



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

**Perfil antioxidante, anti-inflamatório e aplicação cosmética das cascas
do caule da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.K.B.)**

MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA

MANAUS
2022



MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA

Perfil antioxidante, anti-inflamatório e aplicação cosmética das cascas do caule da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.K.B.)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Emersom Silva Lima

MANAUS-AM

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p Silva, Márcia de Jesus Amazonas da
Perfil antioxidante, anti-inflamatório e aplicação cosmética das cascas do caule da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.K.B) / Márcia de Jesus Amazonas da Silva . 2022
143 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emersom Silva Lima
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. castanha-do-brasil. 2. anti-envelhecimento. 3. inflamação. 4. capacidade antioxidativa. 5. fitocosmético. I. Lima, Emersom Silva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


"Perfil antioxidante, anti-inflamatório e aplicação cosmética das cascas do caule da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.K.B.)"

DISCENTE: MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA

PARECER:

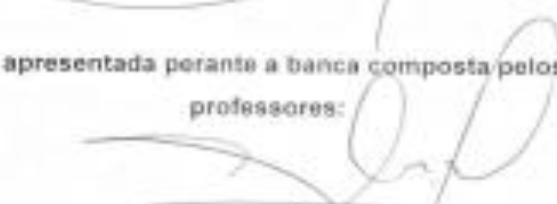
Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 31/10/2022.




Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPCIF


A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Orientador e Presidente da banca



Profa. Dra. Mame Carvalho de Vasconcelos
Membro (UFAM)



Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio
Membro (UFAM)



Profa. Dra. Patricia Melchionna Albuquerque
Membro (UEA)



Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen
Membro (UEA)

A Deus, meus queridos pais por todo amor, dedicação e o incentivo nos meus estudos, e aos meus futuros filhos, se assim Deus permitir Maria Clara e Benícius André.

“Educação gera conhecimento.
Conhecimento gera sabedoria e só um povo sábio pode mudar seu destino”

Anísio Teixeira

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por ser meu refúgio e fortaleza e a intercessão da minha mãe do céu Nossa Senhora.

Aos meus pais Selina Amazonas da Silva e Manoel de Jesus Corrêa da Silva, por tanto incentivo, dedicação na minha criação, pelos bons conselhos e excelente educação que me proporcionaram.

Ao meu esposo André da Silva Chaves por ser meu companheiro, amigo e fiel protetor em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Marcelo de Jesus Amazonas da Silva, pelo braço-amigo sempre que preciso, homem de coração enorme, generoso sempre pronto a ajudar o próximo.

Aos meus sobrinhos Eva Sophia de Jesus Bezerra da Silva, Messias Emanuel de Jesus Bezerra da Silva e Ísis Emanuele de Jesus Bezerra da Silva, e minha irmãzinha Helena que eu tanto amo e que trazem grandes alegrias em nossas vidas.

A minha sogra D. Marlinda, aos meus cunhados e cunhadas em especial Roseline Bezerra da Silva, por ser tão prestativa comigo e ser agraciada em gerar meus sobrinhos tão lindos e inteligentes.

As minhas primas Franciane das Chagas Silva e Evelin Anne Chagas Amore pelo cuidado e preocupação com minha saúde.

As tias Luziana de Cássia, Francisca das Chagas (*in memoriam*), Ana Rita, Lucilene Amazonas, Judith Amazonas, Maria Amazonas, Francisca Nascimento, Marinete Amazonas, que rezam sempre por mim.

A toda família Amazonas, Nascimento e Chaves que torceram tanto por mim para que esse momento tornar-se realidade.

Ao meu excelentíssimo orientador Prof. Dr. Emersom da Silva Lima, que aqui poderia agradecer em um livro, todo aprendizado que me foi transferido, a oportunidade a me oferecida desde o momento que solicitei um estágio voluntário, a bolsa de apoio técnico e assim construindo minha carreira na ciência. A generosidade e prestatividade desse mestre, as cobranças, as opiniões ora mais duras mais um tanto sábias, a inteligência, disciplina e vontade sempre de ajudar e orientar da melhor maneira possível seus alunos.

A disponibilidade em receber e oferecer toda estrutura dos laboratórios BIOPHAR, Cultura de Células, Imagem Molecular aos seus alunos e de outros cursos na execução dos experimentos e principalmente sua dedicação. Muito obrigada meu professor, orgulho em ter sido sua aluna, minha eterna gratidão.

A minha tutora aquela que me direcionou nos passos da ciência, principalmente aos testes de cultura de células, Profa Dra Ana Paula de Araújo Boletti.

Ao Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães por ter cedido o extrato do estudo.

A Profa Dra Marne Vasconcellos pelo apoio, disponibilidade e dedicação ao laboratório da cultura de células.

Aos Professores José Pereira de Moura Neto, Fernanda Guillon, Ellen Regina Paes e Patrícia Danielle pelas palavras de incentivo ofertadas pelos corredores da faculdade.

Aos Professores, Felipe Silva, Hector Koolen, Edson Santos, Jaqueline Campos, Ariane Mendonça, Michelle Sugimoto, Larissa Froede, Rosivaldo Borges, Flávio Amaral, Maritza Ordoñez, Lirlândia Pires pelas parcerias nas publicações.

Ao Queridíssimo Prof Dr José Carlos Tavares, sua esposa Juliana e filha pela amizade e hospedagem em sua casa no Amapá para realização de experimentos.

Aos Professores da banca de qualificação Profa Dra Marne Vasconcellos, Marize Campos e Anderson Cavalcante que se dispuseram avaliar meu projeto em tempos de quarentena da COVID-19 e a banca examinadora desta tese.

A Profa Dra Fernanda Guillon que sempre quando precisei, disponibilizava seu laboratório FITOPHAR para algum experimento ou empréstimo de reagentes.

Aos colegas do PPGIBA, Dra Aguyda e Dra Adriane por sempre nos socorrer quando em falta de algum insumo da cultura de células e o Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani pela parceira, obrigada.

As minhas amigas Marythelma, Marycleuma Henrique, Suniá, Karla Lagos, Alessandra, Mariana, Leidiane que acompanharam de perto toda essa luta e sempre torceram para meu sucesso.

A minha gerente Dra Flora Veiga e meus amigos de trabalho Dra Magda Nascimento, Dra Marilene, Dra Cleidiane, Dra Aracely, Dr Jorge Silva e Dr. André que sempre acompanharam e torceram pela minha vitória.

Minha PIBIC Isabelle Pacheco por tanto carinho e dedicação comigo.

Aos colegas de turma do doutoramento Bruno e Jandiara, “Os Propanos”.

Aos professores convidados a lecionar as disciplinas do doutorado, obrigada por sua oferta.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, direção, corpo técnico, administrativo e serviços gerais meu muito obrigada.

Meus colegas de bancada que ao longo de quase uma década foram minhas companhias em tempos de experimento e convívio laboratorial: Fernanda Gomes, Ana Ralph, Gleyse Barbosa, Ketlen Nascimento, Glauber, Anderson, Fernandinha, Evandro Silva, Fábio Cicalise, Marco Aurélio, Rodrigo Silva, Thiago, Josélia Cavalcante, Rayanne Souza, Larissa, Rosilene, Ellenn Suzany, Zalina Rodrigues, Ângela Comapa, Talita Machado, Carol Valentin, Bianca Lima, Fabrício Rolim, Edna Márcia, Thiago Albuquerque, Márcia Lins, Ana Casaroto, Lorena Santarém, Lívia Hilgenberg, Kríscia Parente, Diana, Serafim, Bárbara Janaína, Ísis Ariel e Paulo Sena.

Aos encontros, almoços e comemorações de aniversário com essa turma que tínhamos o prazer em estarmos juntos.

Em especial, meus amigos muito queridos por mim Leilane Bentes e Leonard Rosales, por tantas vezes serem tão generosos no ensino, ajuda nos experimentos, prestatividade, e na humanidade com o próximo, minha gratidão e admiração.

As Agências de Financiamento de Pesquisa CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelo apoio financeiro ao longo desse doutoramento. Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Farmacêutica - PPGIF e Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM

RESUMO

A Amazônia é considerada um importante celeiro para a produção de matérias-primas de origem natural. Isso se justifica pela enorme biodiversidade da flora a ser explorada no campo da saúde e da alimentação, por exemplo. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de identificar novas fontes naturais de compostos bioativos como alternativa na aplicabilidade de novos produtos para saúde. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil antioxidante, anti-inflamatório e aplicação cosmética (anti-envelhecimento) das cascas do caule de *Bertholletia excelsa*, popularmente conhecida como castanha-do-brasil, aqui denominada BEC. Foram realizados ensaios para identificação dos fitoconstituintes do extrato hidroetanólico, testes para avaliação da capacidade antioxidativa, estudos envolvendo o painel anti-inflamatório, avaliação da expressão gênica, identificação do potencial cosmético, avaliação toxicológica e genotoxicidade do extrato. Foram identificados doze compostos fitoquímicos em BEC, onde os derivados elagitaninos e ácido gálico foram majoritários. Nos ensaios de DPPH•, ABTS•⁺, XO• e ânion superóxido BEC apresentou capacidade antioxidante, assim como citoprotetora em macrófagos (J774) pela diminuição intracelular da produção de ROS. BEC inibiu a produção de óxido nítrico em célula estimulado por LPS. *In vivo* no ensaio da peritonite, o extrato foi eficaz em impedir a migração de leucócitos da cavidade peritoneal de camundongos e não apresentou toxicidade em nematódeo de *Caenorhabditis elegans*. BEC aumentou a expressão de genes antioxidantes HMOX-1 seguido pela inibição da síntese do NO• induzível. Quanto as enzimas da matriz extracelular da pele, o extrato promoveu efeito anti-elastase quando comparado ao controle. Inibiu a glicação pelas vias oxidativa/não-oxidativa e estimulou a proliferação de fibroblastos em diferentes tempos de tratamento. Promoveu a cicatrização celular no teste de arranhadura em monocamada de células, além de estimular a produção de colágeno por fibroblasto. Não apresentou toxicidade em fibroblastos (MRC-5) e queratinócitos (HACAT), todavia somente na menor concentração, BEC não foi genotóxica em célula MRC5. Este estudo foi de vital importância, pois é pioneiro no uso da casca da árvore de *B. excelsa* em relação as aplicações estudadas. Assim, constatada a rica composição de bioativos e seus excelentes resultados experimentais, o extrato pode ser considerado uma alternativa como um possível fitoterápico/fitocosmético ou produto para a saúde. O extrato das cascas de *B. excelsa* pode ser explorado como um produto biotecnológico na terapêutica de algumas doenças ou até mesmo utilizado na indústria cosmética ou farmacêutica, gerando benefícios econômicos para a Amazônia.

Palavras-chave: castanha-do-brasil, fitoterápico, inflamação, capacidade antioxidativa, anti-envelhecimento

ABSTRACT

The Amazon is considered the greatest source of production of natural raw materials, in which it represents a relevant biodiversity in the world's tropical forest and holds a self-sustainable ecosystem. Numerous researches have been carried out in order to identify new natural sources of bioactive compounds as an alternative in the applicability of new health products. In this sense, the objective of this study was to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory profile and cosmetic application (anti-aging) of the stem bark of *Bertholletia excelsa*, popularly known as Brazil nut, here called BEC. Assays were carried out to identify the phytoconstituents of the hydroethanolic extract, tests to evaluate the antioxidative capacity, studies involving the anti-inflammatory profile, evaluation of gene expression, identification of the cosmetic potential, toxicological evaluation and genotoxicity of the extract. Twelve phytochemical compounds were identified in BEC, where ellagitannin derivatives and gallic acid were the majority. In the DPPH•, ABTS•+, XO• and superoxide anion assays BEC showed antioxidant capacity, as well as cytoprotective capacity in macrophages (J774) due to the intracellular decrease in ROS production. BEC inhibited the production of nitric oxide in cells stimulated by LPS. *In vivo* in the peritonitis assay, the extract was effective in preventing the migration of leukocytes from the peritoneal cavity of mice and showed no toxicity in *Caenorhabditis elegans* nematode. BEC increased the expression of HMOX-1 antioxidant genes followed by inhibition of inducible NO• synthesis. As for the extracellular matrix enzymes of the skin, the extract promoted an anti-elastase effect when compared to the control. Inhibited glycation by oxidative/non-oxidative pathways and stimulated fibroblast proliferation at different treatment times. It promoted cellular healing in the cell monolayer scratch test, in addition to stimulating collagen production in cell. It did not show toxicity in fibroblasts (MRC-5) and keratinocytes (HACAT), however, only at the lowest concentration, BEC was not genotoxic in MCR5 cells. This study was of vital importance, as it is a pioneer in the use of the bark of the *B. excelsa* tree in relation to the applications studied. Thus, given the rich composition of bioactives and its excellent experimental results, the extract can be an alternative as a possible phytotherapeutic/phytocosmetic allied to health product. The extract from the bark of *B. excelsa* can be exploited as a biotechnological product in the treatment of some diseases or even used in the cosmetic or pharmaceutical industry, generating economic benefits for the Amazon.

Keywords: Brazil nuts, herbal medicine, inflammation, antioxidant capacity, anti aging

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios programados para o projeto.....24

ARTIGO 1: Botanical characteristics, socioeconomic importance and health uses of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*): A review

Figura 1: Organograma com os resultados das pesquisas embase de dados do estudo e seus resultados quantitativos com as palavras chaves da busca.....52

Figura 2: Produção Brasileira da castanha-do-Brasil em toneladas.....57

ARTIGO 2: Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Bertholletia excelsa* (H.B.K) bark extract

Figure 1: Total ion chromatogram obtained by LC–MS/MS analysis for the BEC extract.....93

Figure 2. Effect of BEC and quercetin on cellular viability in J774 macrophage. J774 macrophages (1×10^6 cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and exposed to various concentrations of BEC and quercetin (3.12-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The values are means \pm SD of three replicates. $*p < 0.05$ compared to control vehicle treated cell.....94

Figure 3. Effect of the BEC on NO^\cdot production in LPS-stimulated J774 cells. Production of NO^\cdot was assayed in culture supernatants of macrophages stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence of the BEC (3.12–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The nitrite values are the mean \pm SD from three independent experiments. The values are means \pm SD of three replicates. $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ compared to control vehicle treated cells.....94

Figure 4. Antioxidant activity measured by DCF assay of BEC and Quercetin (Q). J774 macrophage (1×10^6 cell/well) were preloaded for 30 min with 10 μM of DCFH-DA. After cells were treated (0.005-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BEC and/or quercetin) and 250 μM of H_2O_2 . The fluorescence levels were measured with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 520 nm. Results were expressed in oxidation inhibition (%). The values are means \pm SD of three replicates. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ compared to Oxidation promoted by H_2O_295

Figure 5. Cytotoxic action of BEC and quercetin in cellular viability in H₂O₂-stimulated J774 macrophage. J774 macrophages (1x10⁶ cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and exposed to 250 µM of H₂O₂ and concentrations of BEC (10, 100 and 1000 µg/mL) and quercetin (1, 10 and 100 µg/mL) for 24 h. The values are means ± SD of three replicates. **p* < 0.05 compared to control vehicle treated cells.....95

Figure 6. Antioxidant action of BEC on pathway of pro-oxidant and antioxidant genes. J774 macrophages (1x10⁶ cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and exposed to 250 µM of H₂O₂ and concentrations of BEC (10, 50 and 100 µg/mL) and quercetin (10 µg/mL) for 24 h. Relative mRNA levels were determined for genes: (A) NFR2, (B) HMOX-1, (C) GPX-1 and (D) NOS2. The values are means ± SD of three replicates. **p* < 0.05 compared to control vehicle treated cells.....96

Figure 7. Toxicity of BEC against *C. elegans*. *C. elegans* (L4) were incubated for 24 h at 20 °C with BEC (0.5-500 µg/mL). Data are expressed as mean ± SEM. **p* < 0.05 compared to control vehicle treated cells.....97

Figure 8. Total leukocytes from the peritoneal cavity of mice in a trial of lipopolysaccharide (LPS) stimulated peritonitis after four hours of treatment. Data are expressed as mean ± SEM. ****p* < 0.0001 compared to control LPS 500ng/cavity and ##*p* < 0.001 when compared to the positive control group Dexamethasone 1mg/kg.....97

ARTIGO 3: Cosmetic application of the stem bark extract of (*Bertholletia excelsa* H.K.B)

Figura 1: Atividade inibitória (%) de BEC sobre a glicação por via oxidativa (1-A), atividade inibitória (%) pela via não oxidativa (1-B). Foram utilizados os padrões Quercetina (1mg/mL) para inibição da glicação por via oxidativa e aminoglanidina (1mg/mL) para via não oxidativa. As análises estatísticas foram realizada pelo teste One-way ANOVA de comparação múltipla de teste Tukey, com valor de **p*<0.05, em programa de estatística Graphpad Prisma versão 6.0.....112

Figura 2: Efeito das cascas do caule de *Bertholletia excelsa* – BEC, sobre a viabilidade de células de fibroblasto de pulmão humano – MRC-5 (expressos em porcentagem) utilizando o método do Alamar blue, nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 h. Doxorrubicina (5µg/mL) foi utilizada como controle positivo e somente meio sem tratamento como controle negativo. Os valores estão representados como CI_{50%} (intervalo de confiança de 95%) da Doxorrubicina. Os valores foram expressos como média±desvio padrão em triplicata de experimentos independentes, onde foi considerado valor de **p*<0.05 estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo por ANOVA two way seguido por Bonferroni *post test* em programa de estatística Graphpad Prisma versão 6.0.....115

Figura 3: Efeito de BEC, sobre a Proliferação celular no Ensaio Azul de Tripán. (3-C) Fotomicrografias de fibroblastos nos tempos de tratamento 24, 48 e 72 horas. (3-D) Análise gráfica da população de células representada pela diferença de valores em *delta*

(A), considerando a população inicial e final de células viáveis. Foi utilizado Vitamina C - 50 μ M como (controle positivo) e somente meio sem tratamento como (controle negativo). Os resultados foram calculados baseados na diferença de. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão em triplicata de experimentos independentes, onde foi considerado valor de $*p < 0.05$ estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo por ANOVA *two way* seguido por Bonferroni *post test* em programa de estatística Graphpad Prisma versão 6.0.....118

Figura 4- Avaliação de BEC, sobre a Cicatrização/Migração de células *in vitro*. (4-E) Fotomicrografias de fibroblastos nos tempos de tratamento 24, 48 e 72 horas com o tratamento do extrato BEC (12.5, 6.25 e 3.125 μ g/mL. (4-F) Representação gráfica da distância em micrômetro (μ m) do risco provocado em monocamada de células de MRC-5. Foi utilizado Vitamina C - 25 μ M como (controle positivo) e meio sem tratamento como (controle negativo). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão em triplicata de experimentos independentes, onde foi considerado valor de $*p < 0.05$ estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo por ANOVA *two way* seguido por Bonferroni *post test* em programa de estatística Graphpad Prisma versão 6.0.....120

Figura 5- Avaliação de BEC, sobre a quantificação de colágeno em cultura celular de fibroblastos em curva. (5-G) Células MRC-5 plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/mL e tratadas com BEC a (12.5, 6.25 e 3.125 μ g/mL) por 24 horas. (5-H) Fotomicrografias dos fibroblastos utilizando o ensaio colorimétrico de Picrosirius- Sirius-Red. H-I meio sem tratamento (controle negativo); H-II Vitamina C 50 μ M (controle positivo); H-III; H-IV e H-V; relacionam-se com BEC 3.12; 6.25; 12.5 μ g/mL, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão em triplicata de experimentos independentes, onde foi considerado valor de $**p < 0.001$ e $*p < 0.01$ estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo por ANOVA *two way* seguido por Tukey em programa de estatística Graphpad Prisma versão 6.0.....123

Figura 6- Efeito genotóxico das cascas do caule de *Bertholletia excelsa* – BEC sobre fibroblastos MRC-5 utilizando o Ensaio do Cometa. (6-I e 6-J) Índice e Frequência de dano ao DNA de MRC-5 cultivados em monocamada de células, e tratados com BEC a (100 e 50 μ g/mL) após 3 horas de tratamento. (6-K) Fotomicrografias das lâminas analisadas em microscópio de fluorescência com solução Syber Green 1000x. Foram utilizado os controles positivo Doxorrubicina 10 μ g/mL e controle negativo DMSO 0,2%. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão em triplicata de experimentos independentes, onde foi considerado valor de $**p < 0.001$ estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo DMSO 0,2%. Os resultados foram analisados por ANOVA *two way* seguido por Bonferroni *post tests* em programa de estatística Graphpad Prisma versão 6.0.....126

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: Botanical characteristics, socioeconomic importance and health uses of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*): A review

Tabela 1 – Principais atividades biológicas de *Bertholletia excelsa* abordadas na literatura.....59

ARTIGO 2: Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Bertholletia excelsa* (H.B.K) bark extract

Table 1: UHPLC–ESI-MS/MS analysis of phenolic compounds in *B. excelsa* extract.....98

Table 2. Free radical scavenger activity (IC₅₀ in microgram per milliliter) of BEC and antioxidant standard.....99

ARTIGO 3: Cosmetic application of the stem bark extract of (*Bertholletia excelsa* H.K.B)

Tabela 1: Resultado das cascas do caule de *Bertholletia excelsa* (BEC) quando avaliado a capacidade inibitória enzimática. Análise dos resultados foi expresso em valores de média±desvio padrão. Todo o teste foi realizado em triplicata de experimento e os padrões usados estavam na concentração de 1mg/mL e o extrato BEC (100µg/mL).....110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ROS	Espécies reativas de oxigênio
NF- κ B	Fator nuclear kappa b
NFE2	Fator de transcrição nf-e2
HIF1- α	Fator induzível por hipóxia-1 α
COX-2	Ciclooxigenase-2
iNOS	Síntase indutível do óxido nítrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Dna complementar
OMS	Organização mundial da saúde
UHPLC-MS	Cromatografia líquida de alta pressão
MS	Espectro de massas
MS/MS	Espectro de massas em tandem
CID	Dissociação induzida por colisão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
XO	Xantina oxidase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
BCRJ	Banco de células do rio de janeiro
CO ₂	Dióxido de carbono
RPMI	Roswell park memorial institute
J774A.1	Macrófagos da ascite de camundongos <i>mus musculus</i>
SFB	Soro fetal bovino
MTT	Brometo tiazolil azul de tetrazólio
PBS	Tampão fosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DCFH-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
LPS	Lipopolissacarídeo
NO \cdot	Óxido nítrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
RT-qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativo

NFE2L2	Fator relacionado ao fator nuclear eritróide 2
HMOX-1	Heme oxigenase 1
PRDX-2	Peroxiredoxina-2
GPX1	Glutathione peroxidase 1
MAPK-1	Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
NOS-2	Síntase 2 do óxido nítrico
GAPDH	Gene codificador de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
PCR	Reação em cadeia de polimerase
AAAPVN	N-succinil-ala-ala-ala-p-nitroanilide
FALGPA	<i>N</i> -[3-(2-furyl)acryloyl]-leu-gly-pro-ala
BCTA	Hexadecyltrimethylammonium bromide
NaOH	Hidróxido de sódio
MRC5	Células de fibroblastos de pulmão humano
DMEM	Meio eagle modificado por dulbecco high glucose
HCl	Ácido clorídrico
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida
DPM	Desvio padrão da média
PEVS	Produção da extração vegetal e da silvicultura
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Alanina aminotransferase
GGT	Gama-glutamil transferase
IFN- γ	Interferon gama
Se	Selênio
LOX	Lipoxigenase

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
h	Horas
s	Segundo
~	Sinal til
>	Sinal maior
M	Molar
T	Tonelada
cm	Centímetro
km	Quilômetro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
mM	Milimol
mg	Milígrama
kg	Quilograma
ng	Nanograma
mm ³	Milímetros cúbicos
mmol	Milimol
min	Minuto
kV	Quilovolt
eV	Elétron-volt
UI	Unidade internacional
CI _{50%}	Concentração Inibitória de 50%
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. Introdução.....	22
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Organograma Experimental.....	25
3.2 Obtenção da Amostra e preparação do extrato.....	26
3.3 Caracterização química.....	26
3.3.1 Análise por Espectrometria de massas	26
3.4 Ensaio <i>in vitro</i>	27
3.4.1 Ensaio antioxidantes	27
3.4.1.1 Atividade Sequestrante do Radical DPPH•.....	27
3.4.1.2 Ensaio 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS•+.....	28
3.4.1.3 Ensaio de eliminação do radical de ânion (O ₂ •-) superóxido	29
3.4.1.4 Atividade inibidora da xantina oxidase (XO•)	29
3.4.2 Ensaio em cultura de células.....	30
3.4.2.1 Células	30
3.4.2.2 Viabilidade celular.....	31

3.4.2.2.1 Método de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT)	31
3.4.2.3 Atividade Antioxidante Celular.....	32
3.4.2.4 Inibição da ativação de macrófagos.....	32
3.4.2.5 Quantificação de nitrito	33
3.4.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA	34
3.4.2.7 Ensaio quantitativo PCR em tempo real (RT-qPCR)	34
3.5 Ensaio <i>in vivo</i>	35
3.5.1 Criação e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	35
3.5.1.1 Avaliação da toxicidade em <i>Caenorhabditis elegans</i>	35
3.5.2 Ensaio da Peritonite induzido por Lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos	36
3.5.2.1 Animais.....	36
3.5.2.2 Peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS).....	36
3.6 Ensaio enzimáticos <i>in vitro</i>	37
3.6.1 Inibição da tirosinase	37
3.6.2 Inibição da Enzima Elastase	38
3.6.3 Inibição da Enzima Colagenase.....	39
3.6.4 Inibição da Enzima Hialuronidase.....	39
3.7 Ensaio em cultura de células	40
3.7.1 Linhagens e Cultura Celular	40
3.7.2 Avaliação da Viabilidade Celular.....	41
3.7.2.1 Método Alamar blue.....	41
3.7.3 Ensaio de proliferação celular – Exclusão por Azul de Tripán	41

3.7.4 Ensaio da Cicatrização/Migração celular	42
3.7.5 Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos	42
3.7.6 Coloração de colágeno depositado na matriz extracelular	43
3.9 Análise Estatística	46
4. Resultados.....	47
Artigo 1: Botanical characteristics, socioeconomic importance and health uses of Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>): A review	47
Artigo 2 : Anti-inflammatory and antioxidant properties of <i>Bertholletia excelsa</i> (H.B.K) bark extract.....	67
Artigo 3: Cosmetic Application using stem bark extract (<i>Bertholletia excelsa</i> H.K.B)..	100
5. Conclusão.....	133
6. Referências Bibliográficas.....	135

1. INTRODUÇÃO

A floresta amazônica é a maior floresta tropical do mundo, e esse bioma pode contribuir significativamente para a bioprospecção medicinal de novos extratos/substâncias que apresentam diversidade metabólica e inúmeras propriedades biológicas (SHARMEEN et al., 2021). Sua vasta riqueza vegetal está relacionada a sua biodiversidade e seus benefícios estão vinculados às informações etnobotânicas do uso medicinal tradicional de algumas dessas espécies vegetais (EKIERT & SZOPA, 2022). É claro o interesse em manter a floresta apta a produzir, tendo em vista que a floresta amazônica é um tesouro na produção de matéria-prima (constituintes bioativos) e ainda tem a vantagem de suas fontes serem altamente renováveis (DRASAR & KHRIPACH, 2020).

É crescente a busca por produtos naturais sejam eles aplicados a estética, alimentício, farmacêutico, cosmético ou até mesmo de forma complementar. Uma série de eventos, como a busca de práticas alternativas para o controle de doenças, o crescente custo dos medicamentos industriais e a busca de uma vida mais saudável têm sido discutidos como possibilidades de institucionalização de políticas de saúde pública, como a inserção de fitoterápicos regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (OLIVEIRA, 2001).

As castanheiras *Bertholletia excelsa* HBK (Humboldt Bompland Kunth) são árvores altas, nativas da Amazônia. São encontradas em florestas as margens dos grandes rios como o Amazonas, Rio Negro, Orinoco e o Araguaia (SHEPARD & RAMIREZ, 2011). Geralmente, atingem entre 30 m e 50 m de altura e de 1 m a 2 m de diâmetro, apresentam tronco reto e os galhos se concentram na parte mais alta da árvore, sua casca

é mais acinzentada e as folhas tem de 20 cm a 35 cm de comprimento. As castanheiras são consideradas vulneráveis pela União Mundial para a Natureza (IUNC) e no Brasil aparecem na lista de espécies ameaçadas do Ministério do Meio Ambiente devido ao desmatamento desenfreado da região, é rica no mineral selênio (CARDOSO et al., 2017; SILVA et al., 2020).

Algumas propriedades biológicas de *B. excelsa* já foram descritas na literatura, principalmente as relacionadas ao consumo da castanha. Estudos que evidenciaram aspectos anti-inflamatórios, atividade tripanocida, antimicrobiana e antioxidante já foram explorados, entretanto estudos envolvendo o uso da casca da árvore, como este trabalho é pioneiro. Subprodutos como ouriço, folhas e óleo também já foram apreciados. Composição nutricional e química da castanha foram descritos em trabalhos de (JOHN & SHAHIDI, 2010).

Dentre as atividades biológicas já investigadas com o uso da castanha, a inflamação é caracterizada pela resposta vital do sistema imunológico humano, é um fator importante para o progresso de várias doenças/distúrbios crônicos, que podem ser evidenciados pela geração de radicais livres, resultado de um desequilíbrio de antioxidantes naturais que leva ao desenvolvimento de várias doenças associadas e as infecções de pele também estão envolvidas nesse processo (GASPARINI et al., 2014).

