxidantes, efeitos das dosagens e duração têm sido estudados pela análise de fluídos biológicos e tecidos de animais que passaram por uma dieta rica em antioxidantes. (NIKI *et al.*, 2005). Em compostos antioxidantes podem ser observadas diferenças nas suas capacidades *in vivo* e *in vitro*. O metabolismo é principal fator para esta diferença, uma vez que os antioxidantes são substratos das enzimas P450, sendo conjugados ou metilados na fase de biotransformação (URSINI, 1999).

Para avaliar a capacidade e eficácia dos antioxidantes *in vivo* em diminuir oxidação nos fluídos e tecidos biológicos. A quantificação da concentração de biomarcadores é essencial para este propósito e muito destes têm sido aplicados para avaliar o grau de oxidação em experimento em humanos e animais (HATHERILL, 1991).

O uso de um iniciador apropriado de oxidação é necessário para induzir à intoxicação e, conseqüentemente ao dano oxidativo. Entretanto, será somente verdade que indução foi realizada com êxito se os biomarcadores usados são de alta sensibilidade para mensurar mudanças metabólicas em baixo grau de oxidação (RAO E BALACHANDRAN *et al.*, 2002).

2.5 Marcadores bioquímicos do dano oxidativo

Os estudos acerca da avaliação do estresse oxidativo vêm adquirindo importância. Os marcadores da oxidação desempenham um papel importante na gênese de processos metabólicos que culminam em enfermidades crônicas e degenerativas (NIKI, 2010). A avaliação do estresse oxidativo depende da habilidade de aferição da presença de espécies reativas mensuradas diretamente, por meio de sua concentração em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, mediante a avaliação dos danos causados por esta oxidação (HALLIWELL E WHITEMAN, 2004).

Os biomarcadores possuem características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores que aqui incluiríamos aqueles relacionados ao estado patológico de um indivíduo (DE ZWART, 1999).

Produtos aldeídicos da lipoperoxidação

A propagação degenerativa de reações associada à peroxidação lipídica são frequente e tem como produtos finais a formação de vários aldeídos e compostos carbonilados (BENEDETTI *et al.*, 1979; DE ZWART *et al.*, 1999). A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados dá origem a hidroperóxidos instáveis que, após de consecutivas cisões, rearranjos e reações de oxidação, são convertidos em carbonilas mais estáveis (KADIISKA *et al.*, 2005; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Dentre elas

estão incluídas: n-alcenos, hidroperoxyalcenos, α -dicarbonil, cetonas saturadas e aldeídos (DE ZWART *et al.*, 1999).

A mais importante das carbonilas produzidas durante a liporoxidação são malondialdeído e 4-hidroxinonenal (figura 8) (MARK *et al.*, 1997). Estes produtos são encontrados em grande quantidade nos tecidos, principalmente no hepático. Alguns destes compostos podem ser citotóxicos e genotóxicos por reagirem com proteínas e ácidos nucleicos (MARKESBERY & LOVELL, 1998; SPICKETT, 2013).

O 4-hidroxinonenal (HNE) (figura 8) é produto da peroxidação mais estudados e são muito reativos e citotóxicos (SPICKETT, 2013). O mecanismo de reação da formação do HNE acontece a partir da degradação de intermediários hidroperoxioctadecadienóico na presença de ânion superóxido e catalizado por íons de ferro (PRYOR & PORTER, 1990; POLI & SCHAUR, 2000).

Nos tecidos, HNE é metabolizado em compostos menos tóxicos as células e hidrossolúveis facilitando a sua excreção (ALARY *et al.*, 2003). Uma importante via de metabolização do HNE envolve a conjugação com antioxidantes do grupo dos tióis como a glutathiona, catalizada pela enzima glutathiona – S – transferase nos hepatócitos (SIEMS *et al.*, 1998; BALOGH & ATKINS, 2011). Isso resulta a perda da insaturação permitindo a formação do conjugado HNE-GSH (GUERAUD *et al.*, 2006).

O HNE pode ser quantificado por espectrofotometria, sendo detectado numa faixa de absorbância que varia entre 220 a 223 nm. Em amostras com ausência de proteínas, as concentrações de HNE podem ser quantificadas por HPLC separando-o outros interferente.

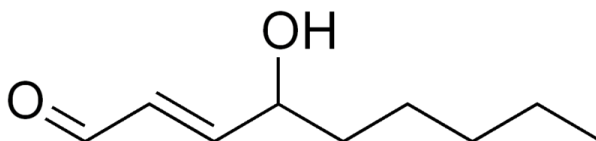


Figura 8. Estrutura química do 4-hidroxinonenal

O malondialdeído é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexaenóico (PETERSEN & DOORN, 2004). O MDA é um biomarcador geral de dano oxidativo derivado da oxidação de lipídios em plasma (KADIISKA *et al.*, 2005).

O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser quantificado na forma livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). Este aldeído reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm (THÉROND *et al.*, 2000) (Figura 7). Este teste não é específico para MDA, devido que outros aldeídos participam da mesma reação. Uma técnica utilizando HPLC com detecção no UV, desenvolvida por Katepe em 2004, em soro humano, revelou-se mais específica para este marcador. Na técnica de Katepe, o soro é acidificado para liberar o MDA ligado ao grupo amina de proteínas (VASCONCELOS *et al.*, 2011). (Figura 9).

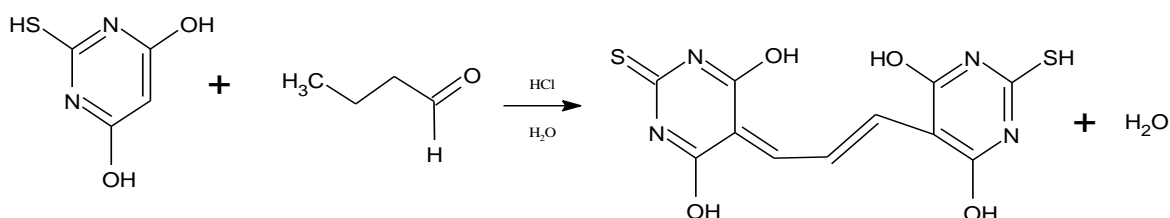


Figura 9. Reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (VASCONCELOS *et al.*, 2007)

Enzimas antioxidantes

Em resposta a exposição inevitável aos radicais livres provenientes de diversas fontes, o organismo desenvolveu um sistema de mecanismo para eliminar estes radicais. Esta é uma resposta evolutiva para lidar com as condições da vida aeróbia. Estas defesas

podem ser enzimáticas e não enzimáticas (CADENAS, 1997). As enzimas deste sistema antioxidante se encontram espalhados por todo corpo. As principais são a superóxido dismutase (SOD), Catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e redutase (GHS-R).

A SOD é responsável pela redução do ânion superóxido em H_2O_2 . Em seguida, o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio pela catalase no lisossomo ou pela GHS-Px nas mitocôndrias (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A SOD apresenta um grande potencial como biomarcador. Segundo Griendling e fitzgerald (2003) trutas e tilápias expostas à radiação UV apresentavam aumento da atividade da SOD no fígado e na pele, como resposta à formação de ânion superóxido, mediada por radiação UV.

A Glutathiona e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste tiol estão associadas com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo. Estas alterações implicam em lesões de DNA gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer (MEISTER, 1995; SENTUERKER *et al.*, 1997).

Este sistema é importante contra o aumento de radicais livres e envolve a enzima denominada glutathiona peroxidase (Gpx). (MANNERVIK, 1985). Esta enzima é encontrada em muitos tecidos de origem animal e quatro diferentes tipos de glutathiona peroxidases são conhecidas, dentre as quais a fosfolipídeo hidroperóxido glutathiona peroxidase (PHGSH-Px) que, também, consegue promover a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular (CARSOL 1997; NAGAI *et al.*, 2001).

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG

(NAGAI, 2001). Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica. *In vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos da membrana celular (HAN *et al.*, 2002) (Figura 10).

A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo, o selênio (Se) obtido da pela ingestão de alimentos de origem vegetal e animal (selenometionina e selenocisteína) (NERY DIEZ *et al.*,2010).

No organismo humano, a selenometionina ocupa o lugar da metionina nas proteínas e a selenocisteína é constituinte das selenoproteínas (RAYMAN, 2000)

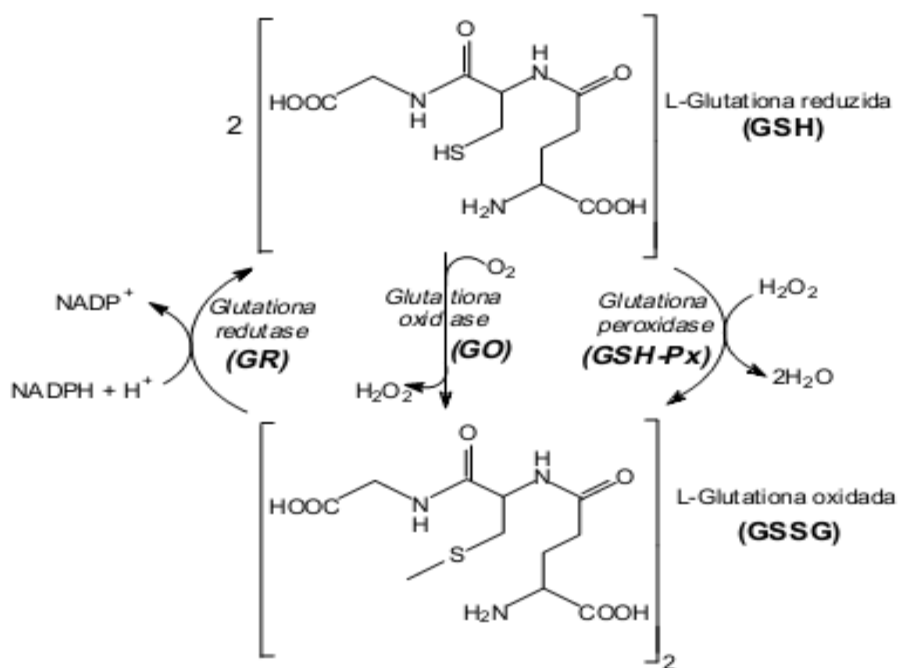


Figura 10. Mecanismo de interconversão da glutatona (JUNIOR *et al.*, 2001)

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de resíduos de três frutos amazônicos.

3.2 Específicos

- Obter extratos padronizados a partir dos resíduos de açaí, castanha e tucumã;
- Avaliar o potencial varredor de radicais livres *in vitro* destes extratos;
- Conhecer o efeito citotóxico e antioxidante dos extratos em modelo celular;
- Averiguar o efeito antioxidante e hepatoprotetor dos extratos em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos resíduos dos Frutos

Três frutos amazônicos de grande consumo pela população foram selecionados para este estudo, são eles a castanha (*Bertholletia excelsa*), Açaí (*Euterpe Oleracea*) e Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). Eles foram coletados nos municípios de Coari/AM, Rio Branco/AC e Manaus/AM. Após a coleta, os resíduos foram secos, limpos e triturados em um moinho de facas. O Material florado das espécies foi coletado para identificação botânica por especialistas dos herbários da UFAM e do INPA.

4.1.2 Preparação dos extratos

Os resíduos utilizados foram as cascas e as sementes destes frutos e a partir deles foram obtidos os extratos secos para as análises subsequentes. A extração dos compostos dos resíduos deu-se por maceração a frio por 48 horas com uma solução extrativa hidroalcoólica em uma proporção etanol:água 5:5 (v/v), sendo a relação droga/solvente de 10%. Os extratos obtidos foram secos em *spray dryer* (MD 01, Labmaq do Brasil, Ribeirao Preto, Brasil) com temperaturas de entrada e saída de 120°C e 80°C, respectivamente e fluxo de 0,6 litro por hora com atomizador de 1mm de diâmetro.

4.2 Delineamento Experimental

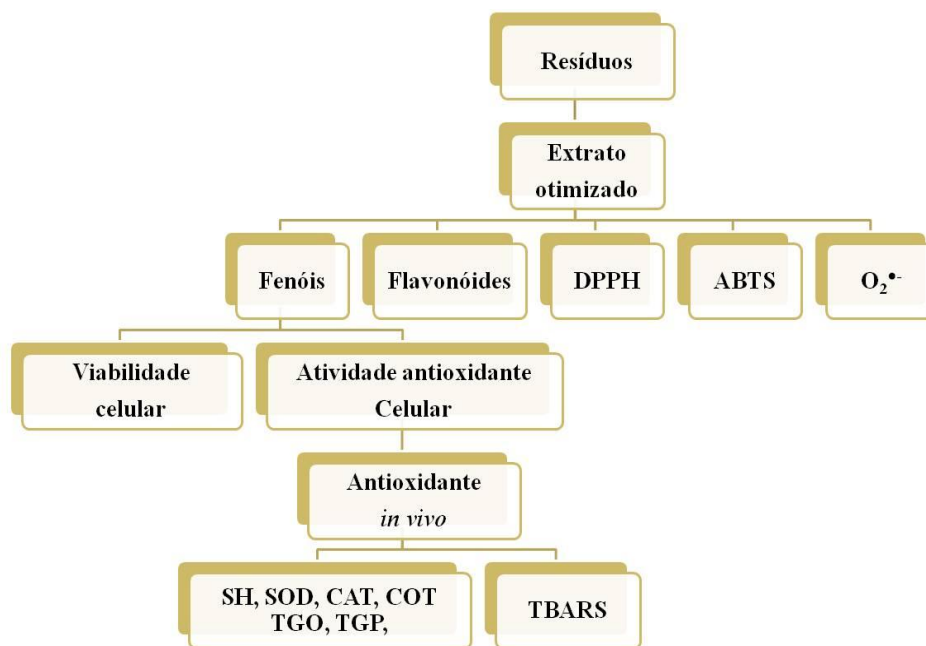


Figura 11. Delineamento experimental ou plano de execução do trabalho

4.3 Dosagem de Fenólicos totais

A concentração de fenóis totais quantificou-se pelo método descrito por Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações. Inicialmente 10µL dos extratos (1mg/mL) mais 50µL da solução Folin-Ciocalteu (1:10) foram adicionados nas microplacas e incubou-se, o mesmo, por 8 minutos, logo após foi adicionado o carbonato de sódio a 0,4% e novamente foi incubado por 3 minutos. Em seguida, fez-se a mensuração da absorbância em 620 nm. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

$$\text{Fenóis totais} = \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs padrão}}$$

4.4 Dosagem de Flavonóides Totais

A quantificação de flavonóides totais foi mediante o método descrito por Zhishen, Mengcheng, and Jianming (1999) com modificações. Inicialmente adicionou-se 30µL do extrato (1mg/mL), 90µL de etanol, 6µL de cloreto de alumínio 10% e 6µL de acetato de potássio nas microplaca. Em seguida as amostra adicionadas foram incubadas por 30 minutos. Em seguida fez-se a leitura no comprimento de onda 510 nm. O padrão utilizado foi quercetina.

$$\text{Flavonóides totais} = \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs padrão}}$$

4.5 Ensaio de varredura do radical DPPH

Este ensaio foi realizado de acordo com BRAND-WILLIANS (1995) com pequenas modificações que para a utilização de microplacas de 96 poços. Inicialmente, a solução de DPPH (0,8 mmol/L) foi preparada, em seguida, diluí-se a solução de forma que sua absorbância seja próxima de 1.000±0,1. Na microplaca foi adicionado 30µL do extrato e 270µL da solução de DPPH, em triplicata.

No controle utilizou-se o mesmo volume citados acima. Em seguida, incubou-se a microplacas em temperatura ambiente na ausência de luz por 30 minutos e então se mensurou as absorbâncias em um leitor de microplacas (DTX800, Beckman) no comprimento de onda 517 nm. Para obtenção da concentração mínima inibitória de 50% dos radicais DPPH (CI₅₀), fez uma curva e gerou-se a equação da reta.

Resultados desta equação foram em µmol/mL. As soluções do padrão e da amostra estavam oitos concentração diferentes (0,781 a 100µg/mL) e as diluições foram

de 1:1 até a 8^o diluição e descartou-se o último volume. Padrão utilizado nesta determinação foi a ácido gálico.

Os calculos de inibição foram feitos mediante a fórmula seguir:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times [(\text{Abs2 amostra} - \text{Abs controle})/\text{Abs controle}]$$

4.6 Ensaio de varredura do radical ABTS

A determinação de atividade antirradical realizou-se mediante o método descrito Re *et al.*, (1999) com pequenas modificações para possibilitar que teste fosse realizado com utilização de microplaca de 96 poços. Onde os composto com atividade antioxidante sequestraram os radicais ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), visualmente reduzindo a coloração do solução de radicais com conseguinte redução da absorbância. Inicialmente preparou-se a solução de ABTS pela reação de 0,7 mmol do radical ABTS dissolvido em água deionizada 5 mL com 5 mL 2,4 mmol de persulfato de potássio e o mistura reacional foi incubada em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para se obter a solução oxidada com tonalidade azul esverdeada. Em seguida, diluí-se numa proporção de 1:5 da solução/ água deionizada e então ajustou-se a mesmo para uma absorbância de $1,000 \pm 0,1$ em um comprimento de onda 715 nm. Retirou-se uma alíquota 30 μ L da amostra e 270 μ L da solução de ABTS, então, foram adicionado na microplaca em triplicata. Para o controle, os mesmos volumes do diluente e de ABTS foram utilizados. As amostras e controle foram incubados por 15 minutos na ausência de luz. Logo após, fez-se a leitura em leitor de microplacas. Para obtenção da concentração mínima inibitória de 50% dos radicais ABTS^{•-} (CI₅₀). Uma curva de concentração foi feita para a obtenção da equação da reta, sendo os resultados desta equação expressos em μ mol/mL. As soluções do padrão e da

amostra estavam em oitos concentração diferentes que foram de 0,781 a 100µg/mL, estas diluições foram de 1:1 até a 8º diluição, o último volume foi descartado. O Padrão utilizado nesta determinação foi o ácido gálico.

