

ANDERSON BARBOSA BAPTISTA

**EXTRATO DE FOLHAS DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.) E DE  
CAJUÍ (*Anacardium microcarpum* D.): PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA, *IN VITRO* E *IN VIVO***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

B222e  
2018

Baptista, Anderson Barbosa, 1978-  
Extrato de folhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) e de  
cajuí (*Anacardium microcarpum* D.): prospecção fitoquímica,  
atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, *in*  
*vitro* e *in vivo* / Anderson Barbosa Baptista. – Viçosa, MG, 2018.  
xvii, 81 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. *Anacardium occidentale*. 3.  
*Anacardium microcarpum*. 4. Stresse oxidativo.  
5. Histopatologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação  
em Ciência da Nutrição. II. Título.

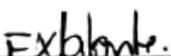
CDD 22. ed. 615.321

ANDERSON BARBOSA BAPTISTA

**EXTRATO DE FOLHAS DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.) E DE CAJUÍ (*Anacardium microcarpum* D.): PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA, *IN VITRO* E *IN VIVO***

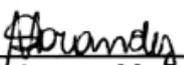
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, comoparte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

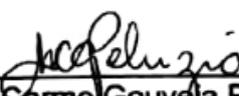
APROVADA:12 de junho de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Flávia Xavier Valente

  
\_\_\_\_\_  
Guilherme Nobre L. do Nascimento  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Hércia Stampini Duarte Martino

  
\_\_\_\_\_  
Mariaurea M. Sarandy Souza

  
\_\_\_\_\_  
Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a meus filhos Gabriel e Mariah, a minha esposa Aline Monique, a minha mãe Maria Madalena e meu pai Wanderley. Não somos nada se não temos uma grande família.

O AMOR É O PRINCIPAL INGREDIENTE DESTA FAMÍLIA.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pai supremo, que me permitiu todo o aprendizado e ao Mestre Jesus.

À Capes pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa pelo acolhimento e desenvolvimento das minhas atividades.

À Universidade Federal do Tocantins pela criação do Dinter, apoio e confiança.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio pelos ensinamentos, acolhida, convivência e por me aceitar como orientado.

Aos meus coorientadores Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento, Dr. João Paulo Viana Leite e Dra. Reggiani Vilela Gonçalves, pelo apoio e ensinamentos.

Aos laboratórios e funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde: Laboratório de Análise de Alimentos - Ricardo; Laboratório de Análises Clínicas – Solange e a Professora Josefina; Laboratório de Nutrição Experimental – Profa. Hércia. No Departamento de Tecnologia de Alimentos: Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos- Doutorando Jeferson. Na Divisão de Saúde: Laboratório de Análises Clínicas.

Aos colegas do Labin Bruna, Luis Fernando, Letícia, Lisiane, Kelly e Milena pela amizade, carinho e colaboração.

À Bioclin pela doação dos kits de análises clínicas.

Em especial a minha esposa Aline e meus filhos Gabriel e Mariah que me acompanharam em todo o processo e me deram muito carinho, amor e apoio que seria impossível a realização sem eles.

A meus pais Madalena e Wanderley que acreditaram em meu esforço e dedicação e sempre me deram muito amor.

Aos colegas do DINTER.

Aos amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado.

**MEU MUITO OBRIGADO!**

## **BIOGRAFIA**

Anderson Barbosa Baptista, nascido em 29 de julho de 1978 na cidade de São Paulo, filho de Wanderley Baptista e Maria Madalena Barbosa Baptista, casado com Aline Monique G.S. Baptista. É graduado em Biomedicina pela Universidade de Franca-São Paulo, concluindo em 2003. Possui Mestrado em Microbiologia pela UNESP de Jaboticabal, concluindo em 2005. Foi professor de língua espanhola por treze anos em escolas de Ituverava-São Paulo e região. Foi Biomédico Supervisor de Estágio na UNIUBE, em Uberaba-MG, no curso de Biomedicina onde permaneceu por um ano. Em 2007 foi professor nas Universidades Atenas, Tecsona e Finom em Paracatu-MG. Na Faculdade Tecsona foi o fundador e coordenador do curso de Biomedicina. Em 2009 foi aprovado para a Universidade Federal do Pará no curso de Biologia, em Altamira, cumprindo atividades acadêmicas por 3 anos e meio. Em 2013 foi redistribuído para a Universidade Federal do Tocantins no curso de Medicina, na qual se encontra até o momento.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS .....	4
3. OBJETIVOS .....	7
3.1 OBJETIVO GERAL.....	7
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. ARTIGO DE REVISÃO .....	8
Abstract .....	8
1.Introduction.....	9
2.Methodology .....	12
3.Results and discussion .....	13
4.Limitations .....	23
5.Conclusion.....	23
References .....	24
ARTIGO 2. Caracterização fitoquímica e análise das atividades antimicrobiana e antioxidante de folhas de <i>Anacardium occidentale</i> L e <i>Anacardium microcarpum</i> D, <i>in vitro</i> .....	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT .....	32
6.1 INTRODUÇÃO.....	32
6.2 MATERIAL E MÉTODO.....	34
6.2.1 COLETA DA AMOSTRA.....	34
6.2.2 EXTRAÇÃO.....	35
6.2.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATERIA SECA DE FOLHAS E DO EXTRATO ETANÓLICO SECO.....	35
6.2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	36
6.2.5 FENÓLICOS TOTAIS .....	36
6.2.6 DOSAGEM DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	37
6.2.7 ANÁLISE DO ÁCIDO ANARCÁDICO POR HPLC.....	38
6.2.8 DPPH.....	38
6.2.9 ABTS .....	38
6.2.10 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	39
6.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
6.4 RESULTADOS .....	41
6.4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	41
6.4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	42

6.4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS	42
6.4.3 ANÁLISE DO ÁCIDO ANARCÁDICO POR HPLC	43
6.4.4 CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA	43
6.4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	44
6.5 DISCUSSÃO	45
6.6 CONCLUSÕES	50
6.7 REFERÊNCIAS	50
7. ARTIGO 3. Atividade antioxidante, análises bioquímicas e histopatológica de folhas de <i>A. occidentale</i> L e <i>A. microcarpum</i> Dem camundongos <i>knockout</i> para interleucina 10.	56
RESUMO	56
ABSTRACT	57
7.1 INTRODUÇÃO	58
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	59
7.2.1 MATERIAL VEGETAL	59
7.2.1 ENSAIO COM ANIMAIS EXPERIMENTAIS	59
7.2.1.1 ESTRESSE OXIDATIVO -Malondialdeído (MDA); Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutaciona peroxidase; Proteína carbonilada.	61
7.2.1.2 ANÁLISE HEMATOLÓGICA – CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	62
7.2.1.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	62
7.2.1.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	63
7.3 ESTATÍSTICA	63
7.4 RESULTADOS	63
7.4.1 ESTRESSE OXIDATIVO	63
7.4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	65
7.4.3 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	66
7.4.4 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	67
7.5 DISCUSSÃO	68
7.6 CONCLUSÃO	74
8. REFERÊNCIAS	75
9. CONCLUSÕES GERAIS	78
10. ANEXOS	79
10.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS	79
10.2 PARECER ÉTICO NO USO DE ANIMAIS	81

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Foto referente ao <i>A. occidentale</i> L no campus da UFT de Palmas. Fotografada pelo autor.....	35
Figura 2. Rotoevaporação e separação dos extratos etanólicos no Lacibs, UFT campus de Palmas. Fotos ilustrativas. Fotografadas pelo autor.....	35
Figura 3. Desenho experimental do ensaio microbiológico em microplaca de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima de <i>A. occidentale</i> L e <i>A. microcarpum</i> D em cepas multirresistentes.....	41
Figura 4. Representação da revelação da cromatografia de camada delgada de flavonóides. Padrão (P) de flavonóides, (1) extrato de <i>A. occidentale</i> L, (2) extrato de <i>A. microcarpum</i> D. 3 - Revelação dos extratos observada em U.V. 254 nm com tons amarelo e verde, após aspersão com $AlCl_3$ .....	42
Figura 5. Cromatograma obtidos por HPLC do padrão de ácido anacárdico, retenção na seta, (a) e dos extratos etanólicos de folhas de <i>A. occidentale</i> (b) e <i>A. microcarpum</i> (c). .....	43
Figura 6. Desenho esquemático dos resultados do extrato de <i>A. microcarpum</i> das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> , com revelador risazurina sódica. Poços em cor rosa presença de células bacterianas viáveis e poços azuis negativos. Poço 1 controle positivo, poço 2 maior concentração de extrato e poço 10 controle negativo (com antimicrobiano). .....	45
Figura 7. Seis grupos experimentais de camundongos <i>knockout</i> IL 10, G1 controle negativo, G2 sem injúria, gavagem de extrato de <i>A. occidentale</i> , G3 sem injúria, gavagem de extrato de <i>A. microcarpum</i> , G4 indução através do paracetamol, G5 após injúria, tratamento com extrato de <i>A. occidentale</i> e G6 após injúria, tratamento com <i>A. microcarpum</i> .....	60
Figura 8. Resultado do ensaio de TBARS em macerado de fígado de seis grupos de camundongos <i>knockout</i> IL-10. Grupos com $p < 0,05$ , diminuição enzimática significativa entre os grupos tratados. Teste estatístico ANOVA one way e Tukey.....	64
Figura 9. Resultado da avaliação da atividade de duas enzimas e metabólito do estresse oxidativo (A – SOD; B – CAT) em macerado de fígado de	

camundongos <i>knockout</i> IL-10. (*/** diferenças significativa entre os grupos, $p < 0,05$ . Teste estatístico ANOVA one way e Tukey. ....	64
Figura 10. Resultado da avaliação da glutathiona peroxidase em seis grupos de camundongos <i>knockout</i> IL-10. * $P < 0,05$ aumento enzimático significativo no grupo tratado. Teste estatístico ANOVA one way e Tukey. ....	65
Figura 11. Resultado do ensaio de proteína carbonilada de 6 grupos de camundongos <i>knockout</i> IL 10 (* $p < 0,05$ , redução significativa nos grupos tratados em relação paracetamol. Teste estatístico ANOVA one way e Tukey. ....	65
Figura 12. Valor absoluto de monócitos encontrada em seis grupos de camundongos <i>knockout</i> IL-10(* /** grupos com $p < 0,05$ , redução significativa entre os grupos sem injúria e com injúria. Teste estatístico ANOVA One way e Tukey. ....	67
Figura 13. Microfotografia óptica de fígado de camundongos <i>Knockout</i> IL-10 submetidos à injúria por paracetamol (A, B e C), aumento de 40x, corados em hematoxilina e eosina. Setas: 1- infiltrado inflamatório; 2- Aumento nuclear; 3- congestão do sinusóide; 4 – Colestase; 5- Depósito de gordura (esteatose);6- Vacuolização do citoplasma. ....	68
Tabela 1. Determinação da composição centesimal da matéria seca (média e desvio padrão) das folhas e do extrato etanólico seco de <i>A. occidentale</i> e <i>A. microcarpum</i> . ....	41
Tabela 2. Prospecção fitoquímica utilizando cromatografia de camada delgada dos extratos brutos de folhas de <i>A. occidentale</i> L e <i>A. microcarpum</i> D. ....	42
Tabela 3. Média e desvio padrão de DPPH e ABTS encontrados para os extratos de folhas de caju e de cajuí expressos em $\mu\text{mol}$ de trolox/ mg de extrato. ....	44
Tabela 4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL de cepas bacterianas multirresistentes, através da concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC, utilizando extratos etanólicos de folhas de <i>A. occidentale</i> e <i>A. microcarpum</i> . ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ALT	alanino aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
CAT	catalase
CEUA-UFT	comitê de ética de uso animais – Universidade federal do Tocantins
CIM	concentração inibitória minima
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	equivalente de ácido gálico
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ER	equivalente de rutina
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
FRAP	poder antioxidante de redução do ferro
GGT	gama glutamil transferase
GPX	glutathiona peroxidase
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IL-10	interleucina - 10
MDA	malondialdeído
ORAC	capacidade oxidante reagente do oxigênio
PNPIC	política nacional de práticas integrativas e complementares
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SOD	superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TAC	capacidade antioxidante total
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPC	conteúdo fenólico total

## RESUMO

BAPTISTA, Anderson Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2018. **Extrato de folhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) e de cajuí (*Anacardium microcarpum* D.): prospecção fitoquímica, atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, *in vitro* e *in vivo*.** Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Guilherme Nobre Lima do Nascimento, João Paulo Viana Leite e Reggiani Vilela Gonçalves.

O homem sempre buscou nas plantas uma alternativa no tratamento para resolver suas patologias. As plantas medicinais vêm sendo utilizadas para fins terapêuticos e em alguns casos sem conhecer o princípio ativo e a toxicidade destes, o *Anacardium occidentale* L (caju) planta com pseudofruto suculento, é característico da região tropical do Brasil. O *Anacardium microcarpum* D (cajui) presente na região dos cerrados da Amazônia e das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiro. O metabolismo secundário das folhas, cascas e pseudofruto dessas plantas produz compostos fenólicos, com atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Os objetivos deste estudo foi realizar a prospecção fitoquímica, avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, *in vivo* e *in vitro* de extratos das folhas do *Anacardium occidentale* L (caju) e *Anacardium microcarpum* D (cajui). Os resultados estão divididos em três artigos, sendo composto por uma revisão sistemática das ações antimicrobiana e antioxidante do caju (*Anacardium occidentale*), do cajuí (*Anacardium microcarpum*) e do pequi (*Caryocar brasiliense*), dois artigos originais, um com ensaios antioxidante e antimicrobiano *in vitro* e outro com ensaios do controle metabólico, estresse oxidativo e hepatotoxicidade *in vivo*. **Artigo 1.** Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C). A systematic review. Elaborou-se uma revisão sistemática dos trabalhos que apresentassem resultados de ensaios com extratos das partes das espécies vegetais acima mencionadas. Foram analisadas as bases de dados Pubmed/Medline, Biblioteca virtual em Saúde (Lilacs e Scielo) e *Science Direct*. De um total de 425 artigos, 32 foram incluídos, sendo 19 estudos com

*Anacardium occidentale*,<sup>3</sup> com *Anacardium microcarpum* e 10 com *Caryocar brasiliense*. A técnica para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* mais utilizada foi de DPPH e da atividade microbiológica foi a concentração inibitória mínima e difusão em discos. A maioria dos ensaios que foram descritos demonstraram resultados potencialmente positivos às ações antioxidantes e antimicrobianas quando da utilização das espécies estudadas. Os resultados trazem importantes dados e perspectivas para a utilização de produtos naturais que possam contribuir para o tratamento de várias enfermidades, destacando-se principalmente as doenças e agravos não transmissíveis. **Artigo 2.** Caracterização fitoquímica e análise das atividades antimicrobiana e antioxidante de folhas de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* D., *in vitro*. A partir das folhas secas trituradas foram preparados extratos brutos etanólicos de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D. Realizou-se a composição centesimal da matéria seca, para determinar a quantidade de lipídios, proteínas, cinzas, umidade e carboidratos totais. A cromatografia de camada delgada foi a técnica de escolha para a prospecção fitoquímica. Por espectrofotometria e regressão linear foram quantificados os fenólicos e flavonoides totais dos extratos. A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi utilizada para verificar a presença de ácido anacárdico. No ensaio antioxidante utilizaram-se as metodologias de captura de radicais estáveis DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) e a atividade antioxidante por meio da captura do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)-ABTS. Para os testes microbiológicos utilizou-se a concentração inibitória mínima em microplacas de 96 poços a partir de cepas multirresistentes de origem hospitalar. Os extratos etanólicos de *Anacardium occidentale* L e *Anacardium microcarpum* D apresentaram captura de radicais DPPH e ABTS semelhantes e foram encontrados 2,32 e 1,64 mg EAG (equivalentes de ácido gálico) de fenólicos totais e valores de flavonóides totais de 0,34 e 0,29 mg ER (equivalentes de rutina), respectivamente. Na prospecção fitoquímica dos dois extratos foi verificada a presença de flavonoides, taninos, saponinas, óleos essenciais e triterpenos. O *A. microcarpum* D foi o extrato que apresentou a menor concentração inibitória mínima, com valor de 0,78 mg/mL em cepas de *S. aureus*. Os extratos etanólicos das folhas

apresentaram capacidade microbicida e antioxidante *in vitro*, o que sugerem potenciais produtos para elaboração de um fitoterápico.

**Artigo 3.** Atividade antioxidante, análises bioquímicas e histopatológica de folhas de *A. occidentale* L. e *A. microcarpum* D. em camundongos *knockout* para interleucina 10. Para os ensaios foram utilizados camundongos *knockout* para interleucina 10, divididos em seis grupos: controle (G1) apenas água e ração; *Anacardium occidentale* (G2) água, ração e extrato; *Anacardium microcarpum* (G3) água, ração e extrato; paracetamol (G4) indução com paracetamol por oito dias; paracetamol+*Anacardium occidentale* (G5), tratados após injúria; paracetamol+*Anacardium microcarpum* (G6), tratados após injúria. Após serem anestesiados foi coletado o sangue retroorbital para contagem de leucócitos e para análises bioquímicas da alanina aminotransferase (ALT), aspartato transferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FAO), colesterol total e triglicérides. O macerado do fígado foi utilizado para as análises do estresse oxidativo a partir dos ensaios de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona e proteína carbonilada. Foi realizada a histopatologia do fígado, a partir da análise da presença ou ausência de alterações do núcleo; congestão sinusóide; esteatose; infiltrado inflamatório, colestase e vacuolização do citoplasma. A análise do estresse oxidativo em macerado de fígado apresentou melhores resultados nos camundongos tratados com *Anacardium microcarpum* D, na maioria das enzimas. Os camundongos tratados com os dois extratos, sem injúria por paracetamol e tratados com *A. microcarpum* após injúria, apresentaram resultados significativos para SOD e CAT, demonstrando eficiência na eliminação de espécies reativas de oxigênio. Destaca-se também o resultado da proteína carbonilada com redução efetiva nos grupos tratados com os dois extratos após injúria com paracetamol. Na análise histopatológica do fígado os camundongos tratados com os dois extratos apresentaram redução no infiltrado inflamatório e na colestase, demonstrando diminuição no processo inflamatório após a injúria pelo paracetamol. Os resultados confirmam a hipótese de atividade antioxidante das folhas do *Anacardium occidentale* L e do *Anacardium microcarpum* D, o que sugere a utilização das folhas para desenvolver um produto fitoterápico.

## ABSTRACT

BAPTISTA, Anderson Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2018. **Extract of cashew leaves (*Anacardium occidentale* L.) and cashew (*Anacardium microcarpum* D.): phytochemical prospection, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity, *in vitro* and *in vivo*.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Guilherme Nobre Lima do Nascimento, João Paulo Viana Leite and Reggiani Vilela Gonçalves.