A presente pesquisa tem como foco o estudo das cascas do caule da árvore *B. excelsa* utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo* na tentativa de desvendar atividades antioxidante, anti-inflamatória e aplicações cosméticas desta parte específica, que pouco tem sido descrita na literatura e elucidar possíveis mecanismos, na promoção do uso do composto natural como alternativa biotecnológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar atividade antioxidante, anti-inflamatória e aplicação cosmética (anti-envelhecimento cutâneo) do extrato das cascas do caule da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.K.B)

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização química do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *B. excelsa* (BEC);
- Verificar a atividade antioxidante do extrato;
- Analisar o perfil anti-inflamatório do extrato;
- Explorar o potencial cosmético do extrato;
- Avaliar a toxicidade e a genotoxicidade do extrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organograma Experimental

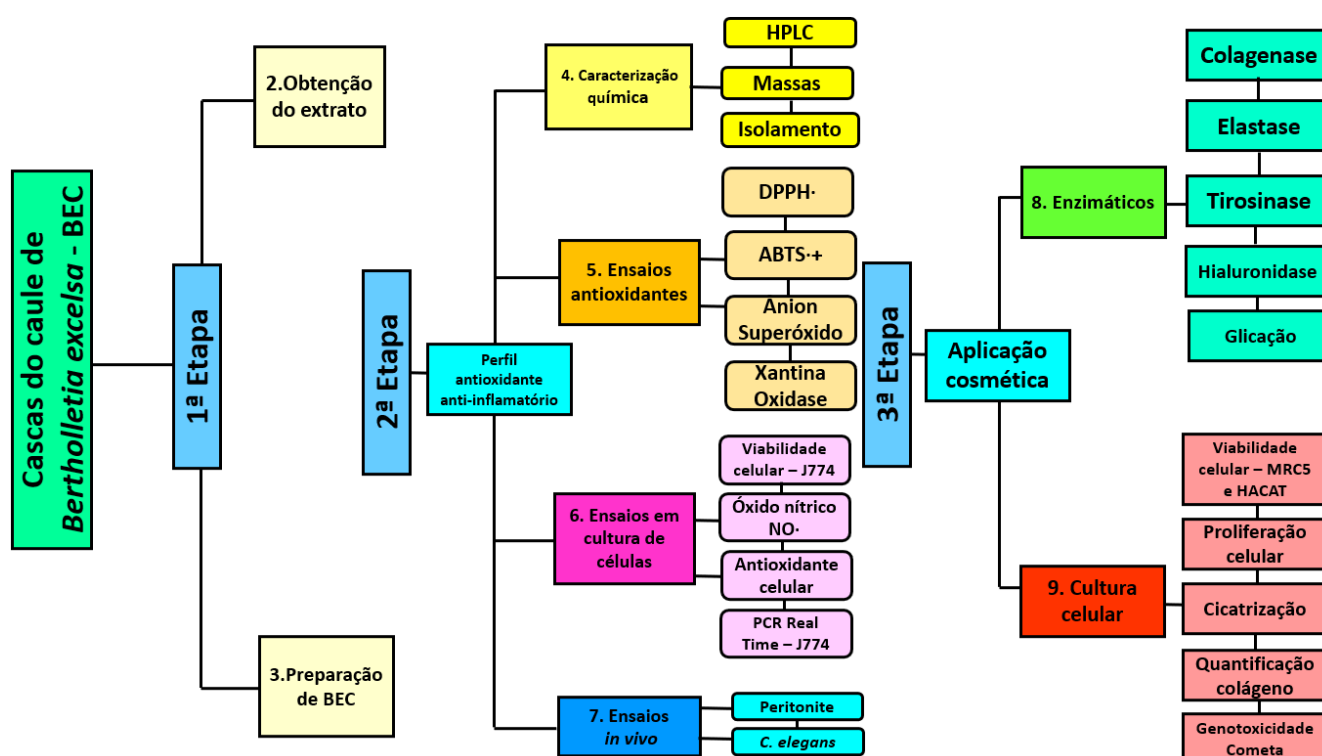


Figura 1: Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios realizados.

3.2 Obtenção da Amostra e preparação do extrato

A coleta de material vegetal da casca do caule de *B. excelsa* (1000g) foi realizada em Muiracupuzinho na estrada da AM-010, Km-56-Itacoatiara-Manaus. Um comprovante foi depositado no Herbário da UFAM nº 10348. O material foi higienizado com pano umedecido e água destilada, seco em estufa com circulação forçada a 60°C, triturado em moinho de facas e armazenado em sacos de papel até a extração. Para a preparação do extrato de *B. excelsa* a casca do caule foi seca ao ar (1000g) e extraída a 60°C durante três dias, usando uma mistura 7:3 de etanol: água (3x2L), moída em seguida os extratos foram combinados o volume foi concentrado em cerca de 1,6L. O extrato apresentou rendimento de 23,35% e 233,5g. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen sob o nº A589ED6.

3.3 Caracterização química

3.3.1 Análise por Espectrometria de massas

Um sistema UHPLC-MS composto de cromatografia líquida Accela 600 acoplado a um espectrômetro de massa LTQ com um analisador de massa de armadilha de íons linear (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foi utilizado para isolamento das substâncias presentes no extrato de *Bertholletia excelsa*. A ionização por electropulverização em modo negativo (ESI-) foi utilizada para acessar a composição de *B. excelsa*. Os espectros de massa (MS) foram adquiridos na faixa de m/z 50 a 1000, e os espectros de massa em tandem (MS/MS) adquiridos por dissociação induzida por colisão (CID) de íons precursores capturados. O hélio foi usado como gás colisional e algumas tentativas foram feitas pela interpretação manual dos dados espectrais de MS/MS. As

separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna Kinetex C18 (2,6 μm , 30 x 4,6 mm, tamanho de poro de 100 Å) (Phenomenex) usando uma fase móvel binária. O solvente A (água ultrapura) e o solvente B (metanol). Uma eluição em gradiente a 28°C foi realizada da seguinte forma: 0–15 min 20–100% a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. A temperatura do analisador automático foi mantida a 20°C e o volume de injeção foi de 5 μL . Os parâmetros de ionização estavam de acordo com um método anterior como segue: tensão capilar - 4,5 kV, tensão de cone 5 kV, chapa de gás 25 arb, gás auxiliar 5 arb. As energias de colisão foram aplicadas como uma rampa crescente de 2 a 50 eV.

Perfil Anti-inflamatório e Antioxidante

3.4 Ensaios *in vitro*

3.4.1 Ensaios antioxidantes

3.4.1.1 Atividade Sequestrante do Radical DPPH•

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH• foi realizada segundo a metodologia de Mahmoudi et al, (2009) com modificações. Diferentes concentrações de extrato de BEC (0-100 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas, em igual volume, à solução de metanol de DPPH• (100 mM). Após 15 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi registrada a 517 nm em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman, CA, EUA). O experimento foi realizado em triplicata. O ácido gálico e o ácido ascórbico foram utilizados como padrão. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle negativo. Os valores de $\text{CI}_{50\%}$ indicam a concentração da amostra, necessária para eliminar 50% dos radicais livres de DPPH•. A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_a / \text{Abs}_c] \times 100$$

Onde: Abs_a = Absorbância da Amostra

Abs_c = Absorbância do controle

3.4.1.2 Ensaio 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS•+

O teste ABTS•+ foi baseado conforme metodologias de Re et al (1999). O ABTS foi solubilizado em água MiliQ a uma concentração de 7 mM. O ABTS•+ foi produzido reagindo à solução-mãe ABTS•+ com persulfato de potássio 5 mM e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 12 a 16 h para obter uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Uma vez formado o ABTS•+, foi adicionada água MiliQ à solução (diluição 1:7) e realizado o plaqueamento em uma placa de 96 poços de fundo chato com volumes de 270 μL de solução ABTS e 30 μL de água. Esta solução foi monitorada através da leitura a 714 nm em um leitor de microplacas (DTX 800, Beckman, CA, EUA) para obter absorbância de aproximadamente 1,00 (controle). Então, 30 μL de BEC de diferentes concentrações (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionados a 270 μL de ABTS•+ e a reação foi novamente mantida em incubação por 15 min no escuro, à temperatura ambiente. Após o período de incubação foi realizado a leitura em absorbância de 714 nm. O ácido gálico e o ácido ascórbico foram usados como controles positivos nas mesmas concentrações de BEC e seguindo os mesmos procedimentos acima descritos. A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_a / \text{Abs}_c] \times 100$$

Onde: Abs_a = Absorbância da amostra

Abs_c = Absorbância do controle

3.4.1.3 Ensaio de eliminação do radical de ânion ($O_2^{\bullet-}$) superóxido

A atividade de eliminação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi medida pelo método NBT de Öztürk e colaboradores (2007). Foram adicionados 100 μ L de NADH (390 μ M), 100 μ l de NBT (250 μ M) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) e 50 μ L de diferentes concentrações de extrato de BEC (0-100 μ g/mL) em cada poço da placa de 96 poços. A reação foi mantida em incubação à temperatura ambiente por 5 min e a primeira reação foi medida a 560 nm contra um branco em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA). Em seguida, foram adicionados a mistura 100 μ L da solução de PMS (10 μ M) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). A mistura de reação foi mantida em incubação por 5 min à temperatura ambiente e a absorbância a 560 nm foi medida novamente. Absorbância reduzida da mistura de reação indica aumento da atividade de eliminação de ânions superóxido. O ácido gálico foi usado como controle positivo e a porcentagem de inibição da geração do radical ânion superóxido de três medidas paralelas foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{[\text{Abs final amostra} - \text{Abs inicial amostra}]}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs é a absorbância inicial e final da amostra

3.4.1.4 Atividade inibidora da xantina oxidase (XO^{\bullet})

A atividade da xantina oxidase foi determinada conforme metodologia de Bondet; Brand-Williams; Berset, (1997) com modificações onde foi medido a formação de ácido úrico a partir da xantina. O reagente 1 foi preparado misturando xantina oxidase

(667 mM), EDTA (0,1 mM) e hidroxilamina (0,2 mM) em solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,5). Em cada poço de microplaca foram adicionados 40 µL da enzima xantina oxidase e 15 µL de extrato BEC (0-100 µg/mL), DMSO ou medicamento controle (alopurinol) e incubados a 37°C por 5 min. Em seguida, 95 µL do reagente 1 foram adicionados à reação e incubados novamente por 30 min a 37°C. A absorvância a 295 nm foi medida em um leitor de microplacas (DTX 800, Beckman, CA, EUA). Depois foram adicionados à mistura 150 µL de reagente de ácido úrico e a absorvância foi novamente medida. O DMSO foi usado como controle negativo e o alopurinol como controle positivo. A porcentagem de inibição da atividade da xantina oxidase foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [A2 - A1 \text{ amostra} / A2 - A1 \text{ controle}] \times 100$$

Onde: A1 é a absorvância inicial e A2 é a absorvância final

3.4.2 Ensaios em cultura de células

3.4.2.1 Células

Foram utilizados células macrófagos da ascite de camundongos *Mus musculus* (J774A.1) que foram adquiridas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ. Estas células foram mantidas em estufa bacteriológica à 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ e condicionadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* RPMI 1640, suplementadas com 10% soro fetal bovino - SFB (GIBCONN *by life technologie*), e acrescentado de 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (GIBCONN *by life technologie*). Estas células foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

3.4.2.2 Viabilidade celular

3.4.2.2.1 Método de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT)

O ensaio colorimétrico do Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Brasil Ltda) foi realizado de acordo com Mosmann (1983), baseado na redução enzimática do MTT para formação de cristais de formazan pela mitocôndria e enzimas desidrogenases celulares. As células de macrófagos murino (J774A.1) foram plaqueadas na concentração de (1×10^6) células/mL em placa de 96 poços e deixadas em incubadora de CO₂ em atmosfera de 37°C por 24 h, após esse período as células foram expostas as concentrações de BEC (0-100 µg/mL) por um período de 24 h.

Após o tempo de incubação a 37 °C o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 µL de PBS 0,1 M com pH 7,4, em seguida adicionado 300 µL de MTT (1 mg/mL) diluído em meio de cultura RPMI 1640 e incubado por 3 h a 37 °C, decorrido esse tempo as células foram ressuspensas com DMSO em cada poço e finalmente as placas foram colocadas em agitação delicadamente em um agitador orbital, por 15 minutos a temperatura ambiente para solubilização dos cristais de formazan originados a partir da reação do MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis. Na última etapa a densidade óptica dos poços foi medida em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA) em 540 nm e os valores de absorbância das células tratadas com BEC foram comparados com os valores de absorbância obtidos a partir das células controle sem tratamento.

Células de macrófagos murinos J774A.1 foram tratadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placa de 96 poços e expostas a temperatura de 37°C com 250 µM de H₂O₂ por 24 h com ou sem BEC e, em seguida, tratados com a solução MTT 1 mg/mL por 3 h, respectivamente. Os cristais de formazan azul escuro formados em células intactas foram dissolvidos em DMSO e a absorbância a 540 nm foi medida com um leitor de microplacas

(DTX 800, Beckman, CA, EUA). Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução do MTT em relação a absorbância das células de controle.

3.4.2.3 Atividade Antioxidante Celular

O 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) pode ser desacetilado nas células onde pode reagir quantitativamente com radicais intracelulares (principalmente derivados de H₂O₂) e ser convertido em seu produto fluorescente a 2',7'-Diclorofluoresceína (DCF) que é retido nas células conforme Wolfe & Liu (2007). Macrófagos murino (J774A.1) foram plaqueados na concentração celular (6x10⁴ células/poço) e mantidos em incubação a 37 °C com 10 µM de DCFH-DA por 1 h. Depois que as células foram lavadas com o tampão de Hank's as células foram tratadas com BEC (0.005, 0.05, 0.5, 5 e 50 µg/mL) e 250 µM de H₂O₂. A fluorescência foi medida imediatamente com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm usando um leitor de microplacas (DTX 800, Beckman, CA, EUA). Foram realizados controles com/sem DCFH-DA. Quercetina foi usada como controle positivo nas mesmas concentrações. A atividade antioxidante intracelular foi expressa como a porcentagem de inibição da ERO intracelular produzida pela exposição ao H₂O₂.

3.4.2.4 Inibição da ativação de macrófagos

Células de macrófago murino (J774A.1) foram plaqueadas na concentração de (1x10⁶ células/mL) em placa de 96 poços por 24 h. Após o período de incubação de 24 h das células a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio foi retirado e adicionado meio RPMI suplementado com 1 % de SFB com volume final de 100 µL/poço, a seguir as células foram

estimuladas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e tratadas com o extrato BEC (0-100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI 1640 enriquecido com LPS e como controle negativo meio RPMI 1640 sem LPS, fármaco de referência Dexametasona 50 $\mu\text{g/mL}$. As células foram mantidas em incubação por 24 h em estufa bacteriológica a 37 °C, 5 % de CO₂, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de óxido nítrico NO \cdot e alíquotas foram congeladas a -20 °C para posterior análise das citocinas.

3.4.2.5 Quantificação de nitrito

A produção de óxido nítrico (NO \cdot) foi mensurada pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) formando um composto azo estável de coloração púrpura para assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da produção de óxido nítrico, 50 μL do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil). Para o preparo destes reagentes foram utilizadas soluções estoque de naftil-1-etilenodiamina 0,1% dissolvido em água destilada H₂O e de sulfanilamida a 1% dissolvida em ácido fosfórico H₃PO₄ (CFQ - Química) a 5%. Anteriormente ao uso as soluções foram adicionadas na proporção 1:1 formando o reagente de Griess.

Após o período de incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA) a 560 nm. O cálculo das concentrações

de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio NaNO_3 15 μM até 1000 μM .

3.4.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído da linhagem celular de macrófagos (J774A.1). A síntese do cDNA da primeira fita foi realizada com Hexamer aleatório, com Transcrição Reversa Superscript III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.2.7 Ensaio quantitativo PCR em tempo real (RT-qPCR)

Foi realizado ensaio da expressão gênica TaqMan® para os genes: fator nuclear eritróide 2 (NFE2L2), heme oxigenase 1 (HMOX-1), peroxiredoxina 2 (PRDX-2), glutationa peroxidase 1 (GPX1), proteína quinase 1 ativada por mitogênio (MAPK-1), sintase 2 do óxido nítrico (NOS-2), interleucina 1 beta (IL -1 β) e o gene codificador de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle interno. Todos foram comprados da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada em um termociclador StepOne Plus Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, EUA). As reações de qPCR foram realizadas em triplicata com as seguintes condições de termociclagem: 96 °C por 10 min, 35 ciclos, cada uma por 15 s a 96 °C e a 60 °C por 2,5 min. A mistura de reação de 10,0 μL foi composta por 5,0 μL de mistura-mestre universal de PCR TaqMan™ (Applied Biosystems) 1,0 μl (~50ng de cDNA), 0,5 μL de ensaios de expressão gênica de TaqMan® e 3,5 μL de água livre de nuclease.

3.5 Ensaio *in vivo*

3.5.1 Criação e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para realizar o ensaio de toxicidade *in vivo*, foi utilizado a cepa N2 do tipo selvagem do nematóide *Caenorhabditis elegans*. As amostras foram colocadas em incubação por 20 °C em placas de Petri contendo ágar de meio de crescimento de nematóide (NGM) e alimentadas com *Escherichia coli*, cepa OP50-1. A cultura dos nemátoides foram sincronizadas através do tratamento de hermafroditas grávidas com hipoclorito de sódio a 2% e hidróxido de sódio 5 M.

3.5.1.1 Avaliação da toxicidade em *Caenorhabditis elegans*

Um ensaio de toxicidade para BEC foi realizado utilizando *C. elegans* em placas de 96 poços. Cada poço continha 10 nemátoides no estágio L4, que foram incubados por 24 h a 20 °C com BEC em diferentes concentrações (0,5–500 µg/mL) em meio M9. Após esse período, a viabilidade do nematóide foi avaliada tocando repetidamente os vermes com uma micro espátula. Um estereomicroscópio modelo Motic SMZ-140 e W10X / 23 (British Columbia, Canadá) foi usado para manipular e examinar os nemátoides. Os dados foram calculados a partir de duas experiências independentes em duplicado (Lewis e Fleming, 1995).

3.5.2 Ensaio da Peritonite induzido por Lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos

3.5.2.1 Animais

Para o estudo foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre (28-30g) com 6 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e mantidos em gaiolas de propileno a temperatura ambiente de (26±1°C) em ciclos claro/escuro de 12 h, com água e ração *ad libitum*. Os cuidados com os animais e todos os procedimentos experimentais, foram realizados de acordo com as declarações éticas estabelecidas pelas diretrizes nacionais para o uso de animais de experimentação do Colégio brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, BRASIL) e os Institutos Nacionais de Diretrizes e Cuidados de Saúde dos Animais (NIH). Os procedimentos com os animais foram realizados, seguindo o protocolo aprovado pela Comissão do Uso Ético dos Animais do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas – CEUA/UFAM e todos os esforços foram realizados com o objetivo de minimizar o sofrimento e o número de animais na experimentação.

3.5.2.2 Peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

A inflamação aguda em camundongos foi realizada por meio da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) nos camundongos, conforme metodologia de Abayomi et al., (2017) com modificações. Inicialmente, os camundongos foram distribuídos em 6 grupos (n=8 animais/grupo) para o pré-tratamento oral com veículo salina (0,2 mL/10g), dexametasona (0,5 mg/kg) e BEC nas doses de 50 e 100 mg/kg. Após uma hora de tratamento, foi administrado o indutor da inflamação o LPS (500ng/0,2mL/cavidade) via intraperitoneal nos grupos testes, enquanto o grupo controle

recebeu somente solução salina (0,2 mL/10g). Após quatro horas de tratamento, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de cetamina (180 mg/kg) e xilazina 40 mg/kg). Ao final desta etapa, a cavidade peritoneal dos animais foi lavada com 10 mL de tampão PBS gelado (10 mM, pH 7,4) contendo EDTA (3 mM). A cavidade peritoneal foi gentilmente massageada por 10x e a suspensão celular foi colhida evitando ao máximo a lise das hemácias. Após centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi ressuspensionado com 200 μ L de PBS, em seguida foi realizada uma solução de (90 μ L de célula e 10 μ L da solução de Turk) para contagem do número de leucócitos totais em câmara de Neubauer e posterior a confecção de lâminas para análise da contagem diferencial dos leucócitos. Ao final, as alíquotas do fluido peritoneal foram congeladas em freezer -80°C para posteriores dosagens de citocinas envolvidas na cascata inflamatória. Os resultados foram expressos como médias do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$) de cada grupo.

Potencial Cosmético

3.6 Ensaio enzimáticos *in vitro*

3.6.1 Inibição da tirosinase

Inicialmente foi realizado poço controle contendo 80 μ L da enzima, 20 μ L de diluente e 100 μ L da DOPA. Absorbância foi monitorada em 0,5, 10, 15 e 20 minutos com incubação a 37°C . A absorbância final foi de $\approx 0,800$ com DMSO e $\approx 1,00$ com tampão diluente. O extrato BEC (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi preparado e testado nestas concentrações como segue: 20 μ L do inibidor [extrato, diluente (controle) ou padrão (ácido kójico)], em seguida adicionou-se 80 μ L da solução da enzima tirosinase, foi

realizada a incubação por 5 minutos a 37 °C incluído o tempo zero e adicionado 100 µL do reagente DOPA, realizou-se a leitura imediatamente nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos sempre colocando a placa em incubação a 37 °C, a placa foi lida no método de tirosinase no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA). Os resultados foram calculados de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra}) / (A2 - A1 \text{ controle}) \times 100$$

Onde: A2 (leitura final) e A1 (leitura inicial)

3.6.2 Inibição da Enzima Elastase

Em uma placa de 96 poços foi adicionado 20 µL do diluente (tampão), 20 µL do inibidor extrato BEC (0-100 µg/mL), 20 µL do controle negativo (DMSO) e 20 µL do padrão (Sivelestat 100 µg/mL) em poços diferentes. Em seguida, foi adicionado 80 µL da enzima em cada poço e incubou-se a placa por 15 minutos a 37 °C, adicionou-se 100 µL do substrato (N-succinil-ala-ala-ala-p-nitroanilide – AAAPVN), realizou-se a primeira leitura da placa (A1) em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA), a placa foi colocada em incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, realizou-se a leitura da placa a cada 10 minutos até 50 minutos (A2). Os resultados foram calculados de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra}) / (A2 - A1 \text{ controle}) \times 100$$

Onde: A2 (leitura final) e A1 (leitura inicial)

3.6.3 Inibição da Enzima Colagenase

Em uma placa de 96 poços, foi colocado 10 µL do solvente (DMSO), extrato BEC (0-100 µg/mL) e padrão Quercetina, em seguida adicionou-se 10 µL da enzima, 80 µL do tampão, a placa foi colocada em incubação por 5 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente, após esse tempo foi adicionado 100 µL do substrato {*N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA)}. Realizou-se a primeira leitura da placa (A1) em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA), novamente a placa foi colocada em incubação em temperatura ambiente e realizou-se a leitura da placa a cada 5 minutos até 30 minutos (A2). Os resultados foram calculados de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra}) / (A2 - A1 \text{ controle}) \times 100$$

Onde: A2 (leitura final) e A1 (leitura inicial)

3.6.4 Inibição da Enzima Hialuronidase

Em uma placa de 96 poços adicionou-se 10 µL solvente (DMSO), extrato BEC (0-100 µg/mL) e padrão (Sivelestat 1 mg/mL), em seguida 30 µL da solução enzimática hialuronidase e incubou-se por 5 minutos a 37 °C, foi adicionado 60 µL do substrato ácido hialurônico e novamente houve incubação por 30 minutos a 37 °C. A reação foi revelada com 200 µL de Hexadecyltrimethylammonium bromide (BCTA) 2,5% e realizou-se a leitura a 405 nm em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, EUA). Os resultados foram calculados de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = (\text{Abs da amostra} / \text{média da abs do controle positivo}) \times 100$$

3.7 Ensaios em cultura de células

3.7.1 Linhagens e Cultura Celular

Foram utilizadas células não neoplásicas de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5, Code 0180, Biosafety:1) doada pela Profa Dra Raquel Montenegro da Universidade Federal do Ceará - UFC e queratinócito humano (HACAT) gentilmente cedidas pela Profa Dra Silvyia Stuch Maria Englerda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP.

Essas linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura (75 e 250 mL) estéreis em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e mantidas a 37 °C e atmosfera úmida 5% de CO₂ em incubadora.

Para os ensaios biológicos o extrato BEC foi solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO), diluído em meio de cultura para a concentração teste pretendida. A concentração final do DMSO em todos os ensaios não excedeu 0,2% (v/v).

Estas células foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

3.7.2 Avaliação da Viabilidade Celular

3.7.2.1 Método Alamar Blue

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com Nakayama, (1997). A linhagem celular de fibroblastos MRC-5 foi plaqueada na concentração (0,5 x 10⁴

células/poço) em placas de cultura de tecidos de 96 poços até um volume final de 100 µL por poço. Após 24 horas, realizou-se o tratamento com o extrato BEC testado nas concentrações de (0-100µg/mL) nos tempos de 24, 48 e 72 horas, após incubação, adicionou-se a solução Alamar Blue (10 µL de Alamar blue 0,4 % em PBS) e incubou-se as células durante 3 horas a 37 °C. A fluorescência foi medida por excitação a 545 nm e emissão a 595 nm no leitor de microplaca. Como controle positivo de morte celular foi utilizada a (Doxorubicin hydrochloride, D1515, Sigma-Aldrich) a 5 µg/mL e meio de cultura sem tratamento como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata de experimentos independentes e expressos como porcentagem de viabilidade celular.

$$\%Viabilidade = \frac{F_t \times 100}{\Delta F_b}$$

Onde:

F_t =(fluorescência da célula+meio+substância+resazurina)

ΔF_b =(fluorescência da célula+meio+resazurina).

3.7.3 Ensaio de proliferação celular – Exclusão por Azul de Tripán

Este ensaio baseia-se na capacidade que o corante azul de tripan tem de penetrar em todas as células. No entanto, as células viáveis conseguem expulsar o corante enquanto células não-viáveis permanecem coradas (PERES & CURI, 2005). O ensaio consistiu na avaliação da curva de crescimento e proliferação celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan (FRESHNEY, 1994) com modificações.

As células de fibroblastos MRC-5 foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 de células/mL em placas de 24 poços. Após 24 h as células foram tratadas com BEC nas concentrações de (0-100 µg/mL) em triplicata nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 h. Ao final de cada tempo foi realizado a contagem das células (viáveis e não viáveis) em câmara de Neubauer usando a solução de Azul de Tripán 0,4% (Trypan blue, T6146, Sigma-Aldrich). Para o cálculo do número de células de cada poço foi utilizada a seguinte equação matemática: $NC \times D \times 10^4 / Q$. Como controles foram utilizados: negativo (meio

sem tratamento), positivo (L-Ascorbic acid, A92902, Sigma-Aldrich) a 50 μ M. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (One way /ANOVA/ Bonferroni).

3.7.4 Ensaio da Motilidade/Migração celular

Para avaliar a capacidade de migração celular *in vitro* das células MRC-5 tratadas com o extrato foi utilizado o método descrito por Liang e colaboradores (2007). O ensaio baseia-se na criação de um espaço artificial (“arranhão”), em uma monocamada de célula confluyente, onde as células da borda irão mover-se para fechar completamente o novo espaço criado. Neste ensaio, as células da linhagem MRC-5 foram transferidas para placas de 24 poços, na densidade de $(10 \times 10^4$ células/poço) e as mesmas mantidas em incubação em atmosfera úmida, a 37 °C, contendo 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente, utilizando uma ponteira de 1- 200 μ L foi feito um risco no meio da monocamada de células contidas em todos os poços. Logo após, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato BEC (0-100 μ g/mL) e Vitamina C (25 μ M) por 24 h. O comportamento das células foi registrado por meio de fotografias acompanhando os tempos de 24, 48 e 72 horas, utilizando o microscópio invertido de luz polarizada (Leica®). Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (One way /ANOVA/ Bonferroni) em triplicata de experimentos.

3.7.5 Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos

Para quantificar a produção de colágeno solúvel no sobrenadante de cultura celular, foi utilizado o ensaio colorimétrico Picrosirius (Sirius-Red) método descrito por JONES et al., (2013) com modificações. As células de fibroblastos MRC-5 foram plaqueadas na densidade de $(1 \times 10^5$ células/mL) em placas de 24 poços e mantidas em

incubação com BEC (0-100 µg/mL) em triplicata por 24 horas. Após o tratamento, o sobrenadante celular foi removido para avaliação do colágeno solúvel e armazenado em uma placa espelho de 96 poços.

A placa foi colocada sem tampa em estufa a 37 °C *overnight* para a secagem do seu conteúdo. Em seguida, foi adicionado 200 µL de solução de Bouim saturada e incubadas por uma hora. O fixador foi removido e adicionado 300 µL de água destilada em cada poço. A placa foi seca em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Após este período, foi acrescentado 200 µL do corante Picrosirius 0,1% por uma hora, sob leve agitação e proteção da luz. O corante foi removido cuidadosamente e adicionado 250 µL de HCl 0,01 M para a remoção do corante não aderido. A solução de HCl foi removida e adicionado 150 µL de NaOH 0,1 M por 30 minutos sob leve agitação.

O conteúdo da placa foi lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão de colágeno foi preparada a partir de uma solução de colágeno tipo I from “*rat-tail*” (Sigma®) diluída em PBS e meio de cultura DMEM sem soro, nas concentrações finais de (30; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 µg/mL). Os valores médios foram plotados em gráfico de dispersão com as concentrações conhecidas de colágeno, com os valores do eixo X e as absorvâncias correspondentes a cada concentração com os valores do eixo Y e calculado a equação da reta e o coeficiente de correlação R. Foram realizados três experimentos em triplicata e os dados analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (Two way /ANOVA/ post-test Bonferroni).

3.7.6 Coloração de colágeno depositado na matriz extracelular

Para a fixação das células aderidas nas placas foram adicionados 100 µL de álcool a 70% gelado, e em seguida mantidas durante 10 minutos no freezer a - 80 °C para a completa fixação do material celular. Logo em seguida, foi removida a solução de álcool

e cada poço lavado com água destilada e as placas secas em temperatura ambiente. Após a secagem foram adicionados 100 µL da solução de Picosirius e as placas mantidas a 37 °C por duas horas. Cada placa foi lavada em água corrente para retirar o excesso do corante e seca em temperatura ambiente. Com o material seco, foi realizado as fotomicrografias das culturas celulares em microscópio invertido de luz polarizada (Leica®).

Avaliação da Genotoxicidade

3.8 Ensaio do cometa – pH alcalino

O teste do cometa alcalino foi realizado conforme metodologia descrita por Singh, et al. (1988) com alterações. Neste teste foi utilizado a linhagem celular não neoplásica de fibroblasto MRC5, na densidade celular (20×10^4), em placa de 24 poços, a placa foi colocada em incubação por atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h. Após esse tempo, as células foram tratadas com o extrato BEC nas concentrações de 100 e 25 µg/mL; (L-Ascorbic acid, A92902, Sigma-Aldrich) a 5 µM, controle negativo DMSO (0,2%), e (Doxorubicin hydrochloride, D1515, Sigma-Aldrich) a 5 e 10 µg/mL como controle positivo durante 3 horas. As lâminas foram preparadas com a agarose e todas as etapas desse processo, em seguida colocadas em cuba de eletroforese para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20 V e com corrente de 300 mA.

Posteriormente, colocou-se as lâminas em solução de neutralização por 5 minutos, para retirar a alcalinidade, em seguida foram secas e fixadas em etanol. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando 30 µL da Solução de Syber Green 1000x (Sigma-Aldrich) diluído 1:10000 em TBE – Tampão Borato de EDTA 1 x (TBE) sobre as lâminas. A análise dos cometas foi realizada de acordo com tamanho e

intensidade da cauda, seguindo os seguintes padrões: classe 0: sem dano, sem calda; classe 1: com a calda menor que o diâmetro da cabeça (nucleóide); classe 2: com o comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com a cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça e classe 4: desintegrado, cometa sem a cauda definitiva. Para cada lâmina foram contados 50 cometas, sendo classificados de acordo com o tamanho da cauda do cometa, incluindo o grau de quebra do DNA. O índice de dano (ID) foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre os números de cometa de cada classe e grau de cada cometa:

$$\text{ID total} = 0. (\text{n Classe 0}) + 1. (\text{n Classe 1}) + 2. (\text{n Classe 2}) + 3. (\text{n Classe 3}) + 4. (\text{n Classe 4}).$$

A frequência do dano foi calculada como a porcentagem de todos os tipos de cometa encontrado (grau 0 a grau 4) em relação ao total de cometas contados (50).

$$\text{Frequência de danos} = [(50 - \text{n Classe 0}) \cdot 100] / 50$$

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Os ensaios foram analisados pelo teste de comparações Dunnett's/One way análise de variância ANOVA/Bonferroni para comparação de mais de duas médias. O valor de $*p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em triplicata de experimentos. Os dados paramétricos e não-paramétricos foram calculados através do programa de estatística GraphPad Prisma (versão 6,0).