4.7 Ensaio de varredura do radical anion radical Superóxido

O método utilizado neste ensaio foi descrito Ozturk *et al.* (2007) e desenvolvido por Ewing & Janero (1995). Uma tampão TRIS-HCL 16 mmol/L pH 8 foi utilizado como solvente para dissolução dos extratos secos dos resíduos. Então, adicionou-se à microplaca 50µL da amostra, 100 µL de azul de nitrotetrazólio a 250µmol e 100 µL de NADH a 390 µmol . Em seguida, fez-se a mensuração da absorbância a 560 nm e 100µL de fenazina metilsulfato a 10µM foi adicionado na microplaca. Após 5 minutos de incubação fez-se uma nova leitura. O ácido gálico será usado como padrão antioxidante para o teste. Os resultados da inibição foram expressos em percentagem de inibição e a CI₅₀ foi obtida mediante uma a equação da reta.

Cálculo de inibição

$$\% \text{ Inibição} = 100[(\text{Abs2 amostra} - \text{Abs1 amostra})/\text{Abs controle}]$$

4.8 Teste de viabilidade celular

Antes da realização do teste da atividade antioxidante em célula foi realizado um teste de viabilidade celular. Foram utilizados fibroblastos humanos MRC-5 para estes ensaios. A citotoxicidade dos extratos foi determinada pelo método Alamar Blue de acordo com Nakayama e colaboradores (1997). O Alamar Blue é um método colorimétrico envolvendo a redução da resazurina a resorufina. Brevemente as células

(5×10^3 céls/poços) cresceu em placas de cultura tissular e expostas aos extratos (50, 25, e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) por 24, 48 and 72 h. Após a incubação 10 μL da solução de Alamar Blue (0.4% Alamar Blue (resazurina) em PBS) foi adicionada e as células foram incubadas por 2 horas a 37°C. Mensurou-se a fluorescência em leitor de microplaca usando uma excitação a 545 nm e emissão a 595 nm e expressa em percentagem de células em relação ao controle negativo. A doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. O teste foi realizado em quadruplicata.

4.9 Teste de Atividade antioxidante em célula

A produção de espécies radicais de oxigênio intracelular detectou-se utilizando o composto não fluorescente, o 2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), como descrito por Wolfe e Liu (2007). O DCFH-DA foi hidrolisado por esterases intracelulares e, em seguida, oxidado por hidroperóxidos em que um composto fluorescente, 2'-7'-DCF. As células MRC-5 foram semeadas a uma densidade de 6×10^4 células / poço numa microplaca de 96 poços em 100 μL de meio de cultivo. Vinte e quatro horas após de serem semeadas, o meio de cultivo foi removido e lavou-se os poços com PBS. Em seguida, 100 μL de uma solução 10 μM de DCFH-DA, dissolvido em tampão de Hank serão adicionados aos poços e incubados durante 30 min a 37 ° C e CO₂ a 5%. Em seguida, as células foram lavadas com 100 μL de PBS e adicionou-se 100 μL da solução dos extratos, com diferentes concentrações, na microplaca. A fluorescência foi medida imediatamente a excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm durante 60 min em intervalos de 5 min. Os controles com / sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos. Quercetina foi utilizados como controle positivo da atividade antioxidante em células.

4.10 Ensaio de atividade antioxidante *in vivo*

O efeito antioxidante *in vivo* dos extratos foram avaliados mediante hepatotoxicidade induzida pelo dano oxidativo causado pelo CCl₄ de acordo com o método descrito (HIRAI *et al.*, 2011) com algumas modificações. Foram utilizados 55 (33.61 ± 2.95 g) camundongos divididos em cinco grupos contendo cinco animais em cada. Nos grupos 1 e 2 (grupos de teste), administrou-se uma dose de 100, 200 e 400 mg/kg dos extratos de resíduos e CCl₄ a 25% (grupo 1, 2 e 3), grupo 4 (controle normal) administrou-se solução salina (1ml/Kg, p.o), grupo 5 (grupo CCL₄) recebeu somente salina (1ml/Kg) e CCl₄ a 25%. Durante cinco dias, os animais receberam o tratamento com os extratos por via oral.

No quinto dia, após 4h de jejum, os animais receberam uma injeção por via intraperitoneal de CCl₄ (2ml/kg) de solução a 25% em azeite de oliva, com exceção do grupo 4 (controle normal) que recebeu solução salina. Depois de 18h da injeção de CCl₄, o animal foram sacrificados com uma injeção letal de tiopental e amostras de sangue e fígado foram coletadas. Amostras de sangue foram centrifugadas (3000 rpm / 10 min) para a obtenção do plasma. O plasma foi utilizado para a estimativa dos parâmetros bioquímicos. O fígado foi processado para avaliação dos índices de produtos da lipoperoxidação. O presente projeto foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Amazonas e somente foi realizado após sua aprovação.

4.11 Dosagens de Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos envolvendo marcadores enzimáticos do dano hepático como as transaminases (TGO e TGP) foram realizados utilizando kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O aparelho de automação utilizado para quantificação deste biomarcadores foi o Chem well Plus[®].

4.12 Capacidade oxidante total

O ensaio desenvolvido por Erel (2005) tem como base na oxidação do íon ferroso, complexado com o-dianisidina, para íons férricos. Os íons férricos reagem com o xilenol Orange em um meio ácido gerando um complexo colorido que pode ser mensurado em espectrofotômetro. Os reagentes foram preparados da seguinte maneira: Reagente 1: O reagente 1 foi preparado pela dissolução de 114 mg de xilenol Orange e 8,18 g de NaCl em 900 mL de H₂SO₄ a 25 mM e 100 µL de glicerol foi adicionado a solução. O reagente final constituía 150 µM de xilenol Orange, 140 mM de NaCl e 1,35 M de glicerol. O pH da solução foi ajustado para 1,75. O reagente 2 foi preparado pela dissolução de 1,96g de sulfato ferroso amoniacal e 3,17 g de diidrocloreto de o-dianisidina em 1L de H₂SO₄ a 25 mM. A solução final foi composta por 5mM de sulfato ferroso amoniacal e 10 mM de diidrocloreto de o-dianisidina. Na microplaca inicialmente adicionou-se 225µL do reagente 1 e 35µL da amostra(soro) e fez-se a leitura do branco. Em seguida, foi adicionado 11µL do reagente 2 com cuidadosa homogeneização. Após 4 minutos de incubação, na ausência de luz, fez-se a leitura em 560 nm. O teste foi calibrado mediante uma curva de peróxido de hidrogênio e os

resultados são expressos em $\mu\text{mol/L}$ equivalente de H_2O_2 por litro ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L).

4.13 Quantificação de tióis totais

A concentração de tióis totais foi quantificada pelo método descrito Ellman e modificada por Hu *et al* (1994). Os tióis presentes na amostra reagem com 5´5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzólico) (DTNB) formando ânions coloridos. Inicialmente, é adicionado a microplaca 300 μL de uma mistura do tampão TRIS 0,25 mM pH 8,2 com 20 mM de EDTA. Em seguida, adicionou-se 3,8 μL de DTNB e 7,5 da amostra (soro) ou do padrão glutathiona reduzida a 0,5 mM (GSH). A microplaca foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Após a incubação, fez-se a leitura em comprimento de 405 nm.

4.14 Quantificação de TBARS.

A lipoperoxidação determinou-se pelo método de TBARS de ohkawa *et al.*, (1979), modificado por Draper & Hadley, (1990). O MDA, um produto final da lipoperoxidação, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um cromóforo rosado quantificado espectrofotometricamente. Primeiramente, fez-se o homogenato do tecido hepático por lixiviação, ressuspendendo-o em NaCl a 150 μM . Adicionou-se 100 μL do homogenato a 1 ml de solução contendo 400 μL de tampão ácido acético 1,3 M em HCl a 0,27 M, pH 3,4; 400 μl TBA 0,8% e 200 μl de SDS 8,1%. Incubou-se a mistura em um digestor a 95 °C por 60 minutos. Após a incubação, centrifugou-se as

amostras a 3500 rpm por 10 minutos, a absorbância foi mesurada em 535 nm. A concentração de MDA total das amostras do tecido foi determinado mediante utilização de uma equação da curva do padrão de MDA com 5 diluições (0,25; 0,5; 1; 2; 4 $\mu\text{mol/L}$)

4.15 Ensaio da atividade do superóxido dismutase

A quantificação de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) foi realizada conforme o método proposto por Nishikimi. O método se baseia na conversão da NBT em formazan indicando a presença do ânion superóxido. Inicialmente adicionou-se 80 μL de PMS (186 μM) e 20 μL NBT (300 μM), 13 μL NADH e 2 μL do homogenato do fígado. Todas as soluções citadas foram feitas em Tampão pirofosfato de sódio (pH 8.3 a 0,052 M). A microplaca foi incubada por 90 segundos e, logo após, foi adicionado o ácido acético para interromper a reação. Depois fez-se a leitura em 560 nm. Resultados foram obtidos foram expresso em U/mL. Os procedimentos acima foram realizado no ChemWell® da Awareness technology.

4.16 Capacidade antioxidante total

A determinação de atividade antirradical foi realizado mediante o método descrito Re *et al.*, (1999) com pequenas modificações para possibilitar que teste fosse realizado com utilização de microplacas de 96 poços. Onde os compostos com atividade antioxidante inibiu os radicais ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico), visualmente reduzindo a coloração do solução de radicais com consequente

redução da absorvância. Inicialmente, fez-se a solução de ABTS pela reação de 0,7 mM do radical ABTS dissolvido em água deionizada 5 mL e adicionado em 5mL 2,4 mM de persulfato de potássio e se incubou a mistura reacional em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para se obter a solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Em seguida, a solução foi diluída numa proporção de 1:5 da solução/ água deionizada e então ajustada para uma absorvância de $1,000\pm 0,1$ em um comprimento de onda 715 nm. Retirou-se uma alíquota 10 μ L do soro e 270 μ L da solução de ABTS e, então, foram adicionados a microplaca em triplicata. No controle, o mesmos volumes de diluente e de ABTS foram utilizados. As amostras e controle foram incubados por 15 minutos na ausência de luz. Logo após, fez-se a leitura em leitor de microplacas em um comprimento de 620 nm. O calculo foi realizado através da equação gerada na curva de concentração do trolox. A curva foi feita com cinco concentrações diferente de trolox com o R= 0,99.

4.19. Análise estatística

As análises *in vivo* foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como $\text{media}\pm\text{desvio padrão}$ da media. A comparação de mais de duas medias foi realizada utilizando teste de variância (ANOVA), sendo que a diferença entre as médias foram consideradas significativas quando o p-valor foi menor que 0,05.

5.0 RESULTADOS

5.1 Determinação de fenóis e flavonóides totais.

A determinação de fenóis totais foi realizada por meio do método de Folin – Ciocalteu, enquanto a quantificação de flavonoides totais foi mediante o método de Singleton & Rossi (1965) e foram obtidos os seguintes resultados. Foram obtidos dois tipos de extratos: hidroetanólicos e etanólicos. Os extratos dos resíduos de açaí apresentou um alto teor de compostos fenólicos e de flavonóides tanto no extrato hidroetanólico quanto no etanólico ($37,24 \pm 1,87\%$; $1,69 \pm 0,31$ e $36,59 \pm 1,13$; $3,26 \pm 0,21$). Observou-se, também, que os resíduos de tucumã contêm uma concentração considerável de fenóis e flavonóides nos dois extratos obtidos ($20,99 \pm 0,81\%$; $1,26 \pm 0,05$ e $6,95 \pm 0,15$; $2,87 \pm 0,50$). No entanto, os extratos da castanha do Brasil foram quem apresentaram os menores teores dentre os três resíduos de frutos, a percentagem de compostos fenólicos e flavonóides são relativamente baixa em relação aos outros resíduos. (Tabela4).

Tabela 4. Teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos de resíduos de açaí, tucumã e castanha do Brasil.

Extrato	Fenóis (%)	Flavonóides (%)
Açaí		
Hidroetanólico	$37,25 \pm 1,87$	$1,69 \pm 0,31$
etanólico	$36,59 \pm 1,13$	$3,26 \pm 0,21$
Tucumã		
Hidroetanólico	$20,99 \pm 0,81$	$1,26 \pm 0,05$
Etanólico	$6,95 \pm 0,15$	$2,87 \pm 0,50$
Castanha do Brasil		
Hidroetanólico	$4,44 \pm 0,22$	$0,57 \pm 0,09$
Etanólico	$5,52 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,16$

5.2 Capacidade sequestrante do DPPH

De acordo com a figura 12, os resultados obtidos na determinação da capacidade sequestrante do radical DPPH[•] foram expressos em percentagem de inibição, mediante a curva de inibição expressos em $\mu\text{g/mL}$. A CI_{50} variou de $9,56 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ a $188,73 \pm 15,72 \mu\text{g/mL}$. De acordo com figura 12, o extrato dos resíduos do açai ($\text{CI}_{50} = 9,56 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$) apresentou valores próximos ao padrão ácido gálico ($7,34 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$), ou seja, contém um potencial antioxidante semelhante ao padrão. Deve-se as altas concentrações de fenólicos, algo muito característico no fruto do açai. No entanto, o extrato dos resíduos da castanha apresentou IC_{50} maior que $100 \mu\text{g/mL}$, significando que o mesmo possui baixa capacidade de sequestro. Observou-se que o extrato do tucumã contém uma capacidade moderada de sequestro de radicais ($21,77 \pm 1,46 \mu\text{g/mL}$), apesar do mesmo conter muitos compostos antioxidantes.

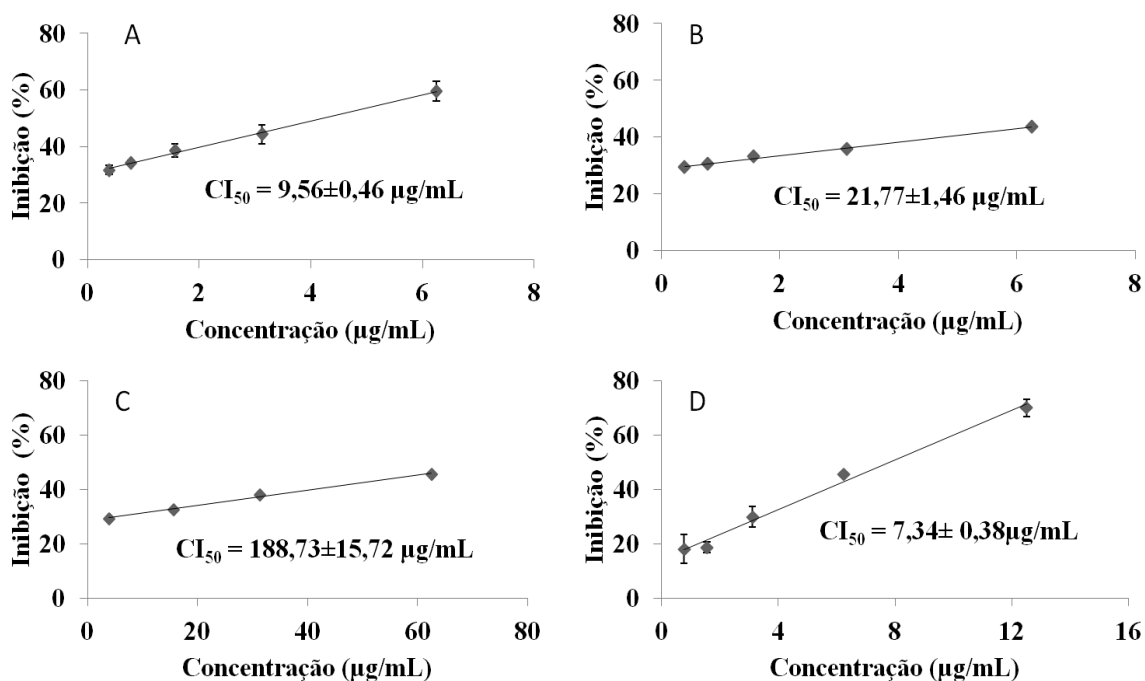


Figura 12. Curva da inibição dos radicais DPPH pelos extratos secos dos resíduos de açai (A), tucumã (B), castanha (C) e padrão ácido gálico (D). Resultados expressos em média e desvio padrão. (n = 3)

5.3 Ensaio de sequestrante do radical ABTS^{•-}

Este ensaio tem o mesmo propósito determinar a capacidade sequestrante de radicais, mas o radical presente neste ensaio é o ABTS^{•-}. Os resultados de inibição foram expressos em percentagem e o CI₅₀ foi obtido pela equação das curvas de inibição dos extratos. De acordo com o mostrado na figura 13, dos extratos avaliados neste estudo, os extrato do resíduo do açaí e tucumã mostraram ter atividade sequestrante diminuindo da concentração de radicais ABTS^{•-} presente na microplaca. O extrato de açaí apresentou um CI₅₀ de 17,88±0,49 µg/mL. Porém, atividade apresentada pelo açaí foi menor do que o padrão utilizado no ensaio, o ácido gálico com IC₅₀ de 2,16 ± 0,06 µg/mL. Os extratos dos resíduos do tucumã e castanha apresentaram uma capacidade menor inibição dos radicais ABTS, em relação ao padrão, sendo os IC₅₀ de 37,25±0,52 µg/mL e 106,93±1,99 µg/mL, respectivamente (Figura 13).

