UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E TOXICOLÓGICO DE
***Anacardium occidentale* Linn.**
(ANACARDIACEAE)
Clone CCP-76

N'zi André Konan

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

SÃO PAULO
2006

N'zi André Konan

Estudo farmacognóstico, farmacológico e toxicológico de *Anacardium occidentale* Linn.(Anacardiaceae) Clone CCP-76

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Orientadora/Presidente

Prof(a). Dr(a). Alba Regina Monteiro Souza Brito

1º. examinador

Prof(a). Dr(a). Ivana Barbosa Sufredini

2º. examinador

Prof(a). Dr(a). Edna Tomiko Myiake Kato

3º. examinador

Prof(a). Dr(a). Eliana Aparecida Varanda

4º. examinador

São Paulo, 5 Maio de 2006.

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012267

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K82e Konan, Nzi André
Estudo farmacognóstico e toxicológico de *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae) clone CCP - 76 / Nzi André Konan. -- São Paulo, 2006.
189p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

I. Anacardiaceae : Farmacognosia I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.32328 CDD

Agradecimentos

Ao CAPES/Brasil pela Bolsa

A Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi pela orientação e sobretudo pela disponibilidade

Ao Prof. Dr. Boni Yavo, a. Nilton Lincopan e a Ricardo Ambrósio Fock do departamento de análises clínicas da FCF USP pela colaboração no ensaio bioquímico e hematológico,

A Claudia Furlan do laboratório de fitoquímica do Instituto de Biociências - USP pela colaboração no estudo químico

A Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda e Soraya Duarte Varelas do laboratório de mutagenicidade da FCF-UNESP Araraquara pela colaboração no ensaio de mutagenicidade

A Profa. Dra. Elza Masae Mamizuka do laboratório de microbiologia clínica da FCF-USP pelo Laboratório e material para realização da parte antibacteriana,

A Profa. Dra. Primavera Borelli do laboratório de hematologia clínica da FCF-USP pelo laboratório e material para realização da parte hematologia e teste de micronúcleo,

Ao Prof. Dr. Antônio Salatino do laboratório de fitoquímica do Instituto de Biociências -USP pelo laboratório e equipamento HPLC,

Ao técnico Roberto de Jesus Onório do laboratório de Biofarmacognosia da FCF-USP pela disponibilidade desde o início da tese

Aos Professores Dr. Vicente de Olivera Ferro, Dominique Hermine Fisher, Paulo Chanel D. de Freitas pela grande amizade

A Profa. Dra. Edna Tomiko Miyake Kato pelas sugestões no estudo farmacobotânico

A secretária do departamento da farmácia, Elisabete Claro de Souza

Aos meus Amigos Elisângela Severina de Melo, Christian Funari e esposa e Pedro Lopez Garcia e esposa, Rogério dos Santos

Aos colegas de laboratório: Fabiana Gaspar Gonzalez, Tais Garcia, Raquel Donatini, Vilma, Sonia, Tati Ishikawa, André Wasicky e Roberto Adati

Aos funcionários Lucia, Elaine, Jorge,

Aos técnicos do Biotério: Flavia, Renata e Wagner.

A Brasil Soka Gakkai e amigos, particularmente à família Shiozawa e ao presidente Daisaku Ikeda e esposa.

In Memoriam : Je dédis cette thèse en la mémoire de mon père , Julien Konan Bah, de ma mère Aya Jeannette Konan , de mon frère, Raymond Konan ,et de mon ami Guy-Michel, *reposez en paix*,

''Dedico esta tese à memória de meu pai Julien Konan Bah, da minha mãe Aya Jeannette Konan, de meu irmão Raymond Konan e de meu amigo Guy-Michel''

*A Milena e a Yann pela alegria que trouxeram na minha vida no decorrer deste trabalho,
meu reconhecimento e amor.*

Remerciements :

A mes frères , soeurs , cousins et nièces : Firmin, Claudine, Paul, Odette, Charles, Christiane, Georges, Marie-Louise, Barthélemy, N'guoran, Mariame, Fabienne et Andréa.

Aux Professeurs de l'Université de Cocody-Abidjan Côte D'Ivoire, François Diafouka , Maria José et à feu Etienne Yapo Ettien

A la grande communauté des ivoiriens au Brésil particulièrement à Ivete Yavo, Désiré Nguessan et famille , Christian Dadié et à Méité Hamadou et famille

A la SOKA GAKKAI ivoirienne et membres

Resumo

Os extratos totais, assim como os compostos fenólicos isolados de diferentes partes de *Anacardium occidentale* conhecido popularmente no Brasil como cajueiro mostraram atividades antiúlcera e antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi a verificação destas atividades nas folhas, estudo farmacobotânico, químico e toxicológico.

Para a análise anatômica foram utilizados cortes do terço mediano inferior da lâmina foliar. Nesta, as epidermes em vista frontal apresentam cutícula estriada, na face abaxial, a epiderme é constituída de células de formato poligonal, com paredes bem justapostas. Na face adaxial, as células são de paredes espessas, ligeiramente onduladas. A mesma é constituída de estômatos de tipo anomocítico e de tricomas glandulares de forma ovóide. O mesófilo é constituído de duas camadas de parênquima paliçádico, espessas, de forma quase regular e de parênquima lacunoso com células de forma irregular, envolvendo os feixes vasculares de nervuras secundarias. Extensões de fibras são observadas no mesófilo. A nervura mediana possui um colênquima desenvolvido e ductos são encontrados no floema assim como no parênquima medular. Drusas são encontradas no parênquima lacunoso assim como no parênquima fundamental e no colênquima.

A partir da triagem fitoquímica, da cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, verificou-se a presença nas folhas de cajueiro de compostos polifenólicos, particularmente de heterosídeos flavonóidicos. As estruturas de flavonóide que parecem ser mais evidentes, de acordo com a cromatografia líquida acoplada a massa, são principalmente os heterosídeos da quercetina.

O extrato etanol 70% liofilizado das folhas do cajueiro foi submetido ao modelo agudo da úlcera gástrica em ratos e a ensaio antibacteriano, esaiando as linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 e ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e de *Campylobacter coli*. Na úlcera aguda, a área relativa de lesão ulcerativa foi diminuída de 98% na dose 400mg/kg, em relação ao controle. A partir de um estudo de doses crescentes sobre a inibição de úlcera, a

DE50 foi calculada como 150 mg/kg e as doses de extrato maiores ou iguais a 100 mg/kg exibiram uma inibição de lesão ulcerativa melhor que o lansoprazol 30mg. A fração metanólica, que inibiu as ulcerações de 88,20%, deve conter alguns dos princípios ativos da atividade antiúlcera. Quanto ao teste antimicrobiano, foram obtidas concentrações inibitória mínima e bactericida mínima, iguais a 320 µg/mL, particularmente com a linhagem *Staphylococcus aureus*, a partir do extrato bruto e da sua fração rica em flavonóides.

A partir de ensaio de toxicidade aguda em camundongos e ratos, a DL50 do extrato bruto foi considerada superior a 2000 mg/kg. Foi feito um estudo de toxicidade de administração reiterada em 30 e 90 dias. Baseados em análises bioquímicas para avaliação da função renal e da função hepato-biliar, os parâmetros uréia, creatinina, transaminases, proteína total, albumina, colesterol e cálcio tendem a comprovar que o produto é bem tolerado pelo organismo dos ratos. Este fato é também confirmado pelo estudo hematológico e pela histopatologia, não ocorrendo alterações, após administração subaguda do extrato em ratos.

O potencial mutagênico foi avaliado através do teste de Ames e do teste do micronúcleo de medula óssea em camundongo. Foi obtido indício de indução de “frameshift” e substituição de pares de bases. Na dose de 2000mg/kg, o extrato de cajueiro parece induzir danos nos cromossomos porém, o fenômeno parece ser extremamente inferior ($p < 0,001$) ao efeito clastogênico induzido pela ciclofosfamida, utilizada como agente mutagênico de referência.

Résumé

Les extraits totaux et les composés phénoliques extraits de l'écorce ou du fruit d'*Anacardium occidentale*, une plante connue populairement au Brésil, sous le nom de cajueiro, ont montré les activités antiulcéreuse et antimicrobienne. L'objectif de ce travail était de vérifier ces activités dans les feuilles et de réaliser les études pharmacobotanique, chimique et toxicologique. Ainsi, dans le cadre des études anatomiques, nous avons utilisé des coupes transversales prélevées au niveau du tier-inferieur de la partie médiane du limbe foliaire. Vu de face, les épidermes présentent une cuticule striée et sur la face supérieure, s'observent des cellules de format polygonal, avec des bordures bien juxtaposées et légèrement ondulées. L'épiderme est également constituée de stomates de type anomocyte et de trichomes glandulaires de forme ovoïde. Le mésophile contient un parenchyme palissadique à deux couches de cellules épaisses à forme régulière. Celui-ci est également constitué d'un parenchyme lacuneux à cellules de forme irrégulière e entourent les faisceaux vasculaires des nervures secondaires. Des extensions de fibres de nature sclerenquimatique s'observent également dans le mésophile. La nervure centrale est caractérisée par un collenchyme super-développé et des ductes de résine sont observés dans le phloème de même que dans le parenchyme médullaire. Des cristaux d'oxalate de calcium se retrouvent aussi bien dans le parenchyme lacuneux, dans le parenchyme fondamental que dans le collenchyme.

A partir des analyses chimiques basées sur le tri-phytochimique en tube, chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide de haute performance et de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, nous avons vérifié dans les feuilles de l'anacardier, la présence de composés polyphénoliques, particulièrement des hétérosides flavoniques. Les structures de flavonoïde qui paraissaient être évidentes avec l'analyse au LC-MS sont surtout les hétérosides de la quercétine.