4. RESULTADOS

Os resultados da presente tese foram apresentados em formato de artigos.

Artigo 1: Botanical characteristics, socioeconomic importance and health uses of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*): A review¹

Artigo 2: Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Bertholletia excelsa* (H.B.K) bark extract²

Artigo 3: Cosmetic Applications of stem bark extract from *Bertholletia excelsa* H.K.B³

¹ Artigo de Revisão publicado na Revista Conjecturas DOI 10.53660/CONJ-709-820 ISSN:1657-5830, em 03/02/2022.

² Artigo Original aceito na Revista Blacpma Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas ISSN: 0717 7917, aceito em 9 de Março de 2022, será publicado em Abril de 2023.

³ Artigo deverá ser submetido a Revista Acta Pharmaceutica Sinica B (ISSN 2211-3843).

ARTIGO 1

Características botânicas, importância socioeconômica e usos em saúde da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*): Uma revisão

Botanical characteristics, socioeconomic importance and health uses of brazil nut (*Bertholletia excelsa*): A review

Márcia de Jesus Amazonas da Silva^{1*}, Ariane Mendonça Kluczkovski², Emerson SilvaLima³,

RESUMO

Bertholletia excelsa é uma espécie de florestas tropicais da família Lecythidaceae. Fonte econômica primária para muitas populações extrativistas apresentando diversas características relevantes. Esta revisão tem como objetivo reunir artigos publicados nas bases de dados Periódico Capes, Pubmed, Science Direct e outros, utilizando descritores referentes a castanha do Brasil, sobre sua importância na saúde e economia. Foram encontrados 38387 artigos dos quais 107 foram avaliados subsequentemente com as leituras de título/resumos, destes 58 foram selecionados para nortear a revisão. Os resultados confirmam a importância do manejo econômico desta espécie nas comunidades tradicionais na cultura de coleta/beneficiamento, bem como suas propriedades biológicas as quais contribuem para a saúde da população. Estudos experimentais adicionais são necessários para a elucidação de mecanismos de ação, segurança e eficácia da espécie na tentativa do uso da planta como recurso biotecnológico.

Palavras-chave: Propriedades Biológicas; Plantas Medicinais; Economia; Anti inflamatório; Antioxidante.

ABSTRACT

Bertholletia excelsa is a tropical rainforest species in the Lecythidaceae family. Primary economic source for many extractive populations with several relevant characteristics. This review aims to gather articles published in the databases Periódico Capes, Pubmed, Science Direct and others, using descriptors referring to Brazil nuts, about their importance in health and economy. A total of 38387 articles were found, of which 107 were subsequently evaluated with the title/abstract readings, of which 58 were selected to guide the review. The results confirm the importance of economic management of this species in traditional communities in the culture of collection/processing, as well as its biological properties which contribute to the health of the population. More experimental studies are needed to elucidate mechanisms of action, safety and efficacy of the species in an attempt to use the plant as a biotechnological resource.

Keywords: Biological Properties; Medicinal Plants; Economy; Anti-inflammatory; Antioxidant.

^{1,2,3} Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas

*E-mail: eslima@ufam.edu.br

1. Introdução

As plantas medicinais representam um tratamento natural para várias doenças humanas, e uma rede potente de diversidade biológica com os compostos que as constituem. Possuem vantagens como baixo custo e subsistência independentes. No entanto, várias pesquisas necessitam ser realizadas para comprovação da segurança e eficácia no uso destas fontes naturais (YANG et al, 2017).

O Brasil possui uma grande variedade de ecossistemas e abrigos na região amazônica, que é a maior floresta tropical do mundo, bem como na vegetação de cerrado, conhecida como a savana mais biologicamente diversificada do mundo (OLIVEIRA et al, 2010). Devido a essa grande biodiversidade, incluindo a Mata Atlântica e outros biomas, muitas plantas medicinais brasileiras ainda não foram investigadas, o que abre a oportunidade de explorar essas plantas para a descoberta de novos metabólitos secundários com capacidade de interferir nas diferentes doenças provocadas em humanos (DUTRA et al. 2016; SHEPARD & RAMIREZ. 2011).

Sobre a diversidade da flora amazônica, podemos estudar e avaliar as diversas atividades de plantas como *Bertholletia excelsa*, espécie vegetal nobre e valiosa na Amazônia produto vegetal extrativo mais importante da região em valor econômico, ecológico, social e alimentar (MÜLLER, 1981). A primeira descrição da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humboldt Bonpland Kunth), data de 1808 decorrente das viagens de um rico geólogo alemão chamado Friedric Heinrich Alexander, Baron von Humboldt que decidiu pesquisar e descrever do ponto de vista científico, pela primeira vez, a flora de várias partes do mundo ainda inexploradas (CHAMBERS; HIGUCHI; SCHIMEL, 1998).

As castanheiras são distribuídas em uma grande área geográfica de latitude de 5°N no alto Orinoco a 14°S no alto Madre de Dios RADAM-Brasil. (1973–1981). Pode ser encontrada na floresta de terra firme de solos na Amazônia e nas Guianas (MORI & PRACE, 1990). A castanheira mais antiga medida até o momento continha 180 cm de diâmetro e 427 anos (BRIENEN & ZUIDEMA, 2006). A árvore cresce em áreas de aproximadamente 400 metros acima do nível do mar, em temperaturas média entre 23,5 a 27, 6°C e precipitação anual de 1.445

a 3.399 mm, sendo típica de solos de oxisol e ultisol pobres em nutrientes e bem drenados (PERES & BAIDER, 1997; SHEPARD & RAMIREZ, 2011).

Sua maior concentração está na porção brasileira, principalmente no planalto que separa a bacia formada pelos afluentes do baixo Amazonas, alto Tocantins e alto Moju, e em terras altas ao norte do Rio Jarí, no estado do Pará e nos estados do Acre, até o alto Beni e no Amapá (CURY et al, 2018). No Amazonas a castanheira é distribuída uniformemente em todo território, porém sua ocorrência é mais frequente ao longo das calhas dos rios Madeira, Purus e Solimões (CARDOSO et al, 2017).

Apresentam-se em bosques de 50 a 100 indivíduos conhecidos como *castanhais* (Portugueses), *manchales* ou *castañaes* (Espanha), separados por distâncias consideráveis (1 km) de habitat compatível, com padrão de floração anual de elevada sincronia entre os indivíduos (PERES & BAIDER, 1997). Essa distribuição irregular levou Adolpho Ducke (1946) a sugerir que as castanheiras do Brasil poderiam ser plantações deixadas pelos antigos povos da Amazônia.

A espécie é responsável pela proteção de milhares de hectares de florestas tropicais, pois teve papel fundamental na inclusão dessas florestas na Categoria VI (áreas protegidas por recursos manejados) no Sistema de Classificação das Áreas Protegidas da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais) (COTTA et al, 2008). Essa categoria foi criada principalmente para legitimar as Reservas Extrativistas (Resex) como um modelo de conservação pautado no uso sustentável dos recursos naturais, além de inferir em uma variedade de características biológicas (HUBBELL, 1979).

Desta forma, a respeito deste potencial biológico da *B. excelsa* foi realizada uma pesquisa de artigos disponibilizados em base de dados, sobre o uso na saúde das diversas partes da planta desde folhas, cascas até raízes, castanha e outros com o intuito de compreender suas atividades biológicas descritas como leishmanicida, anti-malárica, anti-tumoral, antioxidante, anti-inflamatória e outras em estudos *in vitro* e *in vivo*, além de relatar sua importância econômica como fonte de renda de populações extrativistas no âmbito nacional e internacional.

2. Material e método

Foi realizada pesquisa eletrônica nas bases de dados Periódicos Capes, Google acadêmico, Scielo, Pubmed, Science Direct, Medline e Scopus utilizando palavras e combinações de termos da seguinte maneira: “*Bertholletia excelsa*”, *Bertholletia excelsa*, BERTHOLLETIA EXCELSA, “BERTHOLLETIA EXCELSA”, castanheiras do Brasil, *Bertholletia excelsa* and/or biotechnology and Brazil nuts. Os limites colocados na varredura de dados foram trabalhos relacionados às castanheiras do Brasil, uso medicinal da planta, informações de importância econômica e estudos *in vivo* e *in vitro* com *B.excelsa*.

Para seleção de trabalhos foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: 1) artigos publicados nos principais periódicos das áreas: Saúde, Produtos naturais, Farmácia e Medicina 2) Idiomas: inglês, português e espanhol 3) trabalhos com estudo nas atividades biológicas de *B. excelsa* 4) revistas de alto impacto 5) ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* e acessos a teses e dissertações. A pesquisa bibliográfica que subsidiou a presente revisão foi baseada na consulta de trabalhos publicados nos últimos 10 anos (2009 a 2020), conforme as palavras chaves supramencionadas. Para o critérios de exclusão foram delimitados outros idiomas, outros títulos de periódicos e demais termos e tópicos não correspondentes dos apresentados nas buscas das bases de dados.

Os resultados obtidos nesta revisão estão resumidos na figura 1. Na busca realizada em todas as bases de dados referidas, foram encontrados 38387 trabalhos publicados com os descritores.

- Periódico Capes: “*Bertholletia excelsa*” 1094, *Bertholletia excelsa* 1101, BERTHOLLETIA EXCELSA 1696. Google acadêmico: *Bertholletia excelsa* and biotechnology 1910, Castanheiras do Brasil 17300, *Bertholletia excelsa* 13000, Scielo: *Bertholletia excelsa* 83, “*Bertholletia excelsa*” 78, Pubmed: Brazil nuts 523, “*Bertholletia excelsa*” 99, *Bertholletia excelsa* 185, Science direct: *Bertholletia excelsa* 586, “*Bertholletia excelsa*” 581, Medline e Scopus: *Bertholletia excelsa* 151. Deste total foram avaliados título e resumo dos trabalhos para critério de seleção e avaliação para continuidade do estudo sendo 107 selecionados e destes 58

foram escolhidos mais relevantes para nortear esta revisão baseados no tema do estudo, incluindo principalmente aqueles de importância no âmbito socioeconômico e fatores relacionados a saúde

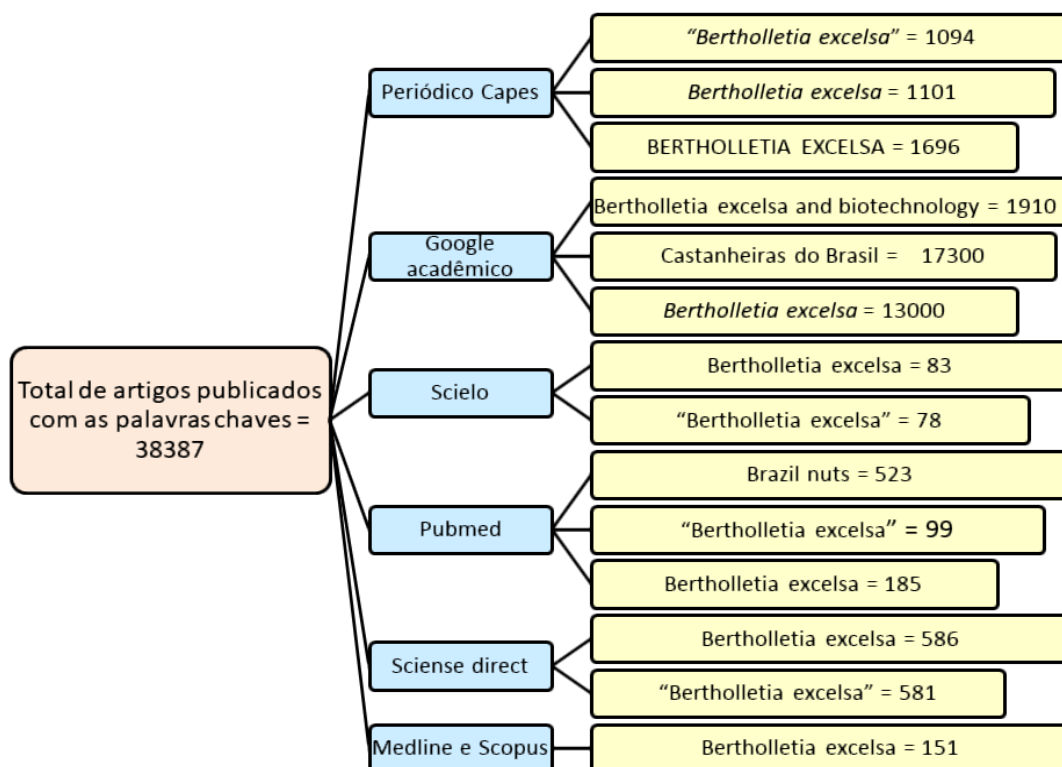


Figura 1: Organograma com os resultados das pesquisas embase de dados do estudo e seus resultados quantitativos com as palavras chaves da busca

3. Aspectos botânicos

A castanha-do-Brasil é classificada botanicamente como pertencente a divisão: *Angiospermae*; classe: Dicotiledônea; ordem: *Myrtiflorae*; família: *Lecythidaceae*; gênero: *Bertholletia*; espécie: *excelsa*. A família inclui cerca de 200 espécies divididas em dez gêneros; no entanto, estudos genéticos recentes demonstram que são necessárias grandes revisões taxonômicas em pelo menos quatro delas (MORI et al, 2007). São todas árvores selvagens, sendo que a maioria cresce em locais úmidos próximos as águas do rio Amazonas e seus afluentes, desde as montanhas peruanas até o Atlântico. As árvores colossais atingem até 60 m de altura e 16 m de circunferência com DAP (Diâmetro de Altura do Peito) maior que 2 m e viver centenas de anos (PIRES, 1984). Possui caule cilíndrico, liso, desprovido de ramos até a fronde, casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A espécie *B. excelsa* é única nas *Lecythidaceae*, seu fruto tem forma de cápsula globosa quase esférica, medindo de 8 a 15 cm de diâmetro sendo visível na parte superior, o vestígio do cálice, apresenta casca espessa, lenhosa, dura e de cor castanha (MAUÉS, 2002). Todas as outras *Lecythidaceae* com frutas que caem no chão na maturidade têm uma frágil parede de frutos (pericarpo) que logo se abre, ou então uma “tampa” que cai do opérculo (abertura semelhante a um cálice), permitindo que as sementes se dispersem (JOHN; SHAHIDI, 2010). A tampa opercular da castanha-do-Brasil cai para dentro, em vez de para fora, bloqueando a abertura que, em qualquer caso é muito pequena (cerca de 1 cm de diâmetro) para liberar as sementes, que têm em média 2,0 cm de largura por 5,0 cm de comprimento (PERES & BAIDER, 1997).

As folhas da castanheira são simples, espaçadas, alternadas, pecioladas, verde escuras, brilhosas na parte superior e pálidas na inferior, apresentam seis pétalas brancas ou brancacentas, tubulosas, grandes, dispostas em panículas terminais e eretas (THOMSON et al, 2008). Suas flores alógamos polinizadas por abelhas grandes (principalmente dos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Xylocopa*, *Epicharis* e *Eulaema*) capazes de voar longas distâncias (> 20 km), garantindo assim um extenso fluxo gênico entre árvores e populações distantes. Essas flores são cobertas por uma das pétalas, que ao longo do tempo necessita serem levantadas pelos polinizadores durante a

polinização, essas mesmas flores são dispostas por inflorescência e uma ou duas se abrem por dia (STOCKLER-PINTO, 2010).

Suas sementes requerem de 12 a 18 meses de armazenamento em condições úmidas para germinação, em comparação com a germinação quase instantânea para a maioria das outras espécies da família Lecythidaceae (MORI & PRANCE, 1990). A castanheira é uma árvore dominante no dossel superior que se regenera naturalmente nas lacunas da floresta (SUN; LEUNG, TOMIC, 1987). Essas áreas de distúrbios florestais de pequena escala fornecem os níveis mais altos de luz aparentemente necessários para que a castanha do Brasil atinja o tamanho reprodutivo (MORI & PRANCE, 1990).

Sua madeira é muito útil para construção principalmente naval e civil, também com a madeira se produz celulose de boa qualidade para fabricação de papéis embora seja ilegal derrubar castanheiras no Brasil (CARDARELLI; OLIVEIRA, 2000). Enquanto, sua casca pode-se fazer um tipo de fibra que apresenta uma cor tipicamente acinzentada que é utilizada como estopa de calefação, do ouriço se faz carvão de elevado poder calorífico e da amêndoa se extrai um óleo de excelente qualidade tanto para fabricação de cosméticos quanto para alimentação (KITAMURA & MULLER, 1984).

A castanha é um alimento que retém selênio em sua composição, incorporando-o às selenoproteínas estão envolvidas nas funções enzimáticas do metabolismo dos anti-inflamatórios, hormônios da tireóide e antioxidantes (FREITAS et al, 2008; SCHOMBURG & KÖHRLE, 2008). Têm em sua matriz complexa substâncias bioativas como α - β -tocoferol, compostos fenólicos, folato, magnésio, cálcio, potássio, zinco, proteínas e ácidos graxos mono e poli-insaturados (KOCYGIT; KOYLU; KELES, 2006; ROS, 2009; ROS et al, 2004). É rica em lipídeos (60-70%), proteínas de alto valor biológico (15-20%), vitaminas, ácido palmítico, esteárico, linoleico, linolênico, sendo que a fração lipídica dos ácidos graxos saturados não ultrapassa 25% de seu total (FREITAS et al., 2007).

Apresenta altos níveis de aminoácidos como cisteína e metionina considerados a fonte mais rica desses aminoácidos essenciais (ANTUNES, 1975; SUN; LEUNG; TOMIC, 1987). A fração

de albumina 2S da castanha-do-Brasil contém altos níveis de metionina e cisteína em uma análise de proteínas de baixo peso molecular segundo (YOULE & HUANG, 1981), após esse achado houve um interesse crescente no valor nutricional da castanha-do-Brasil, pois muitas proteínas vegetais são deficientes nesses aminoácidos essenciais (DE CLERCQ et al, 1990).

O óleo da castanha é usado também como lubrificante na aviação e em componentes eletrônicos pelas suas propriedades antioxidantes e também na fabricação de doces finos *in natura*. Da prensagem da castanha pode ser obtido o óleo e o leite de castanha, usado na elaboração de iguarias culinárias (PERES & BAIDER, 2009). Seu óleo apresenta 13,8% de ácido palmítico, 8,7% de ácido esteárico, 31,4% de ácido oléico e 45,2% de ácido linoleico, além de pequenas quantidades dos ácidos mirístico e palmitoléico (FREITAS et al., 2007).

4. Importância econômica

As castanheiras são de importância econômica em países como Brasil, Peru e Bolívia, sendo considerada fonte econômica para diversas famílias extrativistas representando em até 70% da economia total das regiões produtoras (ALMEIDA, 1963). A cadeia produtiva apresenta variações conforme as tecnologias adotadas pelo extrativista ou pela usina, e é executada em função da finalidade em se obter a castanha com e sem casca (ANSELMO et al, 2018).

A produção extrativa vegetal da Amazônia encontrava fluxo comercial nos mercados europeus desde a época da colonização do Brasil pelos portugueses. De fato, a foz do rio Amazonas era uma região onde se praticava um intenso comércio muitas vezes ilegal de produtos regionais, os quais eram cobiçados por ingleses, franceses, holandeses e irlandeses. Passado um pouco mais de um século, alguns produtos daquela época continuam presentes na pauta do comércio exterior da Amazônia, por exemplo, a castanha, madeiras, óleos, peixes e essências vegetais.

A castanha-do-Brasil produzida é comercializada no exterior, sendo que os maiores compradores são os Estados Unidos, a Inglaterra, França, Alemanha e Itália. No entanto, a

comercialização da castanha dentro do país é uma importante fonte de renda para milhares de povos indígenas que vivem na Amazônia (JOHN & SHAHIDI, 2010).

Os principais países importadores de castanha-do-Brasil são: Itália, Alemanha, Estados Unidos, Reino Unido e Japão. Apesar das barreiras sanitárias estabelecidas por esses países, principalmente a partir do ano de 2003, a produção total do Brasil em 2006 foi de 28.806T, com uma participação da região Norte de 98,35% desse total (IBGE/SIDRA, 2007).

Em 1933 a produção brasileira variou de 3557 toneladas em 1944 a 104.487 toneladas em 1970. A baixa produção no início de 1940 foi causada pela demanda reduzida por dois dos maiores consumidores Estados Unidos e Grã-Bretanha durante a Segunda Guerra Mundial, com média de produção anual de 40.000 toneladas (SÁNCHEZ, 1973). Já em 1984 a produção brasileira de castanha era de 90% da produção mundial, até 1990 o país ocupava a liderança no mercado mundial com 80% do comércio internacional e produção maior que 51.000 toneladas (NÉMETH, 2013).

Após a expansão da produção e a comercialização da castanha-do-Brasil no exterior em 1866, com abertura dos portos da Amazônia, a coleta de castanha passou a ser uma importante atividade econômica na Amazônia, principalmente nas regiões de Manaus e Belém (CHUNHIENG et al, 2004).

As exportações a castanha-do-Brasil sofreram também uma retração significativa. O balanço comparativo entre 2000 e 2001 registrou uma queda nas exportações brasileiras de castanha com casca que chega perto de 60%. O Pará obteve pior desempenho, porém embora se mantenha a liderança no ranking de Estados exportadores, sofreu uma redução superior a 62%. O preço da amêndoa também caiu de US\$ 2,64 para US\$ 1,83 o quilo. Em termos nacionais, a exportação caiu de pouco mais de US\$ FOB (*Free On Board*) 11.149.679, em 2001, contra US\$ FOB 27.686.194, em 2000. No Pará, US\$ FOB 13.175.113 somente de casca sem casca e mais US\$ FOB 8.244.044 do produto com casca (FARIA, 2001; ALICE-WEB, 2006).

De acordo com dados da Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura - PEVS ao qual constitui a principal fonte de estatísticas sobre o acompanhamento sistemático da exploração dos recursos florestais em todo o Território Nacional do IBGE, a produção brasileira da castanha-do-

Brasil, alcançou um superávit em 2011 de 42.152T, uma mediana em 2015 com 40.643T e uma menor produção em 2016 de 34.664 toneladas como observado no gráfico 1 (IBGE/PEVS, 2016).

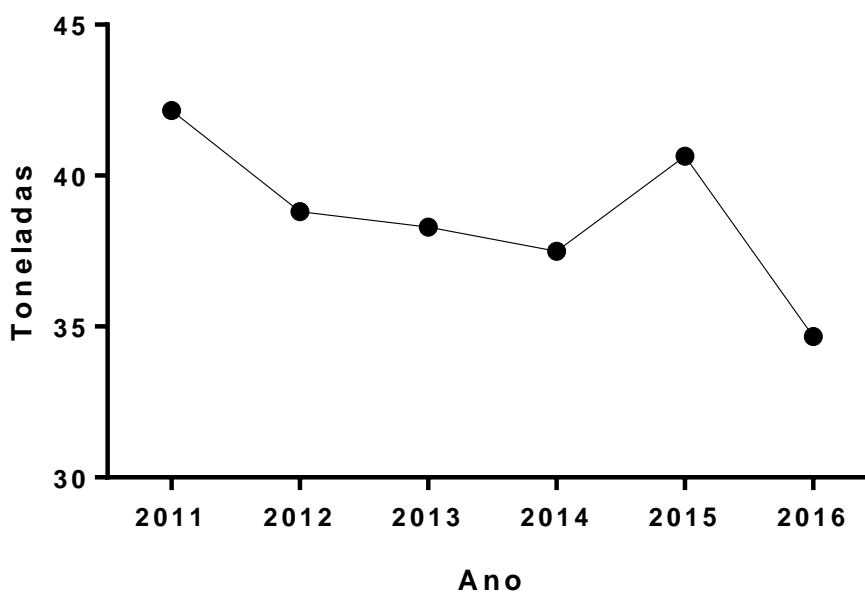


Figura 2: Produção Brasileira da castanha-do-Brasil em toneladas

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção da extração vegetal e da silvicultura – PEVS. 2016.

5. Aplicações para área da saúde

Vários estudos relacionam diversas atividades biológicas com o uso de partes da planta (casca do caule, fruto, folhas, fruto e castanhas) de *B. excelsa* como demonstrado na tabela 1. Segundo Ribeiro et al (2018), as plantas medicinais brasileiras são consideradas um suprimento promissor, no que tange sua biodiversidade, principalmente em relação ao seu potencial anti-inflamatório como constatado em seus estudos com a diminuição de marcadores inflamatórios como as interleucinas, fator de transcrição NF- κ B, prostaglandinas, ciclooxigenases e espécies reativas de oxigênio.

Esta atividade anti-inflamatória de *B. excelsa*, também foi demonstrada nos estudos de Colpo e colaboradores (2014), os quais foi investigado o efeito de uma única dose de castanha (20 ou 50g) nos marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis, testados antes e após o

consumo das nozes. As enzimas renais (ureia/creatinina) e hepáticas (TGO, TGP, GGT, fosfatase alcalina) não apresentaram qualquer alteração bioquímica indicando ausência de toxicidade hepática e renal, já os valores séricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ foram diminuídos, enquanto que os valores da interleucina-10 (anti-inflamatória) foram significativamente aumentados ($p < 0,05$), demonstrando que o consumo a longo prazo da castanha-do-Brasil pode diminuir os marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis.

Com a suplementação diária da castanha por três meses Stockler-Pinto e colaboradores (2015) puderam observar que os níveis plasmáticos de 8-OHdG e 8-isoprostano diminuíram e a atividade dos níveis de GPx e selênio no plasma aumentaram significativamente, promovendo uma resposta anti-inflamatória e antioxidante em pacientes com aporte de hemodiálise. Em se tratando de resposta antioxidativa de *B. excelsa*, Huguenin et al (2015) avaliaram pacientes hipertensos e dislipidêmicos com uso de 13g diária de castanha-do-Brasil, constatou-se aumentou significativamente nas taxas de selênio plasmático (Se), aumento da atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx), capacidade de antioxidante total (TAC) e reduziu os níveis de LDL oxidado nesse grupo de pacientes.

Quanto atividade antiparasitária da espécie extratos brutos e frações da casca do caule de *B. excelsa* promoveram atividade tripanocida em ensaios *in vivo* com animais infectados por *T. cruzi* reduzindo em 90,3% os parasitas (CAMPOS et al, 2005). *B. excelsa* apresentou atividade anti-malárica em cultura *in vitro* de *P. falciparum* com valor de CI50% abaixo de 1,6 μ g/mL frente a outros extratos testados (OLIVEIRA et al, 2015).

Atividade anti-carie com o uso do óleo das castanhas de *B. excelsa* foi descrita por Filogônio e colaboradores (2011), após monitoramento de indivíduos em uso de (dentifrício+óleo vegetal de *B. excelsa*) melhorando o controle do biofilme dental e prevenindo das doenças periodontais. No que se refere atividade anti-tumoral de *B. excelsa*, Ip & Lisk (1994) em modelos com animais avaliaram a prevenção do câncer mamário, após suplementação com castanhas em doses de 1-3 μ g/g.

<i>Bertholletia excelsa</i>	ATIVIDADE	RESULTADO	REFERÊNCIA
Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>)	- Avaliação do perfil antioxidante após suplementação da castanha-do-Brasil	-Uso os ensaios enzimáticos de varredura de radicais livres com ORAC, DPPH, TEAC com diminuição dos níveis de estresse oxidativo	JOHN & SHAHIDI, 2010
Trypanocidal activity of extracts and fractions of <i>Bertholletia excelsa</i>	- Atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra a forma promastigota de <i>Tripanosoma cruzi</i>	- Extratos brutos da casca do caule de <i>B. excelsa</i> reduziu significativamente em 100% o número de parasitos	CAMPOS et al, 2005
Avaliação da atividade da lipoxigenase na castanha do brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>)	-Determinar as condições ótimas da atividade da lipoxigenase (LOX) em <i>B. excelsa</i>	-Detecção das lipoxigenases LOX-2 e/ou LOX-3 em pH 6,5 na castanha-do-Brasil	FERREIRA et al, 2011
Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women	- Avaliar as concentrações de selênio, atividade da glutathione peroxidase e perfil lipídico do grupo em estudo	- Houve aumento de Se e GPx no plasma das pacientes com diminuição dos parâmetros lipídicos reduzindo assim os riscos cardiovasculares	COMINETTI et al, 2012
Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i> , H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients.	- Potencial antioxidante e anti-inflamatório da castanha-do-Brasil em pacientes que fazem hemodiálise	-Aumento no nível de selênio (Se) e glutathione peroxidase (GPx), diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e 8-OHGd no plasma.	STOCKLER-PINTO et al, 2014
Effect of selenium supplementation via Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i> , HBK) on	- Avaliar os níveis plasmáticos de selênio (Se) e dos hormônios da	- Houve a detecção de Selênio nos pacientes após suplementação com castanha-do-Brazil e regulação dos níveis	STOCKLER-PINTO et al, 2015

thyroid hormones levels in hemodialysis patients: a pilot study	tireóide (T4 e T4) nos pacientes em uso de hemodiálise	tireoidianos e da atividade da glutathione peroxidase (GPx)	
Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans	- Avaliar a regulação dos biomarcadores do câncer de coloretal humano com consumo diário da castanha	- Aumento significativo de selênio, selenoproteína retal P (SePP), β -catenina e mRNA. Redução dos níveis de DNMT1 e NF- κ B da inflamação	HU et al, 2016
Prior intake of Brazil nuts attenuates renal injury induced by ischemia and reperfusion	- Investigar a redução da lesão renal por isquemia-reperfusão, inflamação e estresse oxidativo após suplementação com castanha-do-Brasil	- Redução dos parâmetros de função renal (ureia, creatinina, fósforo plasmático), elevação da depuração da creatinina e volume urinário com redução da proteinúria e expressão de iNOS.	ANSELMO et al, 2018
Comparison of the Effects of Brazil Nut Oil and Soybean Oil on the Cardiometabolic Parameters of Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized Trial	-Diminuição da peroxidação lipídica contribuindo para a redução do estresse oxidativo	-Diminuição dos parâmetros antropométricos, pressão arterial, bioquímicos e oxidativos	COSTA et al, 2020
The effect of Brazil nuts on selenium levels, Glutathione peroxidase, and thyroid hormones: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials	- Investigar o efeito da castanha-do-Brasil nos níveis plasmáticos de selênio, glutathione peroxidase e hormônios da tireoide	- Com suplementação diária de 9.42g de castanha foi possível observar aumento nos níveis de selênio e GPx, porém não houve interferência nos hormônios tireoidianos	YINGXIN et al, 2020

6. Considerações finais

A presente revisão norteou a pesquisa dos diversos achados econômicos e uso na saúde de *B. excelsa* na literatura em consulta aos bancos de dados presentes no estudo para subsidiar nossa pesquisa. Foi descrito a origem da espécie, dimensões, localização e seus aspectos botânicos. Pode-se observar uma grande importância no cenário econômico promovido por *B. excelsa*, representando mais de 80% da renda de populações extrativistas e o interesse crescente na demanda do mercado internacional.