Mankind has always sought in plants alternative treatments to pathologies, and the knowledge and use of them, for many traditional communities, may be the only therapeutic option. Medicinal plants have been used for therapeutic purposes, in some cases without so much as the knowledge of their active ingredients and toxicity. On the other hand, there are several known actions performed by plant derivatives, being some: antiviral, antispasmodic, analgesic, antimicrobial, healing, expectorant, relaxing, antiseptic, respiratory, larvicidal, vermifuge and anti-inflammatory action. The increase of multiresistant bacteria stimulates interest in the search for new therapeutic alternatives with antimicrobial power. This has caused an emergence of research in the area, especially from plant resources. The *Anacardium occidentale* L (cashew) plant with a succulent pseudofruit, is characteristic of the tropical region of Brazil, and has pharmacological activities proven by the anti-inflammatory, astringent and antitumoral effects. *Anacardium microcarpum* (cajuí), present in the Cerrado region of the Amazon and in the Northeast, Center-West and Southeast regions of Brazil, presents a small pseudofruit and in its secondary metabolism produces phenolics, compounds with anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities. The aims of this study were to evaluate the antimicrobial activity of leaf extracts of *Anacardium occidentale* (cashew) and *Anacardium microcarpum* (cajuí) against multiresistant bacteria, and its antioxidant actions *in vitro* and in IL-10 knockout mice. The results were divided into three articles, which are composed of a review of the antimicrobial and antioxidant actions of pequi (*Caryocar brasiliense*), cashew (*Anacardium occidentale*) and cajuí (*Anacardium microcarpum*) and two original articles, one with antioxidant and antimicrobial *in vitro* and another with *in vivo*

oxidative stress assays. **Article 1.** Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale L.*), cajú (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense C*). A systematic review. A systematic review of the works that presented results of tests with extracts of the parts of the vegetal species mentioned above was elaborated. The databases Pubmed / Medline, Virtual Health Library (Lilacs and Scielo) and Science Direct were analyzed. Of a total of 425 articles, 32 were included, being 19 studies with *Anacardium occidentale*, 3 with *Anacardium microcarpum* and 10 with *Caryocar brasiliense*. The most used *in vitro* antioxidant capacity evaluation technique was DPPH and the most used microbiological capacity evaluation technique was the minimum inhibitory concentration and disk diffusion. Many articles were not found due to the limitations of the database search. Most of the tests described demonstrated potentially positive results to the antioxidant and antimicrobial actions when using the species studied. The results provide important data and perspectives for the use of natural products that can contribute to the treatment of various diseases, especially non-communicable diseases (NCD). **Article 2.** Phytochemical characterization, antimicrobial and antioxidant activities of *Anacardium occidentale L* and *Anacardium microcarpum* leaves, *in vitro*. Ethanolic extracts of *A. occidentale L* and *A. microcarpum* were prepared from crunched dry leaves for use in the trials. The DPPH and ABTS methodologies were used to evaluate the antioxidant power *in vitro*. Thin-layer chromatography was the technique of choice for phytochemical prospecting and HPLC (high performance liquid chromatography) to verify the presence of anacardic acids. The phenolics and total flavonoids of the extracts were quantified by spectrophotometry and linear regression. For the microbiological tests, the minimum inhibitory concentration in 96 microplates from hospital originated multiresistant strains was used. The ethanolic extracts of *Anacardium occidentale* and *Anacardium microcarpum* showed capture of similar DPPH and ABTS radicals and 2.34 and 1.64 mg GAE (galic acid equivalents) of total phenolics and total flavonoid values of 0.34 and 0, 29 mg RE (routine equivalents), respectively. The phytochemical prospection showed the presence of flavonoids, tannins, saponins, essential oils and triterpenes. The presence of the secondary

flavonoid metabolites and tannins may favor the digestion of nutrients, the organic functioning of the body, activate the antioxidant capacity and modify the synthesis of eicosanoids, with anti-inflammatory response. *A. microcarpum* was the extract with the lowest minimum inhibitory concentration, with a value of 0.78 mg / mL in *S. aureus* strains. The ethanolic extracts of the leaves presented microbicidal and antioxidant capacity in vitro, which leads us to believe that they are potential products for the elaboration of a phytotherapeutic medicine. However, more studies are fundamental to uncover the gaps still existing in the knowledge about these plants. **Article 3.** Antioxidant activity of *Anacardium occidentale* D. and *Anacardium microcarpum* L. leaves in interleukin-10 *knockout* mice. For the tests, interleukin-10 *knockout* mice were used, divided into six groups (control, with injury and treated): control; paracetamol; paracetamol + *Anacardium occidentale*; paracetamol + *Anacardium microcarpum*; *Anacardium occidentale* and *Anacardium microcarpum*. Retroorbital blood was collected for leukocyte count and serum was separated for analysis of the biochemical profile of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (FA), total cholesterol and triglycerides. Liver maceration was used for the analysis of oxidative stress from the malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione and carbonylated protein assays. The histopathological analysis of the liver was performed, observing the changes in the tissue in each group, analyzing the presence or absence of changes in the cytoplasm and nucleus; steatosis; inflammatory infiltrate and cholestasis. Oxidative stress in liver maceration showed better results in mice treated with *Anacardium microcarpum* in most of the enzymes. The result of the carbonylated protein with a value of 33.17 nmol / mg of the paracetamol group and 13.03 nmol/mg was also highlighted. The mice treated with the two extracts, without paracetamol injury and treated with *A. microcarpum* after injury, presented significant results for SOD and CAT, demonstrating efficiency in the elimination of reactive oxygen species. In the histopathological analysis of the liver, the mice treated with the two extracts presented reduction in the inflammatory infiltrate and cholestasis, demonstrating a decrease in the inflammatory process after the injury by

paracetamol. The results confirm the hypothesis of antioxidant activity of the leaves of *Anacardium occidentale* and *Anacardium microcarpum*, which suggests, from more detailed studies, the use of leaves to develop a phytotherapeutic agent.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O homem sempre buscou nas plantas um recurso para sua sobrevivência, levando-o a conhecer técnicas para a prática agrícola e a cura de algumas doenças (LEITE, 2008; BAPTISTA et al., 2018). O conhecimento sobre elas pode ser a única alternativa para muitas comunidades distantes dos atendimentos básicos de saúde (MACIEL et al., 2002; SPAGNUOLO & BALDO, 2009).

A fitoterapia é uma prática antiga, baseada no uso de plantas medicinais ou de suas partes, com a finalidade de curar, prevenir ou aliviar patologias (BETTEGA et al., 2011). A ANVISA na RDC N° 26 define fitoterápico como: “produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal” (BRASIL, 2014).

O desenvolvimento de terapias naturais, complementares e integrativas, no tratamento de várias doenças tem despertado o interesse de pesquisadores, principalmente quanto à sua eficácia em ações microbidas, antioxidante e anti-inflamatória (NASCIMENTO et al., 2007; BAPTISTA et al., 2018).

A investigação de plantas medicinais e seus metabólitos que possam oferecer tratamento alternativo do controle microbiano e contribua na elucidação de substâncias menos tóxicas e eficazes são cada vez mais estudadas (PINHO et al., 2012). Os compostos taninos, por exemplo, encontrados em espécies do *Anacardium* foi analisado por vários pesquisadores pela ação bactericida, utilizando para os ensaios cepas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (FERREIRA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). As plantas constituem uma imensa fonte de compostos capazes de tratar e curar patologias associadas aos microrganismos (ELLER et al., 2015).

Compostos bioativos, como os antioxidantes, são boas alternativas de proteção para o organismo vivo contra os radicais livres, atuando na prevenção e no tratamento de enfermidades (MORAIS et al., 2010). As atividades antioxidantes detectadas em sistemas complexos tais como materiais de origem vegetal, sobre um organismo ou tecido específico ou sobre sistemas biológicos, podem ser causadas por vários tipos de componentes bem como, por efeitos sinérgicos ou interações que ocorrem entre eles (GONÇALVES et al., 2013).

O Brasil vem desenvolvendo pesquisas importantes para o avanço do conhecimento das propriedades medicinais das plantas utilizadas pela população. Existem programas e políticas que estimulam a inserção deste tipo de terapia, o interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), contribuindo e promovendo o uso racional de plantas medicinais (BRASIL, 2015).

Na lista de plantas do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, dentre algumas espécies destaca-se o *Anacardium occidentale* L da família Anacardiaceae (BRASIL, 2009). Planta superior rica em compostos fenólicos, usada na medicina popular na região oeste africana e no Brasil. Todas as partes são utilizadas na medicina popular. Na Amazônia brasileira tribos utilizam as cascas e folhas para tratar diarreia. Chá de cascas e folhas são utilizados para tratar diabetes mellitus, infecções de pele, inflamações, entre outros usos (TAYLOR, 2005). Esses efeitos foram associados, principalmente, à presença de compostos fenólicos (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2007; KUBO et al., 2011).

Outra espécie importante é o *Anacardium microcarpum* D, conhecido como cajuí, uma planta nativa do Brasil, especialmente da região nordeste. O pseudofruto possui um bom conteúdo de vitamina C, polifenólicos e minerais. Diferencia-se morfológicamente do *Anacardium occidentale* L por possuir fruto e hipocarpos de tamanhos diminutos, flores pequenas e perfumadas (BARBOSA-FILHO et al., 2015). Os compostos fenólicos como flavonoides, taninos e o ácido anacárdico, encontrados nas espécies de

*Anacardium*, possuem propriedades biológicas antitumoral, na prevenção de doenças cardiovasculares, anti-inflamatória e antimicrobiana (AGOSTINI-COSTA et al., 2004).

## 2. REFERÊNCIAS

Agostini-Costa, T.S., et al. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. nanum disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p.1075-1080, jul-ago, 2004.

Baptista, A.B., et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C). A systematic review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, Article ID 3753562, p. 1-13, 2018.

Barbosa-Filho. V.M. Avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano de *Anacardium microcarpum* e sua toxicidade em diferentes modelos biológicos *in vitro*, 2015. **Tese de Doutorado**. UFSM. Santa Maria-RS.

Bettega, P.V.C., et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89-97, Jan./Apr, 2011.

Brasil, 2009. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf). Acesso em: 01/04/2018.

Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf). Acesso em: 24/04/2018.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**, 2ª ed.-Brasilia, editora MS-OS, pp. 48-56, 2015.

Castillo-Juárez I., et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, n.114(1), p. 72-77, 2007.

- Eller, S.C.W.S., et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 36, n.1, p.131-136, 2015.
- Ferreira, P.R.B. et al. Antibacterial activity tannin-rich fraction from leaves of *Anacardium humile*. **Ciencia Rural**, v.42, p.1862-1863, 2012.
- Gonçalves, R.M., et al. Comparing Conventional and Supercritical Extraction of (-)-Mammea A/BB and the Antioxidant Activity of *Calophyllum brasiliense* Extracts. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6215-6229, 2013.
- Kubo, L., et al. Multifunctional cytotoxic agents from *Anacardium occidentale*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n.1, p. 38-45, 2011.
- Leite, J.P.V. **Desenvolvimento da Fitoterapia**. In. Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas. São Paulo. Atheneu, cap.1, p. 3-20, 2008.
- Maciel, A.M.M., et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- Morais, T.C., et al. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice, **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 264–269, 2010.
- Nascimento, P.F.C., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.108-113, 2007.
- Pereira, A.V., et al. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 121-127, 2015.
- Pinho, L., et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- Rodrigues, C.G., et al. Antibacterial activity of taninis from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, p. 1-5, 2014.

Spagnuolo, R.S. & Baldo, R.C.S. Plantas Mediciniais e Seu Uso Caseiro: o Conhecimento Popular. **Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 1, p. 31-4, 2009.

Taylor, L. The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. **Square on publishers**, 535 p., 2005.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar a prospecção fitoquímica, atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, de extratos das folhas do caju (*Anacardium occidentale* Linn) e cajuí (*Anacardium microcarpum* Ducke), *in vitro* e *in vivo* em camundongos *knockout* – IL 10.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar uma revisão sistemática dos estudos com *Anacardium occidentale*, *Anacardium microcarpum* e *Caryocar brasiliense*.

Realizar a caracterização química e bioquímica dos extratos das folhas obtidos de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D.

Analisar *in vitro* a atividade antioxidativa dos extratos das plantas utilizadas no experimento.

Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto das folhas de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D e verificar a ação moduladora da resistência. Analisar nos camundongos *knockout* – IL 10:

- A atividade antioxidativa dos extratos de folhas de *Anacardium occidentale* e *Anacardium microcarpum* no fígado e soro sanguíneo; (Não foram so enzimas, então deixa geral)
- Quantificar os leucócitos diferenciais em esfregaço sanguíneo;
- Avaliar o controle metabólico, a resposta imunológica a toxicidade e a recuperação do tecido.

#### 4. ARTIGO DE REVISÃO

Artigo publicado na revista **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**  
(Qualis A1)

Oxidative Medicine and Cellular Longevity  
Volume 2018, Article ID 3753562, 13 pages  
<https://doi.org/10.1155/2018/3753562>

*Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C). A systematic review.*

Baptista Anderson ([biomeddu@yahoo.com.br](mailto:biomeddu@yahoo.com.br))<sup>1</sup>; 55(63) 981440440<sup>1</sup>,  
Gonçalves Reggiani <sup>2</sup>, Bressan Josefina<sup>1</sup>; Peluzio Maria do Carmo<sup>1</sup>

1. Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil
2. Department of Animal Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil

#### **Abstract**

The accentuated increase in the use of medicinal plants by the population to treat diseases makes it necessary to carry out pharmacological studies in order to contribute to the scientific knowledge and clarify the mechanisms involved in the main compounds present in these plants. Due to the difficulty of combating antimicrobial-resistant microorganisms, plants become a low-cost and effective alternative. The stem, fruit and leaves of plants are used to measure antioxidant and antimicrobial capacity and to combat the oxidative degradation of free radicals produced in the presence of xenobiotics. A systematic review is a powerful tool that incorporates the variability among the studies, providing an overall estimate of the use of plant extracts as antioxidants and antimicrobial activities. In view of the controversies in the literature regarding the use of compounds from plants or the isolation and purification of the main substances for the prevention of bacterial various therapeutic actions, the aim of this was to present a systematic review on the antimicrobial and antioxidant properties of cashew (*Anacardium occidentale*), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense*). The following databases were analyzed: Pubmed/Medline, Virtual Health library (LILACS and Scielo) and Science Direct. Out of 425 articles, 33 articles have been used in this study, which were also

represented in the The Prisma Statement. *In vitro* antioxidant tests were conducted in 28 studies using different methodologies. Most of the tests involving the studied species demonstrated positive antioxidant potential and antimicrobial properties. The results provide important data and perspectives into the use of natural products that can contribute to the treatment of various diseases.

Keywords: plants extracts, antioxidants, antimicrobial activity, natural products

## 1. Introduction

Plants have long been used for the prevention and treatment of human health adversities. The first herbal records date back to 2838-2698 B.C., when the Chinese emperor Shen Nung cataloged 365 medicinal herbs. In 1500 B.C., the Egyptian manuscript "Ebers Papyrus" recorded information on 811 prescriptions and 700 drugs. Some of these plants are still in use, such as ginseng (*Panax* spp.), *Ephedra* spp., *Cassia* spp. and *Rheum palmatum* L., being used as a source of drugs for the pharmaceutical industry. Indigenous tribes in their rituals and cure of diseases have always used medicinal plants [1].

The use of phytotherapy started gaining popularity in the mid-70s and 80s. The trade of herbal medicines in Brazil is around 5% of the total trade of medicines [2]. According to the Ministry of Health, patients seeking treatment based on medicinal plants and phytopharmaceuticals increased to 161% between 2013 and 2015, probably due to the low cost of herbal medicines and also to the fact of the population being accustomed to their use [3]. The World Health Organization (WHO) notes that 70% to 95% of the population depends on the use of herbal medicines in the primary care setting, therefore issuing a recommendation to encourage countries to formulate national policies and regulations regarding the use of traditional medicines of proven effectiveness [4].

The concept of medicinal plants being "natural" does not guarantee benefits and safety, which makes it fundamental that popularly known herbal medicine is widely studied with regard to its pharmacological and toxicological aspects in order to understand its adverse effects [5]. Adverse effects arise from the production of plant secondary metabolites that can be toxic to the organism, as anthraquinone, for instance, in *Aloe vera* can cause

nephritis when the latter is ingested in a high concentration. In addition, the pyrrolizidine alkaloid metabolites present in Comfrey (*Symphytum officinale*) are also hepatotoxic [6]. The appearance and dissemination of microorganisms resistant to commercially available antimicrobials have been reported for decades, encouraging the search for new sources of antimicrobial substances, such as plants used in the traditional medicine and laboratory trials [7]. The use of plants as antimicrobial agents has seen a major increase in the last years. A good example of this fact are phenolic compounds, present in the essential oils of many plants that are known as active substances, such as the essential oil of rosemary leaves, used in the preservation of food to inhibit microbial contamination and dissemination [8]. Another example is that barks of the cashew tree have shown considerable bactericidal effect due to the presence of tannins [9].

Apart from antimicrobial agents, the pursuit for safe natural antioxidants that can be beneficial to the human health and can replace those of synthetic origin is of interest to the scientific community [10]. The plant kingdom is a valuable source of bioactive and phytochemical compounds. Furthermore, the adequate consumption of fruits and vegetables is directly related to the reduced risks of diseases due to the amount of health-beneficial antioxidants present in such plants [11].

The oxidative stress, which occurs in cells, in general, can be combated by antioxidants since they hold oxidation stability and therefore prevent the formation of reactive species of oxygen and nitrogen. Reactive oxygen species such as superoxide radicals, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide may favor the development of diseases such as cancer, cardiovascular disorders, aging, and degenerative diseases. In contrast, the consumption of natural antioxidants such as polyphenol-rich foods, fresh fruits and vegetables, can counteract the oxidative degradation of free radicals [12;13]. In this context, we can highlight 3 plants (caju, cajuí and pequi) which are widely used in cooking and traditional Brazilian medicine, mainly in the north, northeast and central west regions of the country. Cashew nut and its byproducts have several industrial and biological properties such as antioxidant and antimicrobial activities. There are 11 different species in

the genus *Anacardium*, in which the *Anacardium occidentale* L (cashew) is the most common in Brazil, especially in the north and northeast regions. This pseudofruit is juicy and rich in vitamin C (200mg / 100g of juice) [14]. *Anacardium microcarpum* (cajuí) is widely used in traditional folk medicine for the treatment of inflammation, rheumatism, tumors and infectious diseases. The extracts can hold potential antioxidant agents that modify the oxidation states of cells [15]. *Caryocar brasiliense* C. (pequi) is a native plant of the Cerrado biome and it is well distributed in the north and midwest regions of the country. The fruit has carotenoids with antioxidant activity and is a precursor of vitamin A [16]. It demonstrates a strong potential for sustainable exploration, since the fruit is fairly rich in a nutritional and functional point of view, presenting sensory properties such as color, aroma, and a distinctive flavor compared to other fruits, besides having a pleasant taste [17].

Some clinical and preclinical studies have attempted to demonstrate the antioxidant and antimicrobial effect of plant compounds and their derivatives. However, this hypothesis may not always be confirmed mainly due to the comprehensive methodological variations involving the obtaining of the compounds, the therapeutic schemes and the mechanisms of action. However, it is important to search for new data from various studies in order to clarify the aforementioned discrepancies. In this context, the systematic review is a powerful tool that incorporates the variability among the studies and allows the obtaining of an overall estimate of the use of plant extracts (cashew, cajui and pequi) as antioxidants and antimicrobial properties. Moreover, a systematic review, unlike the widely used narrative reviews, has never been carried out before and might provide us with reliable and solid new evidence on whether or not crude extracts and fractions of cashew, cajui and pequi could be beneficial in antioxidant and antimicrobial defense mechanisms. Based on the latter, our systematic review has been developed to present the results of tests with extracts of parts of the following plant species: *Anacardium occidentale* L, *Anacardium microcarpum* and *Caryocar brasiliense* C. The hypothesis is that these species contain substances that are beneficial to the human health and could be appropriately used by the population, replacing synthetic products and expanding the National Policy on Integrative and Complementary Practices in Health (PNPIC) of the

Brazilian Unified Health System (SUS). The results can then lead to greater discussion and provide interest to the pharmaceutical industry in reducing the high costs of producing and purchasing synthetic substances [18].

## 2. Methodology

### 2.1 Literature research

The studies included in this review have been selected using the following databases: PubMed/Medline, Virtual Library in Health (Bireme, Lilacs and Scielo) and Science Direct. The descriptors used were “pequi”, “pequi antioxidant”, “antimicrobial pequi”, “Caryocar brasiliense”, “Caryocar”, “caju antioxidant”, “caju antioxidant”, “bacteria caju”, “caju antimicrobial”, “cashew”, “Anacardium occidentale”, “caju” and “Anacardium microcarpum”. The original studies used in this review covered the period from 2006 to 2016. This time period can be justified by the limited number of specific studies conducted in recent years and their relevance. Classic articles on the topic and the others resulting from reverse search were also selected. Only articles published in English, Portuguese and Spanish have been included. However, studies that focused on toxicity; wound healing; anti-inflammation; chemical characterization; prebiotic; genotoxic; antidiabetic; gastroprotective; cardiovascular diseases have been eliminated. Reviews, comments and notes, as well as unpublished studies have not been considered. The studies have been selected based on the inclusion criteria indicated below:

- Studies reporting the effect of antioxidant and antimicrobial of crude extracts, fractions and metabolite isolated of the cashew tree (*Anacardium occidentale* L), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C) in animal model.
- Studies *in vitro*, reporting the effect of antioxidant and antimicrobial of crude extracts fractions, and metabolite isolated of the cashew tree (*Anacardium occidentale* L), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C).

### 2.2 Extraction and data management

Abstract selection: three independent reviewers (BAB, BJ, PMC) have selected studies based on title and abstract analysis. In case of disagreement, a fourth reviewer (GRV) would decide whether the study met the inclusion and exclusion criteria. In order to eliminate subjectivity in the data collection and selection process, the information has been independently extracted by both reviewers (BAB and PMC) and analyzed separately. Data from each study has been extracted and tabulated using standardized information, such as: features of the publication (author, country and year); plant (plant family, species and popular name, part used), test conducted, type of analysis, test dosage, animal model, number of animals, sex and type of extract used. When the reviewers faced some kind of difficulty in extracting the data or in obtaining the studies, the authors would be contacted by e-mail to provide the necessary information. Subsequently, the data has been compared and the conflicting information was identified and corrected through discussion in order to reach consensus among the reviewers.

### **3. Results and discussion**

The initial search generated 425 studies out of which 325 were assigned to the descriptor cashew, 24 for cajui and 76 for pequi. Studies that have not met the previously defined criteria were disregarded. The articles that did not report antioxidant and/or antimicrobial activity, those related only to popular knowledge, without relevance and literature reviews were of 392. A total of 32 articles were included at the end of the analysis: Other 24 studies performed tests for antioxidant action, 13 ran tests for antimicrobial action and 5 articles conducted both tests. The Brazilian states that carried out the studies were Ceará (10 studies), Minas Gerais (8 studies), Goiás (1 study), the Federal District (3 studies), Paraíba (2 studies), Mato Grosso (1 study), and Piauí (1 study). Some other studies have also been found in Mexico (1 study), the United States (1 study), Malaysia (1 study), Cuba (1 study) and Africa (2 studies). The exclusion of articles can be justified because they investigate different lines of research from the scope of this study (Study Flow Diagram, shown in Figure 1).