L'extrait éthanol 70% des feuilles de l'anacardier, a été testé pour son activité antiulcéreuse en induisant l'ulcère chez la rate avec l'alcool chlorhydrique. Nous avons également réalisé une étude antibactérienne tout en utilisant les souches de

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 et ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et de *Campylobacter coli*. Au niveau du test antiulcéreux, nous avons obtenu une inhibition de l'aire relative de lésion ulcéreuse de 98% avec l'extrait, à la dose de 400mg/kg. A partir d'une étude d'effet dose-réponse, la DE50 a été évaluée à 150 mg/kg et les doses supérieures ou égales à 100mg/kg d'extrait total des feuilles de l'anacardier ont montré une activité supérieure au lansoprazol à la dose 30mg/kg. La fraction méthanolique qui a inhibé les ulcérations de 88,20% comparativement au contrôle semble contenir le principe actif de l'activité antiulcéreuse. Quant à l'essai antibactérien, nous avons obtenu des concentrations inhibitrices minimum et bactéricides minimum égales à 320 µg/mL sur la souche *Staphylococcus aureus* à partir de l'extrait brut et de l'une de ses fractions riches en flavonoïdes.

Les essais toxicologiques ont montré que l'extrait total possède une toxicité aiguë modérée puisque la DL50 a été évaluée supérieure à 2000mg/kg chez le rat et chez la souris. Les études de toxicité de administration répétée sur 30 et 90 jours ont été réalisées et celles-ci ont montré par le biais d'analyses biochimiques, hématologiques et d'études histopathologiques que l'extrait est bien toléré par l'organisme de rat.

Les études de mutagénicité utilisant le test de Ames et de micronucleus d'érythrocyte de mammifère ont montré des indices d'induction de "frameshift" et de substitution de paires de base et à la dose de 2000mg/kg, l'extrait semble induire des mutations chromosomiques cependant, le phénomène paraît être extrêmement inférieur à l'effet clastogénique de la cyclophosphamide 50mg/kg utilisée comme agent mutagène de référence.

Abstract

Crude extracts as well as phenolics isolated from the bark or the fruit of *Anacardium occidentale* popularly known as cajueiro in Brazil, showed antiulcer and antibacterial effects. The aim of this work was to verify those effects in the leaf, botanical, chemical and toxicological studies.

Ultrastructure of the leaf was carried on. Cross-sections from the third inferior part of the leaf blade were used. Cashew leaf contains uniseriate epidermis with a sub-epidermic layer, anomocytic stomata and glandular ovoid trichomes on the inferior surface. The mesophyll exhibits two cell layers of palisadic parenchyma and a lacunose parenchyma containing vascular bundles of the secondary nervures. The median nervure contains a developed collenchyma. Several druses of calcium oxalate are present in the fundamental parenchyma, lacunose parenchyma and in the collenchyma. Resin ducts are also observed in the phloem as well as in the medullar parenchyma. Extensions of sclerenchymatous fibres are observed in the mesophyll.

By phytochemical analyses using TLC, HPLC-DAD and positive ions LC-ESI-MS, we verified the presence of polyphenols in cashew leaves particularly heterosids of flavonoids. From LC-ESI-MS, evident structures of flavonoids seemed to be heterosids of quercetin.

Ethanol 70% extract of cashew leaves was used for antiulcer and antibacterial essays. With extract dose 400mg/kg, ulcer lesions induced by HCL/ethanol 60% in rats, decreased about 98%. By a dose-response effect study, ED50 was evaluated about 150 mg/kg. Extract doses higher than 100mg/kg showed potential of lesion inhibition superior to lansoprazol 30mg. Extract methanolic fraction that gave 88,20% of ulcer inhibition likely contains the principle active of the antiulcer effect. Using bacterial strains, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 and ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and a clinical isolate *Campylobacter coli*, for antibacterial essay, the ethanolic extract and one fraction rich in flavonoids were only active in *S. aureus* with MIC and MBC equal to 320 µg/mL.

Acute, 30-day and 90-day subacute toxicity studies were carried out. Crude extract DL50 was superior to 2000mg/kg. Based on biochemical analyses for the evaluation of renal and hepato-biliary functions, level of urea, creatinine, transaminases, total protein, albumin, bilirubin, cholesterol and calcium proved that the extract is biologically tolerated by rat organism. This result was also confirmed by studies in hematology and histopathology.

Genotoxicity was accessed by Ames test in *Salmonella typhimurium* strains TA97, TA98, TA100, TA102 and bone marrow micronucleus test in mice. The extract exhibited sign of frameshift and base pairs substitution. Extract dose 2000mg/kg seemed to induce damage in the chromosomes however; the activity was extremely inferior to the clastogenic effect induced by cyclophosphamide.

Índice

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Botânica e etnobotânica de <i>Anacardium occidentale</i>.....	5
2.1.1 Botanica- Variedades- Descrição.....	5
2.1.2 Características morfológicas do clone CCP76.....	5
2.1.3 Dados etnobotânicos de <i>Anacardium occidentale</i>	6
2.2 Química de <i>Anacardium occidentale</i>.....	7
2.2.1 Fenóis simples e ácidos fenolcarboxílicos.....	9
2.2.1.1 Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico mono e tri-hidroxilados.....	9
2.2.2 Fenóis lipidícos.....	9
2.2.2.1 Ácidos anacárdicos.....	9
2.2.2.2 Cardanóis.....	10
2.2.2.3 Cardóis.....	11
2.2.2.4 Metilcardóis.....	12
2.2.3 Flavonóides.....	13
2.2.4 Taninos.....	14
2.3 Dados farmacológicos sobre <i>Anacardium occidentale</i>.....	14
2.3.1 Atividade antibacteriana.....	15
2.3.2 Atividade antiúlceras.....	16
2.4 Testes de toxicidade	17
2.4.1 Toxicidade aguda.....	17
2.4.1.1 Dose mínima mortal.....	17
2.4.1.2 Dose letal 50%(DL50).....	17
2.4.2 Toxicidade subaguda ou Subcrônica.....	17
2.4.3 Potencial carcinogênico e mutagênico.....	18
2.4.3.1 Inventário dos testes de mutagenicidade.....	19

2.4.3.1.1 Mutações gênicas.....	19
2.4.3.1.2 Mutações cromossômicas.....	20
2.4.3.2 Teste de Ames.....	20
2.4.3.2.1 Procedimentos do teste de Ames.....	20
2.4.3.2.2 Biotransformação e importância do S9mix no teste de Ames.....	21
2.4.3.2.3 Linhagens bacterianas usadas e suas características.....	24
2.4.3.3 Teste de micronúcleo de eritrócitos da medula óssea de mamíferos.....	25
2.4.3.3.1 Gênese dos eritrócitos.....	25
2.4.3.3.2 Princípio do teste.....	26
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Estudo farmacobotânico com as folhas de <i>A. occidentale</i>.....	33
4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	33
4.1.2 Caracterização macroscópica da folha.....	33
4.1.3 Estudos anatômicos da folha.....	33
4.2 Estudo químico com as folhas de <i>A. occidentale</i>.....	34
4.2.1 Obtenção do extrato bruto.....	34
4.2.2 Triagem fitoquímica.....	34
4.2.2.1 Alcalóides.....	34
4.2.2.2 Antraderivados.....	35
4.2.2.3 Cumarinas.....	35
4.2.2.4 Esteróides.....	35
4.2.2.5 Saponinas.....	35
4.2.2.6 Compostos fenólicos.....	36
4.2.2.7 Flavonóides.....	36
4.2.2.8 Taninos.....	37
4.2.2.8.1 Taninos totais.....	37

4.2.2.8.2 Taninos condensados e Taninos hidrolisáveis.....	37
4.2.3 Métodos cromatográficos analíticos.....	38
4.2.3.1 Cromatografia em camada delgada do extrato liofilizado.....	38
4.2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	40
4.2.3.3 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.....	42
4.2.4 Doseamento dos fenóis totais.....	42
4.2.4.1 Fenóis totais de EEAO.....	42
4.2.4.2 Doseamento dos taninos no EEAO.....	44
4.2.4.3 Doseamento dos flavonóides no EEAO e na sua fração ME.....	44
4.3 Ensaios farmacológicos com o extrato hidroetanólico de folhas de	
<i>Anacardium occidentale</i>..	45
4.3.1 Atividade Antiúlcera Gástrica Aguda.....	45
4.3.1.1 Animais.....	45
4.3.1.2 Ensaio com o extrato bruto.....	46
4.3.1.3 Efeito de doses crescentes de EEAO sobre a ulcera aguda.....	46
4.3.1.4 Frações do EEAO.....	47
4.3.1.5 Análise estatística.....	47
4.3.2 Atividade antibacteriana.....	47
4.4 Ensaios de toxicidade com o extrato hidroetanólico de folhas de	
<i>Anacardium occidentale</i>.....	48
4.4.1 Toxicidade aguda do extrato bruto.....	48
4.4.1.1 Animais.....	48
4.4.1.2 Ensaio.....	48
4.4.1.3 Observações.....	49
4.4.2 Toxicidade de administração reiterada durante 30 dias.....	49
4.4.2.1 Animais e doses.....	49
4.4.2.2 Ensaio.....	50
4.4.2.3 Testes bioquímicos.....	50
4.4.2.4 Testes hematológicos.....	51
4.4.3 Toxicidade de administração reiterada durante 90 dias.....	51
4.4.3.1 Animais e doses.....	51