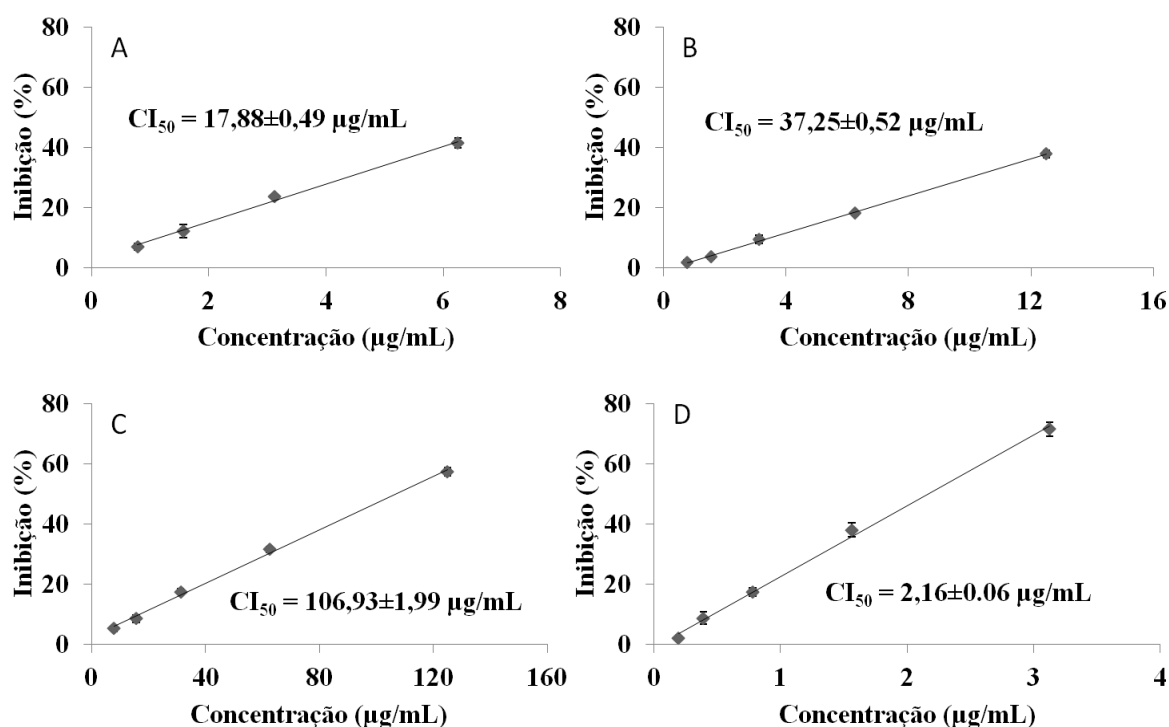


Figura 13. Curva da inibição dos radicais ABTS pelos extratos secos dos resíduos de açaí (A), tucumã (B), castanha (C) e padrão ácido gálico (D). Resultados expressos em média e desvio padrão. (n = 3)

5.4 Capacidade sequestrante do anion superóxido

Para determinar a capacidade dos extratos em sequestrar o ânion superóxido foi realizado ensaio proposto por Ozturk et al (2007), onde há conversão do NBT em formazan na presença do ânion. Segundo a figura 14, os extratos tiveram uma capacidade de sequestro baixa em relação ao padrão utilizado no teste do ânion superóxido, o ácido gálico ($CI_{50} = 29,81 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$). Os resíduos que obtiveram os melhores resultados foram o açaí e o tucumã, com concentrações de inibição semelhantes, sendo estes resultados de CI_{50} de $50,14 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$ e $53,14 \pm 8,17 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Observou-se que para o resíduo da castanha sequestrar 50% dos ânions presente no meio, foi preciso uma concentração de $CI_{50} = 425,31 \pm 4,51 \mu\text{g/mL}$, mostrando ter baixa capacidade de sequestro para este radical.

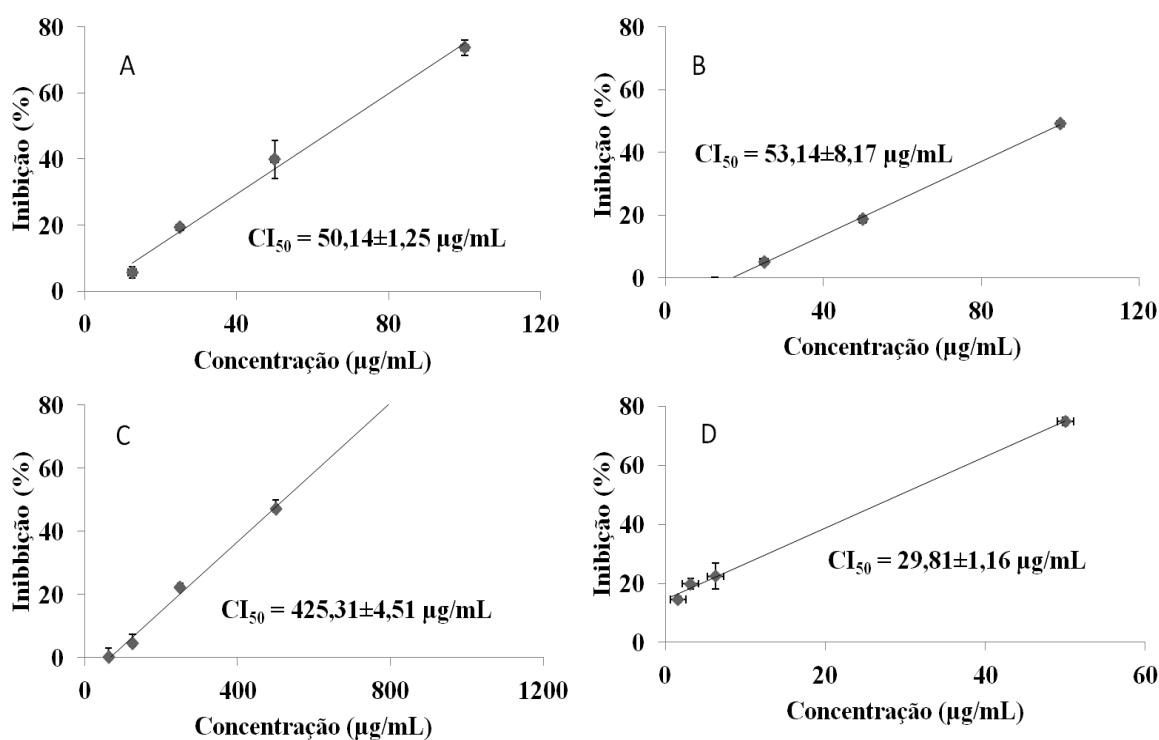


Figura 14. Curva da inibição do ânion radical superóxido pelos extratos secos dos resíduos de açaí (A), tucumã (B), castanha (C) e padrão ácido gálico (D). Resultados expressos em média e desvio padrão. (n = 3)

5.5 Teste de viabilidade celular

Para verificar uma possível citotoxicidade dos extratos, realizou-se o ensaio com fibroblastos MRC-5 utilizando o corante alamar blue para determinação da viabilidade destas células. Neste ensaio, observou-se a viabilidade de células após a incubação dos extratos com as células em 8 diferentes concentrações. As células viáveis convertem a resazurina em cromóforo rosado, rezorufina, aquelas que não estão viáveis ficam com a coloração azul. Utilizando concentrações que variavam entre 1,67 a 100 µg/mL, a exposição das células aos extratos de açaí e tucumã diminuiu da viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL, apresentando uma percentagem $9,22 \pm 0,33\%$ e $26,46 \pm 1,21\%$, respectivamente. Mas, a atividade citotóxica observadas nestes extratos são diferente ao que vista na doxorrubicina que exerce este efeito em 5 µg/mL. Por outro lado, o tratamento com extrato do resíduo de tucumã praticamente não teve um efeito citotóxico, na concentração de 100 µg/mL, sendo a percentagem de viabilidade foi de $87,05 \pm 2,65\%$ (figura 15).

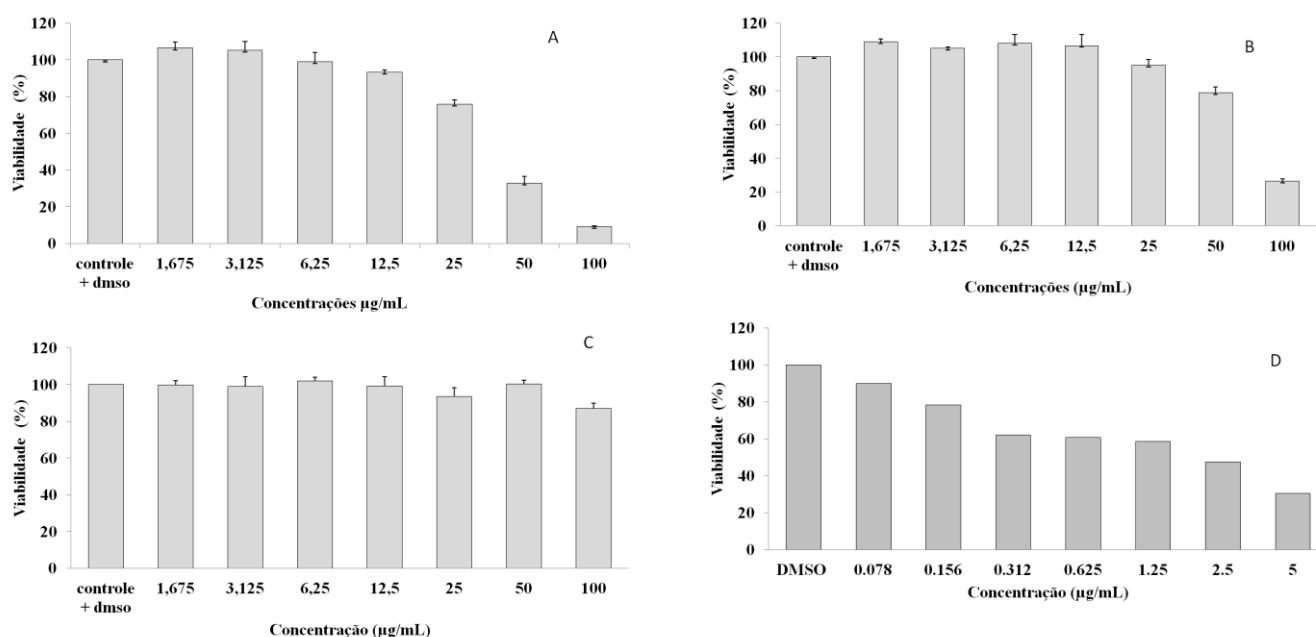


Figura 15. Ensaio de viabilidade de celular em linhagem de fibroblastos MRC-5 dos extratos de resíduos do açaí (A), Tucumã (B) e Castanha (C), Doxorrubicina (D). Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 3).

5.6 Teste de Atividade antioxidante celular

Sabe-se que o metabolismo celular gera muitos radicais livres, na sua maioria, derivados do oxigênio radicalar. Para avaliar a capacidade antioxidante em célula de um extrato ou composto, usa-se o método da diclorofluoresceína (DFC), onde a mesma é oxidada por radicais oxigenados formando fluoresceína, que pode ser monitorada por fluorescência. Foram realizados ensaios de verificação da atividade antioxidante por meio do método da diclorofluoresceína em fibroblastos humanos MRC-5. Todos os extratos apresentaram um potencial antioxidante neste ensaio, contendo inibições próximas a 80% nas concentrações utilizadas, as quais foram de 50, 25 e 12,5 µg/mL (Figura 16). Conforme apresentado na figura 16, dos extratos avaliados, aquele que apresentou o melhor resultado extrato foi o da castanha. O mesmo inibiu $86,40 \pm 2,81\%$ na concentração de 50 µg/mL e manteve a inibição próxima dos 80 % nas menores concentrações. O açaí teve a sua melhor inibição em 50 µg/mL ($83,51 \pm 2,55\%$), mas conforme foi decrescendo a concentração, também atividade decrescia. Nas concentrações de 50 ($71,76 \pm 6,63\%$) e 25 µg/mL ($70,96 \pm 1,65\%$), o extrato do tucumã apresentou uma atividade antioxidante em torno de 70%, semelhante ao açaí. A mesma era proporcional a concentração, ou seja, quanto menor a concentração, menor a atividade.

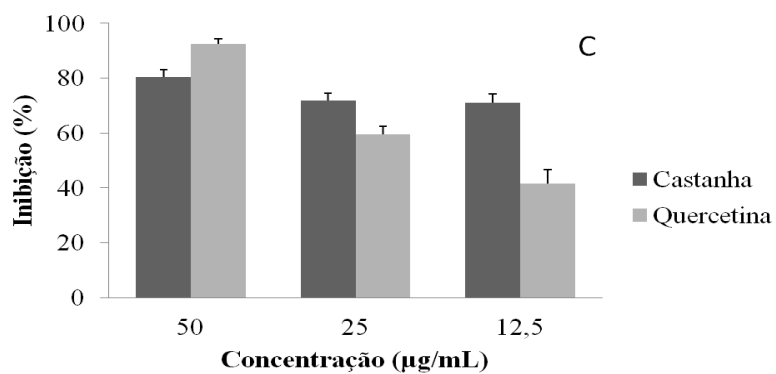
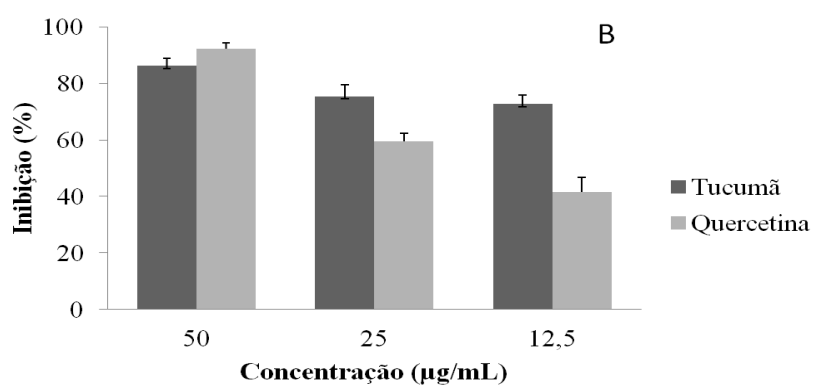
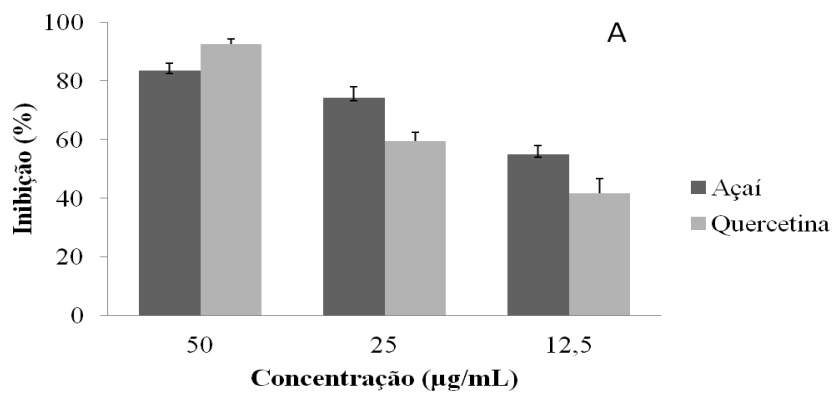


Figura 16. Ensaio da atividade antioxidante celular em linhagem de fibroblastos MRC-5 dos extratos de resíduos do açai (A), Tucumã (B) e Castanha (C) em comparação com a quercetina. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 3).

5.7 Ensaios atividade antioxidante e hepatoprotetora dos extratos de resíduos do açaí, tucumã e castanha.

Para avaliar atividade antioxidante *in vivo* dos extratos foram realizadas dosagens de cinco parâmetros, além das transaminases. Os testes realizados foram: a capacidade oxidante total (COT), superóxido dismutase (SOD), tióis totais (SH) capacidade antioxidante total (CAT) e quantificação de TBARS. O primeiro se baseia na oxidação da o-dianisidina pelos radicais gerados a partir do H_2O_2 convertendo-a em um cromóforo escuro, na presença de antioxidante não há esta conversão devido o sequestro dos radicais. O segundo determina-se a atividade da SOD mediante a conversão do NBT em formazana, não havendo formação de cromóforo quando o extrato possui uma atividade antioxidante. Os tióis totais determina a quantidade de compostos plasmáticos contendo o grupo tiol pela reação 5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) formando ânions coloridos. A CAT verifica a atividade antioxidante do plasma pela inibição dos radicais $ABTS^{\bullet-}$, onde observou-se um decréscimo na absorbância quando houve uma atividade. O último determina-se a quantidade de malondialdeído formado no plasma pela reação com ácido tiobarbitúrico formando um complexo de coloração rosada, os extratos contendo compostos antioxidantes inibem a formação deste complexo. A utilização das transaminases auxilia investigar o potencial hepatoprotetor de composto, seja ele sintético ou natural. A elevação da concentração destas enzimas no plasma indica injúrias teciduais, principalmente de tecido hepático.