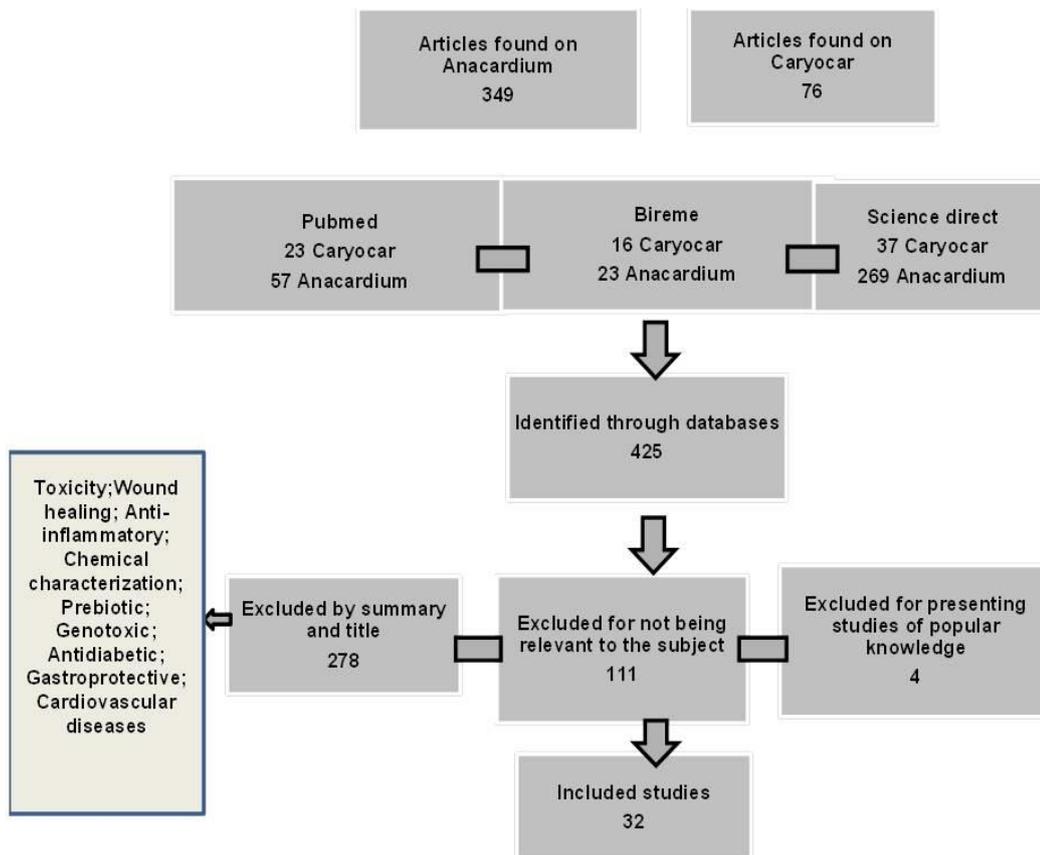


Figure 1: The flow diagram report the systematic review literature search results.

Considering the results shown above, it can be observed that although some countries report the therapeutic use of these extracts, it is in Brazil that most of the works are specific, reporting the beneficial effects of these 3 species to the human health. Possibly this fact can be justified by the regular use of these plants in traditional Brazilian cooking. From this, there are reports in the population of a possible therapeutic power of these extracts, acting mainly as antioxidants, antimicrobial and regenerative properties. Currently, one of these plants (*A. occidentale*), is already listed in the National Program of Medicinal Plants and Herbal Medicine of the country's unique health system for therapeutic purposes. Considering the similar characteristics of the three extracts, we believe that it will be a matter of time for the other two species (*A. microcarpum* and *C. brasiliense*) to be also added to this list. Furthermore, these 3 plant species have a number of total phenolic compounds as flavonoids, anthocyanins and tannins [15;19;20]; which are therapeutically recognized in the treatment of several conditions, such as cancer, cardiovascular diseases, aging, and

neurodegenerative illnesses. Epidemiological studies have suggested that the consumption of natural antioxidants such as vitamins, flavonoids, anthocyanins and other phenolic compounds have protective effects against the previously mentioned diseases [13;21;22]. The interventions with herbal and phytotherapeutic plants take place in the primary health care setting. The practice of phytotherapy involves the interaction between knowledge, multiprofessional efforts in health care, prevention and health actions (Table 1). The results of our work suggest a growing interest for natural products of plant origin in recent years, mainly due to the use these compounds represent in the care and health prevention (Table 1; Table 2). Several studies have reported relevant results mainly in combating oxidative stress and antimicrobial action. These results highlight the importance and relevance of popular knowledge in the treatment of human diseases using phytotherapeutics. In 2009, the Ministry of Health made available a list of 71 medicinal plants, which comprise the National Register of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System (RENISUS), being its purpose to boost the generation of products for use mainly in the basic health care setting through the development of the entire productive chain related to the regulation, cultivation, management, production, marketing and distribution of medicinal plants and herbal remedies.

Table 1 Antioxidants properties and main analysis of studies found citing cashew, cajui and pequi.

Species, family and popular name.	Parts used	Antioxidant assay	Analysis	Dose of the test	Country	Animal model	Number of groups	Sex	extract used	References
<i>Anacardium occidentale</i> L. <i>Anacardiaceae</i> Cashew	Leaves	FRAP; DPPH;TAC	<i>In vitro</i>	1 mg/mL	Nigeria	-	-	-	Fraction	[23]
<i>Anacardium occidentale</i> L. <i>Anacardiaceae</i> Cashew	Fruit	DPPH; TAC	<i>In vitro</i>	?	Brazil	-	-	-	Crude	[24]
<i>Anacardium occidentale</i> L. <i>Anacardiaceae</i> Cashew	Cashew Nut	DPPH; Xanthine	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> antioxidant assay (the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> model).	100;200;500 and 1000 µg/ml	Brazil	-	-	-	Cashew Nut Shell Liquid	[21]
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Fruit	DPPH;	<i>In vitro</i>		Brazil	Rats	24	Males	Crude	[12]

<i>Anacardiaceae</i>		TBARS	<i>In vivo</i>	200/ 400 mg/Kg						
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fruit	TPC; BETA CAR/LIN; TBARS	<i>In vitro</i>	0,5 mg/mL	Sri Lanka.	-	-	-	Crude	[22]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Stem bark	DPPH; TPC	<i>In vitro</i>	40,2; 127; 402 mg/kg	Africa.	Mice	28 mices	Males	Crude	[25]
<i>Anacardiaceae</i>			<i>In vivo</i>				7groups (n=4)			
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Stem bark	DPPH; Xanthine	<i>In vitro</i>	?	United States of America	-	-	-	Fractions	[26]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fibers and fruit	ABTS; TPC	<i>In vitro</i>	500 mL juice	Brasil	-	-	-	Crude	[27]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fruit	DPPH; BETA CAR/LIN	<i>In vitro</i>	20 - 300g pulp fruit 1:2 water	Brazil	-	-	-	Crude	[28]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fruit peels	DPPH; TSP; ABTS; AOC	<i>In vitro</i>	1 g of freeze-dried peel	Mexico.	-	-	-	Crude	[13]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fruit peels	Gastric nitrate/nitrite levels; SOD; CAT; ; TBARS.	<i>In vivo</i>	30 mg/Kg	Brazil	Mice and rats	8 animals per group	Males	Anacardic acids	[29]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fruit peels	TAC; TPC; ABTS	<i>In vitro</i>	?	Brazil	-	-	-	Crude	[30]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Fruit	DPPH; ABTS; TPC	<i>In vitro</i>	1 g	Brazil	-	-	-	Crude	[31]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Leaves	DPPH; TPC; FRP	<i>In vitro</i>	0,3 and 1,0 g/ 50 mL of methanol	Malaysia.	-	-	-	Crude	[32]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium occidentale L.</i>	Nut, fiber and fruit.	Xanthine	<i>In vitro</i>	10 mg/mL	Brazil	-	-	-	Fractions	[14]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cashew</i>										
<i>Anacardium microcarpum</i>	Stem barks	DPPH; TBARS	<i>In vitro</i>	1-400 µg/mL	Brazil	Rats	?	?	Fractions	[15]
<i>Anacardiaceae</i>			<i>In vivo</i>							
<i>Cajuí</i>										
<i>Anacardium microcarpum</i>	Stem barks	TPC; ABTS; SOD; CAT; GST	<i>In vitro</i>	1 - 400 µg/mL	Brazil	-	-	-	Crude/ fractions	[33]
<i>Anacardiaceae</i>										
<i>Cajuí</i>				1 and 10 mg/mL						
<i>Caryocar brasiliense</i>	Leaves	ABTS;	<i>In vitro</i>		Brazil	-	-	-	Supercritical CO <sub>2</sub>	[10]
<i>Caryocaraceae</i>		Human fibroblast		0,2 - 0,025% w/v						



occidentale L. Anacardiaceae Cashew	peels					µg/mL		<i>aureus</i>		
Anacardium occidentale L. Anacardiaceae Cashew		MIC	<i>In vitro</i>	-		100 - 0,19 mg/mL	Brazil	<i>Staphylococcus aureus</i>	Crude	[40]
Anacardium occidentale L. Anacardiaceae Cashew	Stem bark	Agar diffusion test	<i>In vitro</i>	-		12,5% e 50%	Brazil	<i>Streptococcus mitis;</i> <i>Streptococcus Mutans;</i> <i>Streptococcus sanguis;</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>	Crude	[41]
Anacardium occidentale L. Anacardiaceae Cashew	Leaves		<i>In vitro</i>	-		3g and 10g/100 mL of methano l	Malaysia	<i>Brevibacillus brevis;</i> <i>Micrococcus luteus;</i> <i>Staphylococcus cohnii;</i> <i>Escherichia coli,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa;</i> <i>Salmonella enterica</i>	Crude	[32]
<i>Anacardium microcarpum</i> Anacardiaceae Cajú	Stem barks	MIC; Modulation of the antibiotic activity	<i>In vitro</i>	-		1,024 µg/mL	Brazil	<i>Escherichia coli;</i> <i>Pseudomonas aeruginosa;</i> <i>Staphylococcus aureus.</i>	Fractions	[42]
<i>Caryocar brasiliense</i> <i>Caryocaraceae</i> Pequí	Leaves	MIC; Antiseptic activity	<i>In vitro</i>	-		11,25 - 100 mg/mL	Brazil	<i>Escherichia coli;</i> <i>Pseudomonas aeruginosa;</i> <i>Staphylococcus aureus.</i>	Supercritical CO <sub>2</sub>	[10]
<i>Caryocar brasiliense</i> <i>Caryocaraceae</i> Pequí	Fruits and leaves	MIC; **MFC	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Acute Oral Toxicity Evaluation of the Most Active Extract; Female mice, Swiss at the age of 8 weeks.		2000 and 1,95 µg/mL 5000 - 2000 mg/kg (Toxicity )	Brazil	<i>Alternaria solani;</i> <i>Alternaria alternata;</i> <i>Botrytis cinérea;</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Mucor hiemalis;</i> <i>Phytophthora infestans;</i> <i>Venturia pirina</i>	Crude	[43]
<i>Caryocar brasiliense</i> <i>Caryocaraceae</i> Pequí	Oil	Agar diffusion test	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Cytotoxicity Screening, performed on the <i>Artemia nauplii</i>		10 mg/mL	Brazil	<i>Staphylococcus epidermidis;</i> <i>Staphylococcus aureus;</i> <i>Pseudomonas aeruginosa;</i> <i>Escherichia coli</i>	Oil	[34]
<i>Caryocar brasiliense</i> <i>Caryocaraceae</i> Pequí	Leaves	Agar diffusion test/ MIC	<i>In vitro</i>	-		1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL	Brazil	<i>Enterococcus faecalis;</i> <i>Escherichia coli;</i> <i>Pseudomonas aeruginosa;</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Crude	[38]
<i>Caryocar brasiliense</i> <i>Caryocaraceae</i> Pequí	Fruit peels	Agar diffusion test	<i>In vitro</i>	-		200 - 500 mg/mL	Brazil	<i>Staphylococcus aureus;</i> <i>Escherichia coli</i>	Crude	[44]

\*MIC-Minimal Inhibitory Concentration; \*\*MFC-Minimal Fungicidal Concentration

Our results showed that 27 studies conducted *in vitro* antioxidant tests using different methodologies, being the most common the DPPH(2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl) followed by ABTS (2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Figure 2).

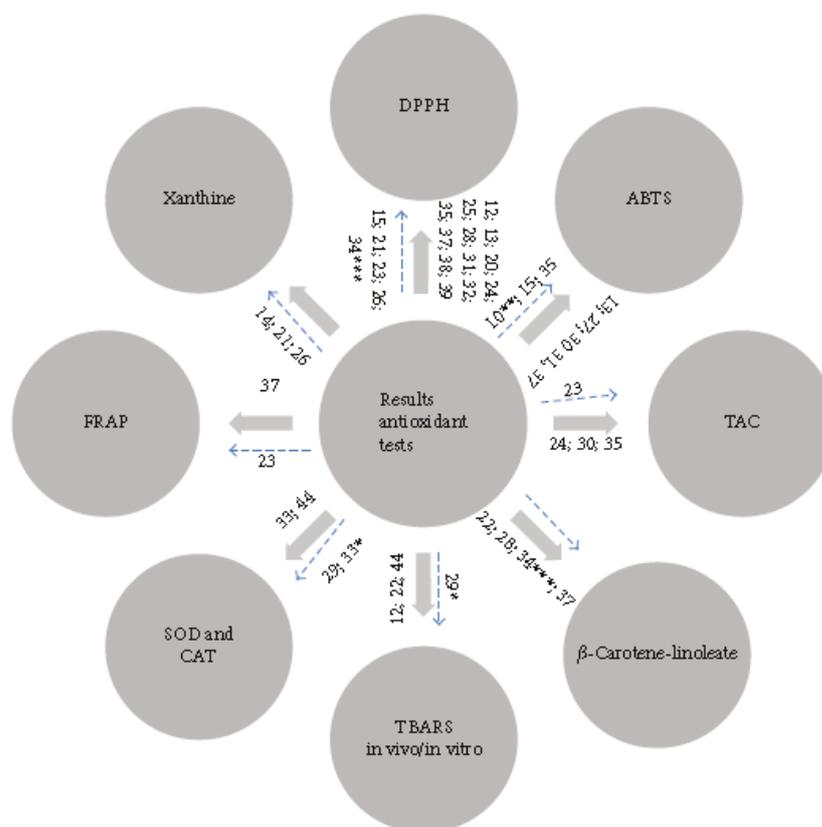


Figure 2: Antioxidant tests used from extract, fractions, oils, and supercritical carbon dioxide (\*Anacardic acids; \*\*Supercritical CO<sub>2</sub>; \*\*\*Oil; solid arrows = crude; dashed arrows = fractions).

The supercritical CO<sub>2</sub> extraction system that consist of a heated extraction column, CO<sub>2</sub> and cosolvent pumps, a thermostatic bath, and a pressure gauge. non-polluting method for extracting plant products. In addition to its low toxicity and environmental impact, supercritical CO<sub>2</sub> extraction replaces conventional extraction methods using organic solvents that require numerous purification processes to remove chemical contaminants [10]. Assays such as β-carotene, FRAP and xanthine have been poorly used probably because they result in difficult numbers to compare, since there is no universal method capable of accurately measuring the antioxidant capacity of all samples.

The determination of the minimum inhibitory concentration in microplate wells was the method most frequently adopted. The antimicrobial test most used was the minimal inhibitory concentration followed by the Agar

diffusion test and antiseptic test (Table 3). Our results also showed that, among the markers of oxidative stress, the most frequent analysis was of thiobarbituric acid markers (TBARS), followed by ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), total antioxidant capacity (TAC), xanthine oxidase and analyses of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Basically, the results showed that cashew, cajuí and pequi extracts decreased the production of TBARS in tissues by increasing the total antioxidant capacity and accelerating the formation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) from molecular oxygen ( $O_2$ ) by SOD action and also by accelerating the decomposition of  $H_2O_2$  by CAT forming water.

**Table 3. Antimicrobial test used in the studies of cashew, caju and pequi extracts.**

Test	References
Minimal Inhibitory Concentration	9;10; 23; 32; 38; 40; 42;43
Agar diffusion test	19; 23; 32; 34; 38; 41; 43;44
Antiseptic test	10

Most of the analyzed studies performed *in vitro* activities to demonstrate the antioxidant and antimicrobial potential of cashew, cajuí and pequi extracts. The tested doses varied substantially, which calls the obtained results into question. Apart from that, there seems to be a lack of information to explain the potential benefits of these extracts to the human health [45]. Another issue that should also be taken into consideration is the significant variation in the reported results using different parts of the plants such as fruits, oils, leaves and barks. The tests for cashew, cajuí and pequi showed that all parts of the plants offer a therapeutic potential when it comes to antioxidant and antimicrobial activities, pointing out the possibilities for developing therapeutic products of plant origin, thus stimulating new research and increasingly consolidating the use of plants that display therapeutic features.

Our study demonstrated that 12 articles have performed tests to assess the antimicrobial effect of different parts of the plants. According to Silva et al. [30], the hydroalcoholic extract of the cashew tree bark, in varied doses, was effective in avoiding the proliferation of *Staphylococcus aureus*. Studies have shown that, even in small doses, the tannins present in the cashew tree bark is effective in inhibiting the proliferation of this bacterium

[9;19]. The effects of these extracts on other bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus* ssp have also been analyzed and the results showed that cajuí and pequi extracts inhibited the proliferation of such bacteria [42]. This activity was related to the high concentration of flavonoids, tannins and alkaloids present in the extracts [42]. Similarly, the variations in the results can be justified by the different concentration of these compounds in different parts of the plants, like leaves, barks and essential oils [34]. This growing need to discover new natural antibiotics simultaneously arises from the ever increasing resistance of these bacteria to the most common antimicrobials, such as penicillin. Therefore, the development of alternative plant-based drugs is urgent and essential in the fight against microbial agents [46].

In our study, 16 articles showed the antioxidant action of the extracts after analyzing leaves, fruits, fibers and oils obtained from cashew, cajuí and pequi. For Andrade, et al. [21], the cashew extract serves as an electron donor, acting as a primary antioxidant that accelerates the passage of electrons, quickly stabilizing molecules. The cashew peduncle extract was used to evaluate the formation of TBARS in the liver, plasma and brain to determine the lipid peroxidation level on the tissue. The results showed an 80% decrease in the formation of malondialdehyde and a 95% increase in total antioxidant capacity. Interestingly enough, cashew peduncles are usually disposed of and, due to that, it is one of the least valued parts of the fruit. Perhaps, it could represent a low-cost alternative in the production of new medicines in the future [12]. Another antioxidant function attributed to the cashew extract is the increase in the activity of SOD and CAT antioxidant enzymes and, consequently, a decrease in lipid peroxidation, reducing damages to cell membranes [29].

However, it is clear that the results vary according to the part of the plant studied. For instance, when using the DPPH technique for radical elimination activity, it has been observed that cashew fruits have a high antioxidant power, which can vary according to the place they were cultivated [28]. Anarcadic acids and cardanol extracted from the cashew oil did not inhibit lipid peroxidation, probably because they do not possess the ability to donate the hydrogen atom to the peroxy radical, derived from the free fatty

acid. Nevertheless, the anacardic acid inhibited the formation of superoxide anions and the ability of various enzymes involved in promoting free radicals in the tissue [26]. The antioxidant power of the leaves (TAC) was measured through the FRAP technique (phosphomolybdenum and ferric reducing antioxidant power techniques). The microbicide test with bacteria and fungi showed little effectiveness against bacteria activity and no effectiveness against fungi, with better results for gram-negative bacteria [23]. Cashew nut bran was also evaluated in different stages, raw and cooked, by Soares, et al. [31], using DPPH and ABTS. When comparing the different stages of bran, they observed that the raw kind presents the greatest antioxidant activity. Cashew fruit and nuts have been valued by the hypoxanthine/xanthine oxidase test and they demonstrated high antioxidant capacity with 100% inhibition obtained by the liquid extract of the nut and 94% inhibition by the fiber. The anacardic acids had the highest antioxidant activity when compared to cardol and cardonol. Anacardic acids present in large quantities in the cashew fibers (residue of cashew nut extraction) can be utilized for the production of chemopreventive substances and protectors of DNA damage instead of being disposed of [14]. Breda, et al. [36] have observed that extracts of the fruit peels and leaves of pequi displayed antifungal activity against several species of fungi, with better efficiency observed in the peel extracts. This difference can be justified by the presence of phenolic phytochemicals in a greater amount in the fruit peels.

In the case of pequi, Moares, et al. [37] have observed that the mesocarp acts as a radical collector, providing a reduction of Fe<sup>+3</sup> when compared to other plants such as *Cipocereus minensis*, *Solanum lipocarpum* and *Byrsonina verbascifolia*. The antioxidant activity of the pequi leaf is comparable to the ones found in isolated compounds of rutin and vitamin C [38]. For the Pinho et al. [44], the pequi oil stimulated the antioxidant defense system, increasing the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and glutathione peroxidase (GPX) after the induction of lipid peroxidation by CCl<sub>4</sub> application. According to Khouri, et al. [35], the fruits extract reduced hydroxyl radicals, inhibiting Fenton's reagent, an important way to form free radicals in tissues. Our results show that any part of the plant used has a high antioxidant power, by acting positively in all ways of forming free

radicals and stimulating antioxidant defense systems. Breda, et al.[43] have observed that extracts of the fruit peels and leaves of pequi presented antifungal activity against several species of fungi, with better efficiency observed in the peel extracts. This difference can be justified by the presence of phenolic phytochemicals in a greater amount in fruit peels.

#### **4. Limitations**

Although our systematic review represents a proposal to compile and critically analyze the evidence on the applicability of plant derivatives (cashew, cajui and pequi) as antioxidant and antimicrobial, a limitation of the results should be considered. Our sampling frame was based on a specific number of databases. Thus, some articles may be not recovered due to the boundaries applied in the search strategy, as well as limitations in algorithms adopted in the search interfaces of each database. These aspects directly affect the sensitivity and specificity of the search strategy, which may have contributed to identify key articles. We attempted to reduce these limitations by screening the reference lists of all articles, which are not limited to databases or any keyword-based search model. In addition, most of the studies were identified to be conducted in the same country, Brazil, which may be related to the failure in searching for studies.