4.4.3.2 Ensaio.....	52
4.4.3.3 Testes bioquímicos	52
4.4.3.4 Testes hematológicos	52
4.4.4 Histopatologia.....	52
4.4.5 Análise estatística.....	53
4.4.6 Determinação do potencial mutagênico.....	53
4.4.6.1 Teste de Ames.....	53
4.4.6.1.1 Linhagens de <i>Salmonella</i>	53
4.4.6.1.2 Preparo da placa-mãe.....	54
4.4.6.1.3 Taxa de reversão espontânea.....	55
4.4.6.1.4 Ensaio.....	55
4.4.6.1.5 Análise estatística.....	56
4.4.6.2 Teste do micronúcleo.....	57
4.4.6.2.1 Animais e doses.....	57
4.4.6.2.2 Análise estatística.....	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Farmacobotânica.....	60
5.1.1 Características macroscópicas da folha de cajueiro.....	60
5.1.2 Características microscópicas da folha de cajueiro.....	60
5.1.3 Caracterização histoquímica.....	68
5.2 Estudos químicos.....	74
5.2.1 Triagem fitoquímica.....	74
5.2.2 Análise cromatográfica do extrato bruto.....	74
5.2.2.1 Cromatografia em camada delgada.....	74
5.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	79
5.2.2.3 LC-Massa.....	85
5.2.4 Doseamento dos fenóis.....	93
5.2.4.1 Fenóis totais e taninos.....	93
5.2.4.2 Flavonóides.....	95
5.3 Ensaios farmacológicos.....	98

5.3.1 Atividade antimicrobiana.....	98
5.3.2 Atividade antiúlcera gástrica aguda.....	99
5.3.3 Relação dose-efeito.....	103
5.3.4 Atividade antiúlcera das frações do EEAO.....	105
5.4 Ensaios toxicológicos.....	108
5.4.1 Toxicidade aguda.....	108
5.4.2 Toxicidade de administração reiterada durante 30 dias.....	113
5.4.2.1 Testes bioquímicos.....	118
5.4.2.1.1 Função hepática.....	118
5.4.2.1.2 Função renal.....	120
5.4.2.1.3 Metabolismo de carboidratos.....	120
5.4.2.1.4 Ferro.....	120
5.4.2.2 Testes hematológicos.....	123
5.4.2.3 Histopatologia.....	125
5.4.3 Toxicidade de administração reiterada durante 90 dias.....	129
5.4.3.1 Testes bioquímicas.....	131
5.4.3.1.1 Função hepática e biliar	131
5.4.3.1.2 Função renal.....	134
5.4.3.1.3 Metabolismo de carboidratos.....	134
5.4.3.2 Testes hematológicos.....	134
5.4.3.3 Histopatologia.....	139
5.4.4 Potencial mutagênico.....	143
5.4.4.1 Teste de Ames.....	143
5.4.4.2 Teste de micronúcleo de medula óssea.....	144
6 DISCUSSÃO.....	145
7 CONCLUSÕES.....	169
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	172

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Anacardium occidentale</i> : diferentes níveis de desenvolvimento da folha.....	8
Figura 2. Curva dose resposta de avaliação de mutagenicidade pelo teste de Ames.....	23
Figura 3. Gênese da hemácia no processo normal e esquematização de intervenção de agente mutagênico.....	28
Figura 4. Métodos de coloração por Giemsa e por Acridina Laranja.....	29
Figura 5. Fractionamento do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> para obtenção da fração ME.....	41
Figura 6. <i>Anacardium occidentale</i> L. Aspecto geral da secção transversal do terço mediano inferior da lâmina foliar.....	61
Figura 7. <i>Anacardium occidentale</i> L.: Vista frontal da face abaxial,.....	61
Figura 8. <i>Anacardium occidentale</i> L. Detalhe da secção transversal da região do mesofilo.....	62
Figura 9. <i>Anacardium occidentale</i> L. Vista frontal da face superior de folha.....	63
Figura 10. <i>Anacardium occidentale</i> L.: Secção transversal do mesofilo.....	65
Figura 11. <i>Anacardium occidentale</i> L. Secções transversais em diferentes regiões do mesofilo.....	66
Figura 12. <i>Anacardium occidentale</i> L. Detalhe da secção transversal da folha junto à face adaxial, evidenciando extensão da bainha do feixe.....	67
Figura 13. <i>Anacardium occidentale</i> L.. a) Secção transversal evidenciando a bainha do feixe vascular. b) Secção transversal anterior ampliada, evidenciando os diferentes tecidos.....	69
Figura 14. <i>Anacardium occidentale</i> :a)Secção transversal da lamina foliar mostrando As regiões ABCDE analisadas. b) Secção transversal mostrando um aumento da região A. c) Secção transversal na nervura mediana mostrando as células Colenquimáticas.....	70

Figura 15. <i>Anacardium occidentale</i> : Secção transversal da nervura mediana. a) Região subepidêmica. b) Outra região subepidêmica.....	71
Figura 16. <i>Anacardium occidentale</i> L. Corte transversal na nervura mediana. a) região (B) evidenciando ducto secretor no floema. b) região (E) evidenciando a região medular com xilema e parênquima medular.....	72
Figura 17. <i>Anacardium occidentale</i> L. Corte transversal da lâmina foliar. Corte submetido a tratamento com cloreto de férrico.....	73
Figura 18. Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> e frações em fase móvel de Acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (110/5/5/10).....	75
Figura 19. Perfis cromatográfico em camada delgada do extrato hidroetanólico e frações de <i>Anacardium occidentale</i> : a) EEAO e frações em fase móvel de Acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (150/5/5/10). b) EEAO e frações em fase móvel de Acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100/11/11/26).....	77
Figura 20. Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico e frações em fase móvel de Clorofórmio/acetona/ácido fórmico(75/16,5/8,5).....	78
Figura 21. Perfil cromatográfico HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	80
Figura 22. Espectros uv-vis de compostos presentes no extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> (azul) e compostos da biblioteca digital.....	81
Figura 23. Cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> e dos padrões de amentoflavona e de apigenina.....	82
Figura 24. Espectros uv-vis de picos do cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	83
Figura 25. Espectros uv-vis de picos do cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	84
Figura 26. Espectro uv-vis do pico 12 do cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	84
Figura 27. Cromatograma dos íons totais(TIC) do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> obtido da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.....	86

Figura 28. Espectro de massa de íon positivo do pico 1 obtido por LC-MS.....	87
Figura 29. Espectro de massa de íon positivo do pico 2 obtido por LC-MS.....	87
Figura 30. Espectro de massa de íon positivo do pico 6 obtido por LC-MS.....	88
Figura 31. Espectro de massa de íon positivo do pico 7 obtido por LC-MS.....	88
Figura 32. Espectro de massa de íon positivo do pico 8 obtido por LC-MS.....	89
Figura 33. Espectro de massa de íon positivo do pico 9 obtido por LC-MS.....	89
Figura 34. Espectro de massa de íon positivo do pico 11 obtido por LC-MS.....	90
Figura 35. Espectro de massa de íon positivo do pico 5 obtido por LC-MS.....	90
Figura 36. Espectro de massa de íon positivo do pico 3 obtido por LC-MS.....	91
Figura 37. Espectro de massa de íon positivo do pico 4 obtido por LC-MS.....	91
Figura 38. Espectro de massa de íon positivo do pico 10 obtido por LC-MS.....	92
Figura 39. Curva de qualibração do ácido gálico a partir das concentrações 2,0 a 10µg/mL.....	94
Figura 40. Curva de calibração da quercetina em metanol obtida a partir das concentrações 4 a 12µg/mL.....	97
Figura 41. Área relativa de lesão ulcerativa obtida no grupo de ratos tratados Com 400mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> e no grupo controle em ensaio de úlcera aguda.....	101
Figura 42. Aspecto de estômagos no grupo de ratos tratados com 400mg/kg. de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> e de ratos controle em ensaio de úlcera aguda.....	102
Figura 43. Efeito de doses crescentes do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> sobre a área de lesão ulcerativa e a área relativa de lesão ulcerativa, induzida por HCL/etanol 60% em ratos.....	104
Figura 44. Efeito de doses crescentes do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> L. sobre a área de lesão ulcerativa e sobre a área relativa de lesão ulcerativa, induzida por HCL/ etanol 60% em ratos.....	104
Figura 45. Área relativa de lesão ulcerativa obtida no grupo de ratos tratados com frações de EEAO e no grupo controle em ensaio de úlcera aguda.....	106

Figura 46. Aspecto de estômagos de grupo de ratos tratados com frações de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> e ratos controles.....	107
Figura 47. Evolução do peso corporal de ratos fêmeas tratadas com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral.....	110
Figura 48. Evolução do peso corporal de ratos machos tratados com dose única de 2000mg/kg de de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral.....	110
Figura 49. Evolução do consumo de ração de ratos fêmeas tratadas com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral.....	111
Figura 50. Evolução do consumo de ração de ratos machos tratados com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral.....	111
Figura 51. Evolução do consumo de água de ratos fêmeas tratadas com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral.....	112
Figura 52. Evolução do consumo de ração de ratos machos tratados com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral.....	112
Figura 53. Evolução do peso corporal em ratos fêmeas tratadas com doses diárias de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral durante 30 dias.....	115
Figura 54. Evolução do peso corporal em ratos machos tratados com doses diárias de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral durante 30 dias.....	115
Figura 55. Evolução do consumo de água em ratos fêmeas tratadas com doses diárias de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> via oral durante 30 dias.....	116
Figura 56. Evolução do consumo de água em ratos machos tratados com doses diárias de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> via oral durante 30 dias.....	116
Figura 57. Evolução do consumo de ração em ratos fêmeas tratadas com doses diárias de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> via oral durante 30 dias.....	117

Figura 58. Evolução do consumo de ração em ratos machos tratados com doses diárias de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por via oral durante 30 dias.....	117
Figura 59. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre a fosfatase alcalina de ratos machos e fêmeas.....	119
Figura 60. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre a creatinina de ratos machos e fêmeas.....	121
Figura 61. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre uréia de ratos machos e fêmeas.....	122
Figura 62. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre os leucócitos de ratos machos e fêmeas.....	124
Figura 63. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre tipos de células leucocitárias de ratos machos e fêmeas.....	124
Figura 64. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias.....	126
Figura 65. Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias.....	126
Figura 66. Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias.....	127
Figura 67. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias.....	127
Figura 68. Fotomicrografia de corte histológico de baço de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias.....	128
Figura 69. Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias.....	128