5.7.1 Açaí

Quantificação de TBARs

Conforme a figura 17, a quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizado com plasma dos camundongos dos grupos tratados com as doses de 100, 200, 400 mg/Kg, bem com o basal e o CCL₄.

Verificou-se que o tratamento com o extrato dos resíduos de açaí diminuiu significativa ($p < 0,05$) a concentração de MDA do plasma dos animais tratados. De acordo com o visto na figura 17, a concentração de MDA nas doses citadas foram $0,65 \pm 0,00 \mu\text{mol/L}$, $0,85 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$ e $0,78 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$, então estes resultados demonstrando que o tratamento reverteu a toxicidade deixando as concentrações de MDA do grupo tratado aos níveis encontrados no grupo controle.

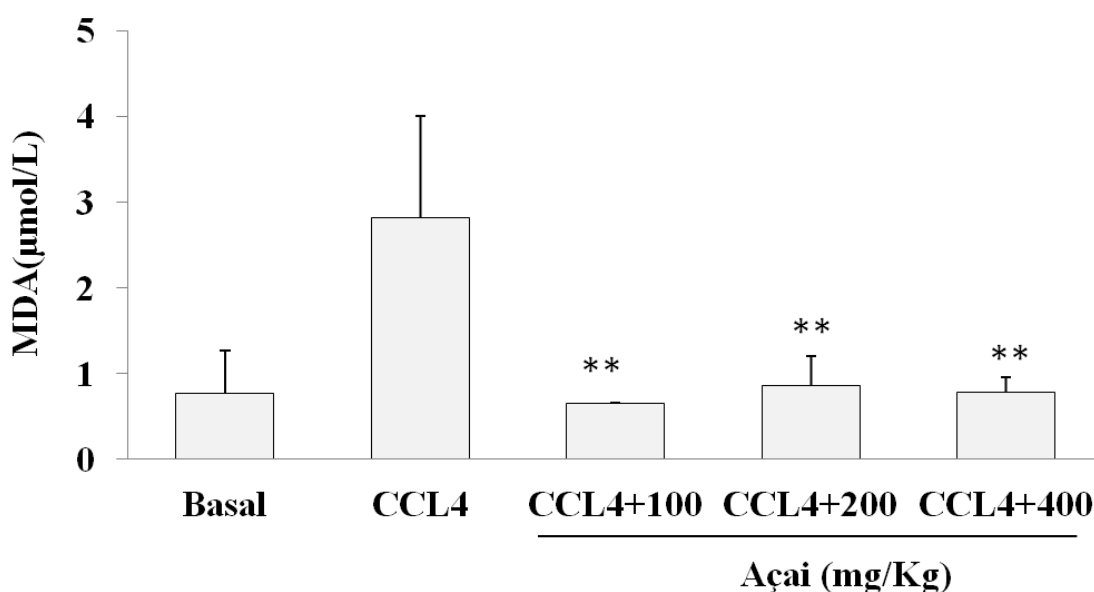


Figura 17. Quantificação de TBARs no plasma de camundongos intoxicados por CCL₄ e suplementados com o extrato dos resíduos de açaí. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 5). Nível de significação de $p < 0,05^{**}$

Determinação da atividade da SOD, COT, CAT e tióis totais.

Em relação ao efeito do extrato dos resíduos de açaí na atividade da superóxido dismutase (SOD) nos animais tratados, a dose de 200 mg/Kg ($423,13 \pm 362,81$ U/mL) apresentaram uma melhor resposta a atividade desta enzima, sendo mesma a duas vezes superior ao grupo CCL₄, apesar da intoxicação pelo CCL₄ (figura 18).

No ensaio de determinação de tióis totais, a doses de 100 e 200 mg/Kg apresentou uma concentração de tióis de $0,94 \pm 0,21$ e $1,19 \pm 0,39$ mmol/L. Porém, um decréscimo foi observado na dose de 400 mg/Kg, sendo a concentração de $0,79 \pm 0,17$ mmol/L, sendo próxima ao grupo basal

Na capacidade antioxidante total (CAT) as dosagens de 100 ($0,95 \pm 0,22$ mmol/L) e 200 mg/Kg ($1,20 \pm 0,41$) mostram ter os melhores potenciais antioxidante plasmático. Por outro lado, em 400 mg/Kg ($0,80 \pm 0,17$ mmol/L) foi diminuída esta capacidade, assemelhando-se ao grupo intoxicado.

No ensaio de capacidade de oxidante total (COT), o tratamento com extrato na dose de 100, 200 e 400 mg/Kg, diminui a concentração de oxidante, sendo a concentração de $1,27 \pm 0,83$; $1,31 \pm 0,33$ e $1,98 \pm 1,22$ μ mol/L, respectivamente. Porém, observou-se que houve um aumento da oxidação na 400 mg/Kg.

Atividade hepatoprotetora

Determinou-se a atividade hepatoprotetora através da atividade das transaminases (TGO e TGP), utilizando-as como marcadores do dano hepático. Conforme visto na figura 19, a concentração de TGP observadas nas doses

administradas para os camundongos foram $932,12 \pm 222,45$; $895,85 \pm 153,19$; $982,01 \pm 232,69$ U/L, respectivamente. Os resultados observados na atividade da TGO foram $950,44 \pm 226,85$; $913,43 \pm 156,20$; $1001,30 \pm 237,26$ U/L. A dose que mais efetiva na atividade das transaminases foi a dose de 200 mg/mL que reduziu de forma significativa a concentração deste marcador no grupo tratado com esta dose ($p < 0,05$).

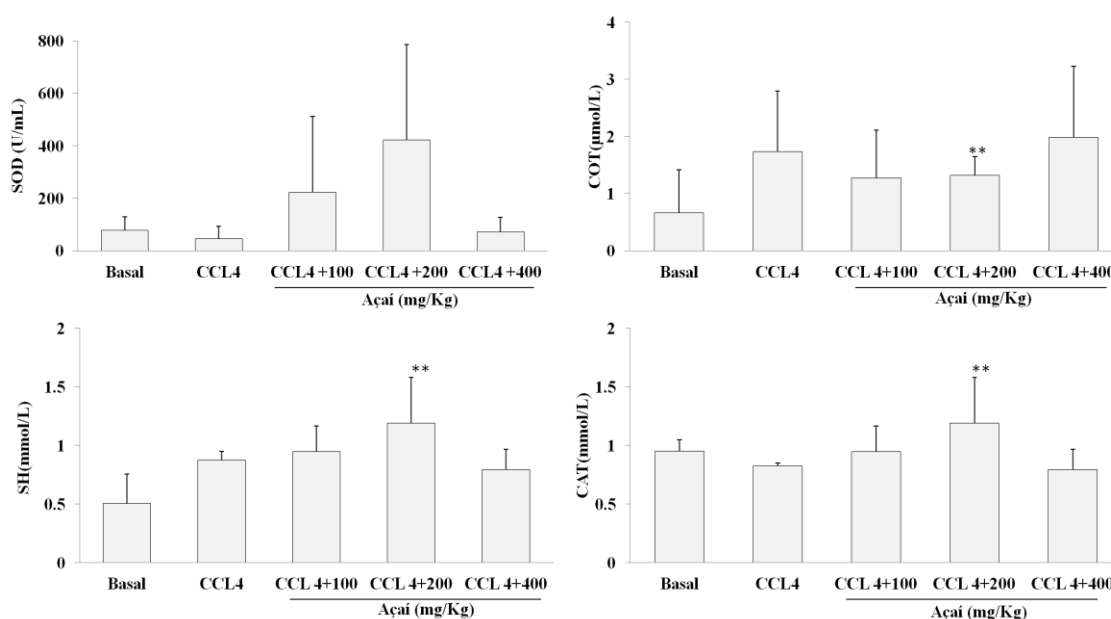


Figura 18. Marcadores antioxidantes plasmático de camundongos suplementados com o extrato seco dos resíduos do açaí nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. SOD: Superóxido dismutase; COT: Capacidade oxidante total; SH: Tióis totais; CAT: Capacidade antioxidante total. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 5). Nível de significância de 95% (P < 0,05)**

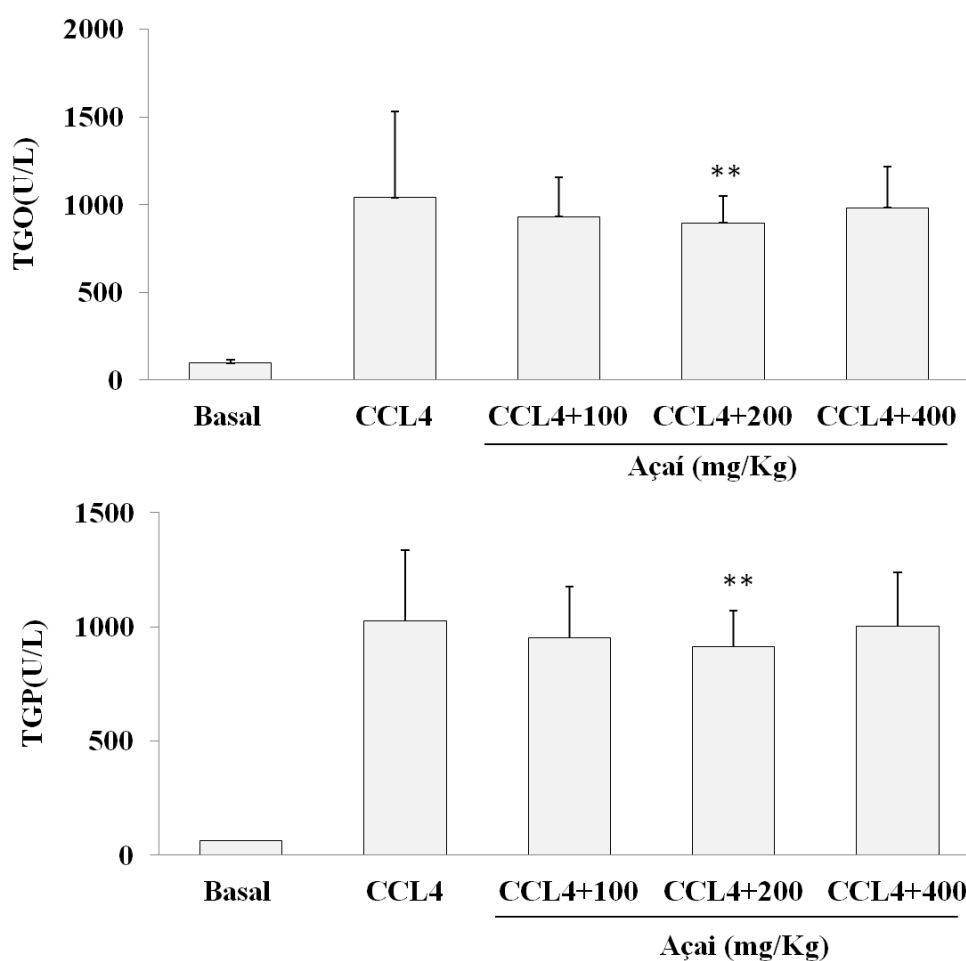


Figura 19. Marcadores bioquímicos hepáticos de camundongos suplementados com extrato seco dos resíduos de açaí nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. TGP: Transaminase glutâmica pirúvica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética. Resultados expressos em média e desvio padrão. (n = 5). Nível de significância de 95 (P < 0,05)**

5.7.2 Tucumã

Quantificação de TBARs

De acordo com figura 20, O tratamento com extrato dos resíduos de tucumã apresentou um efeito na concentração de MDA plasmático. As doses de 100, 200, 400 mg/Kg verificou-se que concentrações deste aldeído nos grupos tratados foram $1,71 \pm 0,01$; $2,27 \pm 0,06$; $0,83 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Os resultados mostram que houve o decréscimo, em relação ao grupo não tratado, sendo essa diminuição mais significativa na dose de 400 mg/mL.

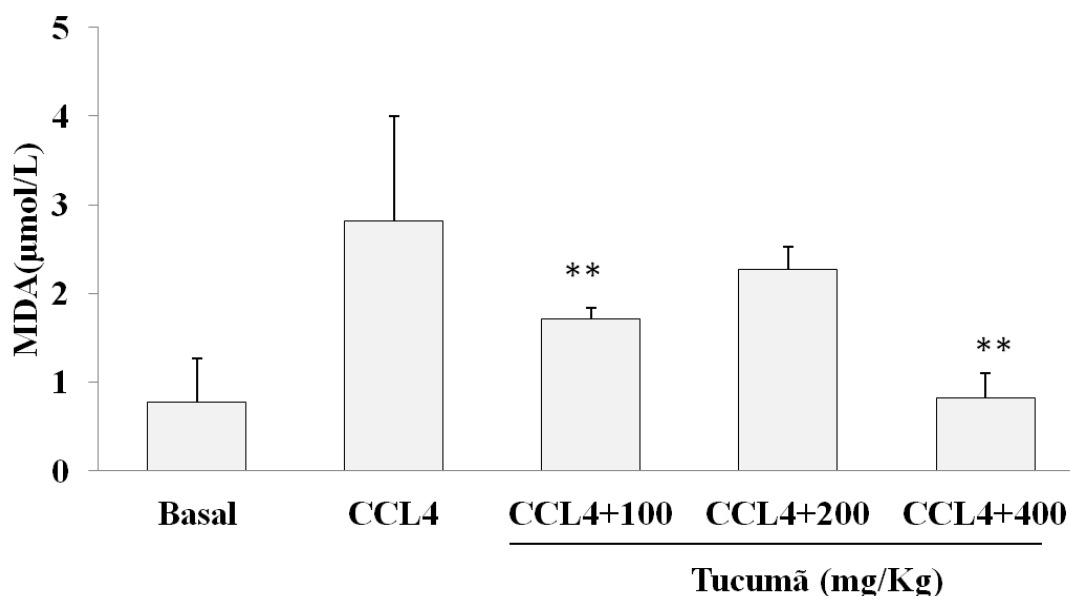


Figura 20. Quantificação de TBARs no plasma de camundongos intoxicados por CCL_4 e suplementados com o extrato dos resíduos de tucumã. Resultados expressos em média e desvio padrão ($n = 5$). Nível de significação de 95% ($p < 0,05$)**

Determinação da atividade da SOD, COT, CAT e tióis totais.

Conforme a figura 21, o extrato do tucumã influenciou na atividade dos marcadores antioxidantes. As dosagens administrada promoveu a elevação da atividade da SOD, destacando o resultados visto a dose de 200 mg/mL que foi $297,40 \pm 257,66$ U/mL.

Observou que a mesma dosagem decresceu a concentração de oxidante no plasma, sendo a concentração de $0,34 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/L}$. Por outro lado, houve o aumento da capacidade oxidativa na dose de 400 mg/mL ($1,21 \pm 0,74$ $\mu\text{mol/L}$). Em relação a quantificação de SH, os animais tratados com 100 e 200 mg/Kg tiveram a elevação no concentração de SH, mas a diminuição da concentração de tióis totais foi observada na dose de 400 mg/Kg ($0,64 \pm 0,14$ mmol/L), enquanto a capacidade antioxidante total apresentada pelo dosagem de 100 mg/Kg foi de $2,90 \pm 0,96$ mmol/L, assim sendo 2 vezes esta capacidade, em relação ao controle ($0,90 \pm 0,10$ mmol)

Atividade hepatoprotetora

De acordo com figura 22, observou que os animais tratados com o extrato dos resíduos de tucumã tiveram o seu perfil da atividade das transaminases melhorada após o tratamento. Os resultados obtidos na quantificação de TGO nas doses administradas foram $624,34 \pm 480,59$; $926,10 \pm 790,97$; $1061,21 \pm 901,28$ U/L, respectivamente. Enquanto a concentrações de TGP observadas nos animais tratados foram $454,30 \pm 56,75$; $877,85 \pm 90,82$; $842,91 \pm 99,09$, respectivamente.