Em conclusão, apontamos as atividades biológicas de *B. excelsa* anti-inflamatória, anti-tumoral, antiparasitária, antioxidante e outros destacando a importância de se realizar mais ensaios experimentais na tentativa de elucidar outras atividades e novos mecanismos de ação desta espécie tão valiosa presente na flora Amazônica, como sendo fonte de renda econômica, ecológica e medicinal de tantas populações. E torná-la um alvo terapêutico promissor no uso das diversas doenças que assolam a sociedade.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica pelo apoio institucional e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas – FAPEAM pela concessão da bolsa de estudo cedida ao primeiro autor.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico

Referências

ALMEIDA, C.P. Castanha do Pará: sua exportação e importação na economia Amazonica. edicções S.I.A. Estudos Brasileiros 19: 1-86, 1963.

ANSELMO, N.A. et al. Prior intake of Brazil nuts attenuates renal injury induced by ischemia and reperfusion. **Jornal brasileiro de nefrologia: orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v.40, n.1, p.10–17, 2018.

ANTUNES, A.J. Protein supplement of navy bean with Brazil nuts. PhD Thesis, Department of Food Science and Human Nutrition, State University of Michigan, East Lansing, MI, USA, 1975.

BALICK, M.J. Useful plants of Amazonia: A resource of global importance. **Amazonia Pergamon Press**, p.339-368, 1985.

BRIENEN, R.J.W.; ZUIDEMA, P.A. Lifetime growth patterns and ages of bolivian rain forest trees obtained by tree ring analysis. **Journal of Ecology**, v.94, n.2, p.481-493, 2006.

CAMPOS, F.R.; JANUÁRIO, A.H.; ROSAS, L.V.; NASCIMENTO, S.K.R.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; CORDEIRO, M.S.C.; TOLDO, M.P.A., ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, v.76, n.1, p.26–29, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.09.008>2005.

CARDARELLI, H.R.; OLIVEIRA, A.J. Conservação do leite de castanha-do-Pará. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 617-622, out./dez. 2000.

CARDOZO, L.F.M.F.; STOCKLER-PINTO, M.B.; MAFRA, D. “Brazil nut consumption modulates Nrf2 expression in hemodialysis patients: A pilot study”. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.60, n.7, p.1719–1724, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500658>, 2016.

CARDOSO, B.R.; DUARTE, G.B.S.; REIS, B.Z.; COZZOLINO, S.M.F. “Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects”. **Food Research International**, v.100, p.9–18. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.036>. 2017.

COLPO, E.; DALTON D.A.C.; VILANOVA, L.G.B.R.; MARTA, M.M.F.; DUARTE, I.L.G.; FARIAS, D. F.M.; MARIANO, D.O.C. “Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters”. **Nutrition**, v.30, n.4, p. 459–65. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005>. 2014.

COTTA, J.N.; KAINER, K.A.; WADT, L.H.O.; STAUDHAMMER, C.L. Shifting cultivation effects on Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) regeneration. **Forest Ecology and Management**, v.256, n.2, p.28-35, 2008.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S.; GARRIDO, 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, p. 891-896, 2011.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; GARRIDO, A.B.; COZZOLINO, S.M.F. “Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women”. **Nutrition Research**, v.32, n.6, p.403–7. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.05.005>. 2012.

CURY, M.F.R. et al. Inflammation and kidney injury attenuated by prior intake of Brazil nuts in the process of ischemia and reperfusion. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v.40, n.4, p.312–318, 2018.

CHAMBERS, J.Q.; HIGUCHI, N.; SCHIMEL, J.P. Ancient trees in Amazonia. **Nature**, v.391, p.135–136, 1998.

CHUNHIENG, T. et al. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.13, p.4318-4322, 2004.

DE CLERCQ, A.; VANDEWIELE, M.; VAN DAMME, J.; GUERCHE, P.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCHHOVO, J.; KREBBUS, E. Stable accumulation of modified 2S albumin and storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants, **Plant Physiology**, v.94, p.970-979, 1990.

DUCKE, A. Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia brasileira. **Boletim Técnico do Instituto Agronomico do Norte**, v.8, p.2-24, 1946.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. “Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives”. **Pharmacological Research**, v.112, p.4-29.2016.<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>. 2016.

SILVA, E.; COSTA, L.M.; MELO, M.L.P.; REIS, F.V.F.; MONTEIRO, M.C.; SANTOS, S.M.; GOMES, B.A.Q.; SILVA, L.H.M. “Comparison of the effects of Brazil nut oil and soybean oil on the cardiometabolic parameters of patients with metabolic syndrome: A randomized trial”. **Nutrients**, v.12, n.1, p.1-14. 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12010046>. 2020.

FERREIRA, F.N.; XAVIER, E.M.P.; PINTO, A.S.; POMPEU, D.R. “Avaliação da atividade da lipoxigenase na castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)”. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.29, n.1, p.1-8.2011. <https://doi.org/10.5380/cep.v29i1.22733>. 2011.

FILOGÔNIO, C.F.B.; SOARES, R.V.; HORTA, M.C.R.; PENIDO, C.V.S.R.; CRUZ, R.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.556-61.2011. <https://doi.org/10.1590/S180683242011000600014>. 2011.

FREITAS, S.P.; SILVA, O.F.; MIRANDA, I.C.; COELHO, M.A.Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.14-17, 2007.

FREITAS, S.C.S.; GONÇALVES, E.B.; ANTONIASSI, R.; FELBERG I.; OLIVEIRA, S.P.D. Meta-analysis of selenium content in Brazil nuts. **Braz J Food Technol**, v.11, p.54-62, 2008.

GONZAGA, Irland Barroncas. Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, L). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2002.

HOLBEN, D.H.; SMITH, A.M. The diverse role of selenium with selenoproteins: a Review. **J. Am. Diet. Assoc.**, v.99, p.836-843, 1999.

HU, Y.; GRAEME, H.; MCINTOSH, RICHARD, K.L. L.; SOMASHEKAR, R.; MENG, X.Q.; GOPALSAMY, G.; BAMBACA, L.; MCKINNON, R.A.; YOUNG, G.P. “Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans”. **British Journal of Nutrition**, v.116, n.11, p.1901-11. 2016. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003937>. 2016.

HUGUENIN, G.V.B.; GLAUCIA, M.M.; OLIVEIRA, A.S.B.M.; SAINT'PIERRE, T.D.; GONÇALVES, R.A.; PINHEIRO-MULDER, A.R.; TEODORO, A.J.; LUIZ, R.R.; ROSA, G. “Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects”. **Nutrition Journal**, v.14, n.1, p. 1-10. 2015.<https://doi.org/10.1186/s12937-015-0043-y>. 2015.

IP, C.; LISK, D.J. “Bioactivity of Selenium From Brazil Nut for Cancer Prevention and Selenoenzyme Maintenance”. **Nutrition and Cancer**, v.21, n.3, p.203-212.1994. <https://doi.org/10.1080/01635589409514319>. 1994.

JOHN, J.A.; SHAHIDI, F. “Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*)”. **Journal of Functional Foods**, v.2, n.3, p.196-209.2010.<https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>. 2010.

- KAINER, K; DURYEY, M.L.; MALAVASI, M.M.; SILVA, E.R.; HARRISON, J. Moist sorra-be of Brasil nut seeds for improved germination and nursery management. **Forest ecology and management**, v.116, p.207-217, 1999.
- KANASHIRO, M.; HARRIS, S.A., SIMONS, A. RAPD diversity in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Silvae Genetica**, v.46, n.4, p.219–223, 1997.
- KITAMURA, P.C.; MULLER, C.H. Castanhais nativos de Marabá-PA: Fatores de depressão e bases para a sua preservação. EMBRAPA, Centro de Pesquisas Agropecuário do Trópico Úmido. Documentos 30: 1-32, 1984.
- KOCYGIT, A.; KOYLU, A.A.; KELES, H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.16, n.3, p.202-209, 2006.
- MAUÉS, M.M. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. In: P. KEVAN & V. L. IMPERATRIZ FONSECA (Eds.): Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature, p.245-254. Ministério do Meio Ambiente, 2002.
- MORI, S.A.; SWARTHOUT, D. Brazil nut family (Lecythidaceae) in the New World. In Encyclopedia of Earth, ed. C. J. Cleveland and D. Swarthout. Environmental Information Coalition, National Council for Science and the Environment, Washington, 2007.
- MORI, S.A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology, and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v.8, p. 130-150, 1990.
- MOMČILOVIĆ, B., PREJAC, J.; VIŠNJEVIĆ, V.; BRUNDIĆ, S.; SKALNY, A.A.; MIMICA, N. “High hair selenium mother to fetus transfer after the Brazil nuts consumption”. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.33, p.110–13. 2016.<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.10.004>. 2016.
- MÜLLER, C.H. Castanha-do-Brasil: Estudos agrônômicos. EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido, Belém, Pará, 1981.
- MYERS, G.P.; NEWTON, A.C.; MELGAREJO, O. The influence of canopy gap size on natural regeneration of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in Bolivia. **Forest Ecology and Management** v.127, n.1-3, p.119-128. 2000.
- NELSON, B.W.; ABSY, M.L.; BARBOSA, E.M.; PRANCE, G.T. Observations on flower visitors to *Bertholletia excelsa* H.B.K, and *Couratari tenuicarpa* A. C. Sm. (Lecythidaceae). **Acta Amazônica**, v.15, p.1-2, supl.: 225, 1985.
- NÉMETH, A. et al. The relationship of selenium tolerance and speciation in Lecythidaceae species. **Metallomics**, v.5, n.12, p.1663–1673, 2013.
- O’MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae): II. Mating system. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, n.6, p.929-932, 1988.
- OLIVEIRA, D.R.; KRETTLI, A.U.; AGUIAR, A.C.C.; LEITÃO, G.G.; VIEIRA, M.N.; MARTINS, K.S. LEITÃO, S.G. “Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil”. **Journal of Ethnopharmacology**, v.173, n. 424–434. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.035>. 2015.
- OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, S.G.; O’DWYER, E.C.; LEITÃO, G.G. ARQMO, Authorization of the traditional knowledge associated access for bioprospecting purposes: the case of UFRJ and the association of the Oriximiná quilombola communities – ARQMO. **Rev. Fitos**, v.5, p.59–76. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672011000300008>. 2010b.

PACHECO, A.M., SCUSSEL, V.M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis, SC: Editograf, 2006.

PERES, C.A.; BAIDER, C. Seed Dispersal , Spatial Distribution and Population Structure of Brazilnut Trees (*Bertholletia excelsa*) in Southeastern Amazonia. *Ecology Tropical*. <http://www.jstor.org>". **Structure**, v.13, n.4, p.595–616, 2009.

PIRES, J.M. The Amazonian forest. in H. Sioli, ed., *The Amazon: Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*, p.581- 602, 1984.

PINTO, R.; CÍNTIA, M.; PUSHKAR, S.B. "Functionality of succinylated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) kernel globulin". **Plant Foods for Human Nutrition**, v.60, n.1, p.1–6. 2005. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-2533-0>. 2005.

RADAM-Brasil. Levantamento de recursos naturais: Geologia, geomorfologia, solos, vegetação, uso potencial da terra (22 volumes). Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia, Departamento Nacional de Produção Mineral. (1973–1981).

RIBEIRO, V.P.; CAROLINE A.; MOHAMED ABD, E.S.; BASTOS, J.K. "Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review". **Pharmaceutical Biology** 56 (1): 253–68. 2018.<https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1454480>. 2018.

ROS, E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v.89, p.1649S-1656S, 2009.

ROS, E.; NUNEZ, I.; PEREZ-HERAS, A.; SERRA, M.; GILABERT, R.; CASALS, E.; DEULOFEU, R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. **Circulation**, v.109, p.1609-1614, 2004.

SÁNCHEZ, J.S. Explotación y comercialización de la castaña en Madre de Dios. Ministerio de Agricultura, Dirección General de Forestal y Caza, Informe n30. Lima, Peru, 1973.

SUN, S.S.M.; LEUNG, F.W.; TOMIC, J.C. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) proteins: fractionation, composition and identification of a sulfur rich protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, p.232-235, 1987.

STOCKLER-PINTO, M.B.; MAFRA, D.; MORAES, C.; LOBO, J.; BOAVENTURA, G.T.; FARAGE, N.E.; SILVA, W.S.; COZZOLINO, S.F.; MALM, O. "Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients". **Biological Trace Element Research**, v.158, n.1, p.105–12. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9904-z>. 2014.

STOCKLER-PINTO, M.B., CARRERO, J.J.; WEIDE, L.C.C.; COZZOLINO, S.M.F.; MAFRA, D. "Efecto de la suplementación de selenio a través de la nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*, HBK) en los niveles de hormonas tiroideas en pacientes de hemodiálisis: Un estudio piloto". **Nutrición Hospitalaria**, v.32, n.4, p.1808–12. 2015. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9384>. 2015.

STOCKLER-PINTO, M.B., MALM, O.; MORAES, C.; FARAGE, N.E.; SILVA, W.S.S.; COZZOLINO, M.F.; MAFRA, D. "A Follow-up Study of the Chronic Kidney Disease Patients Treated with Brazil Nut: Focus on Inflammation and Oxidative Stress". **Biological Trace Element Research**, v.163, n.1–2. p. 67–72. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0167-5>. 2015.

STOCKLER-PINTO, M.B. et al. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, n. 11–12, p. 1065–1069, 2010.

SHEPARD, G.H.; RAMIREZ, H. "Made in Brazil": Human Dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia". **Economic Botany**, v.65, n.1, p.44–65. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12231-011-9151-6>. 2011.

HUBBELL, S.P. Tree dispersion, abundance, and diversity in a tropical dry forest. **Science**, v.203, n.4387, p.1299–1309. 1979. <https://doi.org/10.1126/science.860134.1979>.

SCHOMBURG L.; KÖHRLE J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. **Mol Nutr Food Res**, v.5, p.1235–46, 2008.

SCOLES, R. Do rio Madeira ao rio Trombetas: novas evidências ecológicas e históricas da origem antrópica dos castanhais amazônicos. *Novos Cadernos NAEA*, v.14, n.2, p.265-282, 2011.

THOMSON, C.D. et al. Brazil nuts: An effective way to improve selenium status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, n.2, p.379–384, 2008.

YANG, R.; YUAN, B.C.; MA, Y.S.; ZHOU, S.; LIU, Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharm Biol**, v.55, p.5–18, 2017.

YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species, **American Journal of Botany**, v.68, p.44-48, 1981.

ARTIGO 2

Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Bertholletia excelsa* (H.B.K) bark extract

Márcia J. A. Silva¹, Leonard D. R. Acho¹, Jaqueline F. Campos⁴, José P. M. Neto¹, Anderson Guimaraes², Felipe M. A. Silva², Hector H. F. Koolen³, Edson L. Santos⁴, Ana Paula A. Boleti¹, Emerson S. Lima^{1*}

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I Manaus 69077-000, Brazil.

² Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I Manaus 69077-000, Brazil.

³ Grupo de Estudos em Metabolômica e Espectrometria de Massas, Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Escola Superior de Ciências da Saúde, Av. Carvalho Leal, 1777, Manaus 69050-000, Brazil.

⁴ Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, R. Joao Rosa Goes, 1761, Dourados-MS 79825-070, Brazil.

Correspondence should be addressed to Emerson S. Lima; eslima@ufam.edu.br

Abstract

Bertholletia excelsa is a native tree in the Amazon rainforest known as Brazil nuts is a tree that can reach up to 50 m is an internationally appreciated plant and one of the main export products of the Amazon, and its fruit has innumerable biological activities, however the medicinal use of the bark of the tree is not yet completely elucidated. The purpose of this study was to determine the chemical constituents, antiinflammatory, antioxidant and activities of *B. excelsa* bark extract (BEC). Twelve compounds were detected, among them, ellagitannin derivatives were the main compounds present in the extract. The BEC extract was able to scavenge the free radicals: DPPH·, ABTS·, superoxide anion and to inhibit enzyme xanthine oxidase. BEC decreased the nitric oxide production by *LPS-stimulated macrophages*. The cytoprotective capacity of BEC against H₂O₂-induced oxidative stress in J774 macrophages was confirmed by the decreased intracellular ROS production. The BEC significantly enhanced the expression of antioxidant genes of HMOX-1, followed by inhibition of inducible NO• synthase. Interestingly, BEC overcame the antioxidant effects of glutathione peroxidase-1, reducing its expression, being as efficient as GPx-1 in the detoxification of peroxides in cell. Furthermore, BEC was able to inhibit the migration of leukocytes from the peritoneal cavity of mice in the in vivo assay of LPS-induced peritonitis. In this concluded that BEC efficiently attenuated the oxidative stress induced by cell damage because of its antioxidant properties, and that it could potentially be used as a safe effective source of natural antioxidants.

Keywords: Amazon plant, antioxidant, reactive oxygen species, J774 macrophage, antiinflammatory.

1. Introduction

Bertholletia excelsa nut one of the riches of the Amazon forest, is an important export product in the region. The Brazil-nut or Pará-nut is the seed of the chestnut tree of the botanical family Lecythidaceae, gender *Bertholletia*, and in consideration of its large size, it was named an *excelsa* species. It is a food greatly appreciated for its taste and the fruit of the chestnut tree, commonly called hedgehog, having a woody and quite hard bark [11].

An inflammation is an essential immune response that allows survival during infection or maintains tissue homeostasis under a variety of harmful conditions [1]. It is a complex series of cellular and molecular events that are involved in the inflammatory process, including dilation of arteries, venules and capillaries, increased vascular permeability and exudation of fluids used in plasma analysis, as well as leukocytes for an inflamed area [1, 3]. Oxidative stress resulting from a disturbance in the balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses is the pathological basis of many chronic inflammatory diseases [2, 3].

Oxidative damage, mediated by reactive oxygen species (ROS), which may be generated following cell lysis, oxidative burst, or the presence of an excess of free transition metals, can attack proteins, deoxynucleic acids, and lipid membranes, thereby disrupting cellular function and integrity [3, 4]. A wide range of toxic oxidative reactions are initiated by ROS [5, 2] and released by phagocytic cells, which are involved in phagocytosis. Excessive and persistent formation of ROS by inflammatory cells is thought to be a key factor in genotoxic effects. Administration of antioxidants can result in potential benefits by attenuating injury caused by oxidative stress, and attempts have been made to screen for natural antioxidant agents [2].

Recent studies showed that a dietary supplementation of 1 unit of Brazil nut (the greatest known food source of Se) a day for 3 months is effective in improving Se status and increasing glutathione peroxidase (GPx) levels in hemodialysis patients [12]. Studies have also shown that obese people who consume Brazilian nuts daily can improve both their Se status and lipid profile, especially high-density lipoprotein cholesterol levels, thereby reducing cardiovascular risks [13].

The chestnut tree is a huge tree and its bark has been used as medicine by local Amazonian populations, however with few studies that explore its chemical or pharmacological potential. Therefore, the present study investigated antioxidant and antiinflammatory properties of the *B. excelsa* bark extract against oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in J774 macrophages.

2. Materials and Methods

2.1 Plant Material Collection. The stem bark from branches of *Bertholletia excelsa* (1000g) was collected from trees in Muiracupuzinho, AM-010-Road, Km-56-Itacoatiara-Manaus. A voucher was deposited in the Herbarium of UFAM n° 10348.

2.2. Preparation of the bark B. excelsa extract. The air-dried stem bark (1000g) was extracted at 60 °C over three days, using a 7:3 mixture of Ethanol: Water (3x 2 L). The extracts were combined the volume was concentrated at about 1.6 L.

2.3. Mass Spectrometry Analysis. A UHPLC-MS system composed of an Accela 600 liquid chromatography system coupled to an LTQ mass spectrometer with a linear ion trap mass analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Electrospray ionization in negative mode (ESI-) was used to access the composition of *B. excelsa*. Mass spectra (MS) were acquired in the range of *m/z* 50 to 1000, and tandem mass spectra

(MS/MS) acquired by collisional induced dissociation (CID) of trapped precursor ions. Helium was used as collisional gas. Tentative identifications were made by manual interpretation of MS/MS spectral data with those previously reported. Chromatographic separations were achieved with a Kinetex C₁₈ column (2.6 μm, 30 x 4.6 mm, 100 Å pore size) (Phenomenex) column using a binary mobile phase. Solvent A was ultrapure water and solvent B was methanol. A gradient elution at 28 °C was performed as follows: 0–15 min 20–100% at a flow rate of 0.4 mL/min. The autosampler temperature was held at 20 °C and the injection volume was 5 μL. Ionization parameters were according to a previous method [14] as follows: capillary voltage - 4.5 kV, cone voltage 5 V, sheet gas 25 arb, auxiliary gas 5 arb. Collision energies were applied as an increasing ramp from 2 to 50 eV.

2.4. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical-Scavenging Activity (DPPH). The scavenger activity of the DPPH· was measured according to the method of [15]. Different concentrations of BEC extract (0-100 μg /mL) were added, at an equal volume, to the methanol solution of DPPH· (100 mM). After 15 min at room temperature, the absorbance was recorded at 517 nm. The experiment was repeated three times. Gallic acid and ascorbic acid were used as standard. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as negative control. IC₅₀ values denote the concentration of sample, which is required to scavenge 50% of DPPH· free radicals. The antioxidant activity was calculated using the following equation: % inhibition= 100-(sample abs/ABS control)×100, where abs is the absorbance.

2.5. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Assay (ABTS^{•+}). The ABTS^{•+} assay was based on the method of [16]. ABTS was dissolved in MiliQ water at a 7-mM concentration. ABTS^{•+} was produced by reacting ABTS^{•+} stock solution with 5 mM potassium persulfate and kept in the dark at room temperature for 12–16 h. Once ABTS^{•+}

was formed, MiliQ water was added to the solution (dilution 1:7). A flat-bottomed 96-well plate was filled with 270 μL of ABTS solution with 30 μL of water. This solution was monitored by reading at 714 nm in a microplate reader (DTX 800, Beckman, CA, USA) to obtain absorbance of approximately 1.00 (control). Then, 30 μL of BEC from different concentrations (0- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to 270 μL of ABTS^{*+} and the reaction was incubated for 15 min in the dark at room temperature. After incubation, the absorbance at 714 nm was measured. Gallic acid and ascorbic acid in the same BEC concentrations were measured following the same procedures described above and were used as positive controls. The antioxidant activity was calculated using the following equation: % inhibition = $100 - (\text{abs sample}/\text{Abs control}) \times 100$, where Abs is the absorbance.

2.6. Anion Superoxide Radical-Scavenging Assay ($\text{O}_2^{\cdot-}$). The anion superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) scavenging activity was measured by NBT method [17]. A total of 100 μL of NADH (390 μM), 100 μl of NBT (250 μM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), and 50 μL of different concentrations of BEC extract (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to each well of the microplate. The reaction was incubated at room temperature for 5 min, and the first reaction was measured at 560 nm against a blank (DTX 800, Beckman, CA, USA). Then, 100 μL of PMS solution (10 μM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) was added to the mixture. The reaction mixture was incubated for 5 min at room temperature, and the absorbance at 560 nm was measured again. Decreased absorbance of the reaction mixture indicates increased superoxide anion scavenging activity. The percentage of inhibition of superoxide anion radical generation of three parallel measurements was calculated using the following formula: % inhibition = $100 - (\text{Abs end of the sample} - \text{Abs starting sample}) \times 100$ abs control, where Abs is the absorbance. Gallic acid was used as positive control.

2.7. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity In Vitro (XO). Xanthine oxidase activity was determined by measuring the formation of uric acid from xanthine. The reagent 1 was

prepared by mixing xanthine oxidase (667 mM), EDTA (0.1 mM), and hydroxylamine (0.2 mM) in 50 mM phosphate buffer solution (pH 7.5). Into each microplate well, 40 μ L of xanthine oxidase enzyme and 15 μ L of BEC extract (0-100 μ g/mL), DMSO, or control drug (allopurinol) were added and incubated at 37 °C for 5 min. Then, 95 μ L of reagent 1 was added to the reaction and incubated again for 30 min at 37 °C. The absorbance at 295 nm was measured in a microplate reader (DTX 800, Beckman, CA, USA). After, 150 μ L of uric acid reagent was added to the mixture and the absorbance was measured again. DMSO was used as negative control and allopurinol as positive control. The inhibition percentage of xanthine oxidase activity was calculated using the following formula= $\% \text{ inhibition} = 100 - (A2 \text{ sample} - A1 \text{ sample} / A2 \text{ control} - A1 \text{ control}) \times 100$ where A1 is the absorbance of the initial reading and A2 is the absorbance of the final reading [18].

2.8. Cell culture. The murine macrophage cell line J774 was acquired in the Cell Bank of Rio de Janeiro-RJ and was cultured at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin (Invitrogen).

2.9. Cell viability assay. The MTT assay provides a sensitive measurement of the normal metabolic status of cells, particularly that of mitochondria, which reflects early cellular redox changes [19]. J774 macrophages (1×10^6 cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and were exposed to various concentrations of BEC (0-100 μ g/mL) for 24 h. After incubation, the culture medium containing BEC was removed and the cells were washed with 0.1 mL of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, at 37 °C, followed by the addition of 300 μ L of MTT solution (1 mg/mL in RPMI-1640 medium) and incubation for 3h at 37 °C. Medium was discarded and the dark-blue formazan crystals formed in intact cells were dissolved in DMSO and the absorbance at 540 nm was

measured with a microplate reader (DTX 800, Beckman, CA, USA). The results are expressed as the percentage of MTT reduction relative to the absorbance of control cells.

J774 macrophages (1×10^6 cells/well in 96-well plates) were incubated at 37 °C with 250 μ M of H₂O₂ for 24 h with or without BEC and then treated with the MTT solution (1 mg/mL) for 3 h, respectively. The dark-blue formazan crystals formed in intact cells were dissolved in DMSO and the absorbance at 540 nm was measured with a microplate reader (DTX 800, Beckman). The results are expressed as the percentage of MTT reduction relative to the absorbance of control cells.

2.10. Cellular Antioxidant Activity. DCFH-DA can be deacetylated in cells, where it can react quantitatively with intracellular radicals (mainly derived from H₂O₂) and be converted into its fluorescent product, DCF, which is retained within the cells [20]. J774 cells (6×10^4 cells/well in 96-well plates) were incubated at 37 °C with 10 μ M DCFH-DA for 1 h. After the cells were washed with Hank's Buffer and the cells were treated with BEC (0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 μ g/mL) and 250 μ M of H₂O₂. The fluorescence was immediately measured with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 520 nm using a microplate reader (DTX 800, Beckman, CA, USA). Controls with/without DCFH-DA were made. Quercetin was used as positive control. Intracellular antioxidant activity was expressed as the percent of inhibition of intracellular ROS produced by H₂O₂-exposure.

2.11. NO[•] production assay. Nitric oxide (NO[•]) production by J774 cells was assayed by measuring the accumulation of nitrite in the culture medium using Griess reaction [21]. Briefly, after incubation of the cells (1×10^6 cells/mL) with BEC in different concentrations of 0-100 μ g/mL, cells were incubated for 24h with LPS (1 μ g/mL) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Nitric oxide was measured as NO₂⁻ in culture supernatant by reaction with Griess reagent. Absorbance of the reaction product was determined at 560

nm using a microplate reader (DTX 800, Beckman). Sodium nitrite was used as a standard to calculate nitrite.

2.12. RNA extraction and cDNA Synthesis. Total RNA was extracted from J774A.1 cell lines. First-strand cDNA synthesis was performed with Random hexamer primed Reverse Transcription Superscript III (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

2.13. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR). TaqMan® Gene Expression Assays for nuclear factor erythroid derived 2, (Nfe2l2), heme oxygenase 1 (Hmox1), peroxiredoxin 2 (Prdx2), glutathione peroxidase 1 (Gpx1), mitogen-activated protein kinase 1 (Mapk1), nitric oxide synthase 2 (nos2), interleukin 1 beta (Il1b) and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) encoding-gene as internal reference. All were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Real Time PCR (qPCR) was performed in a StepOne Plus thermal cycler Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA). qPCR reactions were performed in triplicate with the following thermocycling conditions: 96°C for 10 min, 35 cycles, each for 15 sec at 96°C and at 60°C for 2.5 min. The 10.0 µL reaction mixture was composed of 5.0µl TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 1.0 µl (~50 ng cDNA), 0.5 µl TaqMan® Gene Expression Assays and 3.5 µL nuclease-free water.

2.14. Rearing and Maintenance of Caenorhabditis elegans. To perform the *in vivo* toxicity assay, we used the wildtype N2 strain of the nematode *Caenorhabditis elegans*. The specimens were incubated at 20 °C in Petri dishes containing nematode growth medium (NGM) agar and fed with *Escherichia coli* strain OP50-1. The nematode culture was synchronized through treatment of pregnant hermaphrodites with 2% sodium hypochlorite and 5M sodium hydroxide.

2.15. *Assessment of Toxicity in C. elegans.* A toxicity assay for the BEC was performed in *C. elegans* in 96-well plates. Each well contained 10 nematodes at the L4 stage, which were incubated for 24 h at 20 °C with BEC at different concentrations (0.5–500 µg/mL) in M9 medium. After this period, nematode viability was evaluated by repeatedly touching the worms with a microspatula. A Motic SMZ-140 & W10X/23 model (British Columbia, Canada) stereomicroscope was used to manipulate and examine the nematodes. The data were calculated from two independent experiments in duplicate (Lewis and Fleming, 1995).

2.16. *In vivo assay of LPS-induced peritonitis in mice.* Acute inflammation in mice was performed by intraperitoneal injection of bacterial LPS into the peritoneal cavity of the mice (LPS 500 ng/cavity/0.2mL), according to the methodology of Abayomi et al., (2017) with modifications. Initially, the mice were divided into 5 groups (n=4 animals/group) for oral pretreatment with saline vehicle (0.2 mL/10g), dexamethasone (1 mg/kg) and BEC extract (50 and 100 mg/kg). After one hour of treatment, the LPS inflammation inducer (500 ng/0.2mL) was administered in the intraperitoneal cavity in the test groups and only saline in the negative control group. After four hours of treatment, the animals were euthanized with ketamine (180mg/kg) and xylazine (30mg/kg) intraperitoneally, after this procedure the peritoneal cavity was washed with 10mL of cold PBS buffer (10 mM, pH 7.4) containing EDTA (3mM). The abdominal cavity was gently massaged 3x (three times) and the cell suspension was aspirated with a syringe. The aliquots of the abdominal fluid were placed in 15 ml falcon tubes, centrifuged and resuspended with 200 µl of PBS buffer, then an aliquot (1: 1 Turk's solution and cell concentrate) was taken for a time of 3 minutes and total leukocyte counts were performed in a Newbauer chamber. At the end, the aliquots of the peritoneal fluid were frozen in a -80 ° C freezer for further analysis of inflammatory cytokines.