Figura 70. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 90 dias sobre o peso corporal de ratos.....	130
Figura 71. Evolução da porcentagem de redução de peso em relação ao controle, em ratos tratados com doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	130
Figura 72. Regressão linear das porcentagens de redução de peso, durante 90, nos ratos tratados com as doses de 700 e 1000 mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	130
Figura 73. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias sobre o nível de proteína total sérica em ratos.....	133
Figura 74. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias sobre o nível de albumina sérica em ratos.....	133
Figura 75. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias sobre a taxa de hematócrito em ratos.....	136
Figura 76. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias sobre a quantidade de leucócitos em ratos.....	136
Figura 77. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias sobre a contagem de tipos de células leucocitárias em ratos.....	138
Figura 78. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato tratado com 100mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias.....	140
Figura 79. Fotomicrografia de corte histológico de coração de rato tratado com 100mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias.....	140
Figura 80. Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de rato tratado com 100mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias.....	141

Figura 81. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rato tratado com 100mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias.....	141
Figura 82. Fotomicrografia de corte histológico de baço de rato tratado com 100mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias.....	142
Figura 83. Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de rato tratado com 100mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> , durante 90 dias.....	142

Lista de Tabelas

Tabela 1. Local de coleta e rendimento da primeira extração das folhas.....	34
Tabela 2. Principais grupos químicos presentes nas folhas do clone CCP76 de <i>Anacardium occidentale</i>	74
Tabela 3. Características cromatográficas em cromatografia em camada delgada do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> em sílica gel GF e em fase móvel de acetato de etila - ácido fórmico – ácido acético glacial água(110:5:5:10, v/v/v/v).....	76
Tabela 4. Relação concentração/absorbância de ácido gálico obtida por leitura a 760nm.....	93
Tabela 5. Relação concentração/absorbância de amostras de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> obtida por leitura a 760nm.....	95
Tabela 6. Relação concentração/absorbância de quercetina em etanol lida a 425 nm.....	96
Tabela 7. Relação concentração de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> e fração ME/ absorbância a 425nm.....	98
Tabela 8. Efeito do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> E de sua fração ME sobre as cepas de bactérias estudadas.....	99
Tabela 9. Efeito do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> sobre lesões ulcerativas induzidas por HCL/etanol em ratos.....	100
Tabela 10. Efeito de doses crescentes de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> sobre lesões gástricas induzidas por HCL/etanol em ratos.....	103
Tabela 11. Efeito de frações do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> sobre lesões gástricas induzidas por HCL/etanol em ratos.....	105
Tabela 12. Efeito da administração da dose 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> sobre o peso relativo de órgãos de ratos	109
Tabela 13. Efeito da administração de doses de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> sobre o peso relativo de órgãos de ratos	113

Tabela 14. Efeito da administração de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre parâmetros bioquímicos em ratos.....	118
Tabela 15. Efeito da administração de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 30 dias sobre as formulas eritrocitaria e leucocitaria em ratos.....	123
Tabela 16. Efeito da administração de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 90 dias sobre o peso relativo de órgãos de ratos.....	129
Tabela 17. Efeito da administração de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 90 dias sobre parâmetros bioquímicos em ratos.....	131
Tabela 18. Efeito da administração de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i> durante 90 dias sobre as formulas eritrocitária e leucocitária em ratos.....	134
Tabela 19. Taxa de reversão de mutação his ⁻ nas linhagens TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> com ou sem ativador metabólico em presença se doses de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	143
Tabela 20. Taxa de reversão de mutação his ⁻ nas linhagens TA97a e TA98 de <i>Salmonella typhimurium</i> com ou sem ativador metabólico em presença se doses de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	144
Tabela 21. Frequência de policromáticos micronucleados induzidos na medula óssea em camundongos tratados com a dose de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	144

1. INTRODUÇÃO

Folhas de Anacardium occidentale L.

1 Introdução

O uso dos produtos naturais como matéria-prima para obtenção de novos medicamentos está bem estabelecido há muito tempo. Estes produtos naturais são provenientes, principalmente, de microorganismos e de plantas. Os antibióticos, como a eritromicina e as tetraciclina, ou os antitumorais doxorubicina e mitomicina foram inicialmente extraídos dos actinomicetos. Outros antineoplásicos conhecidos, como vimblastina, etopósido e taxanos, são metabólitos secundários de plantas superiores (KOROLKOVAS, 2003). Hoje os produtos naturais e as preparações fitoterápicas representam 25% dos receituários médicos nos países desenvolvidos e quase 80% nos países em desenvolvimento (GUERRA e NODARI, 2002, De LIMA e DAVID, 2002). Também, dentre 119 substâncias químicas extraídas de cerca 90 espécies de plantas superiores em uso na medicina no mundo, 77% são derivadas de plantas usadas na medicina tradicional (De LIMA e DAVID, 2002).

Anacardium occidentale (Anacardiaceae) é uma planta superior rica em compostos fenólicos e largamente usada na medicina popular na região oeste africana, assim como no Brasil (TCHIKAYA, 2000, TAYLOR, 2005). Trabalhos na literatura mostram efeitos biológicos benéficos dos compostos fenólicos (FRANKEL *et al.*, 1993). Particularmente um estudo por KUBO *et al.* (1999) mostrou a atividade inibitória do extrato do fruto de *Anacardium occidentale* contra *Helicobacter pylori*, uma bactéria que infecta a mucosa gástrica. As úlceras pépticas englobam as úlceras gástricas e as úlceras duodenais (DELFOSE, 2000). Recentemente, *Helicobacter pylori*, inicialmente denominada *Campylobacter-like*, *Campylobacter pyloridis* ou *Campylobacter pylori*, foi citada nos casos de ulcera péptica (Do PRADO *et al.*, 1993). *Campylobacter spp.* e *Helicobacter pylori* são muito similares metabolicamente e são responsáveis pela maioria das doenças gástricas e intestinais (BERSWILL e KIST, 2002). De acordo com KUBO *et al.* (1999), as outras partes de *Anacardium occidentale* devem conter o princípio ativo anti-*Helicobacter pylori*. Além disso, são conhecidos efeitos adversos sérios, tais como diarreia, dispepsia, dor abdominal, desconforto na utilização de quimioterapia com antibióticos, sendo que atualmente há uma demanda

maior de preparações medicamentosas com propriedades antibióticas de menores efeitos adversos (KUBO *et al.*, 1999). Pelo fato das moléculas de plantas comestíveis já estarem em contato com a mucosa gástrica, estas poderiam constituir uma boa fonte de agentes antiúlcera ou antibióticos orais, com maior tolerância biológica.

Nesta tese visamos fundamentalmente contribuir às pesquisas que envolvam plantas medicinais brasileiras e da Costa do Marfim, comparando-se principalmente as pesquisas sobre espécies vegetais com atividade antiúlcera. Usando as folhas de *Anacardium occidentale*, clone CCP-76, propusemos verificar as atividades antibacteriana e antiúlcera gástrica, que já foram observadas no fruto (KUBO *et al.* 1999) e também testar a tolerância biológica após análises histológica e química da mesma droga. Assim, intitulamos nossa pesquisa de "Estudo farmacognóstico e toxicológico das folhas de *Anacardium occidentale* L., clone CCP-76".

2. REVISÃO DA LITERATURA

Folhas de Anacardium occidentale L

2 Revisão da literatura

2.1 Botânica e etnobotânica de *Anacardium occidentale* L.

2.1.1 Botânica -Variedades - Descrição

O cajueiro pertence à família Anacardiaceae, faz parte dos Dicotyledoneae, de gênero *Anacardium*, espécies *Anacardium occidentale*, L. (cajueiro comum) e – supostamente – *Anacardium occidentale*, L. var, *nanum* (cajueiro precoce) (HERBARIO, 2006).

No cajueiro precoce destacam-se os clones CCP06 (pedúnculo amarelo), CC09 (amarelado), CCP76 (avermelhado), Embrapa 50 (amarelo) e Embrapa 51 (vermelho) CCP1001 (vermelho). Estes se diferenciam quanto à cor, forma, tamanho, sabor e consistência do pedúnculo do fruto sendo conhecidos como caju amarelo, caju vermelho, caju banana, caju manteiga, caju travoso, caju branco, caju maçã, entre outros (HERBARIO, 2006).

2.1.2 Características morfológicas do clone CCP76

Planta de porte baixo (4 a 6m.), copa compacta (em torno de 7 metros de envergadura), ereta; propagado por enxertia entra em floração aos seis meses, um mês antes do que a do cajueiro comum. O peso do fruto varia de 3g a 13g. O período de maior intensidade de frutificação (Ceará) é de setembro a novembro. O clone CCP76 é sensível à doença mofo preto (HERBARIO, 2006).

- *Nomes populares*(TAYLOR, 2005)

São conhecidos vários nomes populares que são:cajueiro, cashew, cashu, casho, acajuiba, caju, acajou, acaju, acajaiba, alcayoiba, anacarde, anacardier, anacardo, cacajuil, cajou, gajus, jocote maranon, maranon, merey, noix d'acajou, pomme cajou, pomme, jambu, jambu golok, jambu mete, jambu monyet, jambu terong.

2.1.3 Dados etnobotânicos de *Anacardium occidentale*

Quase todas as partes do cajueiro são usadas na medicina e, particularmente, a castanha tem um interesse internacional. O óleo de cajueiro é usado em medicina tradicional e possui aplicações industriais na área de plásticos, assim como nas indústrias de resinas, por seu conteúdo em compostos fenólicos (TAYLOR, 2005).