#### **5. Conclusion**

The parts of pequi and cashew trees can be used to treat infectious diseases caused by bacteria and fungi, fighting free radicals. The DPPH technique was the most utilized and it demonstrates, along with other techniques, that the extracts show satisfactory antioxidant power and in vivo actions that provide protection from oxidative processes. The isolated secondary metabolites suggest better antioxidant activity in relation to the crude extract, such as anacardic acids from cashew. The ethyl acetate fraction suggests having the best antioxidant and bactericidal action. The antimicrobial activities of the extracts in bacteria and fungi proved their efficiency, primarily for minimum bactericidal concentration testing. The

studies mostly used crude extracts,. However the isolated secondary metabolites may have more potent antioxidant and microbicidal action. Based this, we believed that researchs on actions of cashew, cajuí and pequi are important ffor treatment of populations, mainly for reducing costs and increasing the therapeutic spectrum. Furthermore, the use of herbal medicines can also arouse the interest of the industry, adding new value to the pharmaceutical market. However, absence or incomplete characterization of the models, experimental groups, treatment protocols, phytochemical screening, and toxicity analysis of the plant products impair the internal validity of the individual studies. Together with these limitations, contradictory results based on heterogeneous studies of the same plant species compromise the external validity of the evidence, making it difficult to translate data into clinical practice, as well as the relevance of the plant species as potential biotechnological targets in the development of new drugs.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil.

### **References**

- [1] W.C.A. Firmo, V.J.M. Meneses, C.E.C. Passos, et al., “Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais,” *Cadernos de Pesquisa*, São Luís, vol.18, especial, 2011.
- [2] M.C.R. Bruning, G.B.G. Mosegui, and C.M.M. Vianna “A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde,” *Ciencias & Saúde Coletiva*, vol. 17, no.10, pp. 2675-2685, 2012.

- [3] Brasil. Portal Brasil. Brasília DF, “Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161% em três anos,” 2016. Available in; <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161/fito.jpg/view>, Accessed in: 05/08/2017.
- [4] N.M.T. Goncalves, M.M.D.C. Vila, M. Gerenutti, and D.S.A. Chaves, “Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil,” *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Ciudad de la Habana, vol. 18, no.4, pp.632-637, 2013.
- [5] H.G. Araújo-Filho, J.D. Dias, L.J. Quintans-Júnior, et al., “Phytochemical screening and analgesic profile of the lyophilized aqueous extract obtained from *Chrysobalanus icaco* leaves in experimental protocols,” *Pharmaceutical biology*, vol.54, no.12, pp.3055–3062, 2016.
- [6] P.F. Silveira, M.A.M. Bandeira , and P.S.D. Arrais, “Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade,” *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, João Pessoa, vol. 18, no.4, pp. 618-626, 2008.
- [7] L.P.M. Mendes, K.M. Maciel, A.B.R. Vieira, and L.C.V. Mendonça “Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*,” *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol.32, no.1, pp.121-125, 2011.
- [8] D.S. Ribeiro, D.B.M. Melo, A.G. Guimarães, and E.S. Velozo “Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana,” *Ciências Agrárias*, Londrina, vol. 33,no.2, pp.687-696, 2012.
- [9] A.V. Pereira, T. K.B. Azevedo, S.S.S. Higino, et al., “Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana,” *Agropecuária Técnica*, vol. 36, no.1, pp. 121-127, 2015.
- [10] L.F.B. Amaral, P. Moriel, M.A Foglio, and P.G. Mazzola, “Caryocar brasiliense supercritical CO<sub>2</sub> extract possesses antimicrobial and antioxidante properties useful for personal care products,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 14,no.73, pp.1-7, 2014.

- [11] C.Bvenura and D.Sivakumar, The role of wild fruits and vegetables in delivering a balanced and healthy diet. *Food Research International*, vol.99, pp. 15-30, 2017.
- [12] P.R.B. Broinizi, A.Wartha, E.R.S.S. Silva, et al., “Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 44, no. 4, pp. 773-781, 2008.
- [13] V.M. Moo-Huchin, M.I. Moo-Huchin, R.J. Estrada-León, et al., “Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico,” *Food Chemistry*, vol. 166, no.1, pp.17-22, 2014.
- [14] M.T. Trevisan, B. Pfundstein, R. Haubneret, et al., “Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, no.2, pp.188–197, 2006.
- [15] V.M.B. Barbosa-Filho, E.P. Waczuk, J.P. Kamdem, et al., “Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*),” *Industrial Crops and Products*, vol. 55, pp. 280–288, 2014.
- [16] A.L. Silva,R.R.P. Lage, D.E.F. Filho, et al., “Pequi peel meal in laying hen diet,” *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, vol. 38, no.2, pp. 151-154, 2016.
- [17] N. Bezerra, T. Barros, and N. Coelho, “A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos,” *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 17, no.4, pp.875-880, 2015.
- [18] Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS,” 2ª ed.-Brasilia, editora MS-OS, pp. 48-56, 2015, Available in: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_praticas\\_integrativas\\_complementares\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_praticas_integrativas_complementares_2ed.pdf). Accessed: 10/09/2017.

- [19] Y. Martínez Aguilar, F. Soto Rodríguez, M. Almeida Saavedra, R. Hermosilla Espinosa, and O. Martínez Yero, “Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón),” *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 17, no. 4, pp. 320–329, 2012.
- [20] E. Gregoris, G. P. P. Lima, S. Fabris, M. Bertelle, M. Sicari, and R. Stevanato, “Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays,” *BioMed Research International*, vol. 2013, 8 pages, 2013.
- [21] T. J. A. S. Andrade, B. Q. Araújo, A. M. G. L. Citó et al., “Antioxidant properties and chemical composition of technical cashew nut shell liquid (tCNSL),” *Food Chemistry*, vol. 126, no. 3, pp. 1044–1048, 2011.
- [22] N. Chandrasekara and F. Shahidi, “Antioxidative potential of cashew phenolics in food and biological model systems as affected by roasting,” *Food Chemistry*, vol. 129, no. 4, pp. 1388–1396, 2011.
- [23] O. O. Ajileye, E. M. Obuotor, E. O. Akinkunmi, and M. A. Aderogba, “Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract,” *Journal of King Saud University– Science*, vol. 27, no. 3, pp. 244–252, 2015.
- [24] M. S. O. Alves, A. M. Alves, and M. M. V. Naves, “Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado,” *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, vol. 72, 2013.
- [25] S. Encarnação, C. de Mello-Sampayo, N. A. G. Graça et al., “Total phenolic content, antioxidant activity and pre-clinical safety evaluation of an *Anacardium occidentale* stem bark Portuguese hypoglycemic traditional herbal preparation,” *Industrial Crops and Products*, vol. 82, pp. 171–178, 2016.
- [26] I. Kubo, N. Masuoka, T. J. Ha, and K. Tsujimoto, “Antioxidant activity of anacardic acids,” *Food Chemistry*, vol. 99, no. 3, pp. 555–562, 2006.

- [27] A. C. S. de Lima, D. J. Soares, L. M. R. da Silva, R. W. de Figueiredo, P. H. M. de Sousa, and E. de Abreu Menezes, "In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidante compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastrointestinal digestion," *Food Chemistry*, vol. 161, no. 15, pp. 142–147, 2014.
- [28] E. de Almeida Melo, M. I. S. Maciel, V. L. A. G. de Lima, and R. J. do Nascimento, "Capacidade antioxidante de frutas," *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, no. 2, pp. 193–201, 2008.
- [29] T. C. Morais, N. B. Pinto, K. M. M. B. Carvalho et al., "Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice," *Chemico- Biological Interactions*, vol. 183, no. 1, pp. 264–269, 2010.
- [30] A. C. Pereira, N. J. Wurlitzer, A. P. Dionisio et al., "Synergistic, additive and antagonistic effects of fruit mixtures on total antioxidant capacities and bioactive compounds in tropical fruit juices," *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 65, no. 2, pp. 119–127, 2015.
- [31] D. J. Soares, C. R. S. Câmara, E. A. T. de Figueiredo, G. A. Maia, P. H. M. de Sousa, and R. W. de Figueiredo, "Characterization and antioxidant activity of cashew nut bran in different stages of processing," *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 30, no. 1, pp. 147–153, 2012.
- [32] Y. P. Tan and E. W. C. Chan, "Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*," *Food Bioscience*, vol. 6, pp. 17–23, 2014.
- [33] K. R. Müller, I. K. Martins, N. R. Rodrigues et al., "*Anacardium microcarpum* extract and fractions protect against paraquat-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*," *EXCLI Journal*, vol. 16, pp. 302–312, 2017.
- [34] B. S. Ferreira, C. G. de Almeida, L. P. Faza et al., "Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods," *Molecules*, vol. 16, no. 12, pp. 5875–5885, 2011.

- [35] J. Khouri, I. S. Resck, M. Poças-Fonseca et al., “Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.),” *Genetics and Molecular Biology*, vol. 30, no. 2, pp. 442–448, 2007.
- [36] A. L. Miranda-Vilela, I. S. Resck, and C. K. Grisolia, “Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp,” *Genetics and Molecular Biology*, vol. 31, no. 4, pp. 956–963, 2008.
- [37] M. L. Morais, A. C. R. Silva, C. R. R. Araújo, E. A. Esteves, and N. A. V. Dessimoni-Pinto, “Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do cerrado brasileiro,” *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 35, no. 2, pp. 355–360, 2013.
- [38] W. de Paula-Ju, F. H. Rocha, L. Donatti, C. M. T. Fadel- Picheth, and A. M. Weffort-Santos, “Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract,” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, supplement, pp. 625–630, 2006.
- [39] L. R. Torres, F. C. Santana, F. L. Torres-Leal et al., “Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: antioxidant and anti-inflammatory effects,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 97, pp. 205–216, 2016.
- [40] J. G. da Silva, I. A. Souza, J. S. Higino, J. P. Siqueira-Junior, J. V. Pereira, and M. do Socorro V Pereira, “Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*,” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17, no. 4, pp. 572–577, 2007.
- [41] N. L. Silva, R. A. Bezerra, F. N. Costa, M. M. Rocha, and S. L. Pereira, “Avaliação do efeito do extrato da casca do cajueiro sobre microrganismos de biofilme subgengival. Estudo experimental in vitro,” *Brazilian Journal Periodontology*, vol. 23, no. 4, pp. 26–30, 2013.

- [42] V. Barbosa-Filho, E. P. Waczuk, N. Leite et al., “Phytochemicals and modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajuí) on antibiotic drugs used in clinical infections,” *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 9, pp. 5965–5972, 2015.
- [43] C. A. Breda, A. M. Gasperini, V. L. Garcia et al., “Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of Brazilian savanna plants aiming its use as safe fungicides,” *Natural Products and Bioprospecting*, vol. 6, no. 4, pp. 195–204, 2016.
- [44] L. de Pinho, P. N. S. Souza, E. M. Sobrinho, A. C. de Almeida, and E. R. Martins, “Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi,” *Ciência Rural*, vol. 42, no. 2, pp. 326–331, 2012.
- [45] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, “Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica,” *Cadernos de Atenção Básica*, vol. 31, pp. 1–154, 2012.
- [46] I. L. Elisha, F. S. Botha, L. J. McGaw, and J. N. Eloff, “The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, p. 133, 2017.

## ARTIGO 2. **Caracterização fitoquímica e análise das atividades antimicrobiana e antioxidante de folhas de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* D., *in vitro*.**

Anderson Barbosa Baptista; Guilherme Nobre Lima do Nascimento; João Paulo Viana Leite; Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

### **RESUMO**

No Brasil é encontrada a maior diversidade vegetal do planeta. As plantas medicinais são utilizadas na medicina tradicional e muitos compostos extraídos de plantas já foram identificados e são utilizados em ensaios microbiológicos e em avaliações da capacidade antioxidante. O *Anacardium occidentale* (caju) e o *Anacardium microcarpum* (cajuí) estão presentes no cerrado e no nordeste brasileiro. As partes do cajueiro são utilizadas em diversos estudos e, têm demonstrado ações anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. O objetivo desse estudo foi caracterizar e analisar a ação antimicrobiana e antioxidante, *in vitro* dos extratos etanólicos de folhas de *Anacardium occidentale* L e *Anacardium microcarpum* D. Determinou-se a composição centesimal das folhas secas e dos extratos, a prospecção fitoquímica foi realizada através de cromatografia de camada delgada (CCD), a dosagem de compostos fenólicos e flavonoides totais, a concentração do ácido anacárdico por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e capacidade antioxidante por meio das técnicas de DPPH e ABTS. Capacidade bactericida através da concentração inibitória mínima com cepas multirresistentes e a ação modulatória. Na composição centesimal, os dois extratos apresentaram percentual semelhante, com maior valor para os carboidratos. Os resultados dos compostos fenólicos e flavonoides foram 2,32 mg EAG g<sup>-1</sup> e 0,34 mg ER g<sup>-1</sup>, em *A. occidentale* e 1,64 mg EAG g<sup>-1</sup> e 0,29 mg ER g<sup>-1</sup> em *A. microcarpum*, respectivamente. Foram identificados flavonoides, taninos, triterpenos, saponinas, e óleos essenciais. A concentração inibitória mínima do extrato de *A. microcarpum* foi de 0,78 mg/mL para o *Staphylococcus aureus*. Os extratos das folhas de *A. occidentale* e *A. microcarpum* foram investigados nesse contexto pela primeira vez esugerem ser bons produtos com ações antioxidantes e antimicrobianas. Palavras-chave: Fitoterápico; Atividade antioxidativa; Antimicrobiano; *Anacardium occidentale*; *Anacardium microcarpum*.

## ABSTRACT

The greatest plant diversity of the planet can be found in Brazil. Herbal products are used in traditional medicine and many compounds extracted from plants used in medicine have already been identified and are used in microbiological tests and in evaluations of antioxidant capacity. The *Anacardium occidentale* (cashew) and *Anacardium microcarpum* (cajuí) are present in the Cerrado and in the Brazilian Northeast, and their use still lacks a more scientific basis. The pseudofruit, stem and leaves are used in several studies and in general, have shown anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial actions. The aim of this study was to characterize and analyze the antimicrobial and antioxidant action of the ethanolic extracts of *Anacardium occidentale* and *Anacardium microcarpum*. Tests were performed to determine the centesimal composition of dried leaves and extracts, phytochemical prospecting through thin layer chromatography (CCD), HPLC (high performance liquid chromatography) to detect anacardic acids and *in vitro* antioxidant capacity through DPPH techniques and ABTS. The extracts were also evaluated for the microbicidal capacity through the minimal inhibitory concentration with multiresistant strains. In the centesimal composition, the two extracts presented similar percentage, with a higher value for carbohydrates. The phytochemical analysis showed the presence of total phenolic compounds 2.32 mg EAG g<sup>-1</sup> of *A. occidentale* and 1.64 mg EAG g<sup>-1</sup> of *A. microcarpum*, and within that group. Flavonoids, tannins, triterpenes, saponins, and essential oils have been identified. The minimum inhibitory concentration of *A. microcarpum* extract was 0.78 mg / mL for *Staphylococcus aureus*. The extracts from the leaves of *A. occidentale* L and *A. microcarpum* D were investigated in this context for the first time and presented good results, with antioxidant and antimicrobial actions.

**Keywords:** Phytotherapy, Antioxidative activity; Antimicrobials; *Anacardium occidentale*; *Anacardium microcarpum*.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta a maior diversidade biológica do planeta e muitas plantas vêm sendo utilizadas em vários países do mundo na medicina tradicional. Uma boa parte da população brasileira depende dos medicamentos de origem natural, e nos países em desenvolvimento 80% da população utiliza-se de práticas tradicionais nos cuidados básicos à saúde (PINHO et al., 2012; SOUZA et al., 2013; BAPTISTA et al., 2018).

Os metabólitos secundários fenólicos, encontrados naturalmente em plantas, proporcionam a elas proteção contra patógenos e predadores, e em outros organismos podem atuar como fator de proteção, podendo inibir a peroxidação lipídica, protegendo moléculas como o colesterol lipoproteico da oxidação e protegendo o organismo do avanço do câncer e doenças cardiovasculares (SOUZA, 2017). A busca por novos compostos ativos que possuam ação microbicida vem crescendo a cada ano, justificada pelo surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado (BARBOSA-FILHO et al., 2015; GINOVYAN et al., 2017).

*Anacardium occidentale* L., popularmente conhecido como caju, é um membro da família Anacardiaceae, uma planta tropical do Brasil. É amplamente cultivada na Índia e no leste da África. Produz um pseudofruto suculento, fibroso e comestível (TREVISAN et al., 2006). O cajueiro (pseudofruto, casca e folhas) é utilizado na medicina tradicional, com efeitos terapêuticos descritos na literatura como anti-inflamatório e suas atividades contra células carcinogênicas (LUIZ-FERREIRA et al., 2008). As folhas, o pseudofruto e a casca possuem polifenólicos, principalmente taninos que podem atuar como antibiótico natural (PEREIRA et al., 2015).

*Anacardium microcarpum* D (cajuí) é uma planta nativa que apresenta grande dispersão na região do cerrado da Amazônia e das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileira e suas partes possuem ações antioxidantes e antimicrobianas (CARBAJAL & SILVA JUNIOR, 2003; BAPTISTA et al., 2018).

O consumo dos vegetais está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis, associado à presença de compostos do metabolismo secundário (MELO et al., 2008). Os compostos polifenólicos agem como antioxidantes naturais que agem na prevenção de doenças cardiovasculares, no envelhecimento e na carcinogênese (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000), características que devem-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição (CHUN-SOOK et al., 2005).

Como hipótese desse estudo inferimos que os extratos das folhas de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D possuem ação antimicrobiana ativa em cepas multirresistentes e atividade antioxidante *in vitro*. Assim o objetivo do estudo foi caracterizar e analisar a ação antioxidante e antimicrobiana *in vitro* dos extratos etanólicos de *Anacardium occidentale* L e *Anacardium microcarpum* D.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODO**

### **6.2.1 COLETA DA AMOSTRA**

Foram coletadas folhas do cajueiro *Anacardium occidentale* L (caju) (Figura 1) e *Anacardium microcarpum* (cajuí) no Campus da Universidade Federal do Tocantins - UFT, na cidade de Palmas TO, coordenadas S 10° 10.551', W 048° 21.436', no mês de novembro de 2016 (poucas chuvas, época de floração e frutos). Foram depositadas exsicatas no Herbário de Plantas Ecotonais da UFT/LCIA sob os números 109 para o *A. occidentale* L e 875 o *A. microcarpum* D. As folhas foram cuidadosamente coletadas observando integridade e ausência de fungos visíveis. Foram acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso e transportadas ao Lacibs (Laboratório de ciências básicas e da saúde, da Universidade Federal do Tocantins). As folhas foram colocadas em estufa sem sobreposição a 50°C para secagem. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em frascos ambar secos e limpos.



Figura 1. Foto referente ao *A. occidentale* no campus da UFT de Palmas. Fotografada pelo autor.

### 6.2.2 EXTRAÇÃO

Para a obtenção do extrato etanólico, o material vegetal previamente triturado foi submetido a extração, por maceração, empregando etanol PA, por 72 h. Após este intervalo, o extrato foi filtrado em papel de filtro. Este procedimento foi replicado por três vezes consecutivas. Em seguida, o solvente foi destilado em evaporador rotativo a 50°C sob pressão reduzida. O extrato etanólico seco foi transferido para frascos estéreis de vidro e em estufa a 40°C para completar a total evaporação do etanol (Figura 2), sendo armazenado em geladeira para posteriores análises. A etapa de extração foi realizada no Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde da UFT.



Figura 2. Rotoevaporação e separação dos extratos etanólicos no Lacibs, UFT campus de Palmas. Fotos ilustrativas. Fotografadas pelo autor.

### 6.2.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATERIA SECA DE FOLHAS E DO EXTRATO ETANÓLICO SECO.

A composição de cinzas foi determinada por meio do resíduo de incineração obtido por aquecimento em forno mufla em temperatura de 550°C. O conteúdo de proteínas foi determinado por meio do método de

Kjeldahl modificado. O conteúdo de lipídios foi feito pelo método gravimétrico com extração em *Soxhlet*. Todas as determinações foram feitas em triplicata. Os resultados médios da composição centesimal foram expressos em porcentagem (%) da planta, matéria seca (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A umidade foi determinada em Balança Determinadora de Umidade *M5 Thermo*. Por fim, incineradas em forno mufla a 550°C (AOAC, 1990). A análise da composição centesimal foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa e replicada no Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal de Palmas.

#### **6.2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA**

Foram pesados 10mg de cada uma das amostras e diluídas em 1 mL de metanol. Foi utilizada a metodologia de Cromatografia de Camada Delgada, de acordo com (DEGANI et al., 1998). Foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 F<sub>254</sub> (DC-Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV) e como fases móveis: solução de Tolueno/éter etílico na proporção 1:1 e mistura de Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água na proporção 27,5 mL:2,5 mL:2,5 mL:6,0 mL, respectivamente. Foram aplicadas nas placas 20 µL de cada amostra. Após eluição da amostra em cuba cromatográfica foi realizada nebulização com reagente revelador, para cada grupo utilizou-se um sistema eluente adequado, reveladores específicos e amostras de referência, visando à presença dos seguintes grupos: Flavonóides; Taninos; Triterpenos; Saponinas; Alcalóides; Óleos essenciais; Cumarinas; Antraquinonas, realizada no Laboratório de Biodiversidade, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV (STAHL, 1971; MARINI-BETTOLO et al., 1981; DUARTE, 1995; WAGNER & BLADT, 1996; DUARTE, 2001).