2.17. *Statistical Analyses.* All data are shown as the mean \pm standard error of mean (SEM) and for statistically significant differences between the groups, using the analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's post test, comparing the treatment with the control, using the Prism 6 GraphPad software. The results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 *Phytochemical analysis.* The deprotonated ions $[M-H]^-$ and their corresponding fragment ions observed from CID experiments were compared to fragmentation routes previously described for a manual interpretation. For the analysis of BEC (Figure LCMS 1 + Table 1), the peak eluting at 1.92 min displayed the deprotonated molecule at m/z 191, which fragments to the ion of m/z 173 and m/z 111, allowing to identify it as quinic acid [22]. Main peak 2 (Rt 2.04 min) was identified as gallic acid based on its deprotonated molecule at m/z 169 and the characteristic carbon dioxide loss (-44 Da), giving the fragment $[M-CO_2-H]^-$ at m/z 125 [22]. Peaks 3 and 4, eluting at 2.41 and 2.54 min, and with m/z 353 and 355, respectively displayed unusual fragmentation, not positively identified; thus both were described as unknown compounds.

The ellagitannin HHDP-galloyl-glucose was identified eluting at 3.01 min (peak 5) based on the parent m/z 633 and its main fragment ion at m/z 301 [24]. Ethyl gallate was found eluting at 3.18 min (peak 6) based on its typical fragmentation ions (m/z 197 \rightarrow 169 and m/z 169 \rightarrow 125), related to those observed for the gallic acid [25] (Verdam et al., 2017). Peak 7 (3.44 min) was also designed as unknown as its fragmentation was not interpreted. The compound eluting at 7.50 min (peak 8) was identified as the valoneic acid dilactone. This was based on its precursor m/z 469 and main fragment at m/z 425 as previously described [23]. Peaks at 10.19, 10.37 and 11.06 min (compounds 9, 10 and 11) displayed equal fragmentation patterns with m/z 301 as the main ion product [24].

The parent m/z at 463, 477 and 447 enabled the identification of these derivatives as ellagic acid glucoside (9), quercetin-3-*O*-glucuronide (10) and ellagic acid deoxyglucoside (11) [26]. Ellagic acid (m/z 301) was identified eluting at 11.93 min (peak 12) based on the main fragments m/z 257 and 229 as previously described for this compound [27].

3.2. Antioxidant properties of bark B. excelsa extract in vitro. To evaluate the antioxidant activity, we started by investigating its DPPH, ABTS and anion Superoxide Radical scavenging action. Thus, as presented in Table 2, BEC can be considered a free radical scavenger and an antioxidant to DPPH, ABTS⁺, and O₂⁻ showed 50% inhibition (IC₅₀) of free radicals at a concentrations 6.36±0.81, 41.4±0.50 and 38.6±1.35 µg/mL, respectively. Antioxidant activity of BEC was similar to that of the gallic acid that showed 50% inhibition at a 3.25±0.25, 3.53±0.05, 24.23±1.25 µg/mL, respectively.

Furthermore, BEC inhibited 85.03±1.54% of the activity of the xanthine oxidase enzyme (XO) at 100 µg/mL with IC₅₀ at a 18.0±1.15 µg/mL, and these results contribute to O₂⁻ inhibition once this radical is generated during the assay (Table 2). Our results indicate that the considerable antioxidant activity of BEC can be related to the phenolic and flavonoid compounds present in this bark *B. excelsa* extract, which showed in the total phenolic and flavonoid content being 277.21±2.76 GAE mg/g and 52.0±2.27 QE mg/g, respectively, showing a large amount of phenolic compounds greater than flavonoid content.

3.3. Effect of bark B. excelsa extract on cell viability. In order to investigate the cytotoxicity of BEC on the J774 macrophage line, the cells were seeded into wells of 96-well culture plates at a density of 1 x 10⁶ cells/well. The influence of BEC and quercetin at various concentrations on cellular toxicity was analyzed first using the MTT assay,

without the influence of hydrogen peroxide. During a 24h period of incubation, BEC and quercetin did not affect J774A1 cell viability (Fig. 2).

3.4. Inflammatory activity of bark B. excelsa extract. We next investigated whether BEC inhibit NO[•] production in LPS-induced J774 cells by macrophage activation by LPS 1 µg/mL (Fig.3). Nitric oxide is a well-known inflammatory mediator and vasodilator and may induce oxidative stress in pathological conditions [28]. The effect of BEC in inhibiting nitrite levels induced by LPS in macrophage can be determined by Griess reaction. BEC decreases nitrite levels in a concentration-dependent manner. The maximum inhibition of BEC was achieved at a concentration of 100 µg/mL with 40±0.18% of reduction.

3.5. Cellular Antioxidant Activity of bark B. excelsa extract. The present study showed that BEC could protect murine macrophages from oxidative damage. This antioxidant activity in cells indicated that the BEC reduced in 60±1.49% at 5 µg/mL the levels of intracellular ROS promoted by the presence of H₂O₂, with IC₅₀=4.57 µg/mL (with confidence interval between 1.659 to 12.62). Dichlorofluorescein is a probe that is trapped within cells and is easily oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF). The decrease in cellular fluorescence compared to the control cells indicates the antioxidant capacity of the extract (Wolfe and Liu, 2007). The oxidation inhibition values of the quercetin (50 µg/mL) were not significantly different compared with BEC (Fig. 4).

3.6. Bark B. excelsa extract induces expression of antioxidant genes. To investigate the effect of BEC on the expression of antioxidant-related genes, real time PCR analysis was performed (Fig. 6 A-D), checking the intensity of its expression through different concentrations of BEC and Quercetin standard (Q) and 250 µM of H₂O₂. First cell viability was analyzed by MTT assay (Fig. 5 A-B) and a mortality rate of 40% at 250µM H₂O₂ was verified, being high enough to be comparable to antioxidant agents. We chose

concentrations of 10 μg of quercetin for showing the best results of cell protection. The analyses with BEC were carried out in concentrations of 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and a concentration range with higher cell protection.

Since Nrf2 is a key redox-sensitive transcription factor whose translocation from the cytoplasm to the nucleus and binding to the antioxidant response element (ARE), sequences localized in the promoter regions of genes that encode several antioxidant proteins, such as heme oxygenase-1 (HO-1), increase as a result of oxidative stress [29, 7]. Induction of these antioxidant proteins is essential for the protection of cells from oxidative stress caused by ROS like H_2O_2 . Exposure of cells at a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BEC for 24 h resulted in an increase (294%) in the levels of expression of HMOX-1, showing that BEC has the ability to significantly upregulate these cellular antioxidant events (Fig 6 B).

Concomitantly, we observed elevated levels of GPx1 expression in positive control (H_2O_2) and a reduction of 53% in GPx1 expression of macrophages treated with BEC (Fig. 6C). This shows its function specific to H_2O_2 degradation, since GPxs are a family of enzymes homologous to the selenocysteine (Sec)-containing mammalian GPx-1 that uses GSH as an obligate co-substrate in the reduction of hydrogen peroxide to water [30]. When comparing the levels of GPx1 expression in the standard quercetin, the standard was significantly higher compared with BEC. The largest reduction in expression of BEC at 50 and 100 μg demonstrates its effectiveness in capturing free radicals.

BEC was also effective in reducing the expression of pro-oxidant genes. Gene expression analysis (Fig. 6D) also demonstrated that in the presence of H_2O_2 , there was a significant increase in the expression of the NOS2 gene, a nitric oxide synthase responsible for the synthesis of nitric oxide (NO), which plays an important physiological role as a potent vasodilator; however, its expression can be increased in pathological

conditions [31]. However, in the presence of BEC, a significant reduction (64%) in NOS2 expression was verified. The antioxidant effect of BEC showed to be superior to the effects of quercetin at 100 μ M. Considering that the samples and H₂O₂ were co-incubated together, this may possibly have caused the inhibition of ROS by antioxidant compounds before the oxidative action of H₂O₂.

3.7. Toxicity in C. elegans. BEC was not toxic to the nematodes after 24 h of incubation until 100 μ g/mL compared with the control group (Fig. 7). Only at high concentrations did it reduce the viability of the nematode.

3.8. In vivo assay of LPS-induced peritonitis in mice. BEC was assessed for the ability to inhibit leukocyte migration to the peritoneal cavity of previously inflamed mice. Thus, the animals were pre-treated orally at doses of LPS 500ng / cavity, saline (0.2 mL / 10g), dexamethasone (1 mg / kg) and BEC extract (50 and 100 mg / kg), after one hour of treatment LPS was administered intraperitoneally in the groups, less in the saline control group and with 4 hours of experiment, the collection of the peritoneal lavage was performed and the count of the total leukocytes marked in the inflammatory response was performed.

As seen in figure 8, BEC was able to reduce total leukocytes in a dose-dependent manner (50 and 100 mg / kg), significantly decreasing the inflammatory process induced by LPS. However, when compared to the reference drug, BEC at a dose of 100 mg / kg showed a response similar to the 1mg / kg dexamethasone standard. BEC at a dose of 50 mg / kg did not show a statistically significant difference.

4. Discussion

Inflammation is a physiological process that begins in response to infection or tissue damage. It is a mechanism aimed at tissue repair after injury and consists of a cascade of cellular and microvascular events that aims to remove damaged tissues and generate new

ones that can be induced by oxidative stress that occurs when cellular homeostasis, normally involving a fine balance between free radical generation and their detoxification by cellular antioxidants, is disturbed [32]. Antioxidant activities are known to increase proportional to the polyphenol content, mainly due to their redox properties, and products derived from medicinal plants can be used as new therapeutic agents due to the presence of secondary metabolites including groups such as polyphenols [33]. BEC showed to be a prolific source of these compounds, especially ellagitannin derivatives, mainly ellagic acid and its glycosides. In this sense, the bark of *B. excelsa* constitute a reliable alternative source to obtain active polyphenolic compounds as also observed for *Punica granatum* and *Quercus petraea* [34, 35]. Furthermore, radical-scavenging activities of BEC increased in a concentration-dependent manner to DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ and O $_2^{\cdot-}$, results confirmed by inhibition of XO.

The cytotoxic effects of BEC were examined using MTT assay in order to determine non-toxic concentrations for inflammatory and antioxidant activity test. BEC did not show any significant toxic effect on the growth of cells. Therefore, to determine whether BEC prevents oxidative stress by inhibiting ROS generation, we measured intracellular ROS concentrations with DCFH-DA, and found that treatment of J774 cells with H $_2$ O $_2$ induced a marked rise in oxidative stress as characterized by excessive ROS production, followed of reducing the levels of intracellular ROS by BEC. Quercetin, at the level of concentration used in this study, has been shown to exhibit strong suppression of intracellular ROS generation, and BEC was as efficient as the antioxidant standard in scavenging ROS [36].

Macrophages are normal cells that are vital for the recognition and elimination of microbial pathogens, and the survival of macrophages is of critical importance to the host defense system [37, 7]. Several previous studies have demonstrated that the virulence of

some bacteria is due to their ability to trigger the death of activated macrophages via stimulating ROS production [7]. Our results showed anti-inflammatory activity of BEC in the same concentrations of its antioxidant activity.

The present study also showed that the exposure of macrophages to H₂O₂ resulted in a reduction of cell viability by MTT assay. However, pretreatment with different concentrations of BEC, with or without H₂O₂, greatly diminished loss of cell viability compared with quercetin, positive control.

As it has been well documented, the response of an inducible heme-degrading enzyme, heme oxygenase-1 (HO-1), which is an antioxidant enzyme, to a wide range of cellular stresses, exhibiting adaptive responses to oxidative stress including skeletal muscle cells [1]. Therefore, targeted induction of this enzyme may be considered an important therapeutic strategy for protection against oxidative damage. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a major transcription factor of HO-1. BEC induces HO-1 expression to afford protection of macrophages against cytotoxicity and protects cells from H₂O₂-induced cell death by inducing antioxidant enzymes, including HO-1. The most significant finding in our present study is the demonstration of the involvement of the Nrf2 pathway in BEC-mediated HO-1 gene induction.

Nitric oxide (NO•) is an important chemical mediator generated by endothelial cells, macrophages, neurons involved in the process of several biological processes. An elevated production of NO• could promote several diseases. Oxygen reacts with nitric oxide to generate nitrite and peroxynitrite anions that act as free radicals [31, 38]. Our results showed that BEC could combine with oxygen and inhibit the generation of peroxynitrite anions. Similar studies have shown prevention of DNA damage, lipid peroxidation, and increased protein expression and genomic expression of NOS isoforms

(NOS 1, 2, 3) supplemented by extracts containing large amounts of antioxidant compounds [39].

Our research demonstrated that the GPx1 expression levels were elevated in cells stimulated with H₂O₂. This demonstrates its specific function for H₂O₂ degradation. The GPx expression levels in the sample containing quercetin showed to be significantly elevated compared to samples, this can be attributed to a lower efficiency of quercetin compared to BEC, even before a natural increase in gene expression caused by the phenolic compounds by moving the Nrf2 factor to enhance the production of these enzymes. We see the greatest reduction in the expression at 100 µg/mL of BEC, demonstrating effectiveness in capturing free radicals. These data corroborate the graphical analysis, the levels at which the presence of phenolic compounds ellagitannin derivatives, such as ellagic acid, its glycosides and valoneic acid dilactone present in quercetin and BEC, may be responsible for the recorded potentials. Our findings tended to remain near the negative control, reinforcing previous observations of this class of compounds as potent antioxidants as previously determined for punicalagin isolated from pomegranate (*Punica granatum*), and different ellagitannins from different heartnut varieties (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) [40, 41].

Previous studies have shown that *C. elegans* can be used as an alternative *in vivo* model for obtaining rapid results in toxicity studies to assess the pharmacological and toxic effects of drugs [42, 43] because it is a multicellular organism with a high reproduction rate and short life cycle, which makes it an excellent *in vivo* model for complementing cell culture-based systems [42]. BEC shows no significant toxic effects in an *in vivo* experimental model *C. elegans*. Our data corroborate with [45], in their study, the consumption of Brazil nuts in reducing cardiovascular risk in obese women was evaluated by reducing anthropometric and biochemical parameters of inflammation.

In another study [46] observed the effect of selenium supplementation by consumption of nuts in patients undergoing hemodialysis, in this study the normalization of thyroid hormones was found.

5. Conclusion

Collectively the results of our study indicate that BEC could protect macrophages from cytotoxicity caused by H₂O₂ by decreasing expression of ROS production. In addition, the upregulation of HO-1 expression affords protection of macrophages against cytotoxicity and protects cells from H₂O₂-induced cell death by inducing antioxidant enzymes including GPX1. However, the mechanisms involved in their crosstalk with upstream and downstream signaling molecules still need to be better understood.

6. Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

7. Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest in this work.

8. Acknowledgments

For this work, the authors acknowledge CNPQ, CAPES and FAPEAM for financial support. Also, Analytical Center of UFAM for chemical analyses. Jim Hesson revised the manuscript (<https://www.academicenglishsolutions.com>).

9. References

- [1] Kang, J.W, Lee, N. Y., Cho, K. C., Lee, M.Y., Choi, D.Y., Park, S.H., Kim, K.P (2015). Analysis of nitrated proteins in *Saccharomyces cerevisiae* involved in mating signal transduction. *Proteomics*, 15 (2–3), 580–590.
- [2] Wang, S.H., Yang, W. B., Liu, Y. C., Chiu, Y. H., Chen, C. T., Kao, P. F. and Lin, C. M (2011). A potent sphingomyelinase inhibitor from *Cordyceps mycelia* contributes its cytoprotective effect against oxidative stress in macrophages. *Journal of Lipid Research*, 52, 471-479.
- [3] Gardner, A.M., Xu, F. H., Fady, C., Jacobs, F. J., Duffey, DC, Tu, Y., Lichtenstein, A. (1997). Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology Medicine*, 22, 73–83.
- [4] Kwon, S.H., Hong, S. I., Ma, S. X., Lee, S. Y., Jang, C. G. (2015). “3', 4', 7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress.” *Food and Chemical Toxicology*, 80, 41–51.
- [5] Cuzzocrea, S., Riley, D.P., Caputi, A.P., Salvemini, D (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology Review*, 53, 135 – 159.
- [6] Veal, E.A., Day, A. M., Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, 26 (1), 1-14.
- [7] Bhaskaran, N., Shukla, S., Kanwal, R., Srivastava, J.K., Gupta, S. (2012). Induction of heme oxygenase-1 by chamomile protects murine macrophages against oxidative stress. *Life Sciences*, 90, 1027–1033.
- [8] Zweier, J.L., Chen, C.A., Druhan, L.J. (2011). S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive

oxygen species-mediated signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14 (10), 1769–1775.

[9] Otterbein, L.E. and Choi, A.M. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology - Lung Cellular & Molecular Physiology*, 279 (6), L1029–L1037.

[10] Surh, Y.J., Kundu, J.K., Na, H.K. (2008). Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Plantas e Ervas Mediciniais, Fitoterapia e Fitoterápicos*, 74, 1526–1539.

[11] Melo, S.S., Diniz, J.E.M., Guimarães, J.H., Costa, J.S., Brasil, D.S.B., Morais, S.S.S., Brito, D.C., Carvalho, J.C.T., Santos, C.B.R. and Silva, D.L. (2015). Production and characterization of absorbent heat from the bark of residual Brazil nut bark (*Bertholletia Excelsa*). *Chemistry Central Journal*, 9 (36), 2-9.

[12] Stockler-Pinto, M.B., Mafra, D., Moraes, C., Lobo, J., Boaventura, G.T., Farage, N.E., Silva, W.S., Cozzolino, S.F., Malm, O. (2014). Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. *Biological Trace Element Research*, 158, 105–112.

[13] Cominetti, C., Bortoli, M.C., Garrido Jr, A.B., Cozzolino, S.M.F. (2012). Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutrition Research*, 32, 403-407.

[14] Koolen, H.H.F., E. R. Soares, E.R., Silva, F.M.A., Souza, A.Q.L., Medeiros, L.S., Rodrigues Filho, E., Almeida, R.A., Ribeiro, I.A., Ó Pessoa, C., Morais, M.O., Costa, P.M., Souza, A.D.L. (2012). An antimicrobial diketopiperazine alkaloid and co-

metabolites from an endophytic strain of *Gliocladium* isolated from *Strychnos cf. toxifera*. *Natural Product Research*, 26 (21), 2013-2019.

[15] Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Milani, A.S. and Stroeve, P. (2009). An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology*, 20 (22), 7170–7175, 2009.

[16] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9/10), 1231–1237.

[17] Öztürk, M., Aydogmus-Öztür, F., Duru, M.E. and Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103 (2), 623–630.

[18] Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH Free Radical Method. *Food Science and Technology*, 30, 609–615.

[19] Mosmann. T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

[20] Wolfe, L.L. and Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55 (22), 8896–8907.

[21] Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N nitrates] in biological fluids.” *Analytical Biochemistry*, 26, 131–138.

- [22] Bataglion, G.A., Meurer, E., Albergaria-Barbosa, A.C.R., Bícego, M.C., Weber, R.R., Eberlin, M.N. (2015). Determination of Geochemically Important Sterols and Triterpenols in Sediments Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS).” *Analytical Chemistry*, 87 (15), 7771–7778.
- [23] Wyrepkowski, C.C., Costa, D.L.M.G., Sinhoro, A.P., Vilegas, W., Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., Santos, L.C. (2014). Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules*, 19 (10), 16039–16057.
- [24] Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L., Tomás-Barberán, F.A. (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139 (1–4), 578–588.
- [25] Verdam, M.C.D.S., Simplicio, G., Andrade, K.C.D., Fernandes, K.L.M. et al. (2017). Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). *Scientific World Journal*, 2017, 1-8.
- [26] Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A. et al. (2007). Control of Effector CD8 T Cell Factor Eomesodermin. *Science*, 302 (5647), 1041-1043.
- [27] Pedrosa, T.N., Barros, A.O., Nogueira, J.R. et al. (2016). Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. *Archives of Dermatological Research*, 308 (9), 643–654.
- [28] Abramson. S.B. (2008). Osteoarthritis and nitric oxide.” *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, Supplement 2, S15–S20.

- [29] Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biological Medicine*, 47, 1304–1309.
- [30] Lubos, E., Loscalzo, J., Handy, D.E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15 (7), 1957-1997.
- [31] Bayir, H., Kagan, V.E., Clark, R., Janesko-Feldman, K., Rafikov, R., Huang, Z., Zhang, X., Vagni, V., Billiar, T.R., Kochanek, P.M. (2007). Neuronal NOS-mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 101 (1), 168-181.
- [32] Dhuna, K., Dhuna, V., Bhatia, G., Singh, J., S.S. Kamboj, S.S. (2013). Cytoprotective effect of methanolic extract of *Nardostachys jatamansi* against hydrogen peroxide induced oxidative damage in C6 glioma cells. *Acta Biochimica Polonica*, 60 (1), 21-31.
- [33] Galeno, D.M.L., Carvalho, R.P., Boleti, A.P.A., Lima, A.S., Almeida, P.D.O., Pacheco, C.C., Souza, T.P., Lima, E.S. (2014). Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 172, 311–324.
- [34] Konig, M., Scholz, E., Hartmann, R., Lehmann, W., Rimpler, H. (1994). Ellagitannins and Complex Tannins from *Quercus petraea* Bark. *Journal of Natural Products*, 57 (10), 1411-1415.
- [35] Tanaka, T. and Nishioka, G.I.N.I. (1986). Tannins and Related Compounds. XLI.: Isolation and Characterization of Novel Ellagitannins, Punicacorteins A, B, C, and D, and Punigluconin from the Bark of *Punica granatum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34 (2), 656-663.

- [36] Sittisart, P. and Chitsomboon, B. (2014). Intracellular ROS Scavenging Activity and Downregulation of Inflammatory Mediators in RAW264.7 Macrophage by Fresh Leaf Extracts of *Pseuderanthemum palatiferum*. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, Article ID 309095.
- [37] Grom, A.A. and Mellins, E.D. (2010). Macrophage activation syndrome: advances towards understanding pathogenesis. *Current Opinion Rheumatology*, 22 (5), 561–566.
- [38] Moukette, B.M., Pieme, C.A., Biapa, P.C.N., Moor, V.J.A., Berinyuy, E., Ngogang, Y. (2015). *Afrostryax lepidophyllus* extracts exhibit in vitro free radical scavenging, antioxidante potential and protective properties against liver enzymes ion mediated oxidative damage. *BMC Research Notes*, 8 (344), Article ID 101186.
- [39] Colombo, N.B.R., Rangel, M.P., Martins, V., Hage, M., Gelain, D.P., Barbeiro, D.F., Grisolia, C.K., Parra, E.R., Capelozzim, V.L. (2015). *Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48 (9), 852-862.
- [40] Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H., and Young, J.C. (2006). Polyphenolic Profiles and Antioxidant Activities of Heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and Persian Walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8033-8040.
- [41] Cerdá, B., Espín, J.C., Parra, S., Martínez, P., Tomás-Barberán, F.A. (2004). The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *European Journal of Nutrition*, 43, 205-220.

- [42] Leung, M.C.K., Williams, P.L., Benedetto, A., et al. (2008). *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, 106 (1), 5–28.
- [43] Bonamigo, T., Campos, J.F., Alfredo, T.M., Balestieri, J.B.P., Cardoso, C.A.L., Paredes-Gamero, E.J., Souza, K.P., E. L. Santos, E.L. (2017). Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, Article ID 1038153.
- [44] Abayomi, M.A., Domingos, T.O.M., Sikura, O.B. et al. (2017). *Ocimum gratissimum* L. leaf flavonoid-rich fraction suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and peritonitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 204, 169-178.
- [45] Cominett, C., Bortoli, M.C., Garrido, A.B.J., et.al. (2012). Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutrition Research*, 32, (6), 403–407.
- [46] Stockler-Pinto, M.B., Carrero, J.J., Weide, L.C.C (2015). Efecto de la suplementación de selenio a través de la nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*, HBK) en los niveles de hormonas tiroideas en pacientes de hemodiálisis: Un estudio piloto. *Nutricion Hospitalaria*, 32, (4), 1808–1812.

Figures

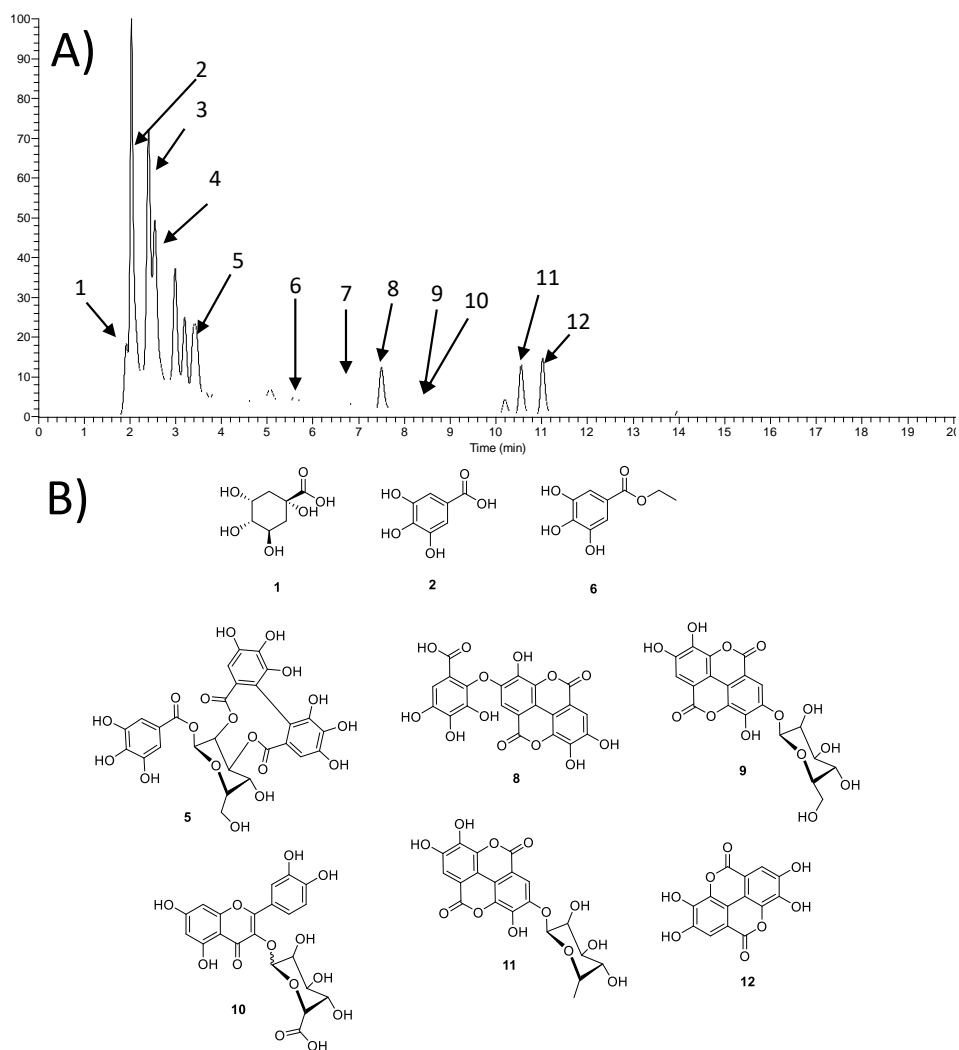


Figure 1: Total ion chromatogram obtained by LC–MS/MS analysis for the BEC extract.

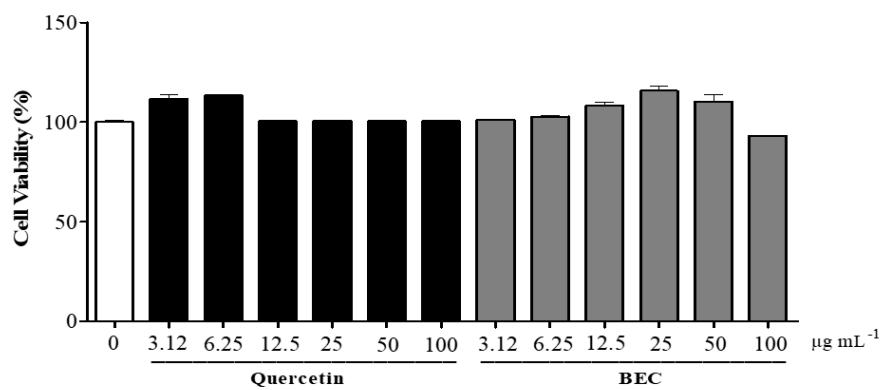


Figure 2. Effect of BEC and quercetin on cellular viability in J774 macrophage. J774 macrophages (1×10^6 cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and exposed to various concentrations of BEC and quercetin (3.12-100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The values are means \pm SD of three replicates. $*p < 0.05$ compared to control vehicle treated cell.

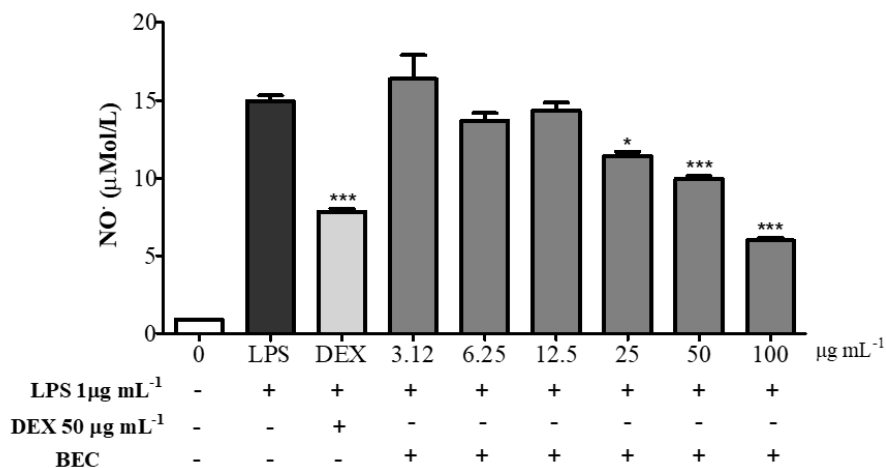


Figure 3. Effect of the BEC on NO^\cdot production in LPS-stimulated J774 cells. Production of NO^\cdot was assayed in culture supernatants of macrophages stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence of the BEC (3.12–100 $\mu\text{g/mL}$). The nitrite values are the mean \pm SD from three independent experiments. The values are means \pm SD of three replicates. $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ compared to control vehicle treated cells.