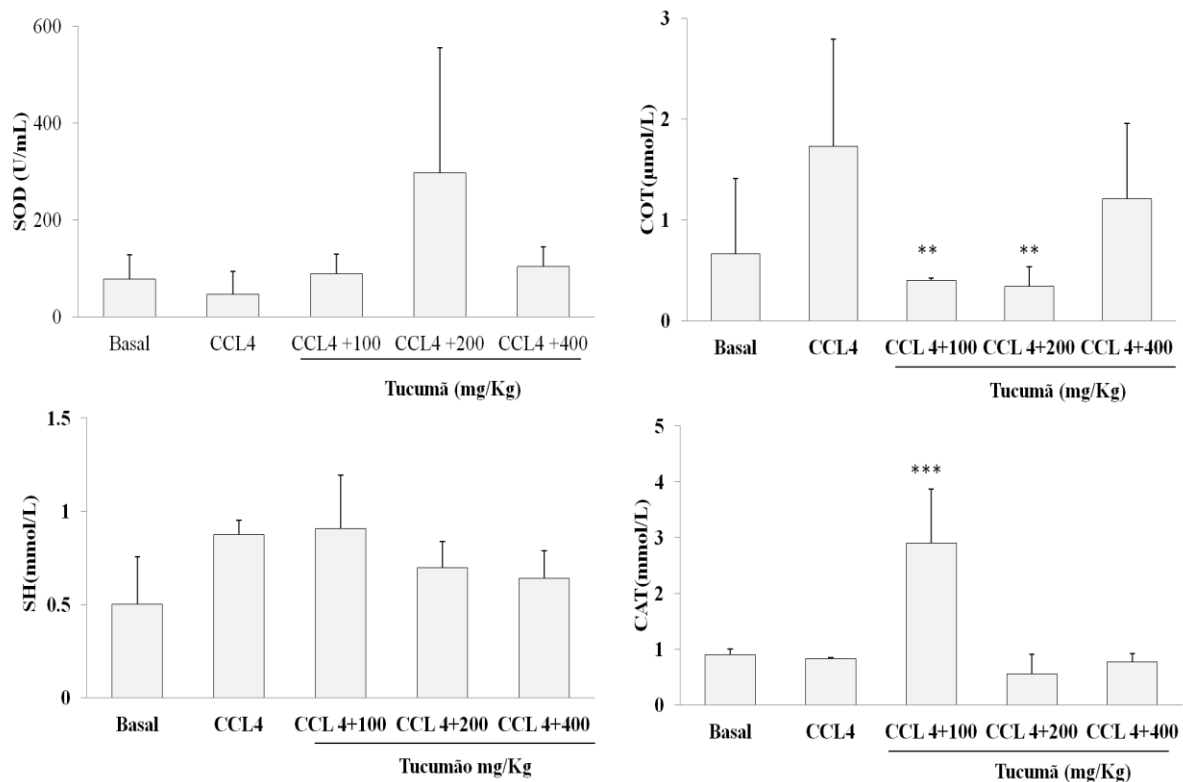


Figura 21. Marcadores antioxidantes plasmático de camundongos suplementados com o extrato seco dos resíduos de tucumã nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. SOD: Superóxido dismutase; COT: Capacidade oxidante total; SH: Tióis totais; CAT: Capacidade antioxidante total. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 5). Nível de significância de 95% (P < 0,05)**

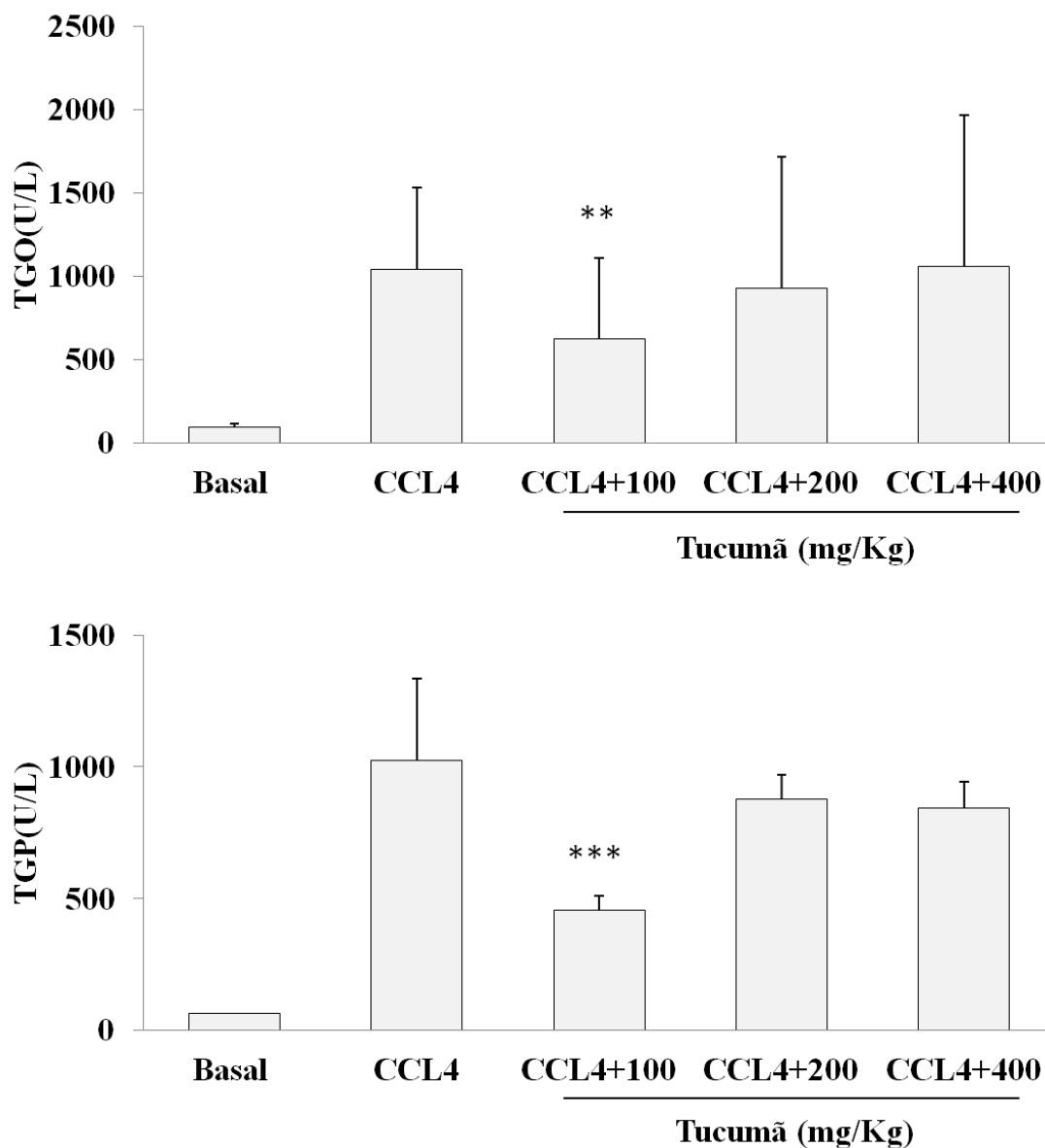


Figura 22. Marcadores bioquímicos hepáticos de camundongos suplementados com extrato seco dos resíduos do tucumã nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e induzidos ao estresse oxidativo por CCl₄. TGP: Transaminase glutâmica pirúvica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética. Resultados expressos em média e desvio padrão. (n = 5). Nível de significância de 95 (P < 0,05)**

5.7.3 Castanha

Quantificação de TBARs

Na figura 23, observa-se que dose 100, 200 e 400 mg/Kg tem concentrações próxima ao encontrados no grupo basal. Os valores da concentração de MDA obtidos dos animais tratados com as respectivas doses foram $0,37 \pm 0,04$; $0,90 \pm 0,04$; $0,56 \pm 0,02$ $\mu\text{Mol/L}$. O tratamento com este extrato teve um efeito significativo na concentração de MDA plasmático, já que houve diferença do grupo tratado em relação ao não tratado ($p < 0,05$).

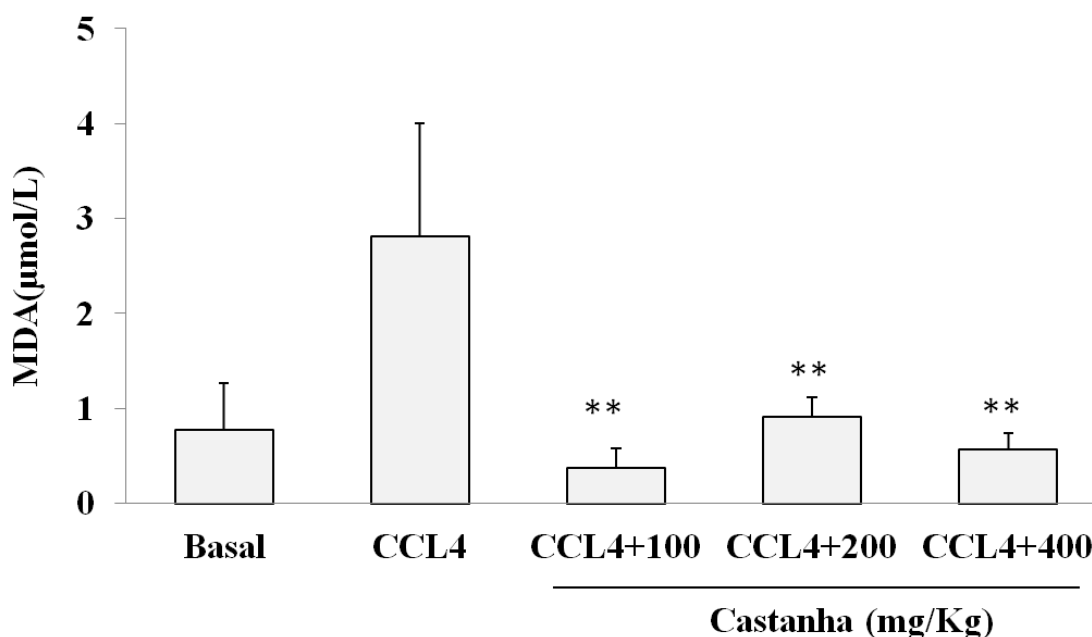


Figura 23. Quantificação de TBARs no plasma de camundongos intoxicados por CCL_4 e suplementados com o extrato dos resíduos da castanha do Brasil. Resultados expressos em média e desvio padrão ($n = 5$). Nível de significação de 95% ($p < 0,05$)**

Determinação da atividade da SOD, COT, CAT e tióis totais.

Em relação ao extrato da castanha, os animais tratados com 200 mg/Kg ($573,35 \pm 578,20$ U/mL) tiveram uma atividade da SOD muito mais efetiva que as 100 ($141,63 \pm 62,11$ U/mL) e 400 mg/Kg ($133,83 \pm 27,88$ U/mL). Por outro lado, no ensaio da COT, a dose de 100 mg/Kg diminuiu a concentração de radicais de oxigênio, sendo esta concentração de oxidante de $0,29 \pm 0,49$ $\mu\text{mol/L}$, nas demais dose foram $0,52 \pm 0,73$ e $0,56 \pm 0,48$ $\mu\text{mol/L}$ (Figura 24).

De acordo com figura 24, a dose de 400 mg/Kg ($0,35 \pm 0,08$ mmol/L) promoveu o decréscimo da SH comparado ao grupo intoxicado ($0,87 \pm 0,07$ mmol/L). Conforme a figura 24, todas as dosagens administradas aos grupos tratados demonstraram uma atividade antioxidante, sendo que os resultados observados foram $0,93 \pm 0,06$ (100 mg/Kg); $0,85 \pm 0,07$ (200 mg/Kg); $0,86 \pm 0,05$ (400 mg/Kg) mmol/L. Observou-se, também que atividade antioxidante ficou um pouco elevada em relação ao grupo basal ($0,90 \pm 0,10$ mmol/L).

Atividade da hepatoprotetora

De acordo com figura 25, observou que os animais tratados com o extrato dos resíduos da castanha tiveram o seu perfil de atividade das transaminases melhorada após o tratamento. Esse efeito é mais significativo nos animais tratados com a dose de 400 mg/Kg. ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos na quantificação de TGO nas doses administradas foram $750,85 \pm 63,97$ (100mg/Kg); $917,33 \pm 0,74$ (200 mg/Kg); $534,3 \pm 351,65$ (400 mg/Kg)

U/L, respectivamente. Enquanto as concentrações de TGP observadas nos animais tratados foram $937,27 \pm 75,34$; $1081,94 \pm 21,57$; $275,70 \pm 139,60$ U/L, respectivamente.

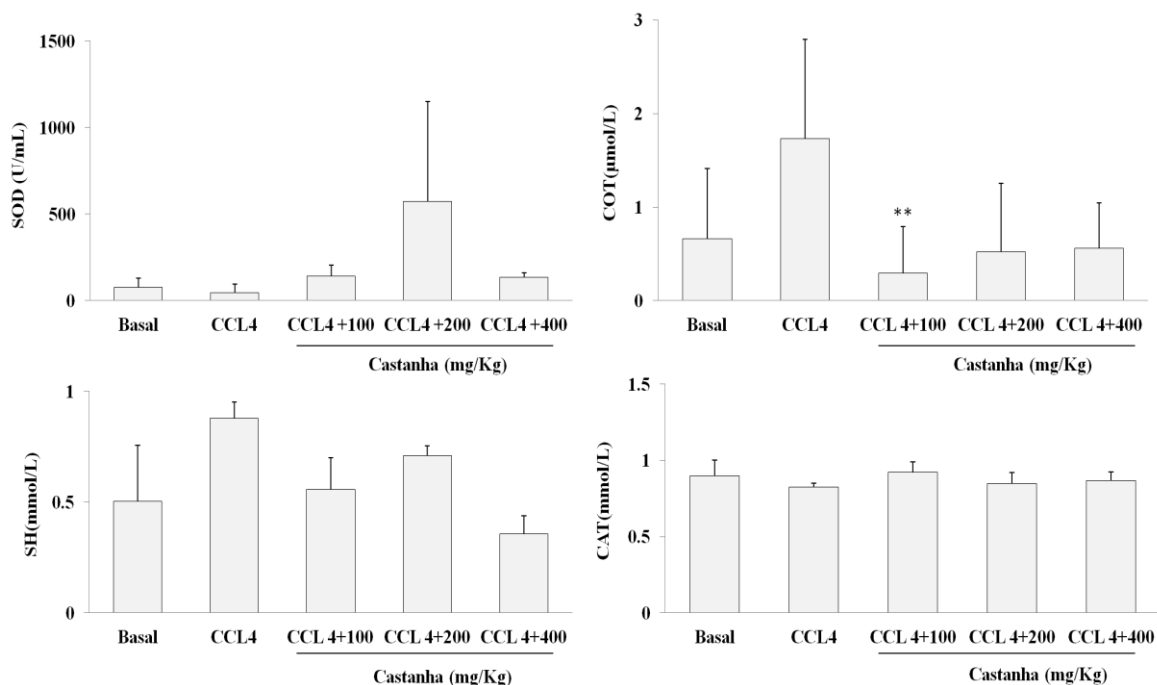


Figura 24. Marcadores antioxidantes plasmático de camundongos suplementados com o extrato seco dos resíduos da castanha do Brasil nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e e induzidos ao estresse oxidativo por CCl_4 . SOD: Superóxido dismutase; COT: Capacidade oxidante total; SH: Tióis totais; CAT: Capacidade antioxidante total. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 5). Nível de significância de 95% ($P < 0,05$)**

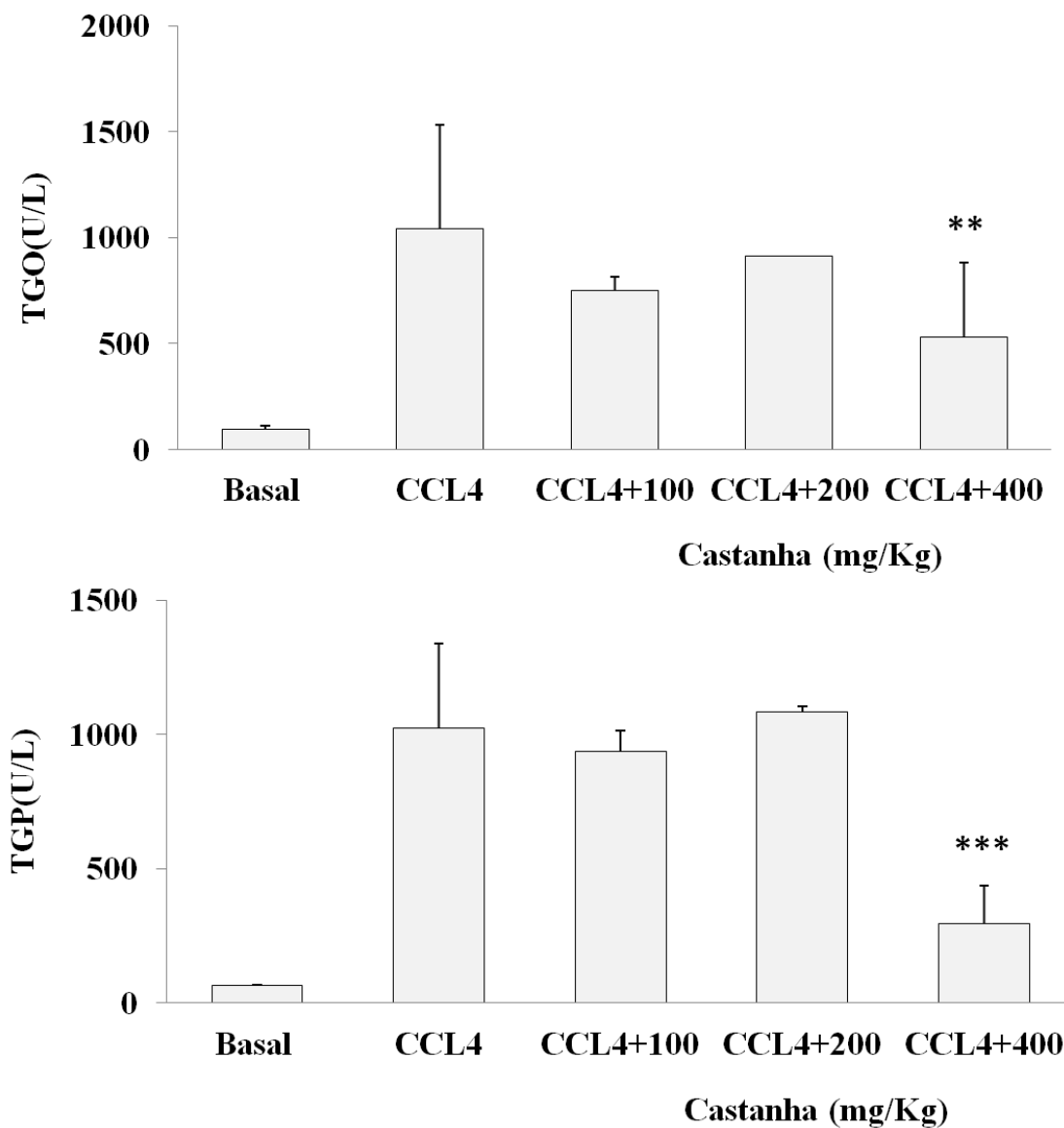


Figura 25. Marcadores bioquímicos hepáticos de camundongos suplementados com extrato seco dos resíduos da castanha do Brasil nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, e submetidos ao estresse oxidativo com CCl₄. TGP: Transaminase glutâmica pirúvica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética;. Resultados expressos em média e desvio padrão. (n = 5). Nível de significância de 95 (P < 0,05)**

6.0 DISCUSSÃO

Atividade antioxidante dos extratos de resíduos in vitro.