#### **6.2.5 FENÓLICOS TOTAIS**

A concentração dos fenólicos totais do extrato etanólico foi determinada utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu, que detecta a presença de todas as substâncias reduzidas pelo reagente, segundo metodologia de JOHNSON&ACKERS, (2000). Os compostos fenólicos

reagem com o reagente Folin-Ciocalteu sob condições básicas. A remoção do próton fenólico leva a formação do ânion fenolato, o qual é capaz de reduzir o reagente. Foram colocados 250 µl da solução da amostra em um balão de 5 mL, acrescentados 250 µl de reagente de Folin, 500 µl da solução saturada de carbonato de sódio, e completados com água destilada. Foi elaborada uma curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mg/mL. A leitura foi realizada em 725 nm em espectrofotômetro UV-vis. Através da equação da regressão linear, os resultados da concentração de compostos fenólicos na amostra foram obtidos pela extrapolação, a concentração é calculada pela quantidade inicial de extrato diluída em 1 mL de etanol. Os resultados foram expressos em mg EAG g<sup>-1</sup> (equivalente de ácido gálico por grama do extrato) (BOROSKI et al., 2015; PEREZ-JIMENEZ et al., 2010). Realizada no Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos, no Departamento de Tecnologia de alimentos, UFV.

#### **6.2.6 DOSAGEM DE FLAVONOÍDES TOTAIS**

A determinação de flavonóides baseia-se na reação de complexação com o metal alumínio, formando um complexo colorido. A quantidade de flavonóides foi determinada pelo método espectrofotométrico (CHANG, et al., 2002). Para a construção da curva de calibração, foi utilizado o padrão rutina, nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Foram preparadas soluções de concentração 1 mg/mL dos extratos de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D500 µL da solução do extrato foi adicionado em 500 µL de cloreto de alumínio 5% em metanol e completadas com 2,5 ml de metanol. Essa mistura foi mantida protegida da luz, a temperatura ambiente por 1 hora, em seguida foi realizada a leitura a 415 nm em espectrofotômetro UV-Vis contra o branco. Os resultados foram expressos em mg ER g<sup>-1</sup> (miligramas equivalente de rutina por gramas de extrato), de acordo com CHANG et al. (2002). Ensaio realizado no Laboratório de Biodiversidade, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

### 6.2.7 ANÁLISE DO ÁCIDO ANARCÁDICO POR HPLC

A análise da presença de ácido anarcádico foi realizada pelo método de HPLC (cromatografia líquida de alta *performance*), adaptado de TREVISAN et al. (2006), em aparelho Shimadzu, com Coluna Shim-pack VP-ODS 250 x 4,6 mm e pré-oluna de Shim-pack GVP-ODS. A detecção foi realizada empregando espectrofotômetro no UV a 278 nm. Utilizou-se a fase móvel com os solventes A (água + ácido acético 2%) e solvente B (acetonitrila). O gradiente utilizado foi: 0 minutos 5% de B; 55 minutos 95% de B; 58 minutos 5% de B e 60 minutos 5% de B, fluxo de 1 mL/min, 30°C. O padrão de ácido anarcádico foi utilizado na concentração de 7 mg/mL em metanol injetado 30 µL. Tempo de execução total de 60 minutos.

### 6.2.8 DPPH

Foi testada a atividade sequestrante de radicais livres dos extratos etanólicos das folhas de *Anacardium occidentale* L e *Anacardium microcarpum* D, utilizando-se o modelo fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) de acordo com BRAND-WILLIAMS, (1995). O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo em 517 nanômetros. Foi preparado uma solução do extrato de concentração 64 g/L<sup>-1</sup>. Pipetou-se 500 µL dessa solução e 3,5 mL da solução etanólica de DPPH para a leitura em espectrofotômetro a 517 nm deixando descansar, ao abrigo da luz, para a leitura após 60 minutos, contra o branco. Foi utilizado o padrão Trolox com as concentrações de 25,50,75,100,125,150,175,200,225 e 250 µmol L<sup>-1</sup> para a construção da curva de calibração. A absorbância média foi utilizada para o cálculo na equação da reta da curva de calibração, obtendo-se uma concentração de extrato expressa em µmol de Trolox. Ensaio realizado no Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos, no Departamento de Tecnologia de alimentos, UFV.

### 6.2.9 ABTS

A atividade antioxidante por meio da captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS, método de capacidade antioxidante do equivalente Trolox (RE, 1999 adaptado). O método tem

como princípio a medida da capacidade em estabilizar o cátion radicalar ABTS presente na solução, que volta à forma do composto neutro ABTS. Foi preparada uma curva de calibração a partir de uma solução de 30 µL de Trolox (10,30,50,70,90,110,130,150 µmol L<sup>-1</sup>) e acrescentou-se uma solução de ABTS, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 734nm. O branco foi preparado em solução de etanol ao invés do Trolox. Os extratos foram analisados utilizando as concentrações de 8, 16, 24, 32, 40 e 48 mg/mL de etanol 80%. Ensaio realizado no Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos, no Departamento de Tecnologia de alimentos, UFV.

#### **6.2.10 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA**

As cepas bacterianas utilizadas para os ensaios eram multirresistentes de no mínimo 3 classes de antimicrobianos, oriundas de fluídos corporais (sangue, escarro ou urina) de pacientes do Hospital Geral da cidade de Palmas, Estado do Tocantins, colhidas no ano de 2015 pelo Laboratório do Centro de Medicina Diagnóstica, unidade Hospital Geral de Palmas-TO e em seguida foram estocadas no laboratório de Microbiologia da UFT em glicerol a -80°C, para posteriores análises. As espécies escolhidas foram: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. As espécies foram identificadas e confirmadas pelo kit de identificação bioquímica de enterobactérias Bactray 1,2,3 da empresa Laborclim, e o perfil antimicrobiano identificado pelo método de Bauer & Kirby, (1966) de difusão de discos, em cooperação com o Laboratório do Centro de Medicina Diagnóstica, unidade Hospital Geral de Palmas, Palmas - TO.

Esses microrganismos foram coletados para investigação de bactérias multirresistentes, causadoras de infecções hospitalares, com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFT, campus de Palmas-TO, processo número 247/2013. As mesmas foram armazenadas em freezer a -80°C, no laboratório de Células da mesma instituição.

Cada cepa foi inoculada em 9 mL de solução fisiológica estéril de modo a se obter uma concentração de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (escala 0.5 MacFarland).

Os extratos de caju e cajuí foram diluídos em 5% de DMSO (dimetilsulfóxido) e água destilada estéril em várias concentrações, 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 mg/mL.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços para análise da concentração inibitória mínima dos extratos (Figura 3). Nos orifícios horizontais da microplaca foram transferidos 100 µL de caldo Mueller Hinton, no poço 2 foram transferidos 100 µL do extrato de cada planta e homogeneizados. Em seguida, 100 µL dessa suspensão foram transferidos ao próximo poço, assim sucessivamente até atingir o nono poço; 20 µL da solução bacteriana foi transferido em cada poço que contém a suspensão (1-9) e foram incubados a 37°C por 24 h. No orifício 10 foram adicionados 100µL da solução do agente antimicrobiano (polimixina B; imipenen) utilizados como controle negativo, e no poço 1 adicionou-se 100 µL de Caldo Mueller Hinton e a cepa (controle positivo), tudo em triplicata. Na vertical da microplaca foi testada cada espécie bacteriana (Figura 3). Os resultados foram avaliados em leitora de Elisa no comprimento de onda de 450 a 650 nm. Para evidenciá-las, foi utilizada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v) (SUFFREDINI et al., 2007).

A concentração bactericida mínima foi confirmada no poço com menor concentração do extrato, no qual não foi evidenciado o crescimento bacteriano pela resazurina sódica a 0,05%. Ensaio realizado no laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Tocantins, Palmas.

Após essa análise foi realizado um teste modulatório utilizando os antimicrobianos: tetraciclina, ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina com clavulanato, cefoxitina e cefalotina, nas quais as cepas testadas eram resistentes. A concentração inibitória determinada foi utilizada para os testes. Em cada disco de antimicrobiano foi colocado 10 µL do extrato, em uma concentração subinibitória na escala de 1/10, utilizando a técnica de antibiograma por difusão de discos.

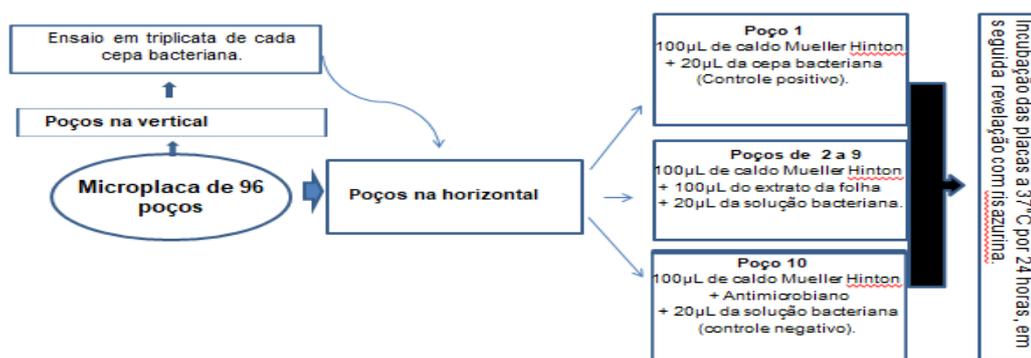


Figura 3. Desenho experimental do ensaiomicrobiológico em microplaca de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima de *A. occidentale* L.e *A. microcarpum* D. em cepas multirresistentes.

### 6.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram utilizados os programas estatísticos SPSS 20 e Graph Pad Prism 5 para os testes de normalidade foi utilizado Shapiro-Wilk e as comparações entre três variáveis independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA), e no pós teste Tukey para detectar as diferenças entre os grupos, considerando significativo quando  $p < 0,05$ .

### 6.4 RESULTADOS

#### 6.4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Após a extração obteve-se extratos secos com rendimentos de 25,6% de *A. occidentale* (159,7 gramas de folhas secas e 41 gramas de extrato seco), e 19,3% de *A. microcarpum* (136,4 gramas de folhas secas e 26,4 gramas de extrato seco). Com as folhas secas trituradas e o extrato seco foram determinados os valores da composição centesimal (Tabela 1).

Tabela 1. Determinação da composição centesimal da matéria seca (média e desvio padrão) das folhas e do extrato etanólico seco de *A. occidentale* e *A. microcarpum*.

Composição centesimal	<i>A. occidentale</i> Folhas secas	<i>A. microcarpum</i> Folhas secas	<i>A. occidentale</i> Extrato	<i>A. microcarpum</i> Extrato
	% Média e desvio padrão			
Lípidios	1,60±0,25	1,10±0,19	**2,73±0,17	**7,49±0,13
Proteínas	*6,30±0,18	*7,92±0,50	1,85±0,009	1,98±0,01
Cinzas	*2,56±0,018	*1,75±0,03	**0,84±0,08	**0,40±0,02
Umidade	*9,51±0,17	*10,14±0,12	**4,20±0,19	**5,87±0,07
Carboidratos	80,03±0,60	79,09±0,55	**90,38±0,12	**84,26±0,24
Total	100	100	100	100

\* valor de  $p < 0,05$  entres as folhas e \*\* valor dep  $< 0,05$  entre os extratos. Teste de Anova One e Tukey.

## 6.4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os ensaios deste estudo apresentaram compostos fenólicos como flavonoides, taninos, triterpenos, saponinas, alcaloides, cumarinas, antraquinonas, além de óleos essenciais (Tabela 2; Figura 4).

Tabela 2. Prospecção fitoquímica utilizando cromatografia de camada delgada dos extratos brutos de folhas de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D.

Compostos	<i>A. occidentale</i>	<i>A. microcarpum</i>
Flavonoides	+	+
Taninos	+	+
Triterpenos	+	+
Saponinas	+	+
Alcalóides	-	-
Óleos essenciais	+	+
Cumarinas	-	-
Antraquinonas	-	-

+ presença; - ausência.

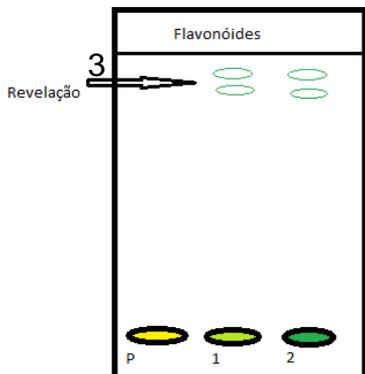


Figura 4. Representação da revelação da cromatografia de camada delgada de flavonóides. Padrão (P) de flavonóides, (1) extrato de *A. occidentale* L, (2) extrato de *A. microcarpum* D. 3 - Revelação dos extratos observada em U.V. 254 nm com tons amarelo e verde, após aspensão com  $AlCl_3$ .

### 6.4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS

As absorbâncias das soluções de ácido gálico foram plotados em um gráfico para produzir uma curva de calibração. O conteúdo de compostos fenólicos foi de 2,32 mg EAG  $g^{-1}$  de extrato e de *A. Occidentale* L 1,64 mg EAG  $g^{-1}$  de extrato de *A. microcarpum* D.

Foi construída uma curva de calibração de rutina e as concentrações encontradas em 1 mL de amostra de compostos flavonoides foram de *A. occidentale* 0,34 mg ER g<sup>-1</sup> de extrato e *A. microcarpum* 0,29 mg ER g<sup>-1</sup> de extrato.

#### 6.4.3 ANÁLISE DO ÁCIDO ANARCÁDICO POR HPLC

Na análise através da cromatografia de alta eficiência não foi encontrado ácido anacárdico nos extratos de folha de *A. occidentale* (caju) e de *A. microcarpum* (cajuí) (figura 5). A seta 1 da figura c representa um composto encontrado apenas no extrato de *A. microcarpum*, ainda não identificado.

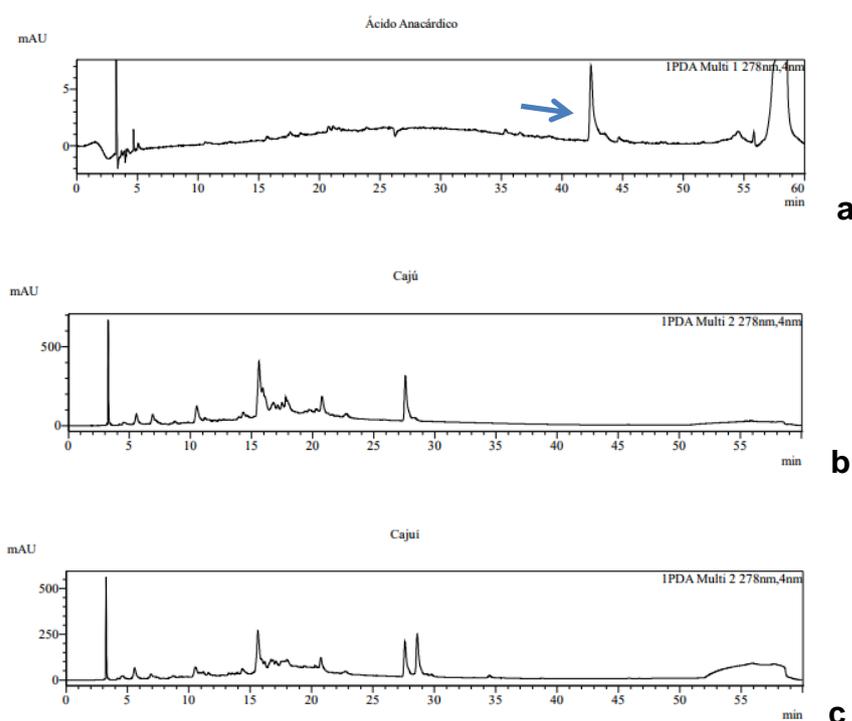


Figura 5. Cromatograma obtidos por HPLC do padrão de ácido anacárdico, retenção na seta, (a) e dos extratos etanólicos de folhas de *A. occidentale* (b) e *A. microcarpum* (c).

#### 6.4.4 CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA

Foram encontrados 2,15 µmol de trolox por miligrama de extrato de *A. occidentale* e 2,01 µmol de trolox por mg de extrato de *A. microcarpum*. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) quanto à capacidade de sequestro entre as amostras. Pelo método de ABTS a captura do radical 2,2 azino-bis

equivalente ao Trolox apresentou também resultados que não diferem entre os extratos,  $p > 0,05$  (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão de DPPH e ABTS encontrados para os extratos de folhas de caju e de cajuí expressos em  $\mu\text{mol}$  de trolox/ mg de extrato.

Ensaio	<i>A. occidentale</i>	<i>A. microcarpum</i>
	$\mu\text{mol}$ de Trolox/mg	
DPPH	*2,15 $\pm$ 0,086	*2,01 $\pm$ 0,037
ABTS	3,02 $\pm$ 0,16	3,25 $\pm$ 0,17

\* Diferença significativa entre as espécies. **Teste T- paramétrico.**

#### 6.4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Na Tabela 4 demonstra-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em miligramas por mililitros (mg/mL) de cepas bacterianas multirresistentes a partir de extratos etanólicos de folhas de *A. occidentale* e *A. microcarpum*. Em microplaca de 96 poços foi determinado a concentração inibitória mínima dos extratos etanólicos de folhas de *A. occidentale* e *A. microcarpum* (Figura 6). A cepa de *Staphylococcus aureus* foi a que apresentou a melhor sensibilidade com concentração inibitória mínima dos extratos de 1,56 mg/mL para o *A. occidentale* e 0,78 mg/mL para o *A. microcarpum*. As cepas de *K. pneumoniae* e *S. marcescens* apresentaram a menor sensibilidade, apresentando inibição na concentração de 100 mg/mL de *A. occidentale* e 50 mg/mL *A. microcarpum*.

Tabela 4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL de cepas bacterianas multirresistentes, através da concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC, utilizando extratos etanólicos de folhas de *A. occidentale* e *A. microcarpum*.

Bactéria $1,5 \times 10^8$ UFC	<i>A. occidentale</i> CIM mg/mL	<i>A. microcarpum</i> / CIM mg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	50
<i>Serratia marcescens</i>	100	50
<i>Escherichia coli</i>	12,5	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,25	12,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,12	3,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,56	0,78

UFC = unidades formadoras de colônia; CIM = concentração inibitória mínima.

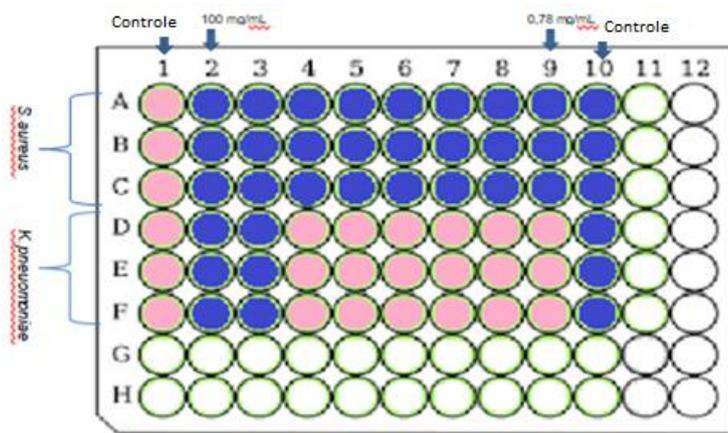


Figura 6. Desenho esquemático dos resultados do extrato de *A. microcarpum* das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, com revelador risazurina sódica. Poços em cor rosa presença de células bacterianas viáveis e poços azuis negativos. Poço 1 controle positivo, poço 2 maior concentração de extrato e poço 10 controle negativo (com antimicrobiano).

O ensaio de modulação utilizando os discos de tetraciclina, ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina com clavulanato, cefalotina não apresentou halo de inibição em nenhum dos extratos.

## 6.5 DISCUSSÃO

Os extratos etanólicos PA das folhas do *Anacardium occidentale* e do *Anacardium microcarpum*, demonstraram capacidade de combater radicais livres e às bactérias multirresistentes *in vitro* e não foram encontrados outros estudos com as características e ensaios aqui desenvolvidos.

Determinar a composição química das folhas secas e do extrato possibilitou verificar quais são as diferenças entre a matéria prima e os compostos pós extração. Nesse sentido o ensaio com as folhas secas de *A. occidentale* e *A. microcarpum* apresentou semelhanças na composição centesimal entre as proteínas e umidade, com maior percentual para *A. microcarpum*, por outro lado percentual de carboidratos foi superior e isso se deve provavelmente à presença de compostos insolúveis em água como a celulose e hemicelulose e também outros solúveis.