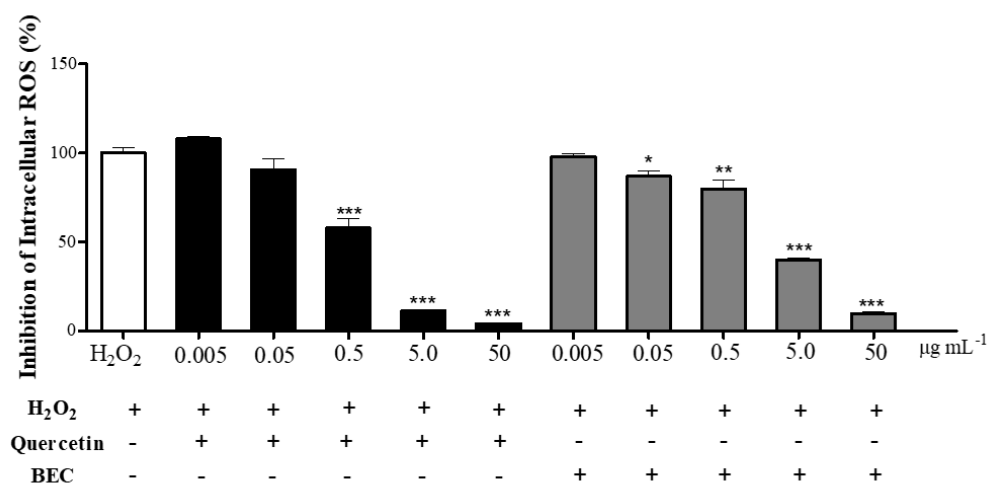


Figure 4. Antioxidant activity measured by DCF assay of BEC and Quercetin (Q). J774 macrophage (1×10^6 cell/well) were preloaded for 30 min with 10 μ M of DCFH-DA. After cells were treated (0.005-50 μ g/mL of BEC and/or quercetin) and 250 μ M of H_2O_2 . The fluorescence levels were measured with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 520 nm. Results were expressed in oxidation inhibition (%). The values are means \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to Oxidation promoted by H_2O_2 .

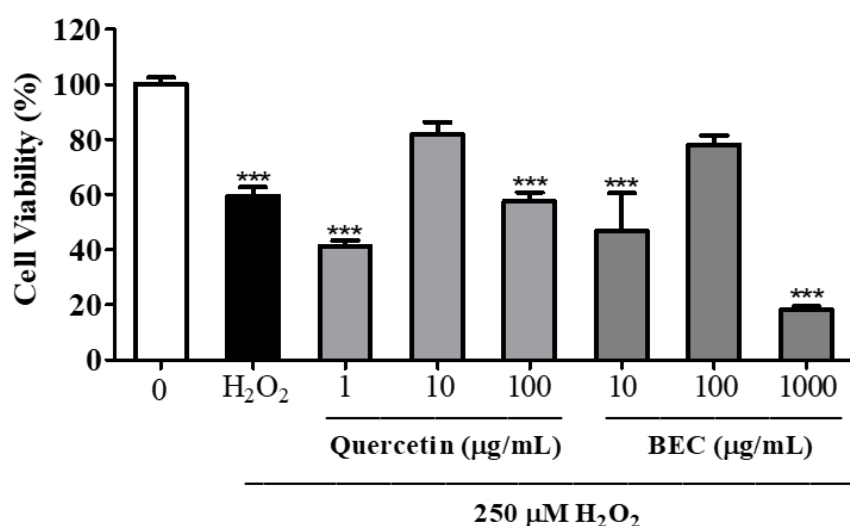


Figure 5. Cytotoxic action of BEC and quercetin in cellular viability in H_2O_2 -stimulated J774 macrophage. J774 macrophages (1×10^6 cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and exposed to 250 μ M of H_2O_2 and concentrations of BEC (10, 100 and 1000 μ g/mL) and quercetin (1, 10 and 100 μ g/mL) for 24 h. The values are means \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ compared to control vehicle treated cells.

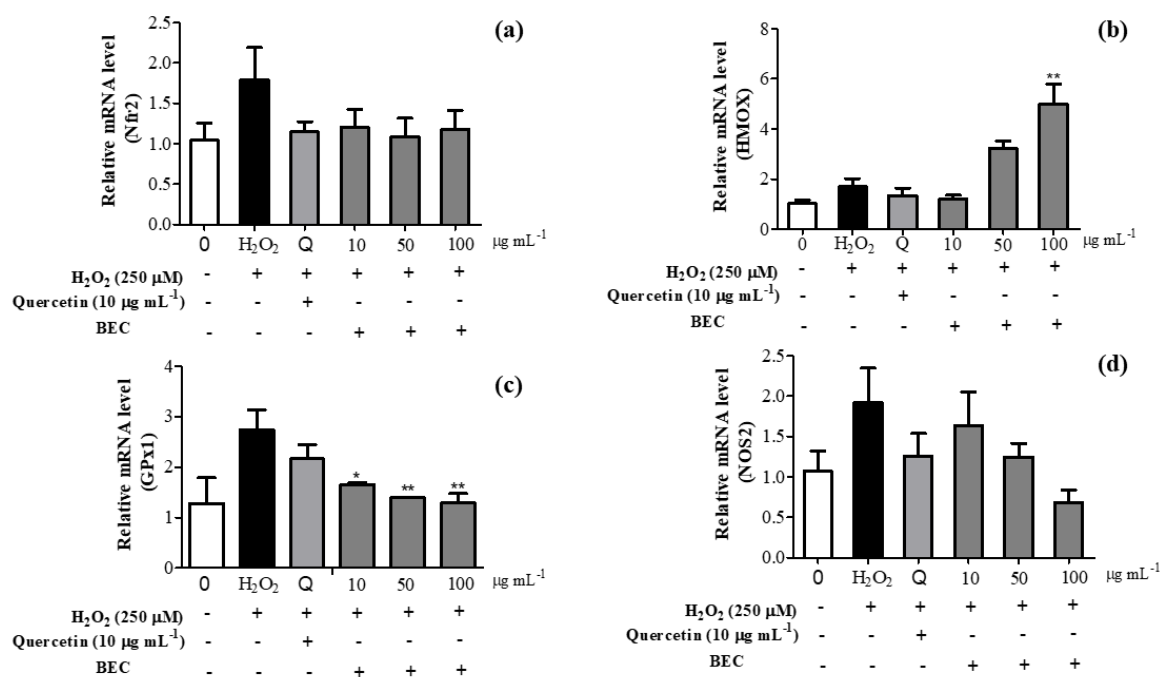


Figure 6. Antioxidant action of BEC on pathway of pro-oxidant and antioxidant genes. J774 macrophages (1×10^6 cells/well) were grown in 96-well tissue culture plates and exposed to 250 μM of H_2O_2 and concentrations of BEC (10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and quercetin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Relative mRNA levels were determined for genes: (A) NFR2, (B) HMOX-1, (C) GPX-1 and (D) NOS2. The values are means \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ compared to control vehicle treated cells.

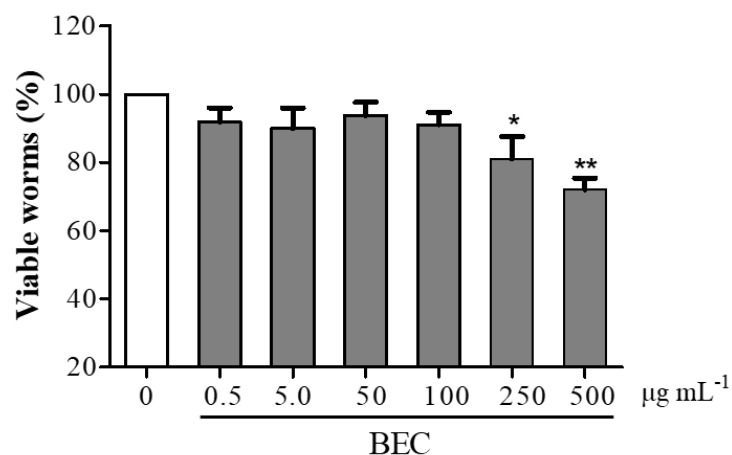


Figure 7. Toxicity of BEC against *C. elegans*. *C. elegans* (L4) were incubated for 24 h at 20 °C with BEC (0.5-500 µg/mL). Data are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ compared to control vehicle treated cells.

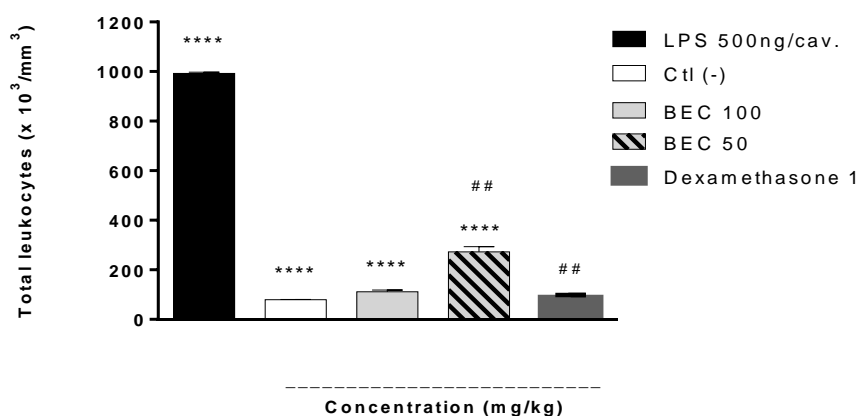


Figure 8. Total leukocytes from the peritoneal cavity of mice in a trial of lipopolysaccharide (LPS) stimulated peritonitis after four hours of treatment. Data are expressed as mean ± SEM. **** $p < 0.0001$ compared to control LPS 500ng/cavity and ## $p < 0.001$ when compared to the positive control group Dexamethasone 1mg/kg.

Table 1: UHPLC–ESI-MS/MS analysis of phenolic compounds in *B. excelsea* extract.

Peak number	Compound	Retention time (min)	[M - H] ⁻	MS Fragments	Class
1	Quinic acid	1.92	191	173, 111	Organic acid
2	Gallic acid	2.04	169	125	Benzenoid acid
3	Unknown	2.41	353	335, 309, 265, 247, 221	-
4	Unknown	2.54	355	337, 311	-
5	HHDP-galloyl-glucose	3.01	633	301	Ellagitannin
6	Ethyl gallate	3.18	197	169, 125	Benzenoid ester
7	Unknown	3.44	291	247	-
8	Valoneic acid dilactone	7.50	469	425	Ellagic acid derivative
9	Ellagic acid hexoside	10.19	463	301	Ellagic acid derivative
10	Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	10.37	477	301	Flavonoid derivative
11	Ellagic acid desoxyhexoside	11.06	447	300	Ellagic acid derivative
12	Ellagic acid	11.93	301	257, 229	Ellagic acid derivative

Table 2. Free radical scavenger activity (IC₅₀ in microgram per milliliter) of BEC and antioxidant standard.

Sample	DPPH			ABTS			O ₂ ^{•+}			XO		
	IC ₅₀ (µg/mL)	A _{max}		IC ₅₀ (µg/mL)	A _{max}		IC ₅₀ (µg/mL)	A _{max}		IC ₅₀ (µg/mL)	A _{max}	
	(%)	µg/mL		(%)	µg/mL		(%)	µg/mL		(%)	µg/mL	
BEC	6.36±0.8	72.37±0.5	100	41.4±0.5	88.61±0.4	100	38.6±1.35	76.52±0.58	100	18±1.15	85.03±1.54	100
Gallic acid	3.25±0.2	98.89±1.0	100	3.53±0.05	92.15±0.7	100	24.23±1.25	81.91±2.36	100			
Allopurinol										2.24±0.03	77.47±0.71	100

Values are means ± SEM. DPPH (*n* = 3), ABTS (*n* = 3), Anion Superoxide (O₂^{•+}, *n* = 3), Xanthine Oxidase (XO, *n* = 3)

ARTIGO 3

Cosmetic application of the stem-bark extract of *Bertholletia excelsa* H.K.B

Márcia J. A. Silva¹, Leonard D. R. Acho¹, Anderson Guimarães², Emerson S. Lima^{1*}

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas - UFAM, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I Manaus 69077-000, Brazil.

² Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Amazonas - UFAM, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I Manaus 69077-000, Brazil.

Correspondence: eslima@ufam.edu.br

ABSTRACT

The Amazon has a rich biodiversity where many different plant species can be found. This diversity is an important source of bioactive substances, mainly due to the different structural components of their phytometabolites. Research for natural products is a strategy for the development of new agents in therapeutic applications, especially cosmetic applications, that have better pharmacological potential. Within this perspective, the objective of the study was to investigate the cosmetic application (anti-aging potential) of the bark of the stem of *Bertholletia excelsa*, popularly known as the Brazil nut tree, here called BEB, a noble plant species of the Amazon that is rich in selenium. For this, enzymatic, glycation, proliferation, cell-healing, collagen quantification, toxicity and genotoxicity assays were used. Among the enzymes involved in the extracellular matrix of the skin, BEB was able to inhibit only elastase (62.67 ± 3.75) when compared to the standard sivelestat (89.04 ± 0.53), and the extract was also able to inhibit both the oxidative and the non-oxidative pathway. When cell toxicity in fibroblasts (MRC-5) and keratinocytes (HACAT) was evaluated, BEB did not present toxicity in 24 hours of incubation. After this period, the extract showed average cytotoxicity in 48 and 72 hours, but not enough to reach the concentration of 50% of MRC-5 fibroblasts. In the trypan blue assay, the extract promoted fibroblast proliferation in 24, 48 and 72 hours of incubation, which was evaluated through exponential cell growth, with emphasis mainly on the lowest concentration with results higher than the standard. When the cell healing capacity was evaluated, in 48 hours of exposure to fibroblast, BEB was able to induce a cell carpet (cell film) in the cell monolayer scratch assay. BEB stimulated collagen production at all concentrations tested. In the alkaline comet assay, at the lowest concentration, the extract did not induce DNA damage when compared to the reference drug doxorubicin. This study proved that BEB extract can be considered an ally in the treatment of skin anti-aging as a possible biotechnological, phytocosmetic product.

Keywords: Brazil nut tree, phytocosmetic, skin, photoaging, cell proliferation

1. INTRODUCTION

The Amazonian flora constitutes the largest living pharmacy in the world. It is the largest reserve of natural products with phytotherapeutic effects and arouses the interest of an entire scientific community due to the medicinal action of herbs (GEERTSMA et al., 2021; DA SILVA et al., 2018). In it, there may be many plant species that represent natural treatments for various diseases of man. It also presents a biodiversity of phytochemical constituents in each species that translate into new biopharmaceutical agents (SARQUIS et al., 2019; VÁSQUEZ-OCMÍN et al., 2021).

Natural products derived from plants have gained significant recognition in the clinical treatment of human diseases. Several research have evidenced the use of plant products in several areas, such as, for example, in cosmetics. These plants can act on specific molecular and cellular targets or even a synergistic effect produced between their secondary metabolites. (DE VARGAS et al., 2016; CERAVOLO et al., 2021).

Aiming at the multidirectional impact of the use of these natural products, the pharmaceutical industry has invested in the research of substances such as raw materials of plant origin that present antioxidant activity, and regenerating and anti-aging effects (WATSON; OGDEN; COTTERELL, 2009). The natural cosmetics market is one of the fastest growing worldwide and, according to a recent survey by Grand View Research, the market for natural beauty products is expected to reach the US\$ 25 billion mark by the year 2025 (DRENO et al., 2014). Thus, the field of skincare research and pharmacological characterization of natural compounds are evolving according to market demand (TUNDIS et al., 2015).

These biological/functional properties of natural compounds (e.g., antioxidants) can be found in various parts of the plant and can generate a pro-health effect with

biotechnological potential. In this context, the objective of this study was to evaluate the cosmetic application of the stem-bark extract of *Bertholletia excelsa*, popularly known as the Brazil nut tree. For this study, in vitro assays were performed to inhibit the enzymes involved in the skin's anti-aging process, inhibition of advanced glycation products (AGEs), determination of cell viability in fibroblasts and keratinocytes, identification of cell proliferative/migratory effect, the quantification of collagen and assessment of cell damage.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Acquisition of the extract

For this study, we used the bark of the stem of the plant *Bertholletia excelsa*, popularly known as the Brazil nut tree. This was designated in this work as BEB (*Bertholletia excelsa* bark). Its acquisition, extraction and spectrophotometric analysis have been described previously in Da Silva et al. (2023).

2.2 Inhibition of collagenase

The collagenase enzyme inhibition assay was performed according to the methodology described by Van & Steinbrink (1981) apud Thring et al. (2009) with amendments. In this test, we used the collagenase from *Clostridium histolyticum* 1 mg/mL. Different concentrations of BEC (0-100 µg/mL) were tested with the enzyme and other reagents at each step. For the controls, we used DMSO (negative control) and quercetin at 1 mg/mL as the positive control. The experiment was performed in triplicate and subsequent reading of the microplate was in a spectrophotometer (DTX 800, Beckman, CA, USA). The results were calculated according to the following equation: % inhibition = $100 - \frac{\text{final} - \text{initial abs sample}}{\text{final} - \text{initial abs control}} \times 100$.

2.3 Inhibition of elastase

The effect of the extract on elastase was performed using the spectrophotometric methodology described by Kim et al. (2005) and modified by Thring et al. (2009). For this assay, the enzyme elastase from porcine pancreas, (substrate AAAPVN) and 6 mM tris-HCl buffer, were used. Different concentrations of BEC (0-100 µg/mL) were tested with elastase enzyme and reagents in each phase of the experiment. The standard, sodium salt hydrate (sivelestat S7198, Sigma-Aldrich), was used at 1 mg/mL, followed by consecutive readings of the plate until 50 minutes had elapsed. The experiment was performed in triplicate and subsequent reading of the microplate in a spectrophotometer (DTX 800, Beckman, CA, USA). The results were calculated according to the following equation: % inhibition = $100 - \frac{\text{final} - \text{initial abs sample}}{\text{final} - \text{initial abs control}} \times 100$.

2.4 Inhibition of hyaluronidase

The inhibition of hyaluronidase activity was determined according to the spectrophotometric methodology described by Reissig et al. (1955) and modified by Marchesan et al. (2006), which was used the enzyme hyaluronidase from bovine testes, substrate hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi*, and 0.2 M sodium acetate buffer. Different concentrations of BEC (0-100 µg/mL) were tested with the enzyme hyaluronidase. For the development of the experiment, we used hexadecyltrimethylammonium bromide - BCTA 2.5% as reagent. DMSO and bovine heparin sodium 1 mg/mL were used as negative and positive controls, respectively. The experiment was performed in triplicate and subsequent reading in a microplate spectrophotometer (DTX 800, Beckman, CA, USA) was performed at 405 nm. The

results were calculated according to the following equation: % inhibition = $100 - \frac{(\text{abs final} - \text{initial sample})}{(\text{abs final} - \text{initial control})} \times 100$.

2.5 Inhibition of tyrosinase

The inhibition of tyrosinase by the extract was evaluated according to the method described by Chan et al. (2008). The enzyme tyrosinase from mushroom substrate L-DOPA and phosphate buffer 10 mM were used. Different concentrations of BEC (0-100 $\mu\text{g/mL}$) were tested with the enzyme tyrosinase and reagents added at each stage, DMSO and kojic acid 1mg/mL were used as negative and positive controls, respectively. The experiment was performed in triplicate and subsequent reading the microplate was performed in a spectrophotometer (DTX 800, Beckman, CA, USA). The results were calculated according to the following equation: % inhibition = $100 - \frac{(\text{final} - \text{initial abs sample})}{(\text{final} - \text{initial abs control})} \times 100$.

2.6 Antiglycation activity: oxidative pathway

The antiglycation activity was determined according to Kiho (2004), with modifications. The reaction was performed in triplicate with concentrations of albumin BSA 8 mg/mL, glyoxal solution at 30 mM and 1 mg/mL of the BEB extract tested at concentrations of (50, 25, 12, 6.25 and 3.12 $\mu\text{g/mL}$). Glyoxal and BSA solutions were diluted in phosphate buffer (200 mM, pH 7.4), containing 3 mM sodium azide as the antimicrobial agent. The 300 μL of the total reaction mixture was composed of BSA (135 μL), glyoxal (135 μL) and DMSO or extract (30 μL) and was incubated at 37 °C for 24 hours (under sterile conditions and in the dark). After incubation, each sample was analyzed in the microplate reader according to fluorescence intensity ($\lambda 330$ nm emission and $\lambda 420$ nm excitation). Quercetin at 1 mg/mL was used as the standard and DMSO as the negative control. The results were expressed in percentage of inhibition and the IC_{50} was calculated using the GraphPad Prism version 6.0. The results were calculated

according to the following equation: % inhibition=100-(fluor. sample. /fluor. control) x100.

2.7 Antiglycation activity: non-oxidative pathway

Antiglycation activity was determined according to Kiho et al. (2004) with modifications. The same steps used in the oxidative pathway antiglycation activity assay were followed, though with the exception of the use of glyoxal, which was replaced by D-(-)-fructose (F0127, Sigma-Aldrich) at 100 mM and the incubation time was increased to 120 hours.

2.8 Cell lines and culture

For this step of the project, we used non-neoplastic cells of human lung fibroblasts (MRC-5, Code 0180, Biosafety: 1) donated by Prof. Dr. Raquel Montenegro of the Federal University of Ceará (UFC) and human keratinocyte (HACAT) kindly provided by Prof. Dr. Silvyta Stuch Maria Engler from Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo (USP). These cell lines were cultured in sterile culture bottles (75 and 250 mL) with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - high glucose culture medium, containing 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% penicillin/streptomycin antibiotic and kept at 37 °C and in 5% CO₂ humid atmosphere in an incubator. For biological assays the BEB extract was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in culture medium to the desired test concentration. The final DMSO concentration in all assays did not exceed 0.2% (v/v).

2.9 Assessment of cell viability

2.9.1 Alamar Blue method

The cell viability assay was performed according to Nakayama (1997). The MRC-5 fibroblast cell line was plated at the concentration (0.5×10^4 cells/well) in 96-well tissue

culture plates to a final volume of 100 μL per well. Fibroblasts were exposed to various concentrations of BEC (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24, 48 and 72 hours. After incubation, the culture medium containing BEC was removed and the cells were washed with 0.1M PBS buffered solution, followed by the addition of 0.4% Alamar blue solution and incubation for 3 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$. Fluorescence was measured via excitation at 545 nm and emission at 595 nm in the microplate reader. As a positive control of cell death, we used doxorubicin hydrochloride 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the culture medium without treatment as the negative control. The tests were performed in triplicate and the mean \pm standard deviation values expressed as percentage of cell viability.

The results were calculated according to the following equation: % Viability = $F_t \times 100 / \Delta F_b$ Onde: $F_t = (\text{cell fluorescence} + \text{medium} + \text{substance} + \text{resazurin})$
 $\Delta F_b = (\text{cell fluorescence} + \text{medium} + \text{resazurin})$.

2.10 Cell proliferation assay- trypan blue

This assay is based on the ability of trypan blue dye to penetrate all cells. However, viable cells manage to expel the dye while non-viable cells remain stained (PERES & CURI, 2005). The assay consisted of evaluating the cell growth and proliferation curve using the trypan blue exclusion method (FRESHNEY, 1994) with modifications.

MRC-5 fibroblast cells were plated at a concentration of 5×10^4 cells/mL in 24-well plates. Fibroblasts were exposed to BEC concentrations (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24, 48 and 72 hours. At the end of each period, the cells (viable and non-viable) were counted in a Neubauer chamber using the 0.4% trypan blue solution (T6146, Sigma-Aldrich). The following mathematical equation was used to calculate the number of cells in each well: $NC \times D \times 10^4 / Q$. As controls, we used medium without treatment for the negative and ascorbic acid (A92902, Sigma-Aldrich) at 50 μM for the positive. The data were analyzed using the GraphPad Prism[®] program (One-way /ANOVA/ Bonferroni).

2.11 Healing/cell migration assay

The method described by Liang, Park and Guan (2007) was used to evaluate cell-healing capacity. In this assay, cells of the MRC5 fibroblast line were transferred to 24-well plates at a density of $(10 \times 10^4 \text{ cells/mL})$. After 24 hours of incubation, fibroblasts were exposed to various concentrations of BEC (0-100 $\mu\text{g/ml}$). For the negative control, the medium was used and the positive control was ascorbic acid (A92902, Sigma-Aldrich) at 25 μM . After the 24 h period, a vertical cut was made from end to end in the well removing an area with a 200 μL tip. The behavior of the cells was recorded by means of photographs during the periods of 24, 48 and 72 hours, using an inverted polarized light microscope (Leica[®]).

2.12 Quantification of collagen from fibroblast cell culture

To quantify the production of soluble collagen in the cell-culture supernatant, we used the picrosirius (Sirius red) colorimetric assay method described by Jones et al. (2013) with modifications. MRC-5 fibroblast cells were plated at a density of $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ in 24-well plates and placed in a CO_2 incubator for 24 h. Fibroblasts were exposed to concentrations of BEC (0-100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hours and after this period the cell supernatant was removed for evaluation of collagen quantification. In this step, saturated Bouin's solution (acetic acid 5% + formaldehyde 9% + picric acid 0.9%), picrosirius dye 0.1% (Direct Red 80, 365548, Sigma Aldrich), HCl 0.01 M and NaOH 0.1 M were used as controls. The negative control was the medium without treatment, and the positive was ascorbic acid (A92902, Sigma-Aldrich) at 50 μM . The plate was placed in a spectrophotometer for reading and compared with the standard curve for collagen. For the coloring of the collagen deposited in the extracellular matrix, the cells adhered to the plates were added 100 μL of cold 70% alcohol, and placed in a freezer at

-80°C, the picosirius solution was used and then the photomicrographs of the cell cultures were performed under an inverted microscope polarized light (Leica®).

The mean values were plotted on a scatter plot with the known concentrations of collagen, with the values of the X axis and the absorbances corresponding to each concentration with the values of the Y axis and calculated the equation of the line and the correlation coefficient R. Three experiments were performed in triplicate and the data were analyzed using the GraphPad Prism® program (two-way/ANOVA/Bonferroni post-test).

2.13 Evaluation of genotoxicity

2.13.1 Comet assay - alkaline pH

The alkaline comet assay was performed according to the methodology described by Singh et al. (1988) with modifications. In this test, the non-neoplastic fibroblast cell line MRC5 was used at a cell density of 20×10^4 cells/well, in a 24-well plate. The plate was incubated in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C for 24 h. After this time, the cells were exposed to the BEC extract at concentrations of 100 and 25 µg/mL; (Ascorbic acid, A92902, Sigma-Aldrich) at 5 µM, negative control DMSO (0.2%), and (Doxorubicin, D1515, Sigma-Aldrich) at 10 µg/mL as a positive control for 3 hours. For cell acquisition, trypsin was used to remove the cell population from the bottom of the plate, then the content was centrifuged to obtain the cell pellet. A cell volume of 10 µL was taken and added to 110 µL of low melting point agarose, and then placed on microscopy slides, pre-covered with normal melting point agarose and covered with coverslips, for homogeneous distribution of samples. Electrophoresis was conducted in the absence of light for 20 minutes, at 20 V and with a current of 300 mA. Subsequently, the slides were placed in neutralization solution for 5 minutes to remove the alkalinity, then dried and fixed in ethanol. The slides were analyzed under a fluorescence microscope, using 30 µL of Syber

Green solution 1,000 x (Sigma-Aldrich) diluted 1:10,000 in TBE – EDTA borate buffer 1 x (TBE) on the slides. The analysis of the comets was carried out according to size and intensity of the tail, and the index and frequency of the damage was calculated. Total ID = 0. (N Class 0) + 1. (N Class 1) + 2. (N Class 2) + 3. (N Class 3) + 4. (N Class 4).
 Damage frequency = [(50-N Class 0). 100]/50

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Enzymatic assays

This work conducted a study on the inhibitory effect of age-related enzymes of the skin (anti-aging effect). Collagenase, elastase and hyaluronidase are enzymes that make up the extracellular matrix and that degrade, respectively, collagen, elastin and hyaluronic acid. On the other hand, tyrosinase is involved in the modulation of melanogenesis. The BEB extract (100 µg/mL) was evaluated as to its ability to inhibit these enzymes at 1 mg/mL. After measurement, the results obtained were transcribed in mean ± standard deviation as observed in Table 1 below.

Table 1: Result of the stem bark of *Bertholletia excelsa* (BEC) when evaluated for enzyme inhibition capacity. The results were expressed as mean values±standard deviation. The assays were performed in independent experiments in triplicate and the standards used were at the concentration of 1 mg/mL and the BEB extract at 100 µg/mL.

Sample	% Enzyme inhibition			
	Tyrosinase	Hyaluronidase	Collagenase	Elastase
BEC	25.85 ± 0.10	24.55 ± 0.40	32.04 ± 3.02	62.67 ± 3.75
Kojic Acid	92.35 ± 0.24	-	-	-
Heparin	-	88.09 ± 1.74	-	-
Quercetin	-	-	81.02 ± 1.24	-
Sivelestat	-	-	-	89.04 ± 0.53

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.0 program with one-way/ANOVA Tukey test multiple comparison with a value of *p<0.05 being considered statistically significant.

The results were expressed in % inhibition for tyrosinase (5.85 ± 0.10), hyaluronidase (0.55 ± 0.40), collagenase (2.04 ± 3.02), and their test standards were kojic acid (92.35 ± 0.24), heparin (88.09 ± 1.74), quercetin (81.02 ± 1.24), respectively.

It was observed that the BEB extract presented an average inhibition capacity of the elastase enzyme (62.67 ± 3.75) when compared to the sivelestat standard (89.04 ± 0.53), which is an enzyme involved in the extracellular matrix of the skin and promotes aging. For the other enzymes, BEB did not present a significant percentage of inhibition greater than 50%, making the dilution unfeasible to obtain the IC_{50} .

Thring et al. (2009) conducted a similar study with the extract of 21 medicinal plants. Very high anti-elastase activity was exhibited by the extracts of white tea and custelos extract, which inhibited more than 89 and 57.9% of the enzyme activity, respectively. Good inhibition activities were exhibited by burdock root (50.9%), anise (31.9%) and angelica (31.6%).

Many plant species have been studied for their biological potential, as is the case of the genus *Warburgia* (Canellaceae family), which is widely distributed in the Afrotropical and Neotropical regions and is used as an anti-inflammatory, antimalarial and for wound healing. A total of 30 compounds have been identified, among them catechin, 11α -hydroxy muzigadiolide, mukaadial, pereniporin B and 11α -hydroxycinnamosmolide. The extract showed antioxidant activity in DPPH and FRAP assays and has an anti-aging profile with inhibition of collagenase, elastase, tyrosinase and hyaluronidase enzymes, with an IC_{50} comparable to the standard, and attenuated oxidative stress *in vivo* (ABDELFATTAH et al., 2022).