O presente estudo buscou avaliar a atividade antioxidante de resíduos de frutos que são consumidos pela população amazônica que são o açaí, tucumã e castanha. A partir da semente do açaí, casca do tucumã e película marrom da castanha obteve-se um extrato hidroetanólico para avaliar a atividade antioxidante em ensaios em *in vitro* e *in vivo*, englobando dentro do último teste para avaliação da atividade hepatoprotetora.

Ao longo dos ensaios observou que os resíduos destes frutos são ricos em compostos fenólicos o que pode conferir a estes atividades antioxidante e hepatoprotetora.

O açaí é conhecido por ter vários composto fenólicos, dentre estes os flavonóides. A concentração de fenólicos encontrados na semente do fruto é consideravelmente alta, confirmando relatos de outras literaturas (RODRIGUES *et al.*, 2006; HEINRICH *et al.*, 2011). Acredita-se que a maior parte dos constituintes existentes sejam antocianinas, já que a quantidade de flavonóides encontrada foi baixa (tabela 4), devido à especificidade do método utilizado para este fenol (PRIOR *et al.*, 2005; PACHECO – PALENCIA *et al.*, 2009). Outros tipos de fenólicos fazem parte da composição química do açaí como a proantocianidinas, derivados do ácido gálico e ligninas (CHIN *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2010; 2011).

Observou-se que os resíduos do tucumã contém uma quantidade considerável de compostos fenólicos em torno de 20%, conforme visto na tabela 4. Sabe-se que este fruto possui vários compostos antioxidantes, porém, a sua maioria são de característica apolar como os carotenos e tocoférois (FERREIRA *et al.*, 2009). Apesar disso, não há tantos artigos relacionados à quantificação de compostos fenólicos contidos em seu

fruto, principalmente na casca. A maioria dos estudos está voltados para caracterização nutricional e a utilização do óleo para biodiesel. (YUYAMA *et al.*, 2008; SIMÕES, 2010).

Entretanto, as quantidades encontradas de fenólicos no extrato da castanha do brasil foram menores em relação aos outros extratos, em torno de 4%, segundo a tabela 4. Este resultado difere ao afirmado por outra literatura de revisão, onde a mesma relata que a castanha do brasil contém altas concentrações de compostos fenólicos em sua película, principalmente ácido elágico, flavonoides, catequinas e epicatequinas (Yang, 2009).

John e Sahidi (2010) encontraram altas concentrações de fenólicos na película da castanha, a concentração era maior a que é encontrada em outras amêndoas. A predominância de constituintes fitoquímicos com capacidade inibição de radical livre conhecido pela polpa do açaí se confirma em sua película (HEINRICH *et al.*, 2011; 2012).

Nos ensaios de atividade sequestrante, os radicais foram sequestrados com baixas concentrações dos extratos, exceto no superóxido, onde foi necessária uma concentração maior para inibir este ânion. Nos testes do DPPH e ABTS foi eficaz a capacidade dos compostos contidos nestes frutos em inibir a ação oxidante destes radicais.

Hogan et al (2010) demonstrou que extrato de açaí possui um elevado potencial de sequestro de oxidantes. Chin *et al.* (2008) observou o mesmo efeito, mas sendo muito ativo frente ao radicais DPPH, com valores de CI_{50} próximos de 4 $\mu\text{g/mL}$. Esta capacidade está relacionada à alta concentração de compostos fenólicos, atribuindo, a maior parte desta atividade, às antocianinas (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; MATHEUS, 2006). Por outro lado, este potencial não é evidente frente às espécies

radicais reativas de oxigênio (ROS) necessitando de concentrações maiores que 50 µg/mL para uma inibição de 50% dos radicais. Talvez isso deve-se ao fato destes ROS's possuírem diferentes reatividades, juntamente com forma de inibição do extrato em questão e de seus antioxidantes (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O tucumã, também apresentou um potencial sequestrante nos ensaios de capacidade sequestro de radicais, devido que em sua composição química há vários fitoquímicos com potencial de inibir a ação oxidativa de radicais livres (RODRIGUEZ – AMAYA *et al.*, 2010). A casca deste fruto mostrou-se capaz de sequestrar agente oxidativos. Nos testes envolvendo os radicais ABTS e DPPH tiveram resultados diferentes àqueles visto no açai, com CI_{50} de $21,77 \pm 1,46$ µg/mL (DPPH) e $37,25 \pm 0,52$ µg/mL (ABTS), apesar de serem concentrações mais altas, isso gera a hipótese que casca possui vários compostos antioxidantes que só eram observados na polpa (LIMA *et al.*, 2011).

Sabe-se que os carotenóides são os compostos antioxidantes mais abundantes neste fruto (AMBRÓSIO *et al.*, 2007). Apesar de ser conhecida a afinidade de frutos oleosos pelos radicais de oxigênio, destacando os peróxidos, não houve um CI_{50} satisfatório para o sequestro do ânion superóxido, em relação ao ácido gálico, mas, o mesmo pressuposto da diferentes reatividades dos ROS's citados acima, pode ser um fator determinante para tal resultado. Acredita-se conhecido que o ânion superóxido está envolvido na origem etiológica de várias doenças de origem de metabólica (NAVES *et al.*, 1998).

Mas, entre os três frutos alvo deste presente, a castanha foi que apresentou baixa atividade de sequestro em todos os testes envolvendo oxidante. Nos ensaios realizados, a castanha apresentou CI_{50} acima de 100 µg/mL. Entretanto, vários trabalhos demonstraram que este fruto contém um potencial antioxidante, não somente pelo seu

teor de fenólicos, mas pelo selênio presente em sua semente. (MIRALIAKBARI E SHAHIDI, 2008; YANG *et al* 2009; KHONKARN *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos de resíduos do açaí e tucumã reduziram a viabilidade das células da linhagem MRC-5 na concentração de 100 µg/m, mas esta concentração é considerada elevada para um ensaio celular de viabilidade devido que em concentração elevadas alguns extratos podem ser citotóxicos, assim sendo segura utilizar concentrações abaixo de 100 µg/mL (Figura 14). Em um estudo realizado por Hogan *et al.* (2010), Eles observaram a atividade antiproliferativa de extratos de açaí ricos em antocianinas frente a linhagem celular C-6 de carcinoma cerebral. Apesar do teste de viabilidade celular ter sido realizado com linhagem celular MRC-5 neste presente estudo, houve toxicidade em concentrações consideradas altas (CHIN *et al.*, 2008).

Verificou-se que extratos ricos em polifenólicos têm atividade supressora e anticancerígena, inibindo a proliferação celular através da ativação a caspase – 3 (BORGES *et al.*, 2013).

O ácido protocatecuíco é um dos fenólicos que apresenta elevada ação apoptótica mediante o mecanismo ativando a caspase e pela fragmentação do DNA. Acredita-se que este fenólico é responsável pela citotoxicidade da semente e da polpa (YIN *et al.*, 2009; DEL CORNÒ *et al.*, 2014).

Um padrão semelhante de citotoxicidade foi observado na casca do tucumã, em concentrações elevadas. Acredita-se que alguns carotenóides e o ácido elágico, presente na casca de muitos frutos amazônico, diminuem a proliferação celular, apresentando um potente efeito antiproliferação contra vários tipos cânceres, principalmente em linfomas (AMBROSIO *et al.*, 2007; WANG E LIU., 2014).

Khonkarn *et al.* (2010) observou que a fração hexânicas de frutos tropicais tiveram um efeito antiproliferativo em adenocarcinomas. Entretanto, a castanha não alterou a viabilidade celular, praticamente, em todas as concentrações avaliadas. Algumas amêndoas semelhantes à castanha são ricas em polifenóis e tocoferóis, cujos os mesmos possuem atividade citoprotetora viabilizando o crescimento celular (MIRALIAKBARI E SHADIHI, 2008; YANG *et al.*, 2009).

No ensaio antioxidante celular todos os extratos demonstram uma atividade antioxidante concentração-dependente, onde a porcentagem de inibição decresce conforme a concentração do extrato diminui. A quercetina possui uma potente atividade antioxidante e foi utilizada neste ensaio como padrão de comparação. Diferentes do padrão, os extratos mantiveram alta atividade antioxidante mesmo em baixas concentrações, sendo mais visível nos extratos de tucumã e castanha. A associação dos entre os polifenóis presente nestes extratos contribue para o potencial antioxidante e constância desta atividade, uma vez que uma mistura contém vários compostos que podem se interagir produzindo uma potencialização desta atividade e o padrão é somente um composto isolado com elevada atividade antioxidante (FREEMAN *et al.*, 2010).

Cada resíduo tem uma classe de fenólicos majoritária responsável pela maior parte do efeito antioxidante, o açaí, o tucumã e a castanha têm como os seus majoritários: as antocianinas, os carotenóides e os tocoferóis, respectivamente. Mas, eles não são responsáveis pela totalidade da atividade, outros constituintes químicos, como ligninas presentes em quantidades traços têm sua participação atuando de forma sinérgica com estes compostos citados (LUI *et al.*, 2004; CHIN *et al.*, 2008; HERRANZ-LÓPEZ *et al.*, 2013).

Em revisão, Lui (2004) descreve a importância da interação entre os fitoquímicos na prevenção de doenças relacionadas à oxidação por radicais livres e esta interação potencializa o poder antioxidante e anticancerígeno dos mesmos. Peyrat-Maillard e cols (2003) e De Kok *et al.* (2008) endossam a hipótese relatando sobre a combinação de efeitos quimiopreventivo de compostos fenólicos, como bem de outros fitocompostos que mais tarde foi confirmado por Hidalgo *et al.* onde a interação entre flavonoide-flavonoides foi o mecanismo chave para a efetividade de alimentos antioxidante.

Atividade antioxidante e hepatoprotetora dos extratos de resíduos in vivo

A ação de radicais livres pode causar injúrias às membranas celulares afetando os tecidos, principalmente o hepático, levando a alteração de processos metabólicos enzimáticos e oxidação de lipídios (SAHREEN *et al.*, 2011).

O fígado é um órgão vital que exerce várias funções incluindo síntese de proteínas e desintoxicação. Porém, este órgão é o alvo mais comum de danos causados por xenobióticos (LIU *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2014). O CCL₄ é considerado uma substância extremamente hepatotóxica, uma vez que os seus metabólitos causam cirrose e fibrose hepática (KIM *et al.*, 2011)

O MDA é o principal marcador da oxidação de lipídios por ser o produto final mais abundante no plasma após a lipoperoxidação e é facilmente quantificado. Este aldeído tem efeito deletério em proteínas e pode causar a fragmentação do DNA (NUCCI *et al.*, 2013)

Os extratos de resíduos diminuíram a concentração deste aldeído no plasma promovendo uma ação antioxidante e hepatoprotetora, destacando a castanha que

reduziu eficazmente concentração deste composto no plasma dos animais tratados. Em relação ao açaí, pode-se atribuir esta ação às antocianinas que podem sequestrar de forma eficiente os peróxidos (HOGAN *et al.*, 2010). Além disso, as antocianinas promovem a redução dos triglicerídeos, que são os lipídios mais suscetíveis à oxidação por peróxidos, reduzindo o risco de aterosclerose e de outras doenças coronarianas (BOECHAT *et al.*, 2014).

Guerra *et al.* (2011) fizeram um estudo em ratos Fisher, induzindo a diabetes neste animais pela administração de estreptozotocina. Observaram que a suplementação com 2% de açaí diminuiu a produção de ROS e lipoperoxidação havendo o decréscimo da concentração de malondialdeído (MDA).

Em relação à capacidade da castanha de prevenir a oxidação de lipídios, Noh *et al.* (2011) verificaram que o extrato da película de *Castanea crenata*, uma castanha semelhante à castanha do Brasil, inibiu a oxidação do lipídios influenciando a formação de produtos finais aldeídicos em camundongos que passaram por um dano hepáticos induzido por etanol.

Os perfis dos marcadores enzimáticos SOD e transaminase foram melhorados nos animais tratados com extrato dos resíduos de açaí e foi na dose 200 mg/Kg onde houve a melhor resposta. A SOD é afetada extremante pela lipoperoxidação havendo o decréscimo da concentração da enzima ou, até mesmo, sua inativação (MANNA *et al.*, 2006).

Souza *et al.* (2012) observaram que a dislipidemia em ratos hipercolesterolêmicos e expressão do gene HMG CoA-R foi diminuída com a suplementação com açaí, sugerindo a atuação dos composto fenólicos presente no fruto no efeito hipocolesterolêmico. Moura *et al.* (2012) verificaram que marcadores

inflamatórios e a atividade de enzimas antioxidantes foram reduzidos em camundongos expostos as toxinas do cigarro modulando o processo de inflamação.

Os biomarcadores de estresse oxidativos nos animais tratados com os extratos dos resíduos de açaí, tucumã e castanha foram eficazmente reduzidos indicando uma ação antioxidante e hepatoprotetora por parte destes extratos. Tal capacidade pode ser atribuída aos compostos fenólicos que podem reduzir a concentração destes biomarcadores atuando na inibição da oxidação dos tecidos, principalmente o hepático promovendo, assim, um efeito hepatoprotetor e antioxidante (YANG *et al.*, 2010).

Porem, doses elevadas de extratos ricos em fenólicos pode ter um efeito reverso, ou seja, pro-oxidante. Isto é observado na capacidade oxidativa total do açaí, onde a dose de 400 mg/Kg aumentou a concentração de ROS, em relação ao controle. Bouayed e Bohn (2010) relatam que altas doses de antioxidantes podem ter efeitos deletérios devido à síntese de radicais de oxigênio. Este efeito pró-oxidante, também, pode está relacionado aos efeitos citotóxicos apresentados pelos extratos de açaí e tucumã, uma vez que as doses elevados dos mesmos afetou a viabilidade dos fibroblastos expostos à estes extratos.

Os tióis totais mostraram-se diferente do observado em outros estudos pelo fato que grupo intoxicado por CCL₄ teve a concentração elevada de proteínas sulfuradas, sendo que o grupo basal deveria apresentar este perfil. Todavia, administração do extrato de açaí teve este efeito devido os flavonoides terem a capacidade de elevar a concentração de proteínas antioxidante pela prevenção de sua degradação (SIWAK *et al.*, 2013). Nassiri – Asl *et al.* (2013) observaram que a rutina, um flavonóide presente no açaí, elevou a concentração de tióis totais em camundongos com estresse oxidativo induzido por ácido kaínico.

Os marcadores antioxidante e hepático dos camundongos tratados com extrato de resíduos de tucumã demonstram uma resposta hepatoprotetora, principalmente nas transaminases, com destaque a TGP, onde houve uma diferença extremamente significativa entre das doses administradas, sendo a dose 100 mg/Kg a mais efetiva na redução da atividade destas enzimas em relação ao grupo não tratado.

Além disso, o extrato do tucumã diminuiu significativamente oxidação dos lipídios, diminuindo formação do MDA no plasma. A quantidade de tióis totais foi elevada nos animais tratados com extrato de resíduos de tucumã provando que esta oleaginosa tem a uma capacidade de prevenir danos a proteínas antioxidantes.

Os benefícios nutricionais do fruto tucumã são bem conhecidos, devido ser rico pigmentos precursores de vitamina A (YUYAMA *et al.*, 2008). Os frutos da família da *Arecaceae*, a mesma que o tucumã faz parte, são conhecidos por terem um potencial antioxidante e hepatoprotetor. Este potencial foi observado com extratos da *Elais guinnensis* em estudo realizado por Sasidharan *et al.*(2012), onde o extrato da folha apresentou um efeito hepatoprotetor e diminuiu a oxidação lipídica em camundongos intoxicados por paracetamol. Al-Shoaibi *et al.* (2012) atribuíram a redução das concentrações das transaminases e de TBARs, em coelhos induzidos a estresse oxidativo por CCL4, aos composto fenólicos contido em frutos de palmeiras. Tucumã, por fazer parte da mesma família, também apresentou esta mesma capacidade hepatoprotetora relatados nos estudos citados acima.

Surpreendentemente, a capacidade antioxidante total foi elevada em doses reduzidas. Isso foi observado por Singh e Prakash (2013) que fizeram um screening com várias plantas tropicais e constataram que as mesmas possuem vários compostos com elevada capacidade antioxidante, dentre eles composto fenólicos.

A castanha do Brasil pode melhorar a atividade de enzimas antioxidante devido ao selênio. O selênio é um metal com potencial antioxidante quando associados com selenoproteínas atuando de forma adjuvante promovendo a ação antioxidante destas proteínas (YANG, 2009; SANTOS *et al.*, 2013). O extrato de seus resíduos demonstrou uma capacidade antioxidante similar em todas as doses administrada. Isso se refletiu na atividade da SOD e das transaminases, onde aumentou a atividade da primeira e reduzindo significativamente concentração de TPG no plasma, bem como reduziu a capacidade oxidante no plasma. O extrato da película da *Castanea crenata* reduziu as concentrações das transaminases nos camundongos tratados revertendo o dano hepático (NOH *et al.*, 2011). O mesmo foi observado em outro estudo que extratos de resíduos de noz-peçã uma atividade hepatoprotetora diminuindo a atividade de destes marcadores de hepático (MÜLLER *et al.*, 2013). Assim, extratos de películas de amêndoas como a castanha do Brasil possuem uma elevada atividade hepatoprotetora e um potencial farmacológico a ser explorado.