O extrato de *A. microcarpum* apresentou maior percentual de lipídios, proteínas e umidade, comparado ao extrato de *A. occidentale*,

provavelmente pela presença dos óleos essenciais que foram identificados através da Cromatografia de Camada Delgada. A análise centesimal desses extratos demonstra a importância da análise do produto vegetal fornecendo de forma grosseira a proporção de grupos químicos em 100 gramas do extrato, o que possibilita verificar a riqueza e o valor calórico, determinando a segurança alimentar e nutricional (LUZIA et al., 2010). Essas diferenças entre as folhas e os extratos se correlacionam ao processo de extração, o tipo do solvente, origem e variedade das espécies. Outro estudo de folhas de *A. occidentale* e de *A. microcarpum* não foi encontrado, no entanto para efeito de comparação entre partes do cajueiro ALVES et al., (2013) utilizaram o pseudofruto do Estado de Goiás encontraram proteína 1,5%, lipídio 0,5%, carboidrato 14% e umidade de 84%. MELO et al., (1998) fizeram a composição da amêndoa da castanha de caju crua e encontraram média de 23% de proteínas, 48% de lipídios, 2,45% de cinzas, 25% de carboidratos e umidade de 5%, sendo este último o único parâmetro químico semelhante às folhas desse estudo.

A detecção de compostos do metabolismo secundário dos vegetais proporciona o entendimento da atividade dos extratos de caju e de cajui nos ensaios propostos. Na prospecção fitoquímica dos dois extratos foram encontrados compostos bioativos flavonoides, taninos, triterpenos, saponinas e óleos essenciais confirmado por AGUILAR et al., (2012) que a partir do extrato etanólico (70%) de folhas de *Anacardium occidentale* encontraram compostos taninos, flavonoides, triterpenos, cumarinas e saponinas. O solvente, a polaridade e a sazonalidade podem justificar o fato de não termos encontrado cumarinas, especialmente quando das variações de acordo com a intensidade de luz. Dependendo da formação do órgão vegetal, folhas jovens, flores, raízes, também pode haver diferentes formações de cumarinas (CZELUSNIAK et al., 2012).

Os flavonoides e taninos apresentam características terapêuticas e profiláticas para diversas patologias e a presença desses metabólitos pode favorecer a digestão dos nutrientes, o funcionamento orgânico do corpo, ativar a capacidade antioxidante e modificar a síntese de eicosanoides, com resposta anti-inflamatória (AGUILAR et al., 2012), etêm sido amplamente

correlacionados positivamente no tratamento de doenças cardiovasculares devido às suas propriedades anti-hipertensivas (XU et al., 2011), especialmente os taninos possuem ações antimicrobianas (ARAÚJO, 2008).

As saponinas são glicosídeos de esteroides que possuem a capacidade de complexar com esteróides, utilizadas para explicar a ação microbicida e hipocolesteremiante (SILVA & ALMEIDA, 2013), o que nos leva a crer que a combinação desses compostos, nos extratos, pode ser o que tornou eficiente os ensaios antioxidante e antimicrobiano.

A quantidade e a natureza desses constituintes ativos não são constantes durante o ano. Há variações sazonais, ciclo dia/noite, no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, entre outros (NETO & LOPES, 2007). Outros parâmetros como o desenvolvimento da planta, incluindo desenvolvimento foliar, surgimento de novos órgãos, processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, temperatura, altitude, índice pluviométrico, radiação UV, composição da poluição atmosférica, disponibilidade de nutrientes e água no solo, herbivoria e ataque de patógenos, influenciam na produção dos fitoquímicos (CZELUSNIAK et al., 2012).

A análise de outras partes do vegetal, com finalidade comparativa entre as partes da planta, são importantes para o conhecimento associado aos metabólitos identificados, sendo assim BARBOSA-FILHO et al., (2015) utilizaram extrato etanólico, frações com acetato de etila e metanólico das cascas do caule do *Anacardium microcarpum* detectaram fenólicos, flavonas, flavonoides, chalconas, xantonas, alcaloides, flavanonas, auronas e taninos, semelhante ao que foi encontrado nas folhas, o que reforça a importância do uso das várias partes da espécie para aproveitar os compostos bioativos como matéria prima para a produção de medicamentos.

As concentrações de fenólicos totais e flavonoides das folhas de *A. occidentale* foram diferentes em relação ao *A. microcarpum*, porém foram observados que possuem capacidade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* semelhante. Os compostos polifenólicos têm como mecanismo de prevenção

a reparação aos danos oxidativos e supressão da resposta inflamatória e a proteção das moléculas, assim é esperado que em diferentes doenças, o uso dessas substâncias previna e iniba a ação dos radicais livres e possuam ação microbicida (DORNAS et al., 2007).

Em outros estudos com as folhas de *A. occidentale* foram encontradas concentrações diferentes e maiores dos compostos acima mencionados. NUGROHO et al., (2013) encontraram 19,78 de fenólicos totais EAG/100g, utilizaram etanol 70% como extrator, para os flavonoides encontraram 1,97 ER/100 g (equivalente rutina a cada 100 gramas). TAN & CHAN, (2014) utilizaram o extrato metanólico das folhas, na Malásia, e obtiveram 3.890 mgEAG/100 g, de fenólicos totais. Os metabólitos das plantas são produzidos conforme suas exigências e sazonalidade, para tanto é normal encontrar a apresentação de resultados diversos, também é fundamental destacar que a execução de diferentes protocolos e de processos de extração altera a concentração.

No HPLC não foi detectado o ácido anacárdico nas folhas dos extratos etanólicos. Estudos complementares são necessários, com outros solventes extratores, para melhor elucidar esse resultado. O ácido anacárdico é um potente agente antioxidante, eliminador de espécies reativas de oxigênio (ROS) inibindo a xantina oxidase e também age como inibidores de lipoxigenase (KUBO et al., 2006; MORAIS et. al., 2010). A ausência do ácido anacárdico sugere-se que a ação antioxidante *in vitro* encontrada se dá pela presença de outros fenólicos como os flavonoides e os taninos, que também são compostos potentes.

Os extratos apresentaram efetiva atividade na varredura dos radicais DPPH e ABTS, é provável que este resultado esteja correlacionado com a quantidade de compostos fenólicos, resultado que foi menor que o do estudo de AJILEYE et al., (2015) em um ensaio de DPPH com extrato e frações de folhas de *A. occidentale*, encontraram a maior eficiência, entre as frações testadas, a acetato de etila, IC50 = 5,66 (concentração de antioxidante necessária para inibir 50% do radical). Pode-se verificar, a partir desses ensaios, que a utilização de extrato das folhas e frações, utilizando

etanol PA e outros solventes extratores demonstram capacidade efetiva no combate a oxidação.

O cajueiro produz compostos secundários e ações terapêuticas em todas as partes, sendo assim, para efeito comparativo um estudo de ALVES et al., (2013) a partir de extratos acetônicos de pseudofrutos do *A. occidentale* em três cidades do Estado de Goiás encontrou atividade antioxidante pelo DPPH em média de 22,7 mg EAG fruto.g<sup>-1</sup>, demonstrando atividades diferentes do fruto nas cidades analisadas. Em outro estudo realizado por MELO et al., (2008) os extratos acetônicos de *A. occidentale* exibiram uma forte capacidade de seqüestrar o radical DPPH (superior a 70%). MOO-HUCHIN et al., (2014) confirmam essas ações antioxidantes *in vitro* pelo DPPH e o ABTS, encontrando para o caju amarelo e vermelho, respectivamente 3.322 e 3050 µmol equivalente Trolox para ABTS e 1579 e 1593 µmol equivalente Trolox. A diversidade dos protocolos adotados por outros autores gera muitas variações nos resultados.

A multirresistência bacteriana está cada vez mais acentuada, principalmente em ambientes hospitalares e visto que as cepas desse estudo são multirresistentes é importante a busca de uma alternativa terapêutica (BAPTISTA et al., 2018). O ensaio microbiológico demonstrou a eficiência microbicida dos extratos, com destaque para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* que apresentaram a melhor sensibilidade frente aos extratos com os menores valores da concentração inibitória mínima, o que possivelmente justifica-se pela presença de compostos do metabolismo secundário capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento bacteriano. A ação microbicida dos extratos foi mais eficiente na cepa de *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram positiva que possui parede celular simples, com peptidoglicano espesso, característica que pode justificar essa melhor ação quando comparada às outras cepas testadas que são Gram negativas, nas quais possuem a parede com peptidoglicano delgado, porém com outros componentes que a tornam mais complexa, fatores que dificultam a ação dos metabólitos antimicrobianos (FORSYTHE, 2013).

Esse resultado foi confirmado no ensaio de AGUILAR et al., (2012), com extrato das folhas de *Anacardium occidentale*, a partir da técnica de difusão de discos, onde demonstraram a presença de halos apenas para o *Staphylococcus aureus*, nas três concentrações testadas: 50, 100 e 200 mg/mL.

Os Taninos identificados nos extratos de folhas de *A. occidentale* e de *A. microcarpum* também podem ser um dos fitoquímicos que favoreceram a ação microbicida, o que foi verificado por PEREIRA et al., (2015) quando isolaram substâncias tânicas do caule do cajueiro e determinaram a concentração inibitória mínima sobre amostras de *Staphylococcus aureus*, encontrando 3,125 µg/ml, com a utilização do metabólito concentrado. A justificativa de terem encontrado valores de concentração inferiores aos que foram encontrados neste estudo pode ser devido ao ensaio utilizado com metabólito isolado, proporcionando ação mais eficiente com uma menor concentração.

## 6.6 CONCLUSÕES

O rastreamento dos metabólitos secundários de origem vegetal é importante para elucidar os benefícios e toxicidade dos vegetais. Nossos extratos etanólicos de folhas de *A. occidentale* (caju) e *A. microcarpum* (cajuí) apresentaram compostos polifenólicos, flavonóides e taninos, que possuem diversas funções benéficas, dentre elas as ações antioxidantes, aqui encontradas nos dois extratos, *in vitro*, pelos testes de DPPH e ABTS. Os ensaios microbiológicos dos extratos foram eficazes para demonstrar ação microbicida frente à cepas multirresistentes. Com base nesses resultados pode-se considerar que os extratos das folhas do *A. occidentale* e do *A. microcarpum* sugerem ser boas fontes de compostos fitoterápicos com ações antioxidante e antimicrobiana, de forma profilática e terapêutica.

## 6.7 REFERÊNCIAS

Aguilar, C., et al Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 4, p. 320-329, 2012.

Ajileye, O., et al. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 244–252, 2015.

Alves, M.; Alves, A.M.; Naves, M.M.V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 327-31, 2013.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington, D.C., 1990. 1298 p.

Araújo, T.A.S. Taninos e flavonoides em plantas medicinais da caatinga: um estudo de etnobotânica quantitativa, 2008. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

Baptista, A.B., et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C). A systematic review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, Article ID 3753562, p. 1-13, 2018.

Barbosa – Filho, P.V.M., et al. Phytochemicals and modulatory effects of *Anacardium microcarpum*(cajui) on antibiotic drugs used in clinical infections. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, 2015.

Boroski, M., et al. **Antioxidantes. Princípios e métodos analíticos**. 2015. 1ª edição, Editora Appris.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

Carbajal, A.C.R. & Silva Júnior, N. Sebrae-CE/Embrapa, Fortaleza. **Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade**. **Agroindústria Tropical**, 2003,16p.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chem, J. 2002. Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.

Chun-Sook, C., et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

Czelusniak, K.E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai..**, Botucatu , v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

Degani, A.LG. et al. Cromatografia. Um breve ensaio. **Química nova na escola**. Cromatografia, v. 7, MAIO, 1998.

Dornas, W.C.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

Duarte, M.G.R. Farmacoquímica de plantas invasoras de uso medicinal. Estudos farmacoquímicos de espécies de Polygonum: *P. hydropiperoides* Mich., *P. spectabile* Mart. e *P. acuminatum*, H.B.K. Belo Horizonte, 82p. 1995. **Monografia de Especialização** - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais..

Duarte, M.G.R. Plantas Invasoras Medicinai: Triagem de espécies dos gêneros Cuphea, Desmodium, Polygonum e Sida para atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico biomonitorado de *Polygonum spectabile* Mart. Belo Horizonte, 195 p. 2001. **Dissertação de Mestrado** - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais..

Forsythe, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

Ginovyan, M.; Petrosyan, M.; Trchounian, A. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. **BMC Complement Alternative Medicine**, v. 17, n. 50, p. 2-9, 2017.

Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. Sao Paulo, 1985.

Johnson, M.J. & Ackers, G K. **Methods in Enzymology**, v. 323, p. 1-545, 2000.

Kubo, I., et al., Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 555–562, 2006.

Luiz-Ferreira, A., et al. Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agente. A scientific approach to the traditional knowledge. **Fitoterapia**, v. 79, p. 207–209, 2008.

Luzia, Débora M. M.; Bertanha, Bruna J.; Jorge, Neuza. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 175-80, 2010.

Marini-Bettolo, G.B., et al. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. **Journal of Chromatography**, v. 213, p. 113-127, 1981.

Martinez-Valverde, I.; Periago, M.J.; Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

Melo, E.A. et al. Capacidade antioxidante de frutas, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

Melo, M.L.P., et al. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) crua e tostada. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 184-187, 1998.

Moo-Huchin, V.M., et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico, **Food Chemistry**, v.166, n. 1, p.17-22, 2014.

Morais, T.C., et al. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 264–269, 2010.

Neto, L.G. & Lopes, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

Nugroho, A.E.; Malik, A.; Pramono, S. Total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antihypertension activity of purified extract of Indonesian cashew leaf. **International Food Research Journal**, v. 20, n.1, p. 299-305, 2013.

Pereira, A.V., et al. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 36, n.1, p. 121-127, 2015.

Perez-Jimenez, J., et al. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: Na application of the phenol-explorer database. **Journal of agricultural and food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4959-4969, 2010.

Pinho, L., et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

Silva, A.E.S. & Almeida, S.S.M.S. Análise fitoquímica das cascas do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale* L. – Anacardiaceae). **Estação Científica**, v. 3, n. 2 ,p. 81-88, 2013.

Souza, C.M.P., et al. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v. 15, n. 2, p.188-193, 2013.

Souza, N. Propriedades anti-inflamatória e antioxidantes dos extratos aquosos das folhas de *Turnera subulata* SM e *Anacardium occidentale* L. **Dissertação de Mestrado** –UFRN. Centro de Biociências, 2017.

Stahl, E. **Analyse chromatographique et microscopique des drogues**. Paris: Tech. Et Doc. 1971.

Suffedrini, I.B.; Varella, A.D.; Yones, R.N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 25, n.2, p.127-9, 2007.

Tan, Y., & Chan, E. Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*. **Food Bioscience**, v. 6, p. 617–23, 2014.

Trevisan, M.T.S., et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 188–197, 2006.

Wagner, H., Bladt, S. 1996. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer.

Xu, Y.J., et al. Health benefits of sea buckthorn for the prevention of cardiovascular diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 2-12, 2011.

### **7. ARTIGO 3. Atividade antioxidante, análises bioquímicas e histopatológica de folhas de *A. occidentale* L.e *A. microcarpum* D.em camundongos *knockout* para interleucina 10.**

Anderson Barbosa Baptista; Reggiani Vilela Gonçalves; Mariaurea M. Sarandy Souza; Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

#### **RESUMO**

O *Anacardium occidentale* L (caju) e o *Anacardium microcarpum*D (cajuí) são característicos do norte e nordeste brasileiros. Possuem compostos fitoquímicos valiosos com ação antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. O objetivo desse estudo foi analisar as atividades antioxidante, bioquímica, anti-inflamatória e histopatológica dos extratos etanólicos de folhas de *Anacardium occidentale*L e *Anacardium microcarpum*D em camundongos *knockout* para IL-10.No ensaio biológico foram utilizados 36 camundongos *Knockout* para IL10, divididos em seis grupos: controle negativo, controle recebendo os dois extratos, injuriados com paracetamol sem extrato e injuriados tratados com os dois extratos.Foram feitas as análises do estresse oxidativo no fígado por meio das metodologias das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase e proteína carbonilada. No soro sanguíneo foram analisados os marcadores bioquímicos alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama GT, colesterol total e triglicérides. No sangue foi realizada contagem diferencial dos leucócitos. As análises histopatológicas do fígado avaliaram aumento nuclear; congestão sinusóide; esteatose; infiltrado inflamatório; colestase e vacuolização do citoplasma. Na análise do macerado de fígado os dois extratos apresentaram atividade antioxidativa, porém o *A. microcarpum*D se mostrou mais eficiente nos camundongos tratados após a injúria. A análise histopatológica do fígado confirma esses resultados demonstrando diminuição do infiltrado inflamatório e da colestase nos camundongos tratados. Os extratos demonstraram atividade antioxidante e anti-inflamatória, destacando o *A. microcarpum*. Esses resultados sugerem que os extratos

podem ser utilizados para testes clínicos com a finalidade de avaliar adiminuição do estresse oxidativo e a evolução dos processos inflamatórios.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Camundongos *Knockout*-IL10; Fígado; *Anacardium occidentale*L.; *Anacardium microcarpum* D.

## **ABSTRACT**

*Anacardium occidentale* (cashew) and *Anacardium microcarpum* (cajuí) are native to northern and northeastern Brazil. They have valuable phytochemical compounds that have antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial action. The aim of the study was to analyze the antioxidant, biochemical and histopathological activities of the ethanolic extracts of *Anacardium occidentale* and *Anacardium microcarpum* in IL-10 knockout mice. In the biological assay, 36 IL-10 *knockout* mice were used and oxidative stress tests were performed on the liver and brain of the animals using thiobarbituric acid (TBARS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase and carbonylated protein. In the blood serum, the biochemical markers ALT, AST, alkaline phosphatase, GT range, total cholesterol and triglycerides were analyzed. In the liver of these animals, histopathological analysis was also performed. In the *in vivo* analysis in liver maceration of IL-10 *knockout* mice, the two extracts showed antioxidative activity, but *A. microcarpum* was more efficient in the mice treated after the injury with paracetamol, in all the analysis of oxidative stress. Histopathological analysis of the liver confirms these results showing a decrease in inflammatory infiltrate and cholestasis in the treated mice. Extract from the leaves of *A. microcarpum* was more efficient in reducing the oxidative stress in the mice that were injured. Histopathology confirms the reduction of the inflammatory infiltrate and cholestasis in the treated mice. The extracts showed antioxidant and anti-inflammatory activity, especially *A. microcarpum*. These results suggest that the extracts can be used for clinical tests with the purpose of evaluating the reduction of oxidative stress and the evolution of inflammatory processes.

**Keywords:** Oxidative stress; IL-10 *Knockout* Mice; Liver; *Anacardium occidentale*L.; *Anacardium microcarpum* D.

## 7.1 INTRODUÇÃO

O *Anacardium occidentale* L (cajueiro) é o mais comum no Brasil, especialmente nas regiões norte e nordeste. O *Anacardium microcarpum* D também encontrado nessas regiões é amplamente utilizado na medicina tradicional para o tratamento de inflamação, reumatismo, tumores e doenças infecciosas. Duas espécies ricas que podem conter agentes antioxidantes que modificam os estados de oxidação das células (BAPTISTA et al. 2018).

O estresse oxidativo é o termo usado para designar o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os antioxidantes, associadas em sua maioria, a função mitocondrial e respiração celular, que podem causar alterações oxidativas irreversíveis, danos aos lipídios, proteínas e ao DNA (BROINIZI et al. 2008).

O organismo humano como forma profilática das patologias citadas possui sistemas antioxidantes enzimáticos representados pela superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase. Aqueles que não são enzimáticos incluem os compostos fenólicos (flavonoides e taninos), vitaminas e minerais, que em condições fisiológicas normais estão em equilíbrio entre as atividades orgânicas e os níveis destes antioxidantes (VALKO, 2007).

O fígado é um órgão vital responsável pela biotransformação e eliminação de compostos químicos que desempenha várias funções (GUYTON & HALL, 2002). A exposição do órgão a fármacos e outros compostos ambientais que superem o seu metabolismo levam o órgão a injúria, verificado pela mudança nos valores enzimáticos da alanina transaminase (ALT) e da aspartato transaminase (AST), e colestático com o aumento das bilirrubinas, da fosfatase alcalina e da gama glutamil transferase (GGT) (CARVALHO, 2009). Como hipótese desse estudo inferimos que os extratos das folhas de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D possuem atividade antioxidante *in vitro* em animais *knockout* para IL-10 contribuindo para diminuição do processo inflamatório e oxidativo. O objetivo do estudo foi caracterizar e analisar a atividade antioxidante *in vivo* dos extratos etanólicos de *Anacardium occidentale* L e *Anacardium microcarpum* D em camundongos *knockout* para a IL-10.

## **7.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.2.1 MATERIAL VEGETAL**

As folhas de *A. Occidentale* L e *A. microcarpum* D foram coletadas do campus da Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO. Foram secas e trituradas em moinho de facas. Para a obtenção do extrato etanólico, o material vegetal previamente triturado foi concentrado em etanol PA, por 72h, e o sobrenadante foi retirado e reservado. Este procedimento foi replicado por três vezes consecutivas. O sobrenadante foi filtrado. Em seguida, o solvente foi destilado em evaporador rotativo a 80°C, sob pressão reduzida. O extrato etanólico foi colocado em frascos estéreis de vidro e em estufa a 40°C para completar a total evaporação do etanol. Os extratos brutos foram acondicionados em frascos, envoltos com papel alumínio e colocados em geladeira para posteriores análises. A etapa de extração foi realizada no Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde da Universidade Federal do Tocantins – UFT, na cidade de Palmas, TO.