Another study, by Pientaweeratch and collaborators (2016), was carried out using *Phyllanthus emblica* and *Manilkara zapota*, both medicinal plants rich in antioxidants, and both presented high concentrations of phenolic compounds and flavonoids. In the

DPPH and ABTS antioxidant assays, they presented an IC_{50} of 1.70 ± 0.07 and 4.45 ± 0.10 $\mu\text{g/mL}$. Inhibition activity against MMP-1, MMP-2 and elastase were detected in *Manilkara zapota* with IC_{50} values of 89.61 ± 0.96 , 86.47 ± 3.04 and 35.73 ± 0.61 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

3.2 Oxidative and non-oxidative antiglycation activity *in vitro*

The extract under study (BEB at 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12 $\mu\text{g/mL}$) was evaluated for antiglycation activity by the oxidative and non-oxidative pathways, and the results are expressed in Figures 1-A and 1-B below.

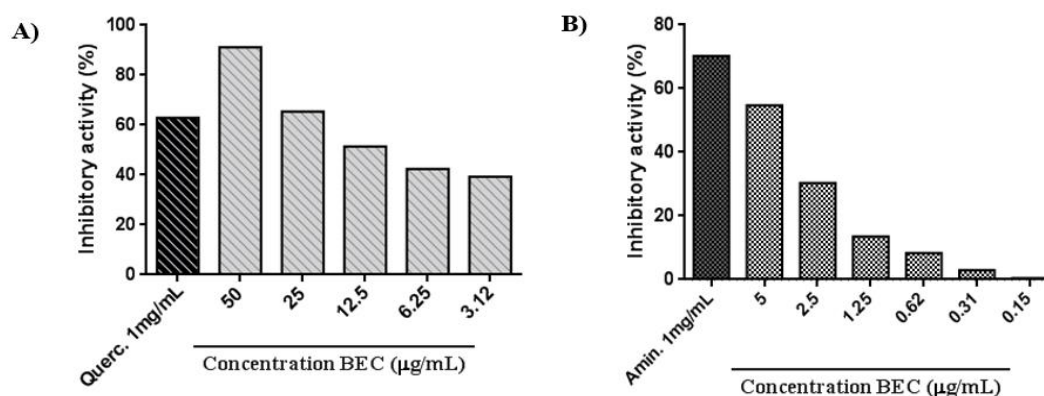


Figure 1: Inhibitory activity (%) of BEB on glycation by the oxidative pathway (1-A), inhibitory activity (%) by the non-oxidative pathway (1-B). The standards quercetin (1 mg/mL) for inhibition of glycation by the oxidative route and aminoguanidine (1 mg/mL) for the non-oxidative pathway were used. Statistical analyses were performed using the one-way/ANOVA Tukey test multiple comparison with a value of $*p < 0.05$, in GraphPad Prism statistical software, version 6.0.

In the oxidative pathway (glyoxal), the standard quercetin at 100 $\mu\text{g/mL}$ was used as a positive control. After the tests, it was found that BEB presented a percentage of inhibition greater than 50% in this pathway, so it was necessary to calculate the IC_{50} . The extract showed the best result at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ with inhibition values of $91.21 \pm 0.29\%$ and an IC_{50} of 12.4 ± 0.41 $\mu\text{g/mL}$, while the control showed values of $84.95 \pm 0.25\%$ and an IC_{50} of 35.56 ± 0.85 $\mu\text{g/mL}$, at the same concentration. Taking into account these results, BEB showed a superior mean in the inhibition capacity of this

pathway mediated by glyoxal (30 mM) for 14 days of exposure, as observed in Figure 1-B.

When evaluating the non-oxidative pathway, the standard of choice was aminoguanidine at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. BEB at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed an inhibition value of $86.5 \pm 1.88\%$ and an IC_{50} of $4.45 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{mL}$. Aminoguanidine, on the other hand, obtained an inhibition value of $77.43 \pm 2.1\%$ and an IC_{50} of $28.6 \pm 1.35 \mu\text{g}/\text{mL}$, also in this pathway. The BEB extract under study showed an inhibition capacity of advanced glycation end-products, now mediated by fructose (0.1 M), as shown in Figure 1-A.

The concentrations of the BEB extract expressed in graphs of Figures 1-A and 1-B correspond to the values used to calculate the minimum inhibitory concentration of 50% (IC_{50}). The comparative data of the BEB and the standards were related to the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which presented the best inhibition in glycation inhibition capacity.

Advanced glycation end-products (AGEs) are a chemically heterogeneous group of compounds formed by the Maillard reaction, when reducing sugars react non-enzymatically with amine residues, proteins, lipids and nucleic acids (HANIF et al., 2021). The accumulation of AGEs is triggered by protein changes in various tissues that alter their biochemical and physicochemical properties (PERRONE et al., 2020).

A recent study by Ali and collaborators (2022) evaluated the antidiabetic potential of 6-formylumbelliferone (6-FU) A furanocoumarin isolated from *Angelica decursiva* for some signaling molecules of antidiabetic activity. Thus, 6-FU was able to inhibit the enzymes involved in this process, such as tyrosine phosphatase, α -glucosidase, recombinant human aldose reductase (HRAR) and the formation of AGEs with IC_{50} values of 1.13 ± 0.12 ; 58.36 ± 1.02 ; 5.11 ± 0.21 and $2.15 \pm 0.13 \mu\text{M}$, respectively. In addition, 6-FU significantly increased glucose uptake and decreased PTP1B expression

in insulin-resistant C2C12 skeletal muscle cells. 6-FU at 0.8-100 μM also inhibited the formation of fluorescent AGEs in glucose-fructose-induced glycation of human serum albumin.

Ardestani & Yazdanparast (2007) conducted research on the inhibitory and antioxidant activity of the protein glycation of the hydroalcoholic extract of *Cyperus rotundus* (Cyperaceae), and this was used as a basis for our study. The extract showed antioxidant activity when tested in ferric reducing ability of plasma (FRAP) assays, as well as antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC). Regarding its antiglycation capacity, fructose at 100 mM increased the fluorescence intensity of glycated bovine serum albumin (BSA) in relation to AGEs. Moreover, when the extract decreased in concentration (25-250 $\mu\text{g/mL}$), it significantly decreased the formation of AGEs.

Other researchers, such as Figueiredo and collaborators (2021), analyzed the antiglycation activity of the dry extract of *Tribulus terrestris*. They used glycated bovine serum albumin (BSA) as protein, and ribose as a glycation agent, and it was found that the extract not only presented antiglycation activity under these conditions, but also exhibited antioxidant activity in the DPPH assay and was able to induce the death of more than 50% of tumor cells.

A bioassay-guided study, which aimed at identifying inhibitors of the glycation process from the leaves of *Ocotea paranapiacabensis*, provided four benzyloquinoline alkaloids (1-4). Alkaloids 1-4 showed inhibition of the formation of AGEs of 62.9%, 83.3%, 26.1% and 98.2% when tested at 150 μM . In the reconstructed human skin model, compounds 1 and 4 showed anti-aging potential with a decrease in dermis contraction in 8.7% and 4.2%, respectively.

3.3 Effect of *B. excelsa* stem-bark extract on cell viability

The viability assay was performed using the Alamar blue method. This reagent is based on the fluorogenic redox indicator called resazurin, which is reduced to resofurin by the metabolism of viable cells in the MRC-5 cell culture. To investigate the cytotoxicity of BEB on the fibroblast lineage of human lung fibroblast (MRC-5) and human keratinocyte (HACAT), these cells were plated at the density of 0.5×10^4 cells/well.

The evaluated effect on the cell viability in these cell lines, when BEB was tested at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (in triplicate), it did not present any interference in the viability of fibroblasts and keratinocytes within 24 hours. It was higher than 50% of viable cells when compared to the standard doxorubicin at 5 $\mu\text{g/mL}$ with IC_{50} value of 1.903 (1.152 – 4.831), as shown in Figure 2.

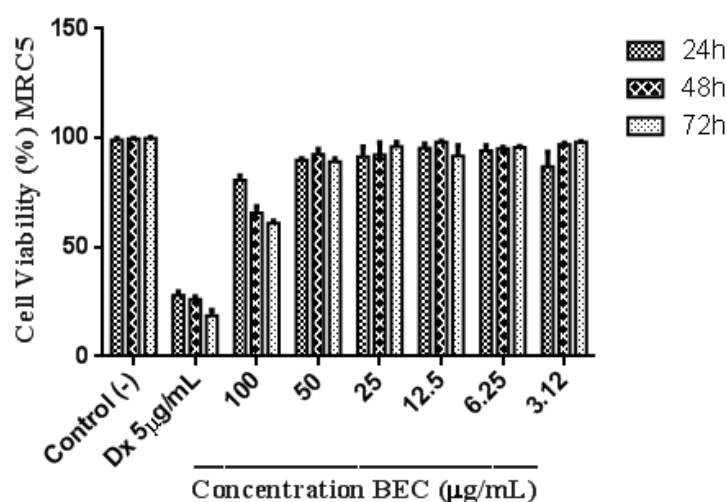


Figure 2: Effect of *Bertholletia excelsa* stem bark (BEB) on the viability of human lung fibroblast cells – MRC-5 (expressed as a percentage) using the Alamar blue method, in treatment periods of 24, 48 and 72 h. Doxorubicin (5 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control and untreated medium was used as a negative control. Values are represented as IC_{50} (95% confidence interval) of doxorubicin. The values were expressed as mean \pm standard deviation in independent experiments in triplicate, where $*p < 0.05$ was considered statistically significant when compared to the negative control using two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test in the GraphPad Prism statistical software, version 6.0.

Only in 48 and 72 hours did the highest concentrations of the experiment (100 and 50 $\mu\text{g/mL}$) show relative toxicity, which was equivalent to $67.87 \pm 1.23\%$; $65.03 \pm 0.55\%$, respectively, when compared to doxorubicin: 0.432 (0.372 – 0.501%); 0.340 (0.266 – 0.434%) for the same times for MRC-5. Untreated medium was used as a negative control. In keratinocyte HACAT, the following results of percentage of cell viability were obtained: 100 ($73.06 \pm 3.17\%$), 50 ($78.21 \pm 1.9\%$), 25 ($85.16 \pm 4.1\%$), 12.5 ($90.5 \pm 2.9\%$), 6.25 ($98.2 \pm 3.5\%$) and 3.125 $\mu\text{g/mL}$ ($93.7 \pm 0.9\%$) in 24 hours of treatment. Since there was no cytotoxic potential of BEB in the assay, it was not possible to calculate the IC_{50} (concentration required to reduce cell viability by 50%).

These results are similar to those found in the studies of Ziemlewska et al. (2021), which tested the leaves of *Vaccinium myrtillus* L., *Ribes nigrum* L., *Rubus fruticosus* L., *Fragaria vesca* L. In the *in vitro* tests, it was possible to identify the antioxidant potential of these species due to the presence of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins. While the cytoprotective potential and the regenerative effect were identified in cell culture assays of fibroblasts and keratinocytes. It is worth noting that the anthocyanins present in the leaves of these species significantly affect the mitigation of the negative impact of solar radiation on human fibroblasts, which can contribute to reducing the process of photoaging of the skin and inhibit the degradation of collagen.

This study corroborates that of Ferreira and collaborators (2021) who conducted database research on trends in botanical use in cosmetics in the prevention of anti-aging. They highlighted that plants with polyphenol compounds and especially flavonoids have a higher prevalence due to the antioxidant and anti-inflammatory profile that these compounds have. Among the main plant species, they identified *Vitis vinifera*, *Butyrospermum parkii* and glycine soja as having greater representativeness. Proanthocyanidins, anthocyanins and flavan-3-ols are among the main flavonoids of

interest in the cosmetic market, along with pharmaceutical formulations that have a DNA-protective effect.

Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant properties were evaluated using the methanolic extract of *Polyscias filicifolia* Bailey (Araliaceae). In the phytochemical profile, numerous compounds were identified including chlorogenic, caffeine, ferulic acid derivatives and saponin fractions. The extracts showed low cytotoxicity against the V79 cell line, with IC₅₀ values of >1 µg/mL in Alamar blue assay (FIGAT et al., 2020).

3.4 Effect of *B. excelsa* on cell proliferation – Trypan blue

The Trypan blue assay was used to estimate the number of viable cells. The reactivity of the dye is based on the fact that the chromophore is negatively charged and does not react with cells unless their membrane is damaged (MISU et al., 2015).

Fibroblasts (MRC-5) were plated at a density of 5×10^4 , then, after 24 hours, were exposed with BEB extract (12.5, 6.25 and 3.125 µg/mL), vitamin C at 50 µM (positive control) and the medium as the negative control, following the exhibition in times of 24, 48 and 72 hours. After this period, viable and non-viable cells were counted in the Neubauer chamber, using the 0.4% trypan blue dye as a marker.

For each time (24, 48 and 72 hours), fibroblasts were quantified in delta values (final Δ - initial Δ) and the difference expressed as the delta (Δ) of viable cells, as represented in Figure 3-D.

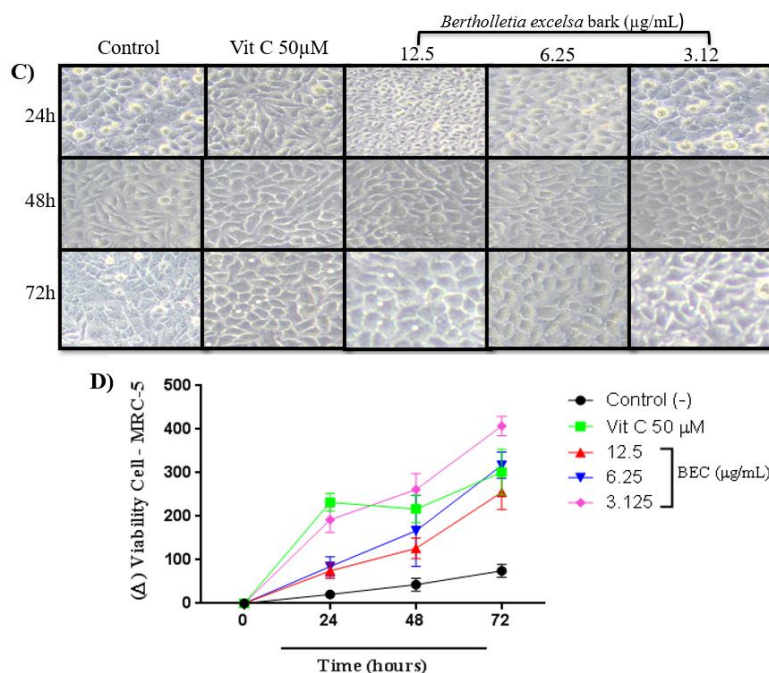


Figure 3: Effect of BEB on cell proliferation in the Trypan blue assay. (3-C) Photomicrographs of fibroblasts at exposed periods (24, 48 and 72 hours). (3-D) Graphical analysis of the cell population represented by the difference of values in delta (Δ), considering the initial and final population of viable cells. Vitamin C at 50 μM was used as positive control and only the medium as the negative control. Data were calculated by the difference between the number of final and initial cells. The values were expressed as mean \pm standard deviation of independent experiments in triplicate, where * $p < 0.05$ was considered statistically significant when compared to the negative control using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test in GraphPad Prism statistical software, version 6.0.

According to the results, BEB did not promote any morphological changes in fibroblasts when tested in the concentrations of the study, as can be observed in Figure 3-C. On the contrary, in all concentrations, it presented significant potential for fibroblast proliferation.

This induction in the proliferation of these cells was evaluated using delta (Δ) values, considering the difference between the initial and final viable cell population of the experiment. The results were thus described following the exposed in periods 24, 48 and 72 h, respectively, and the data are presented in Figure 3-D. Negative control ($\Delta=17.2$; 53.0 and 70.2), vitamin C ($\Delta=236.7$; 251.0 and 354.6), BEB 12.5 ($\Delta=83.7$; 135.0

and 278.9), BEB 6.25 ($\Delta=95.5$; 195.0 and 312.0) and BEB 3.125 $\mu\text{g/ml}$ ($\Delta=208.4$; 275.0 and 432.5).

It is noteworthy that the lowest concentration of the experiment (3.125 $\mu\text{g/mL}$) showed higher delta values ($\Delta=432.5$), especially at 72 hours (peak of the experiment), when compared to the positive control (vitamin C at 50 μM) ($\Delta=354.6$), as is observed in the above data.

A similar study was conducted by Zofia et al. (2020), who investigated the anti-aging and protective properties of plants of the Apiaceae family, the species *Meum athamanticum* L., *Centella asiatica* L. and *Aegopodium podagraria* L. It was demonstrated that the highest antioxidant capacity is found in the species *A. podagraria*. All extracts showed a positive effect on cell proliferation in keratinocyte and fibroblast lines after reaching a concentration of 5%. *A. podagraria* was able to inhibit the activity of enzymes responsible for anti-aging cellular aging (collagenase and elastase) reaching 70% of inhibition of these enzymes at a concentration of 5%.

Agyare et al. (2011) conducted tests with the extracts of the leaves of *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell, which is traditionally used in wound healing. Among its main chemical constituents, geraine and furosine increased the energy state of cells in fibroblasts and keratinocytes and stimulated collagen biosynthesis of NHDF at 50 μM and 5-10 μM . *P. muellerianus* showed stimulating activity on dermal fibroblasts and keratinocytes, which led to increased cell proliferation and formation of extracellular matrix proteins.

3.5 Evaluation of *B. excelsa* in the *in vitro* cell-motility/migration assay

Cell migration is an important process that is involved in several biological events such as healing, inflammation, embryonic development, cell transformation and tumor

metastasis. The process depends on a precise regulation of both mechanical and biochemical signals perceived by cells (COSTA & SANTOS, 2017).

This test is one of the methods that can be used to analyze the migration of cells, such as keratinocytes or fibroblasts in the skin, which exhibit collective migration, also known as “slide migration” (BINDSCHADLER & MCGRATH, 2007). In this case, it allows us to evaluate the movement and morphology of the cells in real time, as well as the measurement of the migration rate of the tested cells. By performing a linear scratch on the cell monolayer, it is possible to evaluate the capacity of the cell migration.

In the *in vitro* cell-migration assay, monolayer MRC-5 fibroblasts were used at a density of 10×10^4 cells/mL and a central vertical section (scratch area) was performed. BEB was tested at concentrations of 12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$, vitamin C at 25 μM was the positive control, and the and medium was the negative control, for periods of 24, 48 and 72 hours, as represented in Figures 4-E and 4-F.

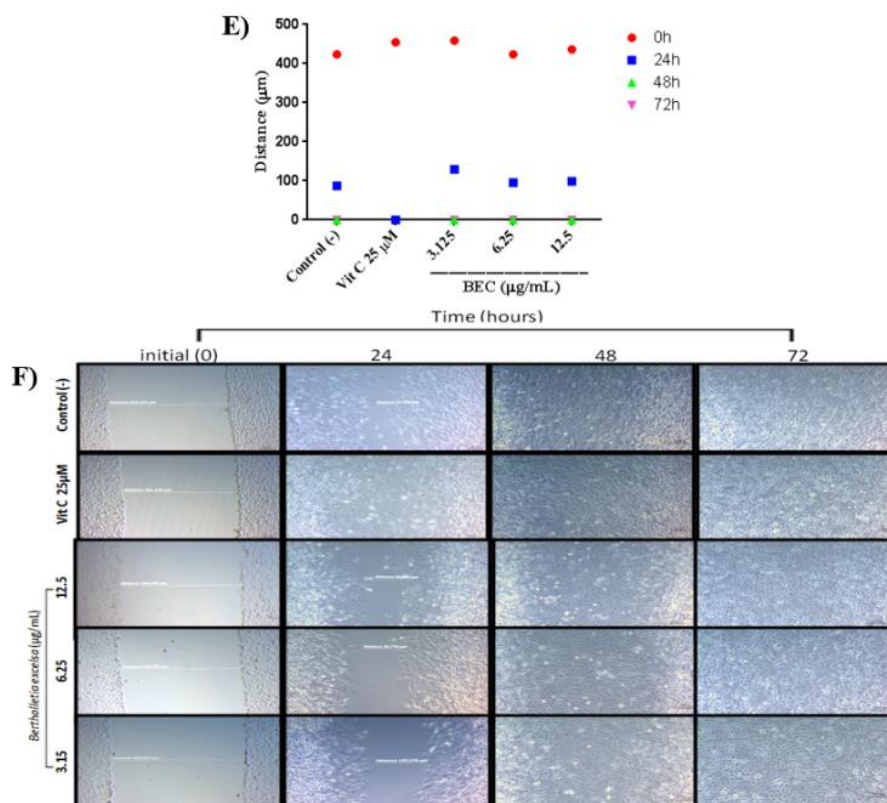


Figure 4- Evaluation of BEC on healing/migration of cells *in vitro*. (4-E) Photomicrographs of fibroblasts for the periods of 24, 48 and 72 hours with BEB extract exposed (12.5; 6.25 and 3.125 µg/mL). (4-F) Graphical representation of the distance in micrometers (µm) of the scratch made in the monolayer of MRC-5 cells. Vitamin C at 25 µM was used as the positive control and the medium without treatment was used as the negative control. The values were expressed as mean±standard deviation in independent experiments in triplicate, where * $p < 0.05$ was considered statistically significant when compared to the negative control using two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test in GraphPad Prism statistical software, version 6.0.

As seen in Figure 4-F, after 24 hours of exhibition, only the positive control (vitamin C) completely closed the induced scratch in the monolayer plate of cells, as expected. After 48 hours of treatment, all concentrations of BEB (12.5, 6.25 and 3.125 µg/mL) and the negative control (medium) formed the conclusion of the closure of the cell carpet over the scratch area, presenting a regenerative effect of fibroblasts. The results of measuring the distance from the scratch are expressed in micrometers (µg/mL) and the data are plotted in Figure 4-E.

According to the studies of Nicolaus et al. (2016), extracts of *Calendula officinalis* flowers have been used in traditional medicine for a long time, and it is currently considered a phytomedicine that is approved by the European Medicines Agency (EMA). In *in vitro* assays, the n-hexane and ethanolic extracts of the species influenced the inflammatory phase by activating the transcription factor NF- κ B in keratinocyte HACAT. They also influenced the migration of keratinocytes during the phase of formation of new tissue in the healing/cell-migration assay.

This study corroborates that of Jettanacheawchankit et al. (2009). After studies with acemannan, one of the main bioactive polysaccharides of the plant species *Aloe vera*, the authors showed functions in the healing of oral wounds in human and rat gingival fibroblasts. These included stimulating the expression of keratinocyte growth factor-1 (KGF-1) and type I collagen production in cells when using a daily dose of 16 mg/mL and improving oral wound healing in rats with a daily dose of 2% acemannan. It was also found that acemannan can significantly accelerate wound closure and fibroblast proliferation in mice.

Siriwattanasatorn et al. (2020) found in their studies that the ethanolic extracts of *Garcinia mangostana* L., *Glycyrrhiza glabra* L., and *Nigella sativa* L were able to inhibit the production of the superoxide anion with IC₅₀ values of 13.97 ± 0.38 , 28.62 ± 1.91 , 71.54 ± 3.22 , and nitric oxide with IC₅₀ values of 23.97 ± 0.91 , 46.35 ± 0.43 and 78.48 ± 4.46 μ g/mL. The extracts showed good activity for the closing capacity in the scratch-closing assay in the monolayer of the murine fibroblast cell 3T3-CC92, with IC₅₀ values of 48.42 ± 1.26 ; 50.72 ± 0.78 and $60.60 \pm 2.31\%$ for *G. mangostana*, *G. glabra* and *N. sativa*, respectively. Thus, the extracts effectively promoted the promotion of wound healing with fibroblast cell proliferation and inhibition of factors involved in inflammation.

3.6 Quantification of collagen in fibroblast cell culture

Collagen stands out for being an essential component of various connective tissues, and is found in the skin, cartilage and bones. It has the function of contributing to the resistance, cohesion and elasticity of tissues. This protein is responsible for ensuring the integrity of the extracellular matrix and has an important role in cell healing and regeneration (RINNERTHALER et al., 2015).

Fibroblasts were plated at a density of 1×10^5 cells/mL and exposed with the BEB extract at 12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$, vitamin C at 50 μM , and untreated medium, and were measured using the picosirius (Sirius-Red) colorimetric assay. After 24 h of exhibition collagen was quantified and expressed in collagen concentration ($\mu\text{g/mL}$), as shown in Figure 5-G, in the first phase of the experiment.

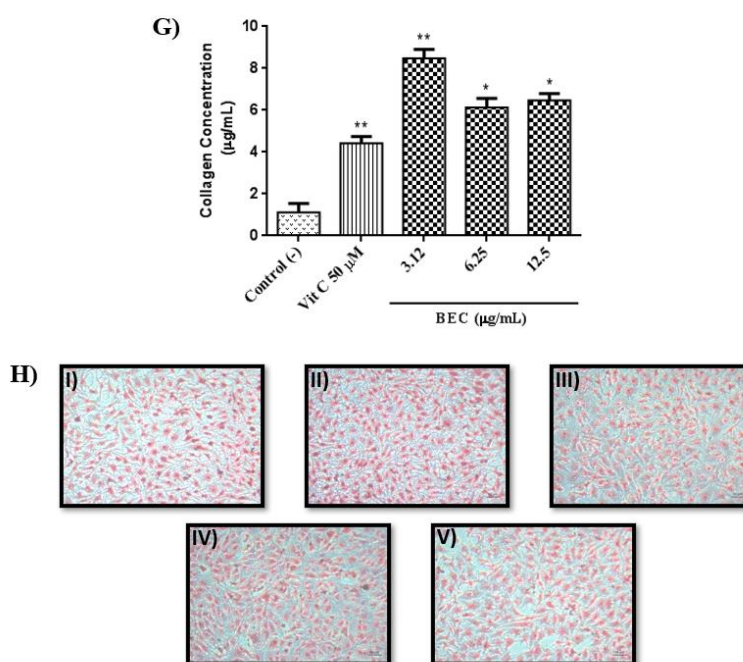


Figure 5- Evaluation of BEC on collagen concentration in cell culture of fibroblasts. (5-G) MRC-5 cells plated at a density of 1×10^5 cells/mL and exposed with BEB at 12.5; 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$ for 24 hours. (5-H) Photomicrographs of fibroblasts using the picosirius (Sirius-Red) colorimetric assay. H-I medium without treatment (negative control); H-II Vitamin C at 50 μM (positive control); H-III; H-IV and H-V; relate to BEB at 3.12; 6.25; 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The values are expressed as mean \pm standard deviation in independent experiments in triplicate, where ** $p < 0.001$ and * $p < 0.01$ were considered statistically significant when compared to the negative control using a two-way ANOVA followed by Tukey's test in GraphPad Prism statistical software, version 6.0.

The concentrations of BEB (12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$) showed values of 6.52 ± 0.98 , 5.67 ± 3.6 and 8.23 ± 2.7 in collagen production in cells. Thus, these values showed superiority to the positive control when quantified spectrophotometrically. With these data, it was possible to observe a significant increase in the total amount of collagen deposited in the dermal extracellular matrix anchored to the dermo-epidermal junction via the collagen of the fibroblasts.

It is noteworthy that the lower concentration of BEB (3.125 $\mu\text{g/mL}$) stimulated collagen production in MRC-5 at 8.23 ± 2.7 , which is higher than the positive control vitamin C at 50 μM (4.0 ± 2.3) and statistically significant with a value of $**p < 0.001$. Promoting greater effect on the production of type II collagen synthesis in fibroblasts.

In the second phase of the experiment, the cells were placed in 70% alcohol and kept in a freezer at -80°C for complete fixation of the material after soaking with picosirius solution. After 2 hours of exposure, they were visualized in an inverted polarized light microscope. Photomicrographs were made and can be seen in Figure 5-H, and it is possible to observe that, at all the concentrations tested, BEB did not interfere with fibroblast morphology in the presence of collagen.

Mhlongo et al. (2021) also evaluated the quantification of collagen in human fibroblast cells (MRHF) with the extracts from the plants *Lobostemon fruticosus*, *Scabiosa columbaria* and *Cotyledon orbiculata*. These extracts showed good activity and negligible toxicity *in vitro* using the MTT assay. *Lobostemon fruticosus* and *Scabiosa columbaria* showed a possible anti-inflammatory activity in RAW 264.7 macrophages, but only *L. fruticosus* stimulated collagen production in 122% above the control values in fibroblast lineage MRHF. In this study, it was found that all extracts stimulated cell proliferation in fibroblasts.

In order to corroborate the previous results, Takahashi et al. (2012) tested a panel of 47 medicinal plants grown in Okinawa. However, only the species *Bischofia javanica*, *Colocasia esculenta*, *Melaleuca alternifolia*, *Piper angustifolia*, *Jasminum sambac* and *Curcuma longa* increased cell proliferation of the NB1RGB lineage, and *C. longa* provided an increase in type I collagen synthesis when compared to the positive control ascorbic acid.

3.7 Genotoxicity assessment via the comet assay

The extract of the stem bark of *Bertholletia excelsa* in the concentrations of 100 and 25 µg/mL, vitamin C at 5 µM, doxorubicin at 10 µg/mL were tested to assess the ability to cause DNA damage in non-neoplastic cells of human lung fibroblasts (MRC-5). In this test, we used an alkaline version of the comet assay and, for comparative analysis, we used the index and frequency of damage, since such parameters reflect the extent of damaged DNA. The alkaline comet assay is usually the most used version and is able to detect all types of DNA damage (JAYAKUMAR et al., 2012).

MRC-5 fibroblasts were incubated with BEB for 3 hours at the above concentrations in alkaline comet assay. It was observed that at the concentration of 100 µg/mL, it presented a higher index of significant damage $^{**}(p<0.001)$ (Figure 6-I), when compared to the positive control doxorubicin at 10 µg/mL. Regarding the frequency of damage (%), grade 1 (76.4%) was the most prevalent when the genotoxic action of BEC was analyzed. This type of cell damage (type I) is related to the fragmented DNA tail smaller than the nucleoid, as shown in Figure 6-J and 6-K. Damage shown in the comet assay includes single and double strand breaks and alkali-labile site breaks of the DNA of fibroblast cells.