A castanha apresenta em sua composição proteínas sulfuradas contribuindo para melhora do estado plasmático de tióis totais, corroborando com o perfil de tióis observado no presente trabalho (LEMIRE *et al.*, 2012). Além disto, este fruto contém composto fenólicos altamente antioxidante e sua atividade foi descrita por John e Sahidi *et al.* (2010) onde fenólicos como ácido elágico, gálico e seus derivados tiveram uma elevada atividade antioxidante.

Os resultados compilados mostram que estes resíduos tem potencial para serem mais uma fonte alternativa de compostos fenólicos, assim podendo ser utilizados em formulações de cosméticos ou nutracêuticos.

Baslatro *et al.* (2011) utilizando a farinha do bagaço da uva para formulação de barras de cereais e observaram que o bago possuía fibra integrais, além de ser

antioxidante. Kiasso *et al.* (2009) obtiveram vários compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante dos resíduos da cebola, aplicando várias técnicas de extração. Eles demonstraram que com aplicações de extrações específicas para extração de compostos fenólicos pode-se obter extratos ricos em fenólicos a partir dos resíduos. Sousa e Correa *et al.*, verificaram que extratos resíduos de maçã descartados no processamento destes frutos, possuíam atividade antioxidante e, os mesmo inibiram a atividade da amilase. Estes estudos mostram que podemos agregar valor nos resíduos descartados aproveitando este potencial econômico que eles dos compostos extraídos destes resíduos.

7.0 CONCLUSÃO

- Os extratos hidroetanólicos foram os que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos;
- Os extratos dos resíduos de açaí e tucumã mostram ter melhor potencial antioxidante *in vitro* que o da castanha e apresentaram esta capacidade varredora na maioria dos radicais avaliados, exceto o ânion superóxido;
- Nenhum dos extratos apresentou toxicidade em fibroblastos até a concentração de 50 µg/mL.
- Todos os extratos tiveram uma atividade antioxidante em células, com inibições próximas a 90% de inibição na concentração de 50 µg/mL;
- O tratamento de camundongos, com lesão hepática e estresse oxidativo induzido pelo CCL₄, com os extratos foi eficaz na redução dos marcadores de hepatotoxicidade e lipoperoxidação, sendo a castanha que melhor promoveu esta proteção;
- Os resíduos de açaí, castanha e tucumã possuem um potencial para serem usados como fonte alternativa para matérias-primas em formulações de cosméticos ou nutracêuticos, bem como utiliza-los como adjuvantes pela indústria farmacêutica.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDILLE, M. D.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n.4, p. 891–896. 2005

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. D. A. C.; FARO, Z. P. D. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista da nutrição**. v. 19. n. 2, 233-243. 2006.

ALARY, J.; GUERAUD, F.; CRAVEDI, J. P. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. **Molecular Aspects of Medicine** v. 24, p. 177–187, 2003.

ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F.; WIKTOROWICZ, R. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. **Food Chemistry**, v. 89, p. 69–76, 2005.

AL-SHOAIBI Z, AL-MAMARY M, AL-HABORI M, AL-ZUBAIRI A, ABDELWAHAB S. In vivo Antioxidative and Hepatoprotective Effects of Palm Date Fruits (*Phoenix dactylifera*). **International Journal Of Pharmacology**. v. 8, n.3, p.185-191. 2012.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 01-09. 2007.

ASCARI, R. A.; BORTOLINI, S. M.; KARAL, A. Análise do gerenciamento dos resíduos. **Revista Contexto & Saúde**, v. 12 n. 23, p. 75-80. 2012.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n.1, p. 391-396. 2011.

BALESTRO, E. A.; SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C. Utilização de bagaço de uva com atividade antioxidante na formulação de barra de cereais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n. 2, p. 195-201. 2011.

BARCELLOS, P.; S.; SILVA, T.; A.; CHAGAS, D.; C.; NASCIMENTO, F.; R.; F.; GUERRA, R.; N.; M.; BARROQUEIRO, E.; S.; B. Avaliação Bioquímica e toxicológica do extrato dos frutos de *Euterpe oleracea*, Martius. **Revista Ciência e Saúde**, São Luís, v.12, n.2, p. 91-96, 2010.

- 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
- BARRETO, G. P.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n.10, p. 1856-1861. 2009.
- BALOGH, L. M.; ATKINS, W. M. Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, p. 165–178, 2011.
- BENEDETTI, A.; CASINI, A. F.; FERRALI, M.; COMPORTI, M. Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. **Biochemistry Journal**, v. 180, p. 303–312; 1979.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.
- BOBBIO, F. O., DRUZIAN, J. I, ABRÃO, P. A, BOBBIO, P. A, FADELLI, S. Fruits of açai palm (*Euterpe oleracea*) (Mart.) identification and quantification of the antocyanins. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20 n.3, p.32-37. 2000.
- BONY, E.; BOUDARD F.; BRAT P. Awara (*Astrocaryum vulgare Mart.*) pulp oil: Chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. **Fitoterapia**, v. 83, n.1, p. 33–43. 2012.
- BOËCHAT, I. G.; KRÜGER, A.; CHAVES, R. C.; GRAEBER, D.; GÜCKER, B. Land-use impacts on fatty acid profiles of suspended particulate organic matter along a larger tropical river. **Science of The Total Environment**, v. 482, 62-70. 2014.
- BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, n.4, p. 228-237. 2010.
- BIANCHI, M.; L.; P.; ANTUNES, L.; M.; G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista da Nutrição** Campinas, v.12, n.2, p. 123-130, 1999.
- BLOMHOFF, R.; CARLSEN, M.; H.; ANDERSEN, L.; F.; JACOBS, D.; R. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n.2, p. 52–60, 2006.
- BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, Q.; T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 82, n.2, p. 155-158. 2002.

- BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHON, J. Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, n.6, p. 865-874. 2001.
- BESTWICK C. S.; MILNE, L. Effects of beta-carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within postconfluent Caco-2 intestinal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1474, n.1, p. 47-55, 2000.
- 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, bioinseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica). Belém, p.207. 2000.
- BIANCHI, M.; L.; P.; ANTUNES, L.; M.; G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista da Nutrição** Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutrition Research**, v. 17, n.3, p. 547-580, 1997.
- CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**.v.6, n.4, p. 391-397, 1997.
- CARSOL M. A.; POULIQUEN-SONAGLIA I.; LESGARDS G.; MARCHIS-MOUREN G.; PUIGSERVER A.; SANTIMONE M. A new kinetic model for the mode of action of soluble and membrane-immobilized glutathione peroxidase from bovine erythrocytes: Effects of selenium. **European Journal of Biochemistry**, v. 247, n.1, p. 248-255, 1997.
- 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**, 279p. 1991.
- CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 535-540. 1997.
- CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. Efeitos da deficiência de água em plantas de *Euterpe oleracea* (açai). **Revista de Brasileira Botânica**, São Paulo, v.23, n.3, p. 225-230, 2000.
- CATENEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.1, p. 93-102, 2008.
- CARVALHO, I. M. M; DE QUEIROZ, J. H.; BRITO, L. F.; TOLEDO, R. C. L.; DE SOUZA, A. L. O consumo de castanhas pode reduzir o risco de processos inflamatórios e doenças crônicas. **Enciclopédia biosfera**, v.8, n.15, p. 1977. 2012.
- CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 441. 2007.

- CERUTTI, P. A. Oxyradicals and cancer. **Lancet**, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.
- CLEMENT, C. R.; LLERAS, P. E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Revista Brasileira de Agrociências.**, v. 9, n. 1-2, p. 67-71, 2005.
- COVINGTON, A. D. Modern tanning chemistry. **Chemical Society Reviews**, v.26, n.2, p. 111-126. 1997.
- COÏSSON, J.; D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G.; CAPASSO, M.; ARLORIO, M. Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, v. 38, n.8, p. 893-897, 2005.
- COTELLE N.; BERNIER J. L.; CATTEAU J. P.; POMMERY, J.; WALLET J. C.; GAYDOU E. M. Antioxidant properties of hydroxylflavones. **Free radical biology and medicine**, v.20, n.1, p. 35-43. 1996
- COLPO, E.; VILANOVA, C. D. D.; REETZ, L. G. B.; DUARTE, M. M.; FARIAS, I. L. G.; MEINERZ, D. F.; ROCHA, J. B. T. Brazilian nuts consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**. v. 30, n.4, p. 459–465 2014.
- COMINETTI, C.; DE BORTOLI, M. C.; PURGATTO, E.; ONG, T. P.; MORENO, F. S.; GARRIDO JR, A. B.; COZZOLINO, S. M. F. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v.27, n.9, 891-896. 2011.
- COMINETTI, C.; DE BORTOLI, M. C.; GARRIDO JR, A. B.; COZZOLINO, S. M. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, n.32, n.6, p.403-407. 2012.
- CHEN, C.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food chemistry*, v.43, n.3, p.177-183. 1992.
- CHIN, Y. W.; CHAI, H. B.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D. Lignans and other constituents of the fruits of Euterpe oleracea (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.17, p.7759-7764. 2008.
- DASTMALCHI, K, DAMIEN DORMAN, H.; J, KOSAR M.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 239-248. 2007.
- DKHAR, P.; SHARMA, R. Effect of dimethylsulphoxide and curcumin on protein carbonyls and reactive oxygen species of cerebral hemispheres of mice as a function of age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28(5), p. 351–357. 2010.

- DA SILVA, M.A.A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista da Nutrição**, v.12, n.1, p. 5-19. 1999
- DEL POZO-INSFRAN D, BRENES C.; H.; TALCOTT S.; T. Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.6), p.1539-45, 2004.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.54, n.4, p.1222-1229. 2006.
- DE SOUZA S. G. A. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.58, n.8), p. 4666-4674. 2010.
- DE ZWART, L.; L.; MEERMAN, J. H.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.1, p.202-226. 1999.
- DE ALMEIDA, C. F. C. B. R.; DE LIMA E SILVA, T. C.; DE AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. D. S.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of arid environments**, v. 62, n.1, p.127-142. 2005..
- DEMAJOROVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos as novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, v.35, n. 3, p. 88-93, 1995.
- DE KOK, T. M.; VAN BREDA, S. G.; MANSON, M. M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. **European journal of nutrition**, v. 47, n.2, 51-59. 2008
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life sciences**, v. 65, n.4), p. 337-353. 1999.
- DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**. v. 3, n.1, p. 1-21. 2004.
- Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology** v.186, p. 421-431. 1990.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.1, p.35-38 2006.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n.1, p.70-7, 1959.

- EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n.1, p 1103–1111. 2005.
- ESCRICHE, I.; KADAR, M.; JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH, E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food chemistry*, v.142, p.135-143. 2014.
- EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical biochemistry**, v. 232, n.2, p.243-248. 1995
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, S. A. D. N.; DE CASTRO, A. F.; GENTIL, D. F. D. O. Emergência de plântulas de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em função do pré-tratamento das sementes e da condição de semeadura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1189-1195. 2010.
- FILOGÔNIO, C. D. F. B.; SOARES, R. V.; HORTA, M. C. R.; PENIDO, C. V. D. S. R.; CRUZ, R. D. A. Effect of vegetable oil (Brazil nut oil) and mineral oil (liquid petrolatum) on dental biofilm control. **Brazilian oral research**, v.25, n.6, p.556-561. 2011.
- FREEMAN, B. L.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. **Journal of food science**, v.75, n.6, p.570-C576. 2010.
- FERREIRA, E. D. S., LUCIEN, V. G., AMARAL, A. S., & SILVEIRA, C. D. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de Tucumã (*astrocaryum vulgare mart*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.4, p.427-433. 2009.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in lipid research**, v. 43, n.3, p. 228-265. 2004.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.8, p.3597-3604. 2000.
- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n.11, p. 1106-1114. 2000.
- GORDON, André *et al.* Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae Mart.*) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, n.2, p. 256–263. 2012.

GUEDES, A. M. M.; FRANÇA, L. F.; CORRÊA, N. C. F. Caracterização física e físico-química da polpa de Tucumã (*Astrocaryum vulgare*, Mart.). In.: V CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS. Campinas, Anais. Campinas, **Sociedade Brasileira de Ciência dos Alimentos**, 2005.

GUERRA, J. F. D. C.; MAGALHÃES, C. L. D. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188-194, 2011.

GUERAUD, F.; PEIRO, G.; BERNARD, H.; ALARY, J.; CREMINON, C.; DEBRAUWER, L.; RATHAHAO, E.; DRUMARE, M. F.; CANLET, C.; WAL, J. M.; BORIES, G. Enzyme immunoassay for a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medical**. v.40, p.54–62, 2006.

GOMES, F. D. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer; Carotenoids: a possible protection against cancer development. **Revista da nutrição**, v. 20 n.5, p.537-548. 2007.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v.108, n.16, 1912-1916. 2003.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v.142, n.2, 231-255. 2004.

HUANG, D.; OU, B.; RONALD, L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n.6, p. 1841-1856. 2005.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n.4, p. 809-812. 1978.

HAN, S. K.; MYTILINEOU, C.; COHEN, G. 1-DOPA Up-Regulates Glutathione and Protects Mesencephalic Cultures Against Oxidative Stress. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n.2, p. 501-510. 2002.

HAEGELE A. D; GILLETTE C; O'NEILL C; WOLFE, P. HEIMENDINGER, J.; SEDLACEK S. Plasmamaxanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, v. 9, n.4, p. 421-425. 2000.

- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n.7, p. 601-617. 1995.
- HATHERILL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **AgentsActions**. v. 32, p. 351-358, 1991.
- HIRAI, S.; ISHIBUCHI, T.; WATABE, S.; MAKITA, M.; KISHIDA, C.; TAKAGAKI, M.; EGASHIRA, Y. Protective Effect of Red-Stemmed Type of *Ipomoea aquatica* Forsk against CCl₄-Induced Oxidative Damage in Mice. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 57, n.4, p. 306-310. 2011.
- HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K.; Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, p. 208–214, 2010.
- HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidadede compostos bioativos de alimentos. In. Cozzolino, S.M.F. – **Biodisponibilidadede Nutrientes**, p. 879-914. 2012
- HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 380-385, 1994.
- HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.) A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v.4, n.1, 10-21. 2011.
- HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.). **Zeitschrift für Phytotherapie**, v.33. 2012.
- HERRANZ-LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; PÉREZ-SANCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; MENÉNDEZ, J. A.; MICOL, V. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. **Phytomedicine**, v.19, n.3, p.253-261. 2012.
- HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.121, n.3, p.691-696. 2010.
- JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, v. 24, n.1, p.112-119. 2001.
- JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, 2(3), 196-209. 2010.
- JORDHEIM, M.; GISKE, N. H.; ANDERSEN, O. M. Anthocyanins in caprifoliaceae. **Biochemical systematics and ecology**, v. 35, n.3, p.153-159. 2007.

- KADIISKA, M. B.; GLADEN, B. C.; BAIRD, D. D.; GERMOLÉC, D.; GRAHAM, L. B.; PARKER, C. E.; BARRETT, J. C. Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl poisoning?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n.6, p. 698-710. 2005.
- KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, n.1, p. 152-157. 2011.
- KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea*, Mart.). **Food Chemistry**, v.122, n.3, p.610-617. 2010.
- KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUČA, K., JUN, D.; JAHODAR, L.; OPLETAL, L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n.5, p.436-447. 2008
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, G. A.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.
- KHONKARN, R.; OKONOGLI, S.; AMPASAVATE, C.; ANUCHAPREEDA, S. Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.8, p.2122-2129. 2010.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n.3, p. 628-633. 2003.
- KIM, H. Y.; PARK, J.; LEE, K. H.; LEE, D. U.; KWAK, J. H.; KIM, Y. S.; LEE, S. M. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. **Toxicology**, v.282, n.3, p.104-111. 2011.
- KIASSOS, E.; MYLONAKI, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. **Innovative food science & emerging technologies**, v.10, n.2, p.246-252. 2009.
- KHIARI, Z.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems. **Food and bioprocess technology**, v.2, n.4, p.337-343. 2009.
- LEMIRE, M.; PHILIBERT, A.; FILLION, M.; PASSOS, C. J. S.; GUIMARÃES, J. R. D.; BARBOSA JR, F.; MERGLER, D. No evidence of selenosis from a selenium-rich diet in the Brazilian Amazon. **Environment international**, v.40, p.128-136. 2012.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e de estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 13, p. 291-297, 2007.

LIU, C. M.; ZHENG, G. H.; MING, Q. L.; CHAO, C.; SUN, J. M. Sesamin protects mouse liver against nickel-induced oxidative DNA damage and apoptosis by the PI3K-Akt pathway. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.61, n.5, 1146-1154. 2013.

LOPEZ-REVUELTA A.; SANCHES-GALLEGO J. I, HERNANDEZ- HERNANDEZ A.; SANCHEZ-YAGUE J, LLANILLO M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico Biological Interactions**, v. 161, n.1, p.79-91, 2006

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Editora Plantarum**, Nova Odessa. 1992

LORENZI, H., SOUZA, H. M., COSTA, J. T. M., CERQUEIRA, L. S. C. & BEHR, N. Palmeiras do Brasil: nativas e exóticas. **Editora Plantarum**. Nova Odessa. 1996

LOWE G.M.; BOOTH L.A.; YOUNG A.J.; BILTON R. F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. **Free Radicals Research**, v. 30, n.2, p.141-51. 1999.