Nativo da costa norte do Brasil, o cajueiro foi enviado para a Índia e para a África do Leste, onde foi naturalizado. No século XVI os europeus utilizavam o suco, assim como o fruto de cajueiro, para “cuidar da febre, obter uma boa respiração e conservar o estômago”. Há muito tempo as populações indígenas da floresta Amazônica usam o cajueiro, sendo esta, uma planta muito comum do seu jardim. A tribo Tikuna, na região nordeste amazônica, por exemplo, emprega o suco do fruto contra a gripe e usa as folhas e a casca em chá para tratar a diarreia. Os Wayãpi, tribo da Guiana, usam a casca em chá como remédio contra a diarreia ou as cólicas em crianças. As tribos em Suriname utilizam o óleo tóxico da semente para matar as larvas na pele. No Brasil, de maneira geral, o chá é usado em banho para as secreções vaginais e como adstringente para impedir a sangria após remoção de um dente. O fruto é utilizado contra a sífilis e também como diurético, estimulante e afrodisíaco. Quanto ao chá das folhas, é empregado nos banhos de boca, em úlceras, amidalite e na limpeza das feridas. Para o tratamento da diabetes, astenia, debilidade muscular, desordens urinárias, e asma, usa-se também a maceração e/ou a infusão da casca. As folhas e a casca são usadas no Brasil em eczemas, na psoríase, nas escrófulas, na dispesia, nos problemas genitais, nas doenças venéreas, assim como na incapacidade sexual, também nos casos de bronquite, para a tosse e nas cólicas intestinais. Hoje em dia, o chá das folhas de cajueiro, é empregado como remédio contra a diarreia, e o chá da casca, contra as infecções da pele, no Peru. Os praticos norte-americanos usam o cajueiro para diabetes, tosse, bronquite, nos casos de amidalite, cólicas intestinais, diarreia e como tônico geral (TAYLOR, 2005).

Na África do oeste, os autores LAURENS e colaboradores (1982), que trabalharam com *Anacardium occidentale* relatam que esta espécie é chamada no

Senegal de darkassu, especialmente na língua local, o *Woloff*. Segundo os autores, a casca do darkassu é usada como antidiarréica em medicina popular.

TCHIKAYA (2000 e 2003) que trabalhou com variedades da Costa do Marfim, citou alguns nomes populares nesta região oeste-africana. Assim, os Serer do Senegal chamam-na de darkasè, finza em Bambara, bululumei em Diula do Senegal, n'guassau em Vili, na república do Congo; yovotsa em Uatchi, na república do Togo; Kaju em yoruba, Nigéria. Este autor cita também Kerharo e Adams, Guenoukpati Adjanohoun et colaboradores que relatam, respectivamente, as propriedades abortivas das folhas de *Anacardium occidentale*, o uso do fruto nas úlceras, verrugas, dor de dente, e o sumo para cuidar da lepra, o decocto da casca para a esterilidade feminina no Togo. Na Nigéria, a casca é utilizada nas diferentes formas de insônia; no Congo, o decocto aquoso da casca fresca é usado para tratar as infecções urogenitais e para acalmar as gastralgias.

2.2 Química de *Anacardium occidentale*.

Anacardium occidentale L. constitui uma fonte de fenóis lipídicos como ocorre geralmente na família Anacardiaceae. Estes podem ser classificados em ácidos fenólicos, como os ácidos anacárdicos, em fenóis monoídricos, que contêm os cardanóis, e em fenóis diídricos, abrangendo duas famílias de estruturas, os cardóis e os metilcardóis (TYMAN, 1979). A estrutura destes fenóis lipídicos consiste em um anel benzênico com uma longa cadeia alifática. A castanha é a fonte principal destes compostos fenólicos. Polifenóis, como os taninos e os flavonóides, estão presentes em *Anacardium occidentale*, encontrando-se no fruto como nas folhas (LAURENS *et al.*, 1982, DUKE, 1992). Vários estudos relatam a funcionalidade fisiológica dos compostos fenólicos (FRANKEL *et al.*, 1993). Os compostos fenólicos encontrados em *Anacardium occidentale* podem ser classificados em fenóis simples e ácidos fenolcarboxílicos, fenóis lipídicos, flavonóides e taninos, cada um com vários tipos estruturais.

Foto: Nzi André

Figura 1. *Anacardium occidentale*: Diferentes níveis de desenvolvimento da folha

1 Tronco de *Anacardium occidentale*, **2.** Folhas adultas, **3.** Folhas jovens, **4.** Folhas de desenvolvimento intermediário.

2.2.1 Fenóis simples e ácidos fenolcarboxílicos

2.2.1.1 Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico mono e tri – hidroxilado(s)

**Ácido p-hidroxibenzóico nas folhas
(DUKE, 1992)**

**Ácido o-hidroxibenzóico (ácido salicílico)
no fruto (DUKE, 1992)**

Ácido gálico na castanha (DUKE, 1992)

2.2.2 Fenóis lipídicos

2.2.2.1 Ácidos anacárdicos

Ácido 6[8(z)-pentadecil] salicílico ou ginkgol na castanha (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

Ácido 6-pentadecil salicílico na castanha (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

Ácido 6[8'(z), 11'(z) pentadecadienil] salicílico na castanha(DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

Ácido 6[8'(z), 11'(z), 14' pentadecatrienil] salicílico na castanha (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

2.2.2.2 Cardanóis

3-pentadecenilfenol na castanha (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

3-[8'(z) pentadecenil] fenol na castanha (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

3-[8'(z), 11'(z) pentadecadienil] fenol na castanha (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

3-[8'(z), 11'(z), 14'(z) pentadecatrienil] fenol (DUKE, 1992; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

2.2.2.3 Cardóis

5-pentadecilresorcinol na casca (DUKE, 1992, TYMAN, 1979, 1992, 1999)

5-[8'(z) pentadecenil] resorcinol na casca (DUKE, 1992, TYMAN, 1979, 1992, 1999)

5-[8'(z), 11'(z) pentadecadienil] resorcinol na casca (DUKE, 1992, TYMAN, 1979, 1992, 1999)

5-[8'(z), 11'(z), 14' pentecatrienil] resorcinol na casca (DUKE, 1992, TYMAN, 1979, 1992, 1999)

2.2.2.4 Metilcardóis

2-metil-5-pentadecilresorcinol na castanha (DUKE, 1992; MASAKI et al., 1991; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

2-metil-5-[8'(z)-pentadecenil] resorcinol na castanha (DUKE, 1992; MASAKI et al., 1991; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

2-metil-5-[8'(z), 11(z)-pentadecadienil] resorcinol na castanha (DUKE, 1992; MASAKI et al., 1991; TYMAN, 1979, 1992, 1999)

2-metil-5-[8'(z), 11'(z), 14'pendecatrienil] resorcinol na castanha (DUKE, 1992; MASAKI et al., 1991; Tyman, 1979, 1992, 1999)

2.2.3 Flavonóides

Naringenina na castanha (DUKE, 1992)

Catequina na castanha (DUKE, 1992)

Leucocianidina no fruto (DUKE, 1992) **Epicatequina na castanha (DUKE, 1992)** **Canferol nas folhas (DUKE, 1992)** **Quercetina nas folhas (DUKE, 1992)**

2.2.4 Taninos

Os taninos de *Anacardium occidentale* não foram descritos especificamente. Entretanto, De MELLO e SANTOS (2002) tratam de proantocianidina que é somente encontrada em Fabaceae e Anacardiaceae. LAURENS *et al.* (1982) que trabalharam com a casca, relatam a presença somente de taninos condensados numa espécie senegalesa. MOTA *et al.* (1985), de Paraíba (Brasil), estudando também a casca, isolaram uma mistura de taninos hidrolisáveis e condensados.

2.3 Dados Farmacológicos sobre *Anacardium occidentale*

Como foi verificado anteriormente, os dados etnobotânicos apresentam vários usos medicinais do cajueiro. Partindo destes dados, um amplo estudo farmacológico foi feito. Várias atividades observadas na medicina caseira foram comprovadas em

estudos farmacológicos, utilizando testes *in vivo* como *in vitro*. Nestes ensaios podemos citar particularmente as atividades antimicrobiana e antiúlcera.

2.3.1 Atividade antibacteriana

Realizando uma pesquisa bibliográfica, foram encontrados os seguintes trabalhos:

KUBO *et al.*(1999) trabalharam com o extrato etanólico do fruto fresco de *Anacardium occidentale*. De acordo com estes autores, o extrato inibe o crescimento de *Helicobacter pylori* (atividade bacteriostática). A partir de um estudo de fracionamento biodirecionado do extrato etanólico os componentes ativos foram identificados como ácido 6[8(z)-pentadecil] salicílico ou ginkgol ácido 6[8'(z), 11'(z),14'pentadecatrienil] salicílico e ácido 6[8'(z), 11'(z) pentadecadienil] salicílico (item 2.2.2.1).

MASAKI e KUBO (1991) trabalharam com os 16 fenóis lipídios (ver item 2.2.2), extraídos do óleo da castanha de *Anacardium occidentale* e observaram atividade antibacteriana significativa somente sobre as bactérias gram-positivas, entre as quais, *Streptococcus mutans*.

AKINPELU (2001), ensaiando o extrato metanólico da casca de *Anacardium occidentale*, notou que o mesmo exibia uma atividade antibacteriana sobre 13 das 15 bactérias submetidas ao ensaio. A triagem fitoquímica revelou a presença de flavonóides e de taninos.

KUDI *et al.*(1999) ensaiaram um extrato etanólico a 80% das folhas e também da casca, e observaram uma atividade sobre bactérias gram+ e 2 bactérias gram- (*E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

LAURENS *et al.*(1982) trabalharam com um extrato alcoólico das folhas e também da casca e mostraram que o efeito antidiarréico é relacionado à atividade antibacteriana dos extratos. A presença de taninos condensados e de heterosídeos flavônicos derivados da quercetina e de ácidos fenólicos foi verificada no extrato.

2.3.2 Atividade antiúlcera

Dois estudos utilizando o extrato da casca de *Anacardium occidentale* foram realizados por FRANCA *et al.* (1993 e 1996). Estes autores comprovaram a eficácia do extrato contra as úlceras da pele, devidas a *Leshmania braziliensis*.

Como foi citado anteriormente, KUBO *et al.* (1999) mostraram a existência de atividade inibitória sobre *H. pylori*, uma bactéria envolvida nas úlceras pépticas, de compostos fenólicos extraídos do fruto de *Anacardium occidentale*. Estes autores relatam a existência destes compostos nas diversas partes da espécie.

A pesar de boas atividades farmacológicas evidenciadas na literatura, estudos de toxicidades sobre o *Anacardium occidentale* não foram encontrados enquanto de acordo com BARRY *et al.* (2003) e FERREIRA (2002), todas as substâncias são tóxicas quando as doses administradas são suficientes. Para que um novo fármaco possa ser usado como medicamento, a atividade farmacológica deve ser evidenciada nas doses nas quais a toxicidade é menor (GRANVILLE, 2002; BARRY *et al.*, 2003; WEPIERRE, 1983).

Um outro elemento de escolha, é sua seletividade, isto é, a especificidade da ação farmacológica do novo produto sem levar à indução de outros efeitos indesejáveis. Os ensaios de toxicidade seguem sempre os ensaios de atividade para seleção de um novo fármaco. Os ensaios mais freqüentes são os de toxicidade aguda, toxicidade subaguda, toxicidade crônica, além de outros mais direcionados, como os estudos sobre a função de reprodução (embriotoxicidade, teratogênese) e os estudos sobre o potencial mutagênico e carcinogênico (GRANVILLE, 2002, BARRY *et al.*, 2003, FERREIRA, 2002). Os ensaios de toxicidade seguem normas, por exemplo, de OECD¹, USA-Environmental Protection Agency OPPTS², JMAFF³, DOT⁴ e indicam protocolos a serem aplicados aos ensaios toxicológicos (AULETTA, 1999).

¹ OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

² OPPTS: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances

³ JMAFF: Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

⁴ DOT: Department of Transport(USA)

2.4 Testes de toxicidade

2.4.1 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda permite apreciar os sintomas da intoxicação e a dose tóxica que pode se traduzir em dose mínima mortal ou dose letal 50%.

O teste é realizado em 24 horas e é seguido por um acompanhamento de 14 dias (WEPIERRE, 1983, AULETTA, 1999).

2.4.1.1 Dose mínima mortal (Dmm)

A dose mínima mortal é a dose mínima de uma substância, capaz de matar um animal em determinadas condições experimentais. Na prática, a substância estudada é administrada em solução por via endovenosa, de maneira lenta e continuada. A quantidade injetada, que provoca parada cardíaca, é a Dmm (WEPIERRE, 1983).

2.4.1.2 Dose letal 50% (DL50)

A DL50 ou dose letal mediana de uma substância corresponde à dose da mesma capaz de matar cerca de 50% dos animais de mesma espécie. A determinação da DL50 é fundamentada nas respostas de mortos ou sobrevivência, usando-se várias doses da substância testada (BARRY *et al.*, 2003, AULETTA, 1999).

2.4.2 Toxicidade Subaguda ou Subcrônica

A toxicidade subaguda tem por objetivo detectar com várias doses, as alterações funcionais ou anatomo-patológicas do organismo e eventualmente constatar a reversibilidade das modificações (WEPIERRE, 1983). Dependendo da duração do experimento de administração reiterada, alguns autores fazem uma distinção entre toxicidade subaguda e toxicidade subcrônica. Assim para os autores CHRISTOPHER

e KIT (2001), a toxicidade subaguda faz-se em 1 mês ou menos e a toxicidade subcrônica acontece em 13 semanas ou 3 meses. O estudo de toxicidade de administração reiterada implica análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatologia.

Os estudos de toxicidade de extratos vegetais, encontrados na literatura, englobam toxicidade aguda, subcrônica e crônica. Estudos toxicológicos especiais, como potencial mutagênico ou sobre a função reprodutiva e teratogenicidade, são raros. Uma grande variedade de substâncias naturais é conhecida pelas suas propriedades carcinogênicas (GRINGAUZ, 1997; BRASILEIRO, 1998).

2.4.3 Potencial carcinogênico e mutagênico

Na maior parte dos casos de câncer, a emergência de um tumor pode ser atribuída a agentes que causam danos ao DNA, ou que interferem na sua replicação e reparo (BRASILEIRO, 1998).

O primeiro exemplo de carcinogênese experimental a partir de um produto puro foi obtido pelos autores Kennaway, Cook e colaboradores, em 1933 (apud HOFNUNG, 1984), que aplicaram benzo- α -pireno sobre a pele de camundongos, para obter tumores. Esses métodos de análise eram preferíveis à epidemiologia que utiliza humanos como sujeitos experimentais, mas apresentavam limitações sérias. São longos e caros e por isto, não permitem analisar os produtos de uso diário nem os novos produtos comercializados a cada ano. Entre 1955 e 1982 mais de 700 mil substâncias para a terapia do câncer foram avaliadas pelo National Câncer Institute, sendo que 350.000 eram sintéticas, 200.000, produtos de fermentação, 120.000 extratos vegetais e 16.000 originárias de animais marinhos (GRINGAUZ, 1997). Os testes de mutagenicidade têm por objetivo avaliar rapidamente e com baixo custo o potencial carcinogênico de um agente químico, físico ou de uma mistura (HOFNUNG, 1984, MITCHELL, 1999). Nestes últimos anos, vários trabalhos sobre agentes químicos permitiram perceber uma correlação entre potenciais mutagênico e carcinogênico. Em 1975, McCANN e colaboradores, estudando 300 compostos

químicos, mostraram que existe uma alta correlação (90%) entre o potencial carcinogênico e mutagênico. A partir de 70 agentes antineoplásicos supostamente carcinogênicos, BENEDICT e colaboradores, em 1977, comprovaram a mesma alta correlação entre mutágenos e carcinógenos. Assim, o teste de mutagenicidade de Ames, por exemplo, é baseado na hipótese segundo a qual carcinógenos são inicialmente mutágenos (AMES *et al.*, 1973, ECOBICHON, 1992). No entanto, certos tipos de agentes carcinogênicos não são obrigatoriamente mutagênicos (HODGSON e LEVI, 1997). Nos ensaios de BENEDICT e colaboradores (1977), por exemplo, mesmo tendo sido observada uma alta correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade, dois carcinógenos, a actinomicina D e a bleomicina, não foram positivos ao teste de Ames, sugerindo que nem todos os processos carcinogênicos são originados de mutagenese.

2.4.3.1 Inventário dos testes de mutagenicidade

Existem mais de 100 testes que visam medir as alterações no DNA. Dentre estes, os mais usados são os baseados nas teorias de mutação gênica e cromossômica (MITCHELL, 1999).

2.4.3.1.1 Mutações gênicas

São alterações pontuais no DNA, que podem se traduzir pela simples substituição de pares de bases ou de deleções de bases e de nucleosídeos (estruturas do DNA constituídas de uma pentose e uma base purínica ou pirimidínica).

Os testes baseados nas mutações gênicas usam células bacterianas ou células de mamíferos. Com as células bacterianas, temos o teste com *Escherichia coli*, o teste de Ames e, utilizando células de mamíferos temos o teste de mutação pontual no locus TK (MITCHELL, 1999).

2.4.3.1.2 Mutações cromossômicas

As mutações cromossômicas se traduzem por vários tipos de alterações no cromossomo eucariótico. Estas mutações abrangem pequenas ou grandes deleções, trocas de filamentos de DNA, não-disjunções dos lotes de DNA e as recombinações mitóticas. Nos testes baseados neste tipo de mutações, distinguimos vários, dentre os quais se destaca o teste de micronúcleos da medula óssea de ratos ou camundongos (MITCHELL, 1999).

2.4.3.2 Teste de Ames

O teste de Ames consiste em examinar se uma substância é capaz de induzir mutações na bactéria *Salmonella typhimurium*. As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas neste teste são as que contêm uma mutação em um dos genes que controla a síntese da histidina, o gene *his*. A mutação neste gene leva à forma alélica *his*⁻, que torna as linhagens incapazes de crescer em um meio sem histidina. Com uma frequência muito baixa, estas mutações no gene *his* para seu alelo *his*⁻ podem reverter espontaneamente em *his*⁺, isto é, na forma alélica possibilitando a biossíntese da histidina. Assim, esta nova forma alélica *his*⁺ vai permitir às bactérias que a possuem crescer em um meio sem histidina. A frequência destas mutações reversas pode aumentar consideravelmente quando as bactérias *his*⁻ estão em contato com os agentes mutagênicos. O teste de Ames permite quantificar a indução das mutações *his*⁺ (MARON e AMES, 1983).

2.4.3.2.1 Procedimentos do teste de Ames

O teste qualitativo ou spot test permite saber rapidamente se um produto tem um efeito mutagênico e/ou tóxico sobre uma linhagem bacteriana. Para realizá-lo, 5 a 10 µL de diversas concentrações da substância a ser testada são depositados numa placa com linhagens bacterianas. Quando a substância é letal após incubação,

observamos zonas de inibição e num segundo caso, aparição de mutantes ao redor de cada aplicação.

O teste quantitativo consiste em formar uma série de misturas de quantidade constante da linhagem bacteriana e de quantidades crescentes da substância a ser testada e depois, expô-las nas placas contendo um meio onde podem crescer só os revertentes his⁺. Traços de histidina são adicionados ao meio de cultura para permitir 2 a 3 ciclos de divisão das bactérias, já que alguns agentes mutagênicos agem somente no crescimento das bactérias. Em geral, para um produto mutagênico, podem existir quatro regiões principais na curva que exprime o número de revertentes em função da concentração de substância. O potencial mutagênico é definido pela inclinação da região linear desta curva (parte B da figura 2).