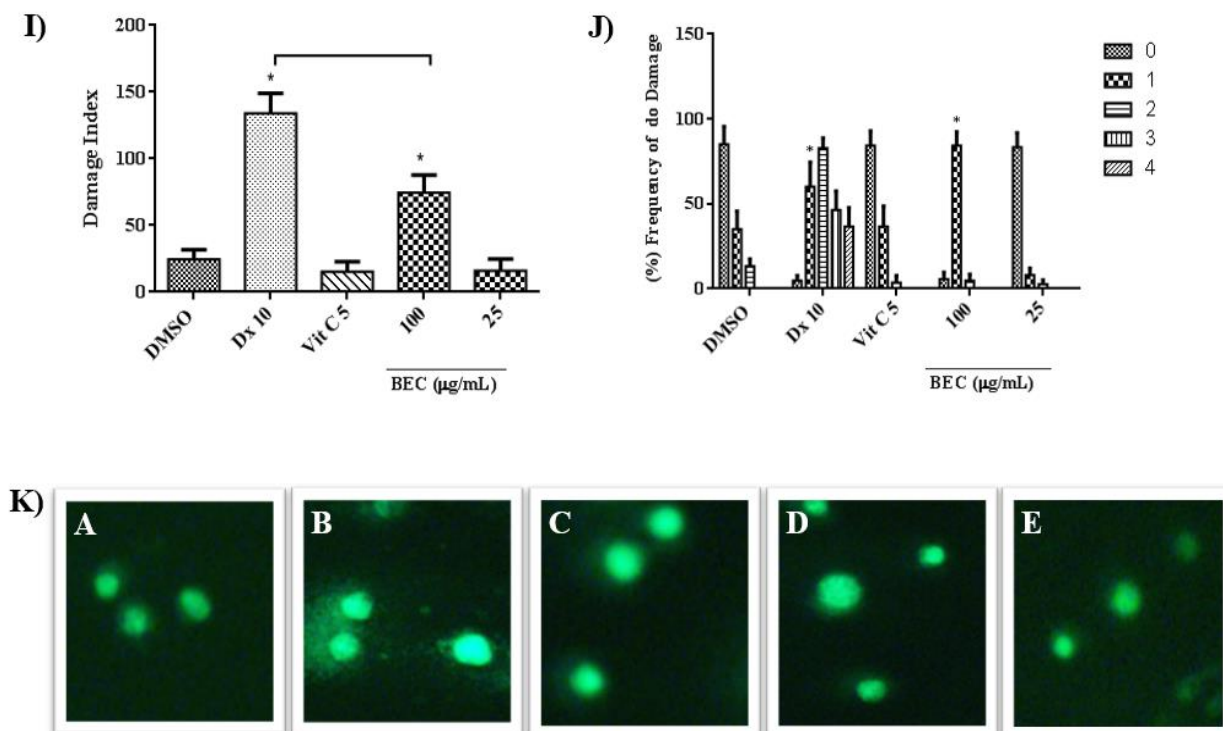


Figure 6- Genotoxic effect of *Bertholletia excelsa* (BEB) on MRC-5 fibroblasts using the comet assay. (6-I and 6-J) DNA damage index and frequency of MRC-5 cultured in cell monolayer, and treated with BEB at 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$ after 3 hours of exhibition. (6-K) Photomicrographs of the slides analyzed in under a fluorescence microscope with Syber Green 1,000 x solution. Positive control was doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$ and negative control was DMSO 0.2%. Values were expressed as mean \pm standard deviation in independent experiments in triplicate, where ** $p < 0.001$ was considered statistically significant when compared to the negative control of DMSO 0.2%. The results were analyzed using two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test in GraphPad Prism statistical software, version 6.0.

Both for vitamin C at 5 μM and BEB at 25 $\mu\text{g/mL}$, no statistical difference was observed in DNA migration, i.e., it did not induce DNA damage when compared to the positive control doxorubicin (10 $\mu\text{g/mL}$), which presented more frequent grade 2, 3 and 4 damage.

Some ethnomedicinal plants can present several types of adverse effects, including mutagenic and carcinogenic ones due to chemical components found in them that can potentiate this effect. Therefore, it is necessary that a thorough study of the beneficial effects is also correlated with their toxicological profile, and thus provide greater safety in the use of these natural products. For this purpose, genotoxicity assays are performed

to detect compounds that possess the ability to interact with DNA (SPONCHIADO et al., 2016).

The comet assay has been applied in the study of toxicological genetics, cytotoxicity, DNA repair and apoptosis. It is a fast and sensitive technique for detecting primary DNA damage. Compared to other genotoxicity tests, the comet assay has advantages due to the short time required to complete the experiment, the need for a small number of cells per sample, and the sensitivity in detecting low levels of DNA damage (UEDA, 2020).

As such, studies have been developed using this type of assay, as is the case of Pavlović et al. (2021), who evaluated the phytochemical, genoprotective and antigenotoxic effect of species of the Lamiaceae family. The extracts of *Melissa officinalis*, *Mentha × piperita*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Satureja montana* presented antioxidant profile via DPPH. In the comet assay, all extracts exhibited genoprotective potential, and antitumor effect was mediated by modulation of reactive oxygen species and nitric oxide production.

Another similar study was developed by Kumari, Elancheran and Devi (2018), which verified the phytochemical, antioxidant, anti-aging and antigenotoxic profiles of the extract of *Amaranthus viridis*. The extract showed excellent antioxidant activity such as DPPH free radical scavenging activity with an IC₅₀ of 47.23 ± 0.66 µg/mL, NO radical scavenging activity of 64.33 ± 2.01 µg/mL, ABTS radical scavenging of 47.61 ± 1.31 µg/mL, lipid peroxidation inhibition of 112 ± 1.21 µg/mL and mainly a protective effect against DNA damage induced by H₂O₂ in an alkaline comet assay.

4. CONCLUSION

When using the hydroethanolic extract of the bark of the stem of *B. excelsa* (BEC), in order to investigate its properties for cosmetic application, it was possible to verify that

when we evaluated the enzymes related to the skin, such as collagenase, elastase, hyaluronidase and tyrosinase, the extract did not present significant inhibition for these enzymes. BEB showed inhibitory properties (anti-aging effect) only on the elastase enzyme in ($62.67\% \pm 3.75$) when compared to the sivelestat control (89.04 ± 0.53). EB extract was shown to be active as an antiglycation agent in the oxidative and non-oxidative pathways when the glycation of glyoxal and collagen was evaluated, respectively.

BEB did not significantly interfere with the viability of fibroblasts and keratinocytes within 24 hours. Only in the test concentrations of 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$ (67.87 ± 1.23 ; 65.03 ± 0.55) during the periods of 48 and 72 hours did BEB show average toxicity in fibroblasts when compared to the standard Doxorubin 0.432 (0.372 – 0.501); 0.340 (0.266 – 0.434); however, it did not induce death in more than 50% at these concentrations.

In the cell proliferation assay using the 0.4% trypan blue marker, BEB (12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$) induced exponential cell growth of fibroblasts within 24 hours. BEB (3.125 $\mu\text{g/mL}$) considerably stimulated the proliferation of these cells, presenting delta values (Δ) = 432.5, which is higher than the standard vitamin C at 50 μM , (Δ) = 354.6.

BEB showed an effect on cell migration (cell film) from 48 hours at test concentrations of 25; 12.5; 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$, when compared to vitamin C at 25 μM . At 50 $\mu\text{g/mL}$, this effect was observed only in 72 hours and the highest concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ had no effect on migration at any time. These data were recorded in an area graph (distance in μm) and the cells were photomicrographed.

In the *in vitro* assay of collagen quantification in fibroblast MRC-5, BEB stimulated collagen production at dependent concentrations of 25; 12.5; 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$. Its

best effect was at 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (8.23 ± 2.7), when a superiority of response to the standard vitamin C at 50 μM (4.0 ± 2.3) was observed.

When analyzing the alkaline comet assay, the test concentrations of choice were 100 and 25 $\mu\text{g/mL}$. It was observed that, at the highest concentration (100 $\mu\text{g/mL}$), BEB promoted a higher rate of significant DNA damage, and is considered genotoxic when compared to doxorubicin at 10 $\mu\text{g/mL}$ and, in relation to the frequency of damage (%), type I damage (76.4%) was more prevalent. In this case, the damage presented refers to that of single and double strand; while at the lowest concentration (25 $\mu\text{g/mL}$), no difference in DNA migration was observed.

In general, the extract from the bark of the stem of *Bertholletia excelsa* (BEB) can be considered efficient for cosmetic applications (anti-aging potential), especially in products to control skin aging. Other biological assays may be necessary to verify whether the DNA damage is reversible or not and whether the type of death is by necrosis or apoptosis, so that BEB can be used as a biotechnological product (formulation) with the necessary safety in the cosmetics industry.

5. REFERENCES

Abdelfattah MAO, Dmirieh M, Ben Bakrim W, Mouhtady O, Ghareeb MA, Wink M, Sobeh M. Antioxidante and anti-aging effects of Warburgia salutaris bark aqueous extract: Evidences from in silico, in vitro and in vivo studies. *J. Ethnopharmacol* 2022;292:115187.

Agyare C, Lechtenberg M, Deters A, Petereit F, Hensel A. Ellagitannins from Phyllanthus muellerianus (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine*. 2011;18:617-24.

Ali MY, Zamponi GW, Seong SH, Jung HA, Choi JS. 6-Formyl Umbelliferone, a Furanocoumarin from *Angelica decursiva* L., Inhibits Key Diabetes-Related Enzymes and Advanced Glycation End-Product Formation. *Molecules* 2022;27:5720.

Ardestani A, Yazdanparast R. *Cyperus rotundus* suppresses AGE formation and protein oxidation in a model of fructose-mediated protein glycoxidation. *Int J Biol Macromol* 2007;**41**:572-8.

Bindschadler M. and McGrath JL. "Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics," *J Cell Sci* 2007;**120**:876–84.

Bird G, Haleagrahara N. ScienceDirect Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. *Biomed Pharmacother* 2017;**90**:38–46.

Ceravolo IP, Aguiar AC, Adebayo JO, Krettli AU. Studies on Activities and Chemical Characterization of Medicinal Plants in Search for New Antimalarials: A Ten Year Review on Ethnopharmacology. *Front Pharmacol* 2021;**12**:734263.

Costa R, Santos L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technol* 2017;**322**:402–16.

Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, Joe CE, Lim TY Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem* 2008;**109**:477–83.

Dabrowska M, Mielcarek A, Nowak I. Evaluation of sex-related changes in skin topography and structure using innovative skin testing equipment. *Skin Res Technol* 2018;**24**:614–20.

Da Silva BJM, Hage AAP, Silva EO, Rodrigues APD. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. *J Integr Med* 2018;**16**:211-222.

De Vargas FS, Almeida PD, de Boleti AP, Pereira MM, de Souza TP, de Vasconcellos MC, Nunez CV, Pohlit AM, Lima ES. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complement Altern Med* 2016;**16**:83.

Dreno B, Araviiskaia E, Berardesca E, The science of dermocosmetics and its role in dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;**28**:1409–17.

Ferreira MS, Magalhães MC, Oliveira R, Sousa-Lobo JM, Almeida IF. Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics. *Molecules* 2021;**26**:1–18.

Figat R, Śliwińska , Stochmal A, Soluch A, Sobczak M, Zgadzaj A, Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A. Antigenotoxic, anti-photogenotoxic, and antioxidant properties of polyscias filicifolia shoots cultivated in vitro. *Molecules* 2020;**25**:1–18.

Figueiredo CCM, Gomes AC, Granero FO, Bronzel Junior JL, Silva LP, Ruiz ALTG, da Silva RMG. Antiglycation and antitumoral activity of *Tribulus terrestris* dry extract. *Avicenna J Phytomed* 2021;**11**:224-37.

Freshney, R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. P. 117, Allan R. Liss, Inc., New York. 1987.

Freitas L, Valli M, Dametto AC, Pennacchi PC, Andricopulo AD, Maria-Engler SS, Bolzani VS. Advanced Glycation End Product Inhibition by Alkaloids from *Ocotea paranapiacabensis* for the Prevention of Skin Aging. *J Nat Prod* 2020;**27**:649-56.

Geertsma IP, Françoço M, van Andel T, Rodríguez MA. What's in a name? Revisiting medicinal and religious plants at an Amazonian market. *J Ethnobiol Ethnomed* 2021;**17**:9.

Hanif M, Khan MA, Rafey MR, Zaman A, Aziz I, Amanullah, Amin A. Inhibitive efficacy of *Nymphoides indica* rhizome extract on α -glucosidase, and cross-link formation of advanced glycation end product. *J Tradit Chin Med* 2021;**41**:376-80.

Jayakumar S, Bhilwade HN, Pandey BN, Sandur SK, Chaubey RC. The potential value of the neutral comet assay and the expression of genes associated with DNA damage in assessing the radiosensitivity of tumor cells. *Mut Res* 2012;**748**:52–9.

Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan Stimulates Gengival Fibroblast Proliferation; Expressões de fator de crescimento de queratinócitos-1, fator de crescimento endotelial vascular e colágeno tipo I; e Cicatrização de Feridas. *J Pharmacol Sci* 2009;**109**:525-31.

Kim MS, Lee SR, Ho HS, Kim DH, Chang S, Chung JH. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clin Chim Acta* 2005;**362**:161–69.

Kumari S, Elancheran R, Devi R. Phytochemical screening, antioxidant, antityrosinase, and antigenotoxic potential of *Amaranthus viridis* extract. *Indian J Pharmacol* 2018;**50**:130-38.

Marchesan ED, Ferronato R, Bednarski F, Alencar SM, Onofre SB. Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*, 2006;**10**:63-6.

Misu M, Ouji Y, Kawai N, Nishimura F, Uchiyama FN, Yoshikawa M. Effects of Wnt-10b on proliferation and differentiation of murine melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;**463**:618–23.

Mhlongo F, Cordero-Maldonado ML, Crawford AD, Katerere D, Sandasi M, Hattingh AC, Koekemoer TC, Van de Venter M, Viljoen AM. Evaluation of the wound healing

properties of South African medicinal plants using zebrafish and in vitro bioassays. *J Ethnopharmacol.* 2022;**286**:114867.

Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *J Ethnopharmacol* 2017;**196**:94-103.

Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. A Modified Colorimetric Method For The Estimation of N-Acetylamino. *J Biol Chem* 1955;**217**:959-66.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter, K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 2015;**5**:545–89.

Pavlović MO, Kolarević S, Đorđević J, Marić JJ, Lunić T, Mandić M, Kolarević MK, Živković J, Aradski AA, Marin PD, Šavikin K, Vuković-Gačić B, Nedeljković BB, Duletić-Laušević S. A study of phytochemistry, genoprotective activity, and antitumor effects of extracts of the selected lamiaceae species. *Plants* 2021;**10**:1–23.

Peres, CM, Curi R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2020;**2020**:3818196.

Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharm Biol* 2016;**54**:1865-72.

Sarquis RDSFR, Rodrigues Sarquis Í, Rodrigues Sarquis I, Fernandes CP, Araújo da Silva G, Borja Lima E Silva R, Gonçalves Jardim MA, Sánchez-Ortíz BL, Carvalho JCT. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019.

Siriwattanasatorn M, Itharat A, Thongdeeying P, Oraikul B. In Vitro Wound Healing Activities of Three Most Commonly Used Thai Medicinal Plants and Their Three Markers. *Evid Alternat Med* 2020;**2020**:6795383.

Sponchiado G, Adam ML, Silva CD, Silva Soley B, De Mello-Sampayo C, Cabrini DA, Correr CJ, Otuki MF. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Ethnopharmacol* 2016;**178**:289–96.

Takahashi M, Asikin Y, Takara K, Wada K. Screening of medicinal and edible plants in Okinawa, Japan, for enhanced proliferative and collagen synthesis activities in NB1RGB human skin fibroblast cells. *Biosci, Biotechnol Biochem* 2012;**76**:2317–20.

Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Menichini F. Potential role of natural compounds against skin aging. *Curr Med Chem* 2015;**22**:1515–38.

Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complem Altern M* 2009;**9**:1–11.

Ueda M. Alkali Comet Assay in Genotoxicity Tests. *Methods Mol Biol* 2020;**2119**:73-78.

Van Wart HE, Steinbrink DR. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal Biochem* 1981;**113**:356-65.

Vásquez-Ocmín PG, Gadea A, Cojean S, Marti G, Pomel S, Van Baelen AC, Ruiz-Vásquez L, Ruiz Mesia W, Figadère B, Ruiz Mesia L, Maciuk A. Metabolomic approach of the antiprotozoal activity of medicinal Piper species used in Peruvian Amazon. *J Ethnopharmacol* 2021;**10**:264-113262.

Watson REB, Ogden S, Cotterell LF, Bowden JJ, Bastilles JY, Longo SP, Griffiths CEM. Effects of a cosmetic “anti-ageing” product improves photoaged skin (corrected). *Br J Dermatol* 2009;**161**:419–26.

Ziemlewska A, Zagórska-Dziok M, Nizioł-Łukaszewska Z. Assessment of cytotoxicity and antioxidant properties of berry leaves as by-products with potential application in cosmetic and pharmaceutical products. *Sci Rep* 2021;**11**:1–14.

Zofia NL, Martyna ZD, Aleksandra Z, Tomasz B. Comparison of the Antiaging and Protective Properties of Plants from the Apiaceae Family. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:5307614.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Existem propriedades anti-inflamatória, antioxidativa e aplicações cosméticas nas cascas do caule de *Bertholletia excelsa*, castanha-do-brasil. Os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroetanólico das cascas do caule da planta apresentaram resultados de maneira concentração-dependente os quais:

- Constatou-se que esse extrato apresenta doze fitocomponentes, quanto à caracterização química, onde os derivados elagitaninos e ácido gálico foram os componentes majoritários;
- Nos ensaios de DPPH•, ABTS•⁺, XO• e ânion superóxido BEC apresentou capacidade antioxidante significativa;
- BEC promoveu citoproteção em macrófagos murino (J774) com a diminuição das espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Inibiu a concentração de óxido nítrico em macrófagos estimulado por Lipopolissacarídeo (LPS);
- *In vivo* o extrato impediu a migração de leucócitos do (tipo neutrófilos) para a cavidade peritoneal de camundongos em ensaio da peritonite induzido por LPS;
- Não apresentou toxicidade em nematódeo *Caenorhabditis elegans*;
- BEC aumentou a expressão de genes antioxidantes principalmente HMOX-1 seguido pela inibição da síntese do NO• induzível;
- Em relação as enzimas da matriz extracelular da pele (colagenase, elastase, hialuronidase e tirosinase), o extrato a 100 µg/mL foi eficaz em inibir a elastase - efeito anti-elastase em (62,67% ± 3,75) quando comparado ao padrão Sivelestat (89,04% ± 0,53);
- BEC inibiu os produtos de glicação avançada (AGES) pelas vias oxidativa com valores de inibição (91,21% ± 0,29) e CI_{50%} (12,4 ± 0,41µg/mL), quando comparado ao controle

quercetina com valores de $(84,95\% \pm 0,25)$ e $CI_{50\%}$ $(35,56 \pm 0,85 \mu\text{g/mL})$, e via não oxidativa com $(86,5\% \pm 1,88)$ de inibição e $CI_{50\%}$ $(4,45 \pm 0,21 \mu\text{g/mL})$, enquanto que o padrão Aminoguanidina desta via obteve valor de inibição $(77,43\% \pm 2,1)$ e $CI_{50\%}$ $(28,6 \pm 1,35 \mu\text{g/mL})$;

- Quanto a proliferação celular, no ensaio do Azul de Tripán, BEC a $(12,5; 6,25 \text{ e } 3,125 \mu\text{g/mL})$, estimulou a proliferação de fibroblastos em 24, 48 e 72 horas de tratamento, avaliado através do crescimento exponencial das células, sendo que a menor concentração $(3,125 \mu\text{g/mL})$ apresentou valores superiores ao padrão;

- Em 48 horas de tratamento, o extrato foi capaz de induzir o atapetamento celular (filme celular) no teste de arranhadura em monocamada de célula;

- O extrato de *B. excelsa* promoveu a produção de colágeno em cultura de fibroblastos;

- O extrato de *B. excelsa* não apresentou toxicidade em fibroblastos (MRC-5) e queratinócitos (HACAT) em 24 horas de tratamento, após esse período o extrato apresentou média toxicidade em fibroblasto somente em $100 \mu\text{g/mL}$;

- O extrato de *B. excelsa* não foi genotóxico quando avaliado a menor concentração $25 \mu\text{g/mL}$ do experimento.

- O extrato das cascas de *B. excelsa* pode ser um aliado a saúde como um novo bioproduto na terapêutica das aplicações estudadas, como um relevante potencial biotecnológico para a Região Amazônica.

6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

- Cardoso, B. R., Duarte, G. B. S., Reis, B. Z., & Cozzolino, S. M. F. (2017). Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food Research International*, *100*(August), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.036>
- Drasar, P. B., & Khripach, V. A. (2020). Growing importance of natural products research. *Molecules*, *25*(1), 14–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25010006>
- Ekiert, H. M., & Szopa, A. (2022). Biological Activities of Natural Products II. *Molecules*, *27*(5). <https://doi.org/10.3390/molecules27051519>
- Gasparini, C., Celeghini, C., Monasta, L., & Zauli, G. (2014). NF- κ B pathways in hematological malignancies. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *71*(11), 2083–2102. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1545-4>
- John, J. A., & Shahidi, F. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of Functional Foods*, *2*(3), 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>
- Oliveira, A. Fitoterapia como alternativa de saúde pública. In: Oliveira, A.; Nishi, N. (Orgs.). *Ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável*. Macapá, 2001. p.43-80
- Silva, LE. M. C., de Melo, M. L. P., Reis, F. V. F., Monteiro, M. C., Dos Santos, S. M., Gomes, B. A. Q., & da Silva, L. H. M. (2020). Comparison of the effects of Brazil nut oil

and soybean oil on the cardiometabolic parameters of patients with metabolic syndrome: A randomized trial. *Nutrients*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12010046>


Sharmeen, J. B., Mahomoodally, F. M., Zengin, G., & Maggi, F. (2021). Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*, *26*(3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>

Shepard, G. H., & Ramirez, H. (2011). “Made in Brazil”: Human Dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia. *Economic Botany*, *65*(1), 44–65. <https://doi.org/10.1007/s12231-011-9151-6>

ANEXOS

Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e da Conhecimento Tradicional Associado

1. Comprovante de Cadastro de Acesso ao Patrimônio Genético – Cadastro nº A589ED6

	
Ministério do Meio Ambiente	
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO	
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO	
Comprovante de Cadastro de Acesso	
Cadastro nº A589ED6	
A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.	
Número do cadastro:	A589ED6
Usuário:	Universidade Federal do Amazonas
CPF/CNPJ:	04.378.626/0001-97
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa
Espécie	
Bertholletia excelsa	
Título da Atividade:	Estudo Fitoquímico e Atividade biológica de Resíduos do Extrativismo da Castanha da Amazônia
Equipe	
ANDERSON CAVALCANTE GUIMARÃES	Universidade Federal do Amazonas
Elsângela Serrão Gonçalves	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Abrames Francisco Ferrerira Goes	Universidade Federal do Amazonas
EMERSON SILVA LIMA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Renata Takeara	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Odínéia do Socorro Pamplona Freitas	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Vadir Florêncio da Veiga Junior	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Felipe Moura Araújo da Silva	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO AMAZONAS

Márcia de Jesus Amazonas da Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Jheiffson Clemente Souza

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: Anais de Congresso, relatórios científicos e art

Data do Cadastro: 09/11/2022 18:02:57

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 18:03 de 09/11/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SINGEN

2. Certificado do Comitê de Ética e Uso dos Animais Cadastro nº 048/2019



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais
CIAEP N. 01.0321.2014, Publicado D.O.U em 21/10/2014



CERTIFICADO

Certificamos que a "Avaliação da atividade anti-inflamatória de xantenos", sob a responsabilidade da pesquisadora **Márcia de Jesus Amazonas da Silva** (Discente/PPGIE/UFAM) e orientação do pesquisador **Emerson Silva Lima** (docente/UFAM) – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exeto humanos), para fins de ensino, disciplina FSG089 - Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (FM) – encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Após solicitação, a mesma foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, sob o N. **048/2019**.

Firralidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De julho/2019 à julho/2020
Espécie/inhagem/raça	Camundongo / Swiss Alvano
N. de animais	120
Peso/idade	28 – 32g / 35 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFAM

Mantus, 19 de setembro de 2019.

Profª. Dra. Cathya Laniê Fritiz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM

APENDICE I – Mini Currículo**MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA**

Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Especialista Clínica pela Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Bacharel em Farmácia pelo Centro Universitário do Norte - UNINORTE. Trabalhou como bolsista PRONAMETRO/INMETRO com o projeto "Implantação de um Laboratório de Bioprospecção e Avaliação de Segurança Toxicológica por Métodos Alternativos ao Uso dos Animais de Produtos Oriundos da Biodiversidade Amazônica no Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA. Em diferentes Projetos de Pesquisa como Atividade Anti-inflamatória de Novos derivados Sintéticos da Classe dos Nitroestirenos, Efeitos de Bioativos Isolados de Plantas da Amazônia sobre o Processo Inflamatório Mediado por Macrófagos e Adipócitos; Perfil anti-inflamatório, antioxidante, aplicação cosmética das cascas do caule de *Bertholletia excelsa*. Tem experiência com ensaios de viabilidade celular em linhagens normais e tumorais in vitro e in vivo, ensaios de inibição de macrófagos e quantificação de óxido nítrico em amostras com possíveis potenciais anti-inflamatórios, ensaios de atividade antitumoral, antiproliferativa, angiogênese, atividade antioxidante e anti-inflamatória. Possui experiência na organização e manutenção do laboratório de cultura celular, padronização de técnicas e manutenção do banco de células do laboratório de cultura celular. Tem experiência em Docência nos Cursos Técnicos e de Especialização do Centro de Educação Tecnologia do Amazonas CETAM.

Produção bibliográfica do período do doutoramento**Artigos completos publicados em periódicos**

1. DE AGUIAR, PAULA AMÂNCIO; **DA SILVA, MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS**; XIMENES, JULIANA DE ARAÚJO; PAES, ELLEN REGINA DA COSTA; LIMA, EMERSON SILVA

Avaliação preliminar do potencial antioxidante e anti-inflamatório da Amêndoa do Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) / Preliminary evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory potential of the Tucuma Kernel (*Astrocaryum aculeatum*). Brazilian Journal of Health Review. , v.5, p.12482 - 12490, 2022.

2. LIMA, EMERSON; **DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, MARCIA**; MENDONÇA KLUCZKOVSKI, ARIANE

Características botânicas, importância socioeconômica e usos em saúde da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*): uma revisão. CONJECTURAS. , v.22, p.574 - 590, 2022.

3. LINS, MARCIA; GUIMARÃES, VICTOR MACHADO DE MELO; CASAROTO, ANA REGINA; **DA SILVA, MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS**; VASCONCELLOS,

MARNE DE CARVALHO; LIMA, EMERSON SILVA; DE MELO, LUCIANA ALEIXO DOS SANTOS; BANDEIRA, MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA; CONDE, NIKEILA CHACON DE OLIVEIRA; TODA, CARINA

Cytotoxicity and potential anti-inflammatory activity of *Libidibia ferrea* L. extract on RAW264.7 macrophages. *CONJECTURAS.* , v.22, p.242 - 255, 2022.

4. Aryane Maia de Castro; **Márcia de Jesus Amazonas da Silva**; Emerson Silva Lima; Fernanda Guilhon-Simplicio. Gel antiacne com frutos amazônicos. *Scientia Amazonia.* , v.11, p.CS92 - CS108, 2022.

5. COSTA, MARIA BEATRIZ SILVA; SIMÕES, REJANE DE CASTRO; **SILVA, MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA**; OLIVEIRA, ANDRÉ CORREA DE; ACHO, LEONARD DOMINGO ROSALES; LIMA, EMERSON SILVA; TADEI, WANDERLI PEDRO; TELES, HELDER LOPES; OLIVEIRA, CAMILA MARTINS . Oxidative stress induction by crude extract of *Xylaria* sp. triggers lethality in the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* , v.55, p.1 - 6, 2022.

6. Douglas Emanuel Mota de Souza; Nádia Cristina Falcão Bücke; Márcia de Jesus Amazonas da Silva; Emerson Lima; Fernanda Guilhon-Simplicio; **AMAZONAS DA SILVA, MÁRCIA DE JESUS**. Pimentas Amazônicas como Novos Ingredientes contra Alopecia Androgênica Masculina. *Scientia Amazonia.* , v.11, p.CS109 - CS118, 2022.

7. OLIVEIRA, LUANA CARVALHO DE; MENEZES, DANIELLE LIMA BEZERRA DE; SILVA, VALÉRIA COSTA DA; LOURENÇO, ESTELA MARIANA GUIMARÃES; MIRANDA, PAULO HENRIQUE SANTANA; **SILVA, MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA**; LIMA, EMERSON SILVA; JÚNIOR, VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA; MARRETO, RICARDO NEVES; CONVERTI, ATTILIO; BARBOSA, EUZÉBIO GUIMARAES; LIMA, ÁDLEY ANTONINI NEVES DE
In Silico Study, Physicochemical, and In Vitro Lipase Inhibitory Activity of β -Amyrenone Inclusion Complexes with Cyclodextrins. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES.* , v.22, p.9882 - 21, 2021.

8. HEIMFARTH, LUANA; NASCIMENTO, LEANDRO DA SILVA; **AMAZONAS DA SILVA, MÁRCIA DE JESUS**; LUCCA JUNIOR, WALDECY DE; LIMA, EMERSON SILVA; QUINTANS-JUNIOR, LUCINDO JOSÉ; VEIGA-JUNIOR, VALDIR FLORÊNCIO DA

Neuroprotective and anti-inflammatory effect of pectolinarigenin, a flavonoid from Amazonian *Aegiphila integrifolia* (Jacq.), against lipopolysaccharide-induced inflammation in astrocytes via NF- κ B and MAPK pathways. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY.* , v.157, p.112538 - 11, 2021.

9. CRUZ, KÁTIA SANTANA; LIMA, EMERSON SILVA; **SILVA, MARCIA DE JESUS AMAZONAS DA**; SOUZA, ERICA SIMPLÍCIO DE; MONTOIA, ANDREIA; POHLIT, ADRIAN MARTIN; SOUZA, JOÃO VICENTE BRAGA DE

Screening and Antifungal Activity of a *β*-Carboline Derivative against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *International Journal of Microbiology*. , v.2019, p.1 - 8, 2019.

10. BORGES, RAPHAELLE SOUSA; KEITA, HADY; ORTIZ, BRENDA LORENA SÁNCHEZ; DOS SANTOS SAMPAIO, TAFNIS INGRET; FERREIRA, IRLON MACIEL; LIMA, EMERSON SILVA; **DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, MÁRCIA**; FERNANDES, CAIO PINHO; DE FARIA MOTA OLIVEIRA, ANNA ELIZA MACIEL; DA CONCEIÇÃO, EDEMILSON CARDOSO; RODRIGUES, ALEX BRUNO LOBATO; FILHO, ARLINDO CÉSAR MATIAS PEREIRA; CASTRO, ANDRÉS NAVARRETE; CARVALHO, JOSÉ CARLOS TAVARES

Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. *INFLAMMOPHARMACOLOGY*. , v.122, p.1 - 24, 2018.

11. Ariadna Lafourcade Prada; Hady Keita; Tatiane Pereira de Souza; Emerson Silva Lima; Leonard Domingo Rosales Acho; José Carlos Tavares Carvalho; Jesus Rafael Rodriguez Amado; **DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, MÁRCIA**. Cassia grandis Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitor effect. *SAUDI PHARMACEUTICAL JOURNAL*. , v.1, p.1 - 9, 2018.

12. SUGIMOTO, MICHELLE; **DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, MÁRCIA**; FROEDE BRITO, LARISSA; DOS SANTOS BORGES, ROSIVALDO; AMARAL, FLÁVIO; DE ARAUJO BOLETI, ANA; ORDOÑEZ, MARITZA; CARLOS TAVARES, JOSE; PIRES SOUSA, LIRLANDIA; LIMA, EMERSON. Anti-Inflammatory Potential of 1-Nitro-2-Phenylethylene. *MOLECULES*. , v.22, p.1977 - 1989, 2017.