LIU R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v.134, n.12, p. 3479-85. 2004.

LIMA, A. L. D. S.; LIMA, K. D. S. C.; GODY, R. L. D. O.; ARAÚJO, L. M.; PACHECO, S. Application of low doses of ionizing radiation in the Brazilian fruit tucumã (*Astrocarium vulgare* Mart.). **Acta Amazonica**, v.41, n.3, p.377-382. 2011.

MANNA, P., SINHA, M.; SIL, P. C. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. **BMC complementary and alternative medicine**, 6(1), 33. 2006.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ-SONOJA, R.; SANCHEZ, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific orle of the microorganism involved in the process. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 62, p. 484-488, 2003.

MOURA, R. S.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; PIRES, K. M. P.; NESI, R. T.; RESENDE, A. C.; VALENCA, S. S. Effects of *Euterpe oleracea*, Mart.(AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, n.19, n.3, p.262-269. 2012.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p.33-39, 2008.

MATHEUS, M. E.; FERNANDES, S. B. D. O.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; MENEZES, F. D. S.; FERNANDES, P. D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea*

Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n.2, p.291-296. 2006.

MANNERVIK, B.: Glutathione peroxidase **Methods in Enzymology**, Academic Press, New York, v.113, p. 490. 1985.

MARANHÃO, P. A.; KRAEMER-AGUIAR, L. G.; OLIVEIRA, C. L.; KUSCHNIR, M. C.; VIEIRA, Y. R.; SOUZA, M. G.; BOUSKELA, E. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutrition & Metabolism**, v.8, n.1, p.32. 2011

MASUCHI, M. H.; CELEGHINI, R. M. D. S.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R. Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. **Química Nova**, v. 31, n.5, p.1053-1057. 2008

MARINHO, H. A.; CASTRO, J. S. Carotenóides e valor de próvitamina A em frutos da região amazônica: pajurá, piquiá, tucumã e umari. In **XVII Congresso brasileiro de fruticultura** (Vol. 17). Belém: Meio magnético. 2002.

MARK, R. J.; LOVELL, M. A.; MARKESBERY, W. R.; UCHIDA, K.; MATTSON, M. P. A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β -Peptide. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n.1, p. 255-264, 1997.

MARKESBERY, W. R.; LOVELL, M. A. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 19, n.1, p. 33-36. 1998.

MENEZES NETO, M. A.; ALVES J. D.; OLIVEIRA, L. E. M. Anaerobic metabolism of Euterpe oleracea. II-Plant tolerance mechanism to anoxia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.7, n.1, p. 47-51, 1995.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Nutritional value of açai pulp (Euterpe oleracea Mart.) liophylized. **Acta Amazonica**, v. 38, n.2, p. 211-316. 2005.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods in enzymology**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MENDES, E. 2003. Demanda pode tornar açai raro e caro no Pará, O Liberal. 15/02/2003. Disponível em www.oliberal.com.br. Acesso em 20/12/2012.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n.4, p. 673-751. 2000.

MIRANDA, I. P. A. Frutos de palmeiras da Amazônia. Manaus: MCT/INPA, p. 120. 2001.

MORAIS, J. D.; DIAS, M. R. P. Elaboração do doce em massa e néctar de tucumã (*Astrocaryum vulgare*, Mart). 96f. Monografia (Especialista em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará. Belém, 2001.

- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.5, p. 892-896, 2005.
- 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
- MÜLLER, L. G.; PASE, C. S.; ECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.; BOUFLEUR, N., PRADO, A. C. P.; BURGER, M. E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n.1, p. 65-171. 2013.
- MUNTEANU, A.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. (2004). Anti-atherosclerotic effects of vitamin E: myth or reality. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 8(1), p. 59-76. 2004.
- MURAKOSHI, M.; TAKAYASU, J.; KIMURA O.; KOHMURA E.; NISHINO H.; IWASHIMA A. Inhibitory effects of alpha-carotene on proliferation of the human neuroblastoma cell line GOTO. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, n.21 p.1649-52, 1989.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods in enzymology** v. 251, p. 3-7. 1995.
- MIRALIKBARI, H.; HAHIDI, F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. **Food Chemistry**, v.111, n.2, 421-427. 2008.
- NAGAI, M.; AOKI, M.; MIYOSHI, I.; KATO, M.; PASINELLI, P.; KASAI, N.; ITOYAMA, Y. Rats expressing human cytosolic copper–zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n.23, p. 9246-9254. 2001.
- NERY-DIEZ, A. C. C.; CARVALHO, I. R.; AMAYA-FARFÁN, J.; ABECIASORIA, M. I.; MIYASAKA, C. K.; FERREIRA, C. D. S. Prolonged ingestion of prehydrolyzed whey protein induces little or no change in digestive enzymes, but decreases glutaminase activity in exercising rats. **Journal of medicinal food**, v.13, n.4, p.992-998. 2010.
- NASSIRI-ASL, M.; NASERPOUR, F. T.; ABBASI, E.; SADEGHNIA, H. R.; SHEIKHI, M., LOTFIZADEH, M.; BAZAHANG, P. Effects of rutin on oxidative stress in mice with kainic acid-induced seizure. **Journal of integrative medicine**, v.11, n.5, p.337-342. 2013.
- NAKAYAMA, G.R. Assessment of the alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal Immunology Methods**, v. 204, p. 205–208. 1997
- NAVES, M. M. V. Beta caroteno e o câncer. **Revista da Nutrição**. Campinas, v.11, n.2, 99-115, 1998.

- NETO, S. F. C.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; DO PRADO, I. N.; DOS SANTOS, G. T.; FREGADOLLI, F. L.; DALPONTE, A. O. Mandioca e resíduos das farinheiras na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial. **Revista Brasileira de zootecnia**, v. 29, n.6, p. 2099-2108. 2000.
- NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n.4, p.531-537. 2000.
- NISHINO, H.; TOKUDA, H.; MURAKOSHI, M.; SATOMI, Y.; MASUDA, M.; ONOZUKA, M. Cancer prevention by natural carotenoids. **Biofactors**, v. 13, n.1, p. 89-94. 2000.
- NISHINO H.; MURAKOSHI M.; LI T.; TAKEMURA M.; KUCHIDE, M.; KANAZAWA M. Carotenoids in cancer chemoprevention. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21, n.3, p. 257-264. 2002.
- NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n.1, 668-676. 2005.
- NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49 n.4, p.503-515. 2010.
- NISHIKIMI, M.; APPAJI RAO, N.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and biophysical research communications**, v.46, n.2, p.849-854. 1972.
- NOH, J. R.; KIM, Y. H.; GANG, G. T.; HWANG, J. H.; LEE, H. S.; LY, S. Y.; LEE, C. H. Hepatoprotective effects of chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract against chronic ethanol-induced oxidative stress in C57BL/6 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p 1537-1543. 2011.
- NUCCI, C.; DI PIERRO, D.; VARESI, C.; CIUFFOLETTI, E.; RUSSO, R.; GENTILE, R.; MANCINO, R. Increased malondialdehyde concentration and reduced total antioxidant capacity in aqueous humor and blood samples from patients with glaucoma. **Molecular vision**, v.19, p.1841. 2013.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358. 1979.
- OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **The Journal of nutrition**, 119, n.1, p.94 1989.
- OLINTO, F. A.; ANDRADE, F. D. D.; SOUSA JÚNIOR, J. R. D.; SILVA, S. S. D. COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS SÓLIDOS. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.7, n.5, p.40-44. 2013.
- OLIVEIRA, M.S.P.; CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.L.O.; MÜLER, C.H. Cultivo do Açaizeiro para Produção de Frutos. **Circular Técnica**. n. 26. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Pará. 2002

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702. 2009.

OZTURK, M.; AYDOGMUS-OZTURK, F.; DURU, M. E.; TOPÇU, G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. **Food Chemistry**, v. 103, n.2, p. 623-630, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.10, p. 3593–3600. 2008.

PACKER, L.; WEBER, S. U.; RIMBACH, G. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. **The Journal of nutrition**, v. 131, n.2, p. 369-373. 2001.

PARKS, E. J.; GERMAN, J. B.; DAVIS, P. A.; FRANKEL, E. N.; KAPPAGODA, C. T.; RUTLEDGE, J. C.; SCHNEEMAN, B. O. Reduced oxidative susceptibility of LDL from patients participating in an intensive atherosclerosis treatment program. **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n.4, p. 778-785, 1998.

PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.* Updated methodology to de Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n.3, p. 274–285, 2008.

PETERSEN, D.R.; DOORN, J.A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n.7, p. 937–945. 2004.

PEYRAT-MAILLARD, M. N.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.80, n.10, p.1007-1012. 2003.

POLI, G.; SCHAUR, R. J. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 50, p. 315–321; 2000.

PRIOR, R. L.; Wu, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p.10, p. 4290-4302. 2005.

PRYOR, W. A.; PORTER, N. A. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.8, p.541–543, 1990.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species (*Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*) **Food chemistry**, v.115, n.4, p.1199-1205. 2009.

RAO, A.V.; BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. **Nutritional neuroscience**, v.5, n.5, p.291-309. 2002

RAYMAN, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. **The lancet**, v.356, n. 9225, p. 233-241. 2000.

RODRIGUES, R. B.L; ICHTENTHÄLER, R.; ZIMMERMANN, B. F.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F.; ALMEIDA, O. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart.(acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.54, n.12, p.4162-4167. 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of food composition and analysis**, v.23, n.7, p.726-740. 2010.

RE, R. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology**, v. 26, n. 9, p.1231-1237, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P. A. S. C. A. The chemistry of red wine color. **Chemistry of wine making**, v. 137, p. 50-88. 1974.

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

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D. A. C.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. D. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, n.1, p. 22-28 2010.

ROBARDS, K.; DILLI, S. Analytical chemistry of synthetic food antioxidants. A review **Analyst**, v.112, n.7, p.933-943. 1987.

ROS, E. Nuts and novel biomarkers os cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.89, n.5, p.1649-56, 2009.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E., DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v.121, n.4, p.996-1002. 2010.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica** v. v.21, n.2, p.135-140. 1998.

SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; CARVALHO JUNIOR, R. N.; COSTA, C. E. F.; FRANÇA, L. F. F.; LANNES, S. C. S. Comparative parameters of the nutritional

contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. **Food Research International**, v.51, n.2, p.841-847. 2013.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.22, p. 8604–8610. 2006.

SAHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, R. A. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl₄-induced damage in rat. **BMC complementary and alternative medicine**, v.11, n.1, p.48. 2011.

SASIDHARAN, S.; VIJAYARATHNA, S.; JOTHY, S. L.; PING, K. Y.; LATHA, L. Y. Hepatoprotective Potential of *Elaeis Guineensis* Leaf Against Paracetamol Induced Damage in Mice: A Serum Analysis. **International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering**, v.39. 2012.

SENTUERKER, S.; KARAHALIL, B.; INAL, M.; YILMAZ, H.; MUESLUEMANOGLU, H.; GEDIKOGLU, G.; DIZDAROGLU, M. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme level in childhood acute lymphoblastic leukemia **FEBS Letters**, v. 416, n.3, p. 286-290, 1997.

SOUTO, R.N.M. Uso da radiação γ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **Seropédica**, RJ. 95pp. 2001.

SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. C.; LEITE, F. M. N.; REIS, F. S. Microbiological evaluation of the Brazil nut processing plants in Acre. Rio Branco, Acre. (**Embrapa Acre, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 39 p. 200. 2004.

SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, p. 804–810. 2010.

SOUZA, M. O.; SOUZA E SILVA, L.; BRITO MAGALHÃES, C. L.; FIGUEIREDO, B. B., COSTA, D.; C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. The hypocholesterolemic activity of açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, v.32, n.12, 976-984. 2012.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. D. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 101-107. 2005.

SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.1, p.25-30. 2012

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, n.1, p. 200. 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista da Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81. 2002.

SIMÕES, Dayane Lorraine Vale. Composição nutricional e elaboração do biscoito e da barra de cereal do fruto de Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Dissertação de mestrado** – Universidade Nova Lisboa. 2010.

SIEMS, W. G.; PIMENOV, A. M.; ESTERBAUER, H.; GRUNE, T. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism. **Journal of Biochemistry**, v.123, p.534–539, 1998.

SIWAK, J.; LEWINSKA, A.; WNUK, M.; BARTOSZ, G. Protection of flavonoids against hypochlorite-induced protein modifications. **Food chemistry**, v.141, n.2, p.1227-1241. 2013.

SINGLETON V. L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTOS R. M. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-177. 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. JR. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, n.3, p. 144-158, 1965

SPICKETT, C. M. (2013). The lipid peroxidation product 4-Hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis. **Redox Biology**, v.1, n. 1, 2013, p. 145–152. 2013.

SINGH, S. K.; PRAKASH, V. Screening of antioxidant activity and phytochemicals strength of some herbal plants. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.3. p. 296-300, 2013.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

STOCKLER-PINTO, M.D.; MAFRA, D.; FARAGE, N.E.; BOAVENTURA, G.T.; COZZOLINO, S.M.F Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition** v.26 p.1065–1069. 2010.

STOCKLER-PINTO, M.B.; JULIE, L.; MORAES, C.; LEAL, V.O.; FARAGE, N.E.; ROCHA, A.V.; BOAVENTURA, G.T.; COZZOLINO, S.M.F.; MALM, O.; MAFRA, D. Effect of Brazil Nut Supplementation on Plasma Levels of Selenium in Hemodialysis

Patients: 12 Months of Follow-up. **Journal of Renal Nutrition**, v.22, n.4, p 434-439. 2012.

STOCKLER-PINTO, M. B.; MAFRA, D., MORAES, C.; LOBO, J.; BOAVENTURA, G. T.; FARAGE, N. E.; MALM, O. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, HBK) Improves Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in Hemodialysis Patients. *Biological trace element research*, v.158, n.1, p.105-112. 2014.

STRUNZ, C.; OLIVEIRA, T.; VINAGRE, J.; LIMA, A.; COZZOLINO, S.; MARANHÃO, R. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v. 28, p.151–155. 2008.

SCHWARTZ, S. J.; CARLE, R. Enhanced bioavailability of carotenoids: the influence of chromoplast morphology, dietary lipid, and thermal processing. **In 7 th International Congress on Pigments in Food** (p. 43). June, 2013.

TERAO, J. Dietary flavonoids as antioxidants. **Forum Nutrition** v.61, p.87–94, 2009.

THÉRON, P. *et al.* Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Clinical Nutrition Metabolism Care**, v.3, p.373-384, 2000.

THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. **Free radical biology & medicine**, v. 28, n.12, 1995.

TSIMIDOU, M.; PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. **Food chemistry**, v. 45(2), p. 141-144. 1992.

THOMAS, M.B.; SINGH, L.; SHAMA, S.K. Review on in-vitro antioxidant screening assays. **Journal of drug discovery and therapeutics**, v.1 n.09, p.65-72, 2013

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **Food Science and Technology**. v.42, n.2, p.1573–1580, 2009.

YANG, J.; LIU, R. H.; HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. **LWT-Food Science and Technology**, v.42, n.1, p.1-8. 2009.

YANG, J.; LI, Y.; WANG, F.; WU, C. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.58, n.10, p.6525-6531. 2010.

YUYAMA, L. K. O. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 408-412, 2008.

YU, H.; ZHENG, L.; YIN, L.; XU, L.; QI, Y.; HAN, X.; PENG, J. Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation. **International immunopharmacology**, v.19, n.2, p.233-244. 2014.

YOSHIDA, Y., NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and physics of lipids**, v.123, n.1, p.63-75. 2003.

VALKO, M. Antioxidant Activity. **Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties**, p.325. 2013

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n.2, p. 178-189. 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n.5, p.1323-1338. 2007

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; SILVA, M. A. M. D.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; RABELO, L. A.; FONTES, G. Markers of redox imbalance in the blood of hypertensive patients of a community in northeastern Brazil. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.97, n.2, p.141-147. 2011.

VANDGHANOONI, S; FOROUHARMEHR, A; ESKANDANI, M; BARZEGARI, A; KAFIL, V; KASHANIAN, S. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. **DNA and cell biology**, v.32, n.3, p.98-103. 2013.

WANG, X. F. J.; LIU, M. Ellagic Acid Exerts Anti-proliferation Effects via Modulation of Tgf-B/Smad3 Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, n.1, p.273-276. 2014.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. (1995). DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer letters**, v. 93, n.1, p. 113-120. 1995

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v.23, n.4, p.209-240, 1997.

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; WILLIAM KOH, J. H. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n.4, p. 775-783. 2006

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 8896-8907. 2007.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A., WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v.285, n.5432, p.1393-1396. 1999.

XIE, C.; KANG, J.; BURRIS, R.; FERGUSON, M. E.; SCHAUSS, A. G. NAGARAJAN, S.; WU, X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice

through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n.2, p. 327-333. 2011

XU, G.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; MA, Y.; SHI, J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chemistry**, v. 106, n.2, p. 545-551. 2008.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p.555–559. 1999.

ZHU, Y.; LING, W.; GUO, H.; SONG, F.; YE, Q.; ZOU, T.; YANG, Y. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.23, n.9, p.843-849. 2013.