Este teste pode ser feito com pré-incubação em meio líquido ou sem pré-incubação. Certos agentes genotóxicos dificilmente serão detectados sem pré-incubação, sendo preferível os testes com pré-incubação (HOFNUNG,1984; MARON e AMES, 1983).

2.4.3.2.2 Biotransformação e importância do S9 mix no teste de Ames

Quando um composto exógeno é inserido em um sistema biológico, ele deve sofrer um processo de metabolização chamado também de biotransformação. A etapa da metabolização tem uma importância sobre o mesmo, tanto no seu potencial tóxico, como em sua habilidade de excreção. O produto de metabolização é sempre mais solúvel na água do que o seu composto original e assim facilita a sua excreção (HODGSON e LEVI,1994). De acordo com MELO (2002), a finalidade desta fase é de tornar o xenobiótico mais polar, favorecendo sua solubilidade em água, para ser facilmente eliminado pelo rim, a mais importante via de eliminação. No entanto, processos de biotransformação podem levar a um aumento de toxicidade do composto. Assim, alguns compostos são genotóxicos somente depois de terem sido biotransformados (HOFNUNG,1984). A biotransformação ocorre em duas fases, no fígado. A fase 1 consiste na alteração da molécula original, de forma a possibilitar a

fixação de um grupo funcional que poderia ser conjugado na segunda fase. Desta maneira, é inserido neste xenobiótico um grupo funcional polar durante a fase 1 ou fase das reações metabólicas. A fase 2 consiste em uma conjugação, tendo como centro o grupo funcional polar inserido na primeira fase. Os produtos da fase 2 podem às vezes admitir uma outra metabolização em uma terceira fase. Muitas vezes a fase 1 é catalisada por enzimas encontradas abundantemente no fígado dos animais. As enzimas da biotransformação têm sempre uma localização celular particular; a maioria delas se encontra no retículo endoplasmático. Na fase 1, as primeiras transformações químicas às quais o composto é submetido, são reações de oxidação catalisadas por um só sistema enzimático, o Citocromo P450 mono-oxigenase, localizado no retículo endoplasmático liso. Em humanos, por exemplo, os P450 que se relevaram ativos no metabolismo dos fármacos são os citocromos CY2A6, CYP2C, CYP2D e CYP2E1 (GILLHAM *et al.*, 2000).

Este sistema enzimático pode ser isolado a partir da fração microsomal resultante do fracionamento celular (TIMBRELL, 1995, GRINGAUZ, 1997).

Como o referido sistema enzimático é encontrado no fígado, no teste de Ames, a metabolização do composto é permitida com a adição do S9 mix, preparado a partir de fígado de rato (HOFNUNG, 1984; MARON e AMES, 1983).

Figura 2. Curva dose resposta de avaliação de mutagenicidade pelo teste de Ames (HOFNUNG, 1984)

2.4.3.2.3 *Linhagens bacterianas usadas e suas características*

Várias linhagens são usadas no ensaio, uma vez que determinados agentes mutagênicos revertem certos tipos de mutação. As linhagens usadas derivam da linhagem selvagem de *Salmonella typhimurium* LT2. Existem as linhagens TA1535, TA100 e TA102, que possuem mutações his^- , correspondendo a substituições de pares de bases (AMES *et al.*, 1975; LEVIN *et al.*, 1982a), as quais são usadas preferencialmente no caso dos agentes mutagênicos que provocam substituições de pares de bases. As linhagens TA1537, TA1538, TA97 e TA98 possuem mutações his^- , que levam a alterações do quadro de leitura do código genético, isto é, pequenas adições ou deleções de pares de bases (Frameshift) (LEVIN *et al.*, 1982b; ISONO e YOURNO, 1974). Estas linhagens são, portanto, usadas preferencialmente para os agentes que provocam adições ou supressões de pares de bases.

Além da mutação his^- , as linhagens possuem outras mutações que aumentam a capacidade de testar os agentes mutágenos:

- a mutação *rfa* afeta o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa da bactéria, aumenta a permeabilidade das linhagens para as moléculas de grandes tamanhos.
- a mutação *uvr B* leva a uma deficiência do processo de reparação por excisão, de forma que um número elevado de lesões do DNA primitivo não é mais reparado. Esta mutação confere às linhagens uma sensibilidade maior aos agentes capazes de danificar o DNA, mas a mesma torna as linhagens auxotróficas à biotina.

Pode-se também introduzir nas linhagens o fator R: o plasmídeo pKM 101, que aumenta a mutagênese induzida e espontânea por crescimento de erros durante a replicação (AMES *et al.*, 1975, LEVIN *et al.*, 1982a e 1982b). Nestes últimos anos, novas linhagens de *Salmonella typhimurium* foram criadas. Estas linhagens possuem novas características genéticas, tornando, assim, o teste de Ames mais poderoso. Isto pode ser verificado na linhagem TA1538/1A2bc-b5, possuindo dois plasmídios capazes de exprimir as atividades de citocromos P450 humano (KANG *et al.*, 2004).

2.4.3.3 Teste de micronúcleo de eritrócitos da medula óssea de mamíferos

O teste do micronúcleo consiste em detectar dano nos cromossomos ou nos lotes mitóticos de eritroblastos, induzido por agentes mutagênicos, a partir da análise de amostras de eritrócitos originados da medula óssea de animais, geralmente roedores (EPA⁵, 1998).

2.4.3.3.1 Gênese dos eritrócitos (SACHER, et al., 2002)

No processo de desenvolvimento morfológico dos precursores eritrocitários, como mostrado na figura 3, o primeiro precursor é uma célula grande e imatura, o proeritroblasto, com múltiplos nucléolos e um citoplasma densamente basofílico. Esta célula amadurece no eritroblasto basofílico. O citoplasma da célula assume uma coloração rósea (com corante de Giemsa), com o aumento da síntese da hemoglobina e a seguir, o núcleo torna-se mais picnótico e agregado, produzindo um eritroblasto policromatofílico. No decorrer da maturação, há uma maior condensação do núcleo e hemoglobinizacão contínua do citoplasma no eritroblasto ortocromático. Finalmente, a célula perde o seu núcleo, restando um RNA citoplasmático residual produtor de policromasia (coloração difusa cinza ou azulada) e o aspecto morfológico de um reticulócito (uma célula rica em RNA, ligeiramente maior do que a célula madura). Depois da expulsão do núcleo, à medida em que os eritrócitos amadurecem, são necessários vários dias para que as células contendo hemoglobina eliminem o RNA citoplasmático residual. Este processo ocorre tanto na medula óssea como na circulação. Durante esta última fase, o reticulócito contendo RNA é ligeiramente maior do que a célula madura e contém fragmentos de mitocôndrias e de organelas bem como RNA ribossômico.

⁵United States Environmental Protection Agency(EPA)Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.5395, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, EPA 712-C-98-226 August 1998

2.4.3.3.2 Princípio do teste

No decorrer do desenvolvimento eritrócitário, a interferência de um agente clastogênico leva à formação de micronúcleos que são similares em aparência, mas muito menores do que o núcleo verdadeiro.

O teste de micronúcleo da medula óssea ou do sangue periférico permite detectar se um produto pode causar mutações cromossômicas. Quando um agente clastogênico intervém durante a diferenciação celular dos eritrócitos imaturos, só o verdadeiro núcleo é expulso da célula enquanto o micronúcleo formado permanece. Nos eritrócitos policromáticos (PCE) que têm uma duração de vida curta, a aparição de micronúcleo traduz um evento recente. A frequência de micronúcleos induzidos depende do tempo da amostra, isto é, com o nível de desenvolvimento das células sanguíneas (PUTMAN *et al.*, 2001).

Quando os policromáticos estão em um estágio intermediário de desenvolvimento, eles contêm ainda, ribossomos. Contrariamente aos policromáticos, os eritrócitos normocromáticos (NCE) são os eritrócitos maduros e assim não possuem ribossomos. Uma vez corados por corantes seletivos aos ribossomos, os dois grupos de eritrócitos apresentarão diferentes colorações (EPA, 1998). Na literatura são encontrados vários tipos de corantes. O Giemsa, que foi inicialmente usado, baseando-se na diferenciação a partir de ribossomos (HAYASHI *et al.*, 1983). O Giemsa cora os eritrócitos jovens em azul arroxeado, enquanto os normocromáticos aparecem em laranja acinzentado (Figura 4).

Um outro corante, a Acridina laranja, tem a capacidade de discriminar DNA (dos micronúcleos) e RNA (das inclusões). Com este corante, o DNA emite uma fluorescência verde, enquanto que o RNA, uma fluorescência vermelha (HAYASHI *et al.*, 1983). A acridina se liga também aos polissacarídeos ácidos, para emitir uma fluorescência vermelha clara (KASTEN, 1967).

A avaliação da clastogenicidade a partir do teste consiste em avaliar o número de policromáticos com micronúcleo em um grupo teste e compará-lo ao número obtido

com um controle negativo, constituído pelo veículo. Um controle positivo, usando um agente mutagênico, é usado para estabelecer a efetividade do experimento.