### **7.2.1 ENSAIO COM ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados camundongos machos, com 60 dias, *Knockout* para IL 10, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UFAL), Alfenas, Minas Gerais. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura média de  $22 \pm 2$  °C. Os mesmos receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais nº23101.001539/2017-08 CEUA-UFT e os animais foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O tamanho amostral, foi de 6 animais por grupo, totalizando um n= 36. (GIRISH et al., 2009; SCHEIBE et al., 2008; DAMY SB et al., 2010). Foram divididos em seis grupos experimentais: controle negativo, que recebeu apenas água e ração (G1); controle com gavagem do extrato de *A.occidentale* (G2); controle com gavagem do extrato de *A.microcarpum* (G3); paracetamol (G4); paracetamol+extrato de *A. occidentale* (G5); paracetamol + extrato de *A. microcarpum* (G6) (Figura 7). Os animais de

cada grupo receberam diariamente 100 µL de solução contendo água destilada ou extrato das folhas de *A. occidentale* ou *A. microcarpum*, via gavagem. Os extratos secos foram ressuspensos em água destilada estéril, agitados em vórtex e ultrassom até a dissolução total. Foi utilizado 400 mg de extrato por kg do camundongo e receberam através de gavagem por 30 dias (LUCENA et al., 2006; BROINIZI et al., 2008)

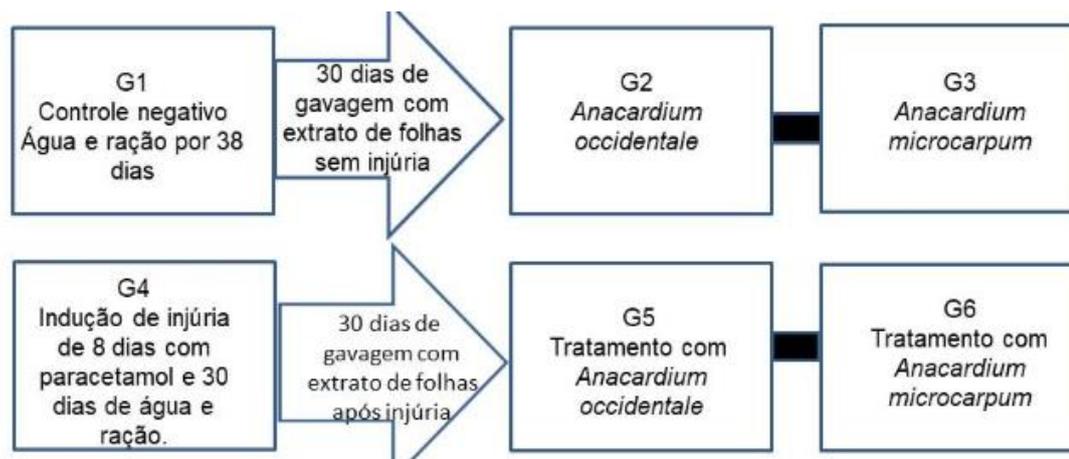


Figura 7. Seis grupos experimentais de camundongos *knockout* IL 10, G1 controle negativo, G2 sem injúria, gavagem de extrato de *A. occidentale*, G3 sem injúria, gavagem de extrato de *A. microcarpum*, G4 indução através do paracetamol, G5 após injúria, tratamento com extrato de *A. occidentale* e G6 após injúria, tratamento com *A. microcarpum*.

Para a indução do estresse foi utilizado paracetamol 500 mg/Kg do animal, da marca Tylenol durante 8 dias consecutivos, em 0,1 mL através de gavagem. Após a indução, no nono dia começou-se o tratamento com os extratos brutos de folhas de *A. occidentale* L e *A. microcarpum*D, por um período de 30 dias (GIRISH et al., 2009).

Os camundongos foram eutanasiados através de inalação com isoflurano a 5%. O sangue obtido de coleta retroorbital (10 µL) foi colocado em lâminas e imediatamente produzido o esfregaço, e em ependorf (2 mL) para os exames bioquímicos. Realizou-se deslocamento da coluna cervical após exanguinação total e o fígado foi coletado e dividido em duas partes, uma parte para armazenamento a -80°C em ultrafreezer para posteriores análises bioquímicas e a outra parte de cada órgão foi colocado em fixador Formalina de Carson para as análises histológicas.

### **7.2.1.1 ESTRESSE OXIDATIVO - Malondialdeído (MDA); Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutaciona peroxidase; Proteína carbonilada.**

A avaliação da peroxidação lipídica pela medida da concentração de malondialdeído foi realizada segundo método de TBARS descrito por WINTERBOURN et al., (1985). Foi tomado 0,2 mL dos homogeneizados de fígado e o volume completado para 0,5 mL com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4.

A atividade da SOD foi determinada no macerado de fígado de 36 camundongos *knockout-IL 10* segundo DIETERICH et al., (2000) modificado, baseando-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido  $O_2^-$  à peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol. Basicamente, os tecidos foram homogenizados em tampão glicina (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,1) e a atividade enzimática foi estimada (duplicata) pela inibição da auto-oxidação espectrofotometricamente (480nm). Utilizou-se uma leitora de Elisa em 570nm para análise dos homogenatos.

Para determinar a atividade da Catalase no tecido hepático (100 mg), o mesmo foi homogenizado em tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> e a suspensão resultante foi centrifugada à 3000 rpm à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensuração da atividade enzimática. A atividade da catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (10 mmol.L<sup>-1</sup>) lido em espectrofotômetro a 240nm, segundo metodologia de AEBI, (1984). A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada por meio do método de LOWRY et al., (1951) e os resultados foram expressos em U Catalase/mg proteína, segundo metodologia de AEBI, (1984) adaptado.

A determinação da atividade da glutaciona peroxidase foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro (340nm), conforme descrito por FLOHÉ & GUNZLER, (1984). A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada por meio do método de LOWRY et al., (1951) e os resultados expressos U glutaciona/mg proteína.

O ensaio da proteína carbonilada foi realizada por meio de um método baseado na reação de carbonilação de proteínas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DPNH) formando dinitrofenilhidrazona, um composto de

coloração amarela detectável espectrofotometricamente em 370nm(LEVINE et al., 1990). O conteúdo de proteínas carboniladas foi calculado usando o coeficiente de extinção molar ( $21 \times 10^{31}$  mol cm) e os resultados são expressos em nanomols por miligrama (nmol/mg) de proteína. Ensaios realizados no Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Nutrição e Saúde, UFV.

### **7.2.1.2 ANÁLISE HEMATOLÓGICA–CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS**

Foram preparados esfregaços sanguíneos colocando-se 10 µL de sangue, no dia da eutanásia, imediatamente após a exanguinação, em lâminas histológica e coradas com corante Panótico da Laborclin produtos para laboratórios Ltda (KEEBLER & SOMRAK, 1993). O Panótico Rápido LB baseia-se no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky, 1891 (Panótico rápido nº 1 solução de triarilmetano a 0,1%; nº 2 solução de xantenos a 0,1%; nº 3 solução de tiazinas a 0,1%). Em cada lâmina foram escolhidos os campos com menor concentração celular para contagem dos leucócitos diferenciais (neutrófilo, linfócito, monócito, eosinófilo e basófilo), totalizando um valor absoluto de 100 células. Ensaio realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Nutrição e Saúde, UFV e Laboratório de Análises Clínicas da UFV.

### **7.2.1.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

Foram realizados testes bioquímicos utilizando-se o soro dos animais coletados em *ependorf* seco e estéril a partir da técnica de coleta sanguínea pelo plexo retrorbital, com os camundongos anestesiados. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm (870 g), por 10 minutos. Os parâmetros avaliados foram ALT (Alanina aminotransferase) AST (Aspartato aminotransferase), GGT (gama glutamil transferase), FAO (fosfatase alcalina), Colesterol total e Triglicerídeos. Foram utilizados os kits analíticos gentilmente doados pela empresa Bioclin Quibasa- Belo Horizonte-MG, no aparelho automatizado BS 200 *Chemistry Analyser*. Realizada no Laboratório de Análises Clínicas, Departamento de Nutrição e Saúde, UFV.

#### **7.2.1.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

Fragmentos do fígado foram removidos e fixados, por 24 horas, em formalina de Carson (1973) em temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol e incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin®, Leica). Secções transversais e longitudinais de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2155, Leica) com navalhas de vidro e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Foram avaliados possíveis infiltrados inflamatórios e alterações que possam indicar a toxicidade do extrato das plantas utilizadas. De cada grupo foi produzida uma lâmina, em seguida cada lâmina foi fotografada através da câmera Leica MC 170, em microscópio de luz Leica DM 750, com aumento de 20X, em 10 campos aleatórios, totalizando 60 fotos (campos) por grupo, realizada no laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Biologia Animal da UFV. Para a avaliação do tecido hepático observaram-se em cada lâmina a presença ou ausência de: aumento nuclear; congestão sinusóide; esteatose; infiltrado inflamatório; colestase e vacuolização do citoplasma (manifestação de dano celular provocando uma degeneração hidrópica ou esteatose). Análise realizada no Laboratório de Patologia Experimental, CCB2, UFV.

#### **7.3 ESTATÍSTICA**

Foram utilizados os programas estatísticos SPSS 20 e Graph Pad Prism 5 para os testes de normalidade foram utilizados *Shapiro-Wilk* e as comparações entre três variáveis independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA), para dados com distribuição normal utilizou-se no pós teste Tukey para detectar as diferenças entre os grupos. Foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

#### **7.4 RESULTADOS**

##### **7.4.1 ESTRESSE OXIDATIVO**

Nesse estudo os ensaios da reação ao ácido tiobarbitúrico em homogenato de fígado apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados após

estresse, ou seja, paracetamol e paracetamol+A. *microcarpum*; paracetamol+A. *occidentale* e paracetamol+A. *microcarpum*(Figura 8).

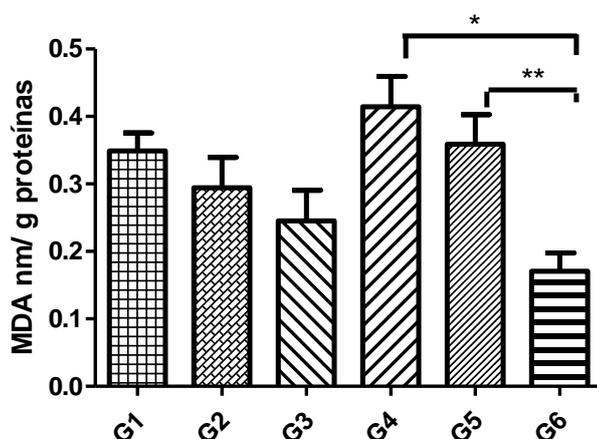


Figura 8. Resultado do ensaio de TBARS em macerado de fígado de seis grupos de camundongos *knockout* IL-10. Grupos com  $p < 0,05$ , diminuição enzimática significativa entre os grupos tratados. Teste estatístico ANOVA one way e Tukey.

No ensaio de superóxido dismutase foi observado diferença significativa entre os grupos tratados com os extratos de *A. occidentale* e *A. microcarpum*, apresentados no gráfico B da figura 9, através dos testes estatístico Anova One e Tukey. Observou-se um aumento na atividade das enzimas SOD e CAT, significativo entre grupos controle versus *A. occidentale* e paracetamol versus paracetamol+A. *microcarpum*.

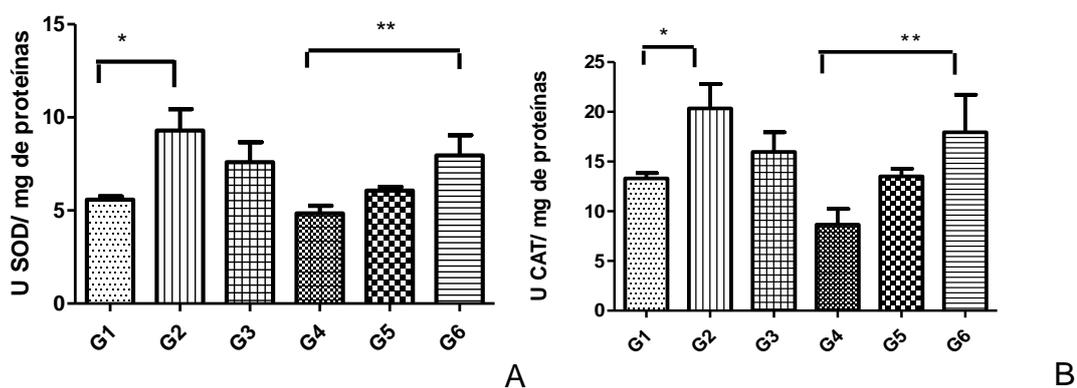


Figura 9. Resultado da avaliação da atividade de duas enzimas e metabólito do estresse oxidativo (A – SOD; B – CAT) em macerado de fígado de camundongos *knockout* IL-10. (\*/\*\* diferenças significativas entre os grupos,  $p < 0,05$ . Teste estatístico ANOVA one way e Tukey.

Na análise da glutiona peroxidase o aumento foi significativo entre os grupos paracetamol e paracetamol+A. *microcarpum* (figura 10).

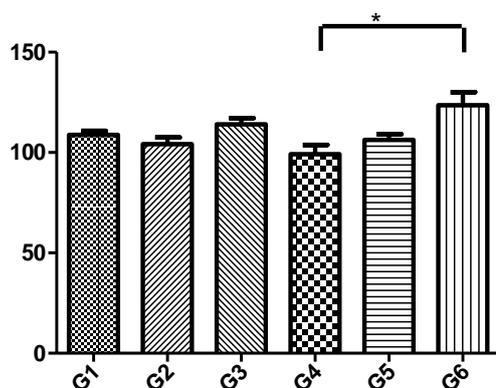


Figura 10. Resultado da avaliação da glutiona peroxidase em seis grupos de camundongos *knockout* IL-10. \*  $P < 0,05$  aumento enzimático significativo no grupo tratado. Teste estatístico ANOVA one way e Tukey.

A proteína carbonilada apresentou redução entre os grupos tratados paracetamol e paracetamol+A. *occidentale* e paracetamol + *A. microcarpum* (figura 11).

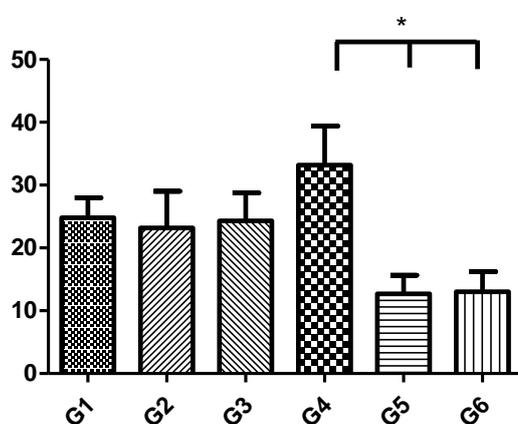


Figura 11. Resultado do ensaio de proteína carbonilada de 6 grupos de camundongos *knockout* IL 10 (\* $p < 0,05$ , redução significativa nos grupos tratados em relação paracetamol. Teste estatístico ANOVA one way e Tukey.

#### 7.4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O resultado dos parâmetros bioquímicos das enzimas hepáticas, colesterol total e triglicerídeos encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Média e desvio padrão de parâmetros bioquímicos do soro de seis grupos de camundongos *knockout* para interleucina 10.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
ALT	77,83 ±16,74	69,50 ±14,12	71,00 ±12,17	**72,60 ± 6,98	**58,00 ± 4,00	70,80 ±6,38
AST	208,20 ± 12,56	191,3 ±24,70	186,20 ±36,16	209,4 ±79,84	140,20 ±65,00	176,6,2 ±19,50
FAO	*164,40±49,9 3	*87,50 ±30,29	*66,67 ±18,93	104,40 ±32,97	84,00 ±26,68	98,50 ±19,49
GGT	35,40 ± 7,47	48,00 ±7,58	47,50 ±6,12	39,80 ±16,38	34,00 ± 12,08	41,00 ± 14,75
C.T.	110,83 ±13,69	107,20 ±20,00	107,14 ±23,29	98,33 ±17,82	85,00 ± 13,84	104,83 ±8,61
TAG	*180,33 ±23,81	*121,33 ±42,42	*110,80 ±28,17	91,40 ±11,48	93,60 ± 31,70	123,60 ±17,17

ALT – alanino aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FAO – fosfatase alcalina; TAG = triglicerídeos; GGT = gama gt; C.T. = colesterol total; Parac.= paracetamol. \*P < 0,05 significativos entre os grupos sem injúria e \*\* p < 0,05 entre os grupos com injúria. Teste estatístico ANOVA one way eTukey.

Os grupos que receberam apenas os extratos de *A. occidentale* e *A. microcarpum* apresentaram redução significativa da fosfatase alcalina, demonstrando que houve melhora na função biliar. Os camundongos tratados com *A. occidentale* apresentaram redução na ALT. A Fosfatase alcalina e os Triglicerídeos reduziram significativamente nos camundongos que receberam os dois extratos, sem injúria por paracetamol.

### 7.4.3 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

A contagem diferencial de leucócitos utilizado como valor de referência foi estabelecida por SANTOS et al., (2016) em camundongos *Swiss Webster*, C57BL/6 e BALB/c. Os valores absolutos de C57BL/6 *background* para o camundongo IL 10, por 100 células, foram: neutrófilos 8-20; eosinófilo 0-3; linfócito 76- 91; monócito 0-4 e basófilo 0 (zero). Na tabela 8 estão os resultados da contagem diferencial dos leucócitos em valores absolutos por 100 células. Foi observado, em sua maioria, que a quantidade média de monócitos por 100 células nos grupos que foram tratados com os extratos apresentaram valor entre 0 e 4, considerados normais, a partir da referência acima utilizada (Figura 12).

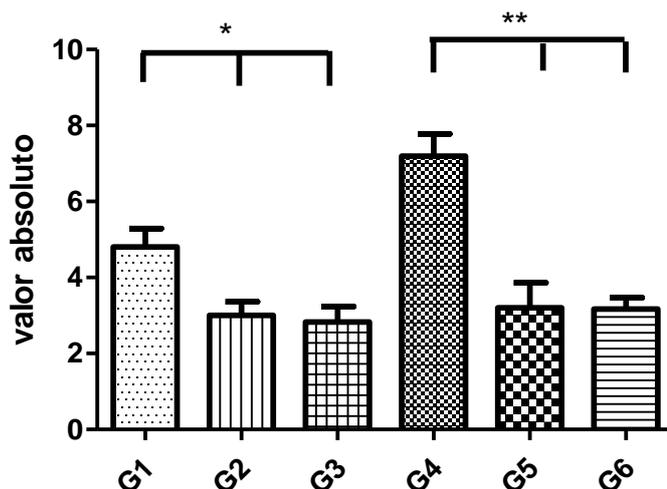


Figura 12. Valor absoluto de monócitos encontrada em seis grupos de camundongos *knockout* IL-10(\* /\*\* grupos com  $p < 0,05$ , redução significativa entre os grupos sem injúria e com injúria. Teste estatístico ANOVA One way e Tukey.

#### 7.4.4 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Na análise histopatológica do tecido hepático foram quantificados hepatócitos em vários aspectos cujo resultado está expresso na tabela 7. Nota-se que o grupo controle possui alterações hepáticas, em destaque a vacuolização do citoplasma promovida pelo acúmulo intracelular de água ou pela ocorrência de degeneração gordurosa nos hepatócitos, e o infiltrado inflamatório, justificado por serem naturalmente inflamados (Tabela 7; figura 13).

De acordo com os resultados obtidos, os camundongos do grupo controle, que receberam apenas o paracetamol, apresentaram aumento nuclear e congestão dos sinusoides bem elevados e foi o único grupo que apresentou discreta esteatose, ou seja, hepatócitos com depósito de gordura.

Tabela 7. Resultado da análise histopatológica do fígado de seis grupos de camundongos *knockout* IL-10.,

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Aum.Nuc.	*6,50±1,12	3,30±1,03	*2,00±0,89	**8,50±1,04	**2,80±0,98	**2,00±0,63
Cong.sin.	6,16±1,94	6,30±1,03	7,30±1,50	**8,70±1,36	**4,16±2,78	5,50±2,07
Infil. Infl.	*6,60±0,89	5,00±1,58	*4,16±1,47	**7,50±1,04	**4,33±0,51	**4,50±2,16

Colest.	1,83±1,16	1,00±1,26	1,50±0,83	**6,83±0,98	**0,66±0,51	**1,16±1,60
Vacul.Cit	*9,33±0,81	6,33±3,01	*5,16±3,18	6,66±1,63	7,00±2,60	6,66±2,42
Esteat.	0	0	0	1,66±2,06	0	0

Aum.Nucl.= aumento nuclear; Cong.sin.= congestão sinusóide; Inf. Infl.=infiltrado inflamatório; Colest.= colestase; Vacul. Cit. = vacuolização do citoplasma; Esteat.= esteatose; Par.= paracetamol. (\*grupos com p<0,05). \*P<0,05 entre os grupos sem injúria e \*\* p < 0,05 entre os grupos com injúria. Teste estatístico ANOVA One Way e Tukey.

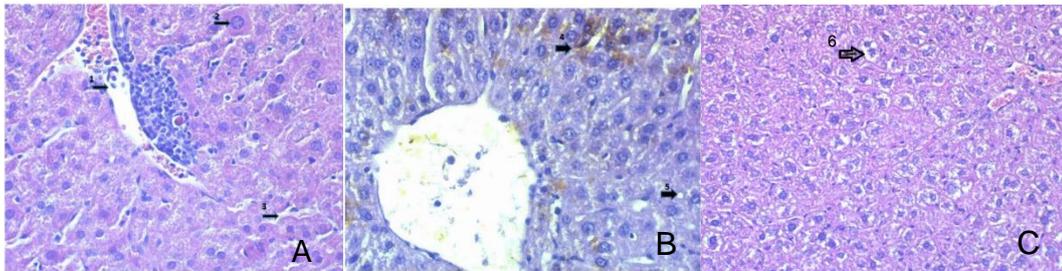


Figura 13. Microfotografia óptica de fígado de camundongos *Knockout* IL-10 submetidos à injúria por paracetamol (A, B e C), aumento de 40x, corados em hematoxilina e eosina. Setas: 1- infiltrado inflamatório; 2- Aumento nuclear; 3- congestão do sinusóide; 4 –Colestase; 5- Depósito de gordura (esteatose);6- Vacuolização do citoplasma.