Figura 3. Gênese da hemácia no processo normal e esquematização de intervenção de agente mutagênico

Figura 4. Métodos de coloração por Giemsa e por Acridina Laranja. Figuras A e B, medula óssea de camundongo 24h após tratamento com mitomicina: pode-se verificar 4 micronúcleos corados em azul com Giemsa (A) e amarelo-esverdeado, com Acridina Laranja. 2 NCE são corados com Giemsa (A), não emitem fluorescência com a Acridina (B). O micronúcleo a ser levado em consideração é o da célula com fluorescência vermelha, que é um PCE (D, F). Figuras C e D, aspecto da medula óssea de rato obtido 24h após tratamento com mitomicina. Existe uma célula que corada com Giemsa, apresenta micronúcleo (flecha espessa) mas não emite fluorescência com Acridina. Nesta figura os PCEs são as células que emitem a fluorescência. Figura E e F: medula de camundongo obtido 24 horas após indução de clastogenicidade com a quinacrina dihidroclorídrico. Uma célula considerada como NCE após coloração com Giemsa apresenta uma fluorescência com a Acridina. (Adaptado de HAYASHI et al. 1983)

3. OBJETIVOS

Folhas de Anacardium occidentale L.

3 Objetivos

Foram objetivos do presente trabalho:

1. Caracterizar morfo-anatômicamente das folhas de *Anacardium occidentale*;
2. Caracterizar os principais grupos de princípios ativos presentes nas folhas;
3. Verificar as atividades antiúlcera aguda e antibacteriana do extrato hidroetanólico das folhas de *Anacardium occidentale* e de suas frações;
4. Avaliar toxicologicamente o extrato das folhas hidroetanólico de *Anacardium occidentale*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de Anacardium occidentale L.

4 Material e Métodos

4.1 Estudo farmacobotânico com as folhas de *Anacardium occidentale*

4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas do clone CCP-76 do cajueiro (*Anacardium occidentale* L. Anacardiaceae) foram coletadas em Maio de 2002, no campo experimental da EMBRAPA, situado a 50 km de Fortaleza (4°10'S; 38°27'W). A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica (SPF) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, sob o n° SPF 376982.

4.1.2 Caracterização macroscópica da folha

Folhas adultas frescas foram analisadas quanto às suas dimensões, forma, aspecto externo, cor e odor. Para tanto, foram observadas a olho nu ou com auxílio de lupa estereoscópica Willd, de acordo com a metodologia usada por HICKEY (1973).

4.1.3 Estudos anatômicos da folha

Cortes da folha foram realizados a mão livre, no sentido transversal, na região do terço mediano inferior da lâmina foliar. Cortes paradérmicos foram realizados a partir da lâmina foliar, para observação da epiderme. Após tratamento com hipoclorito de sódio 20% e lavagem com água acética 0,5%, os cortes histológicos foram corados, usando dupla coloração com azul de astra e fuscina básica e montados em glicerina-água (1:1) (SOUZA *et al.* 1995, OLIVEIRA e AKISUE, 2000)

A alguns cortes foi adicionada solução de cloreto férrico a 2%, para verificação da presença de substâncias fenólicas nos tecidos analisados (JOHANSEN, 1940).

4.2 Estudo químico com as folhas de *Anacardium occidentale*

4.2.1 Obtenção do extrato bruto

As folhas de *Anacardium occidentale* foram secas durante 24h em estufa de circulação de ar a 50° e, a seguir, moídas, para obter um pó de coloração verde.

A droga pulverizada foi extraída por percolação, com uma solução de etanol 70%. Para tanto, o pó da droga foi mantido em maceração com etanol 70%(v/v) por 24h e a seguir, foi realizada a percolação com fluxo de 3mL/min, usando o mesmo líquido extrator. A solução hidroetanólica obtida foi concentrada em rotaevaporador Büchi com temperatura entre 40 e 50°C. A solução aquosa restante foi liofilizada em liofilizador Edwards. Desta maneira, foi obtido o extrato hidroetanólico a 70%, liofilizado, de *Anacardium occidentale* (EEAO) ou extrato bruto. Várias extrações foram feitas, usando folhas da mesma época do ano. A Tabela 1, a seguir, resume o local de coleta e o rendimento da primeira extração.

Tabela 1: Local de coleta e rendimento(rdt) da primeira extração das folhas de cajueiro

Droga e Espécie	Lugar de coleta(Data)	n° de referencia	Peso seco (g)	Volume do extrato hidroetanólico (L)	Peso seco do extrato hidroetanólico [g](rdt)
Folhas de <i>Anacardium occidentale</i>	Pacajus, Ceará Maio 2002	SPF 376982	1440	14	376 (26,11%)

4.2.2 Triagem fitoquímica

Os ensaios foram realizados com o pó de folhas e com o extrato bruto.

4.2.2.1 Alcalóides

Dois gramas de amostra foram extraídos em meio alcalino com clorofórmio. Os extratos obtidos foram testados com os seguintes reativos de precipitação: Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer (AKISUE *et al.*, 1991; DOMINGUEZ, 1961, 1983; FARNSWORTH, 1966; FREITAS & BACCHI, 1990; WICHTL, 1971).

4.2.2.2 Antraderivados

Dois gramas de amostra foram levados à fervura com 30 mL de etanol a 60%. O extrato hidroalcoólico foi analisado através da reação de Bornträger (AKISUE *et al.*, 1991; FREITAS & BACCHI, 1990).

4.2.2.3 Cumarinas

Dois gramas de amostra foram lavados com éter de petróleo a frio. Depois da lavagem, o pó foi colocado em um béquer e extraído com 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5N a quente. A mistura foi filtrada e o extrato acidificado com ácido clorídrico 1N. Após acidificação a extração foi realizada com éter etílico. O extrato etéreo foi colocado em cápsula de porcelana e concentrado sendo, a seguir, adicionando-se uma gota de solução saturada de hidroxilamina em álcool e uma gota de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 0,5N. A mistura foi aquecida até início da fervura e após resfriamento, foram adicionadas uma gota de ácido clorídrico 0,5N e uma gota de solução de cloreto férrico 1% (FARNSWORTH, 1966).

4.2.2.4 Esteróides

Dois gramas de amostra foram fervidos com 20 mL de etanol 80% e filtrados. O extrato hidroalcoólico foi analisado através da reação de Liebermann-Burchard (AKISUE *et al.*, 1991; DOMINGUEZ, 1961, FARNSWORTH, 1966; FREITAS & BACCHI, 1990, MATOS *et al.*, 1965).

4.2.2.5 Saponinas

Dois gramas de amostra foram fervidos com 15 mL de água. A mistura foi filtrada e o filtrado colocado em um tubo de ensaio sob forte agitação, para verificação da propriedade afrogênica (AKISUE *et al.*, 1991; FREITAS & BACCHI, 1990).

- *Índice de espuma:*

0,500g do extrato bruto liofilizado foram solubilizados em água destilada em balão volumétrico de 50mL. Este extrato aquoso a 1% foi utilizado para determinação do índice de espuma.

Dez tubos de ensaio de dimensões semelhantes foram usados, adicionando-se 5mL do extrato aquoso a 1% no primeiro e no segundo tubos. A todos os tubos, com exceção do primeiro, foram adicionados 5mL de água destilada. O segundo tubo foi homogeneizado e 5mL da solução foram transferidos para o terceiro tubo. O processo foi realizado seqüencialmente até o décimo tubo. 5mL do décimo tubo foram desprezados.

As seguintes concentrações foram obtidas: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600, 1/51200. A seguir, todos os tubos foram agitados vigorosamente ao mesmo tempo, durante 15 segundos, no sentido longitudinal e deixados em repouso por 15 minutos. Após repouso, os tubos foram observados e foi anotada a menor diluição capaz de provocar uma camada de espuma persistente de 1cm de altura. O índice de espuma é o valor da diluição (inverso da concentração) do referido tubo.

4.2.2.6 Compostos fenólicos

Dois gramas de amostra foram fervidos com 20 mL de água e após resfriamento, filtrou-se em papel de filtro Watman. O filtrado foi testado com acetato de chumbo a 10%, cloreto férrico a 2% e acetato de cobre a 5% (AKISUE *et al.*, 1991; FREITAS & BACCHI, 1990).

4.2.2.7 Flavonóides

a. Reação de Shinoda

Dois gramas de amostra foram fervidos com cerca de 20 mL de etanol 80%. Após resfriamento, a mistura foi filtrada e testada em soluções de cloreto de alumínio

em etanol a 5% (p/v), hidróxido de sódio 1 N e pela reação de Shinoda (AKISUE *et al.*, 1991; DOMINGUEZ, 1961, 1983; FREITAS & BACCHI, 1990; MATOS *et al.*, 1965);

6. Reação da cianidina

Foram evaporados 2 mL do filtrado, de acordo com o item 4.2.3.6. A seguir, foram adicionados 5 mL de etanol clorídrico ao resíduo. A adição de 2 a 3 pedaços de magnésio e de gotas de álcool isoamilico permitiu verificar a presença de flavonóides.

Assim, a aparição de coloração alaranjada foi associada à presença de flavona, a aparição de coloração vermelho-cereja, à presença de flavanóis; de coloração vermelho-violeta, considerado como sendo devida à presença de flavanonas e, finalmente, a coloração vermelha-púrpura traduziu a presença de antocianinas (SIMAGA, 1999; NZI, 2002)

4.2.2.8 Taninos

4.2.2.8.1 Taninos totais

O filtrado obtido no item 4.2.3.6 foi submetido à solução de gelatina em água a 2,5% e sulfato de quinina a 0,5% observando-se o aparecimento de precipitado. A prova de adstringência foi realizada através da degustação dos extratos (FREITAS & BACCHI, 1990).

4.2.2.8.2 Taninos condensados e hidrolisáveis

a) Taninos condensados

5mL do filtrado do item precedente foram evaporados até a secura e ao resíduo foram acrescentados 15 mL de reagente de Stiasny (10mL de Formol 30% + 5mL de ácido clorídrico concentrado). A mistura foi mantida em banho de água a 80°C por 30minutos. Após resfriamento, a precipitação da solução em grandes flocos foi

considerada como devida à presença de taninos condensados(SIMAGA, 1999; NZI, 2002).

6) Taninos hidrolisáveis

A solução que foi usada para caracterizar os taninos condensados foi filtrada e após adição de 3 gotas de cloreto