## 7.5 DISCUSSÃO

Os camundongos *knockout* para interleucina 10 são animais geneticamente modificados, deficientes da interleucina 10 que desenvolvem enterocolite crônica a partir de 2 a 3 meses de idade(BOAUABE, 2012). Essa condição proporciona ao modelo uma situação inflamatória, sendo possível a análise do efeito das plantas em estudo, quanto ao aspecto inerente à capacidade antioxidativa, como também quanto à hepatotoxicidade quando da indução provocada pela administração do acetaminofeno, o paracetamol (CARVALHO, 2009).

Nossos resultados demonstraram serem efetivos na diminuição do estresse oxidativo no fígado dos camundongos que foram tratados com os extratos, após a injúria pelo paracetamol. No sistema biológico, a peroxidação lipídica gera um número de produtos de degradação, como malondialdeído (MDA), que é amplamente utilizado como um marcador de estresse oxidativo.

Considerando resultados em outras partes do *Anacardium*, para descrever ações antioxidativas pela técnica de TBARS demonstramos o estudo de BROINIZI et al. (2008) que fizeram um ensaio com extrato de pedúnculos do

caju (*Anacardium occidentale*) em ratos machos Wistar. Na análise do tecido plasmático e hepático para a determinação da peroxidação lipídica por TBARS, os resultados da lipoperoxidação mantiveram os mesmos valores para todos os grupos, sem diferença significativa. BARBOSA-FILHO et al. (2014) utilizando tratamento com frações de extratos de cascas de caule de *Anacardium microcarpum* D em encéfalos de ratos, observaram-se redução máxima de peroxidação lipídica na fração etanólica.

Os camundongos tratados com o extrato de *A. microcarpum* D no grupo injuriado, e no grupo que recebeu apenas o *A. occidentale* L resultaram em aumento nos valores de SOD e CAT, significando que os extratos nessas situações agiram na primeira linha de defesa endógena contra as EROs, resultando na diminuição do dano oxidativo. Quando essas enzimas apresentam valores aumentados comparativamente entre os grupos controle e tratado indicam que há eliminação dos radicais livres altamente reativos causadores de efeitos deletérios na integridade da membrana celular (FERNANDES, 2012).

Os extratos, provavelmente, estão relacionados com as funções protetivas desse aumento da superóxido dismutase que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e a catalase presente principalmente no fígado que degrada  $H_2O_2$  em uma molécula de oxigênio e água, evitando o acúmulo de metahemoglobina, tendo consequente função fundamental a defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio (BARBOSA, 2006).

A castanha do fruto do *Anacardium occidentale* L, como efeito comparativo de outras partes da espécie para a atividade de SOD e CAT, foi analisada por MORAIS et al., (2010) que induziram lesões na mucosa do estômago com etanol, em camundongos *Swisse* utilizaram o ácido anacárdico para avaliar o efeito antioxidativo, demonstrando efeito eficiente do composto presente na castanha.

Na análise da glutatona peroxidase os camundongos que receberam tratamento com o extrato de *A. microcarpum* D após injúria ao medicamento demonstraram melhor atividade antioxidante, pois foi

observado aumento significativo nos níveis dessa enzima, indicativo de processo de combate ao estresse oxidativo. Esta enzima está envolvida com um dos principais meios de defesa antioxidante de origem enzimática, encontradas em muitos tecidos de origem animal. O estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da glutathione, aumentando a liberação de glutathione oxidada no organismo, o que reforça a ação de combate ao estresse oxidativo pela administração do extrato (HUBER et al., 2008).

Foi verificado nesse ensaio que o grupo dos camundongos que foram tratados após injúria ao paracetamol que houve redução nos níveis da proteína carbonilada no macerado do tecido hepático, e que demonstra eficiência no combate à formação de derivados carbonílicos da oxidação proteica, provocada pelo estresse oxidativo do paracetamol, reforçando o papel protetor a oxidação. A carbonilação de proteínas afeta diretamente o metabolismo celular ao alterar a função das proteínas, as proteínas modificadas oxidativamente contêm um aumento dos grupamentos carbonil que provocam a oxidação. Atualmente, a dosagem de proteína carbonilada é o marcador mais utilizado para determinação dos níveis de oxidação proteica (LEVINE et al., 1990).

Em outro estudo UKWENYA et al., (2013) determinaram os efeitos do extrato das folhas de *A. occidentale* nas atividades de G-6-PDH, TBARS, GPx e SOD, além dos testes de hiperglicemia induzida em macerado de testículos de ratos. Mostraram que o extrato tem potentes efeitos antioxidantes, potencializando a estimulação de G-6-PDH e inibindo a peroxidação lipídica. O extrato também estimula a produção endógena de enzimas antioxidantes (SOD e GPx) inerentes para os testículos promovendo sua integridade funcional.

As análises bioquímicas demonstraram que não houve comprometimento hepático nos camundongos que receberam os extratos. Os camundongos *knockout* possuem inflamação provocada pela falta da interleucina 10. Os níveis das enzimas entre o controle e aqueles que receberam o paracetamol apresentam-se com valores próximos e após receberem os extratos, foi observado redução, mesmo que não significativa,

mas que se enquadram em valores de referência. Essas enzimas bioquímicas que avaliam o metabolismo hepático são importantes indicadores de alteração do fígado e vias biliares, por uma característica infecciosa ou farmacológica, por isso é importante realizar a dosagem após um tratamento com um fitoterápico.

A atividade da ALT (alanina aminotransferase) é um parâmetro bioquímico importante para detecção de hepatotoxicidade, outros marcadores, como AST (aspartato aminotransferase), são complementares ao resultado. A combinação das duas fornece resultados mais seguros quanto à presença de lesão hepática. A GGT (Gama glutamil transferase) e a Fosfatase Alcalina são importantes marcadores adicionais da função hepática, inclusive como diferencial para diagnóstico da função biliar (OZER et al., 2008). Com base nos valores de referência (média e desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos para camundongos machos C57BL/6 determinados por LAPCHIK et al., (2009), a saber: para ALT 41,4 +/- 16,4, AST 99,5 +/- 33,4, fosfatase alcalina 59 +/- 11,4, colesterol total 94,8 +/- 16,9 e triglicerídeos 97 +/- 21,1, ao comparar os resultados deste estudo, verificou-se que as enzimas relacionadas à preservação das funções hepáticas analisadas, além dos valores de colesterol total encontrados nos grupos tratados e controle, não houve alteração significativa. Mesmo assim, ainda não alcançaram a normalidade referencial de um camundongo C57BL/6, mas nos dá bons indicativos de ação dos extratos na melhora das funções hepáticas, o que foi observado no ensaio do estresse oxidativo e histopatológico.

Os triglicerídeos apresentaram redução significativa entre os grupos controle e aqueles que receberam os extratos de *A. occidentale* e *A. microcarpum*, sugerindo que os extratos podem agir como hipolipemiantes diminuindo os níveis de triglicerídeos plasmáticos, parâmetro capaz de promover proteção dos vasos sanguíneos na formação de ateromas e que neste estudo nos chama a atenção para estudos mais detalhados com as folhas do *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D que possam avaliar um possível efeito de proteção dos vasos sanguíneos na produção de ateromas.

YE (2015) fizeram um estudo com modelo de camundongo *knockout* –IL 10 para examinar vários parâmetros bioquímicos e a expressão de citocinas inflamatórias. Os parâmetros bioquímicos avaliados como ALT e AST nos camundongos IL 10 em relação ao controle foram mais elevados, mas não significativo, no entanto encontraram outros parâmetros como INOS e RNAm IL-1b aumentado no tecido hepático, evidências que sugerem algum dano no tecido. Esses resultados confirmam os achados nesse estudo nos camundongos controle e no grupo que recebeu o paracetamol em relação às enzimas ALT e AST, o que sugere ação desses extratos na redução dos danos teciduais no fígado em situações metabólicas de ausência ou redução da interleucina10.

A contagem diferencial dos leucócitos somados aos outros ensaios, confirmaram a redução do processo inflamatório e oxidativo que a injúria ou a ausência da interleucina 10 puderam desenvolver, pois os grupos tratados com os extratos das duas espécies vegetais apresentaram redução no número de monócitos em 100 células entre os grupos paracetamol e os que receberam tratamento, significativa pelo teste de Tukey. O número de neutrófilos e linfócitos apresentou um pequeno aumento entre os grupos controle e tratados, porém que não refletem significância e estão dentro de valores estabelecidos por SANTOS et al., (2016). Realizar a contagem diferencial dos leucócitos pode ajudar na elucidação do processo patológico e os efeitos dos extratos propostos, pois através de um procedimento técnico simples de esfregaço sanguíneo é possível analisar e quantificar as células no sangue total que são responsáveis pela defesa do organismo permitindo avaliar a resposta frente a diversas situações.

Para verificar possíveis danos hepatocelulares dos camundongos, fez-se também o estudo histopatológico, complementando-se os dados obtidos nas análises enzimáticas. O estudo microscópico do tecido hepático é fundamental para a análise da toxicidade do produto testado, da reação à injúria pelo paracetamol, e a reação produzida no tecido após ser tratado com os extratos vegetais das duas espécies.

O estudo histopatológico revelou vacuolização do citoplasma nos camundongos controle *knockout*, provocado provavelmente, pelo acúmulo

de água intracelular (degeneração hidrópica) desses animais, em situação de atividade inflamatória pela deficiência da IL10, após o tratamento com o extrato de *A. microcarpum*D houve diminuição significativa desse processo patológico, indicando possível atividade de reversão do dano hepático.

O infiltrado inflamatório, resposta do organismo ao estímulo agressor químico e/ou biológico, foi verificado de maneira mais evidente nos camundongos dos grupos controle e paracetamol, não obstante os extratos de *A. occidentale*L e *A. microcarpum*D mostraram ter efeito hepatoprotetor nos grupos que receberam o paracetamol, pois reduziram o processo significativamente, verificado também no grupo que recebeu o *A. microcarpum* D sem injúria, provavelmente os extratos contribuíram para diminuir o processo inflamatório reduzindo a ativação dos leucócitos no local da injúria.

Foi verificado que a colestase foi evidente nos camundongos do grupo que recebeu o paracetamol, isso nos leva a crer que o fluxo do líquido biliar foi alterado, ocasionado pela obstrução e/ou lesão hepatocelular. A concentração da fosfatase alcalina (FA) aumentada pode ser um parâmetro bioquímico que indica uma obstrução e confirma esse resultado histopatológico. No entanto observou-se que os extratos de *A. occidentale*L e *A. microcarpum*D demonstraram ação efetiva na redução da colestase nos camundongos que foram tratados após a injúria.

A esteatose hepática foi verificada apenas no grupo que recebeu o paracetamol, indicando dano no tecido por acúmulo de gordura decorrente da desordem no metabolismo normal, condição que leva a produção de radicais livres e a degeneração, causado, por exemplo, pela intoxicação medicamentosa do paracetamol. Não obstante os extratos de *A. occidentale* L e *A. microcarpum*D demonstraram capacidade de reverter essa condição patológica, pois os camundongos tratados após a injúria não apresentaram esteatose.

O aumento nuclear foi observado nos grupos controle e paracetamol o que pode indicar que a atividade nuclear estava aumentada, havendo consequente processos apoptóticos. Os camundongos dos grupos que

receberam o extrato de *A. occidentale* D e *A. microcarpum* L apresentaram diminuição nesse processo, o que sugere que após o tratamento o tecido apresentou-se com menor atividade de regeneração.

As amostras analisadas dos grupos tratados não apresentaram qualquer indício de fibrose ou pontos hemorrágicos no lóbulo central. Foi visualizado tecido conjuntivo organizado de maneira regular, tecido hepitelial formando placas com agrupamento de hepatócitos com núcleo central e arredondado, e as veias centro lobulares estavam normais, indicando que não houve necrose e fibrose, o que sugere que os extratos não produziram toxicidade na dose testada e apresentaram efeitos hepatoprotetores.

TEDONG et al. (2007) avaliaram o fígado de camundongos após receberem extrato hexano de folhas de *A. occidentale* L e observaram que até 14 g do extrato por kg do animal, via gavagem, as doses não foram tóxicas. O exame histopatológico de órgãos selecionados mostrou infiltrados e congestão hepática, um estudo limitante pois não há relato de forma comparativa entre os grupos. Em outro estudo utilizando extrato etanólico de *A. occidentale*, KONAN et al. (2007) não encontraram alterações no fígado até 1000 mg/kg de e as enzimas bioquímicas ALT e AST se mantiveram normais, podendo o extrato ter agido como hepatoprotetor, possivelmente por apresentarem grande quantidade de compostos polifenólicos, o que justificaria esse estudo com os extratos de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D.

## **7.6 CONCLUSÃO**

O extrato das folhas de *A. Microcarpum* D foi mais eficiente na diminuição do estresse oxidativo nos camundongos tratados após injúria ao paracetamol, por outro lado o *A. occidentale* L administrado em camundongos sem injúria hepática demonstrou melhores resultados para as enzimas SOD e CAT, ou seja, foi mais eficiente na remoção de espécies reativas de oxigênio. A histopatologia confirma a redução do processo oxidativo e inflamatório em ambos os extratos sem alterações que indiquem toxicidade hepática e demonstrando efeito hepaprotetor. De forma geral os dois extratos possuem efeitos eficientes na diminuição do estresse oxidativo, anti-inflamatório e da

hepatotoxicidade o que sugere que esses extratos possam ser utilizados em estudos clínicos para comprovação da eficiência nos humanos.

## 8.REFERÊNCIAS

Aebi, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

Baptista, A.B., et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), cajui (*Anacardium microcarpum*) and pequi (*Caryocar brasiliense* C). A systematic review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, Article ID 3753562, p.1-13, 2018.

Barbosa, L.F.; Medeiros, M.H.G; Augusto, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

Barbosa-Filho, V.M., et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*), **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280-288, 2014.

Bouabe, H. Cytokine Reporter Mice: The Special Case of IL-10. **Scandinavian Journal of Immunology**,v. 75, p. 553–567, 2012.

Broinizi, P., et al. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 773- 781 2008.

Carvalho, IMM. Avaliação da atividade antihepatotóxica de duas espécies vegetais popularmente conhecidas como “quina”: *Strychnos pseudoquina* A. st. Hil e *Coutarea hexandra* (jacq.) K. Schum. 2009.**Dissertação de Mestrado. Bioquímica Agrícola**. UFV. Viçosa-MG.

Damy, S.B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-11, 2010.

Dieterich, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart, **Circulation**, v. 4-11, n.101(1), p. 33-9, 2000.

Fernandes, M.S. Determinação de parâmetros oxidativos e bioquímicos em indivíduos multitransfundidos. 2012. **Dissertação de Mestrado**. Programa de PósGraduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

Flohé, L. & Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods and Enzymology**, v. 105, p.114-21, 1984.

Girish, C. et al. Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 6, p. 735-45, 2009.

Guyton, A.C., Hall, J.E **Tratado De Fisiologia Médica** 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002.

Huber, P.C. et al. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo , v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

Keebler, C.M. & Somrak, T.M. **The manual of cytotechnology**. 7 th ed Chicago: ASCP Press, 1993.

Konan, N.A, et al. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 30–38, 2007.

Lapchik, V.B.V., et al. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. Atheneu Editora, São Paulo, 2009, 708p.

Levine, R.L., et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-78, 1990.

Lowry, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

Lucena, J.E.X., et al. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v. 16, n. 1, p. 67-72, 2006.

Morais, T.C., et al. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 264–269, 2010.

Ozer, J., et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity **Toxicology**,v. 245, p. 194–205, 2008.

Santos, E.W., et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo,v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

Scheibe, P.O. Number of samples-hypothesis testing. **Nuclear Medicine and Biology**, 35, 3-9, 2008.

Tedong, L. et al. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* linn (anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 2, p. 140 – 147, 2007.

Ukwenya, V., et al., Evaluation of antioxidant potential of methanolic leaf extract of *Anacardium Occidentale* (Linn) on the testes of streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **European Journal of Anatomy**, v. 17, n.2, p. 72-81, 2013.

Valko, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology and Medicine**, v. 39, n.1, p. 44-84. Epub 2006, 2007.

Winterbourn, C.C.; Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. **Journal Free Radical Biology and Medicine**, v.1, n. 1, p. 43-9, 1985.

Ye, L. Effects of interleukin-10 gene deficiency on hepatic biochemical metabolism in mice. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 15, p. 321–325, 2015.

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

As partes do cajueiro *Anacardium occidentale*, *Anacardium microcarpum* e do pequiheiro *Caryocar brasiliense* apresentam ações eficazes *in vitro* e *in vivo* antioxidantes e microbicidas e que são ainda pouco explorados pelos pesquisadores mundialmente. Os ensaios desse estudo demonstraram que as folhas do caju e do cajui podem ser utilizadas no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes e atuando no combate ao estresse oxidativo, ao processo inflamatório e a recuperação de danos hepáticos. Portanto as folhas de *A. occidentale* L e *A. microcarpum* D podem ser vistas como boas matérias primas e talvez possam despertar o interesse das indústrias, visando a produção de fitoterápicos que promovam o combate do processo oxidativo e das infecções bacterianas. Destaca-se a relevância dessas espécies vegetais como potenciais alvos biotecnológicos no desenvolvimento de novas drogas. Com o potencial demonstrado pelas mesmas, também sugere-se outros testes com diferentes solventes extratores, utilizando-se diferentes doses em modelos animais com ensaios clínicos.

## 10. ANEXOS

### 10.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

 <b>UFT</b> Universidade Federal do Tocantins		<b>CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS</b>
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO</b>		<b>PROCESSO Nº</b>
<b>PROJETO DE PESQUISA OU TIPO DE TRABALHO:</b> <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS – FACULDADE DE MEDICINA</b>		<b>247/2013</b>
O parecer consubstanciado do relator será utilizado como subsídio para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade do Tocantins elaborar seu parecer final.		
<b>1 – Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso</b>		
Título: ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE CEPAS BACTERIANAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÃO HOSPITALAR E RASTREAMENTO DE CLONES DO HOSPITAL GERAL DE PALMAS - TO		
Coordenador do Projeto ou Professor Orientador do TCC: Anderson Barbosa Batista		
Pesquisadores: Anderson Barbosa Batista Departamento/Faculdade: Faculdade de Medicina/UFT		
<b>2 – Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso</b>		
O Projeto de Pesquisa visa detectar a presença de clones bacterianos que são transmitidos pelo ambiente e má manipulação dos funcionários. Seu objetivo é entender como está a resistência bacteriana no Hospital Geral de Palmas para usar racionalmente os antimicrobianos, criando um protocolo de prevenção juntamente com a CCIH.		
<small>– Objetivos e Adequação metodológica (Verificar a exequibilidade da proposta, isto é, se existe clareza do objeto, compatibilidade entre os objetivos, a fundamentação teórica e a metodologia ou plano de ação, evidenciando consistência entre objetivos, procedimentos, ações de execução da pesquisa e capacidade do proponente, demonstrada por outros trabalhos similares.)</small>		
Metodologia adequada ao Projeto de Pesquisa.		
<b>12 – Avaliação do Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>		
O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresenta-se correto.		
<b>2.3 – Revisão Bibliográfica</b>		
Compatível com a Pesquisa.		
<b>3 – Qualificação do Pesquisador/Orientador</b> (Indicar os atributos do Pesquisador/Orientador, salientando a titulação e experiência compatível com a função de orientação, qualidade e regularidade da produção científica/tecnológica/artística, compatível com o projeto de pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)		
O orientador mostra em seu curriculum estar apto para a pesquisa.		

*Parecer consubstanciado CEP - UFT - Página 1/1*

--

**4 – Parecer conclusivo, recomendações e/ou sugestões:**

Aprovado.
-----------

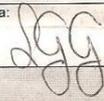
**5 – Pendências:** (Enumerar sucintamente as pendências a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Não há.
---------

**6 – Parecer Consubstanciado**

Aprovado:                      Pendências: Sim                      Não aprovado:                      Aprovado e encaminhado para à CONEP:

**7 – Dados dos membros do CEP-UFT**

Nome Completo: Leandro Guimarães Garcia		
Telefone(s): (63) 9291-8898 / 8424-9548 / 8119-4484	Instituição: Universidade Federal do Tocantins	
Local: <b>Palmas/TO</b>	Data: 27/06/2014	Assinatura: 
Assinatura do Coordenador do CEP:	Data da reunião:	

## 10.2 PARECER ÉTICO NO USO DE ANIMAIS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CEUA-UFT**

O projeto intitulado “**Ação anti-oxidante de plantas originárias do cerrado da cidade de Palmas-TO**” processo nº 23101.001539/2017-08, sob a responsabilidade de Anderson Barbosa Baptista, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pelo parecerista da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Araguaina, 06 de abril de 2017.

A handwritten signature in black ink that reads 'Alberto Yim Júnior'.

---

**Atenciosamente,**

**Alberto Yim Júnior**

**Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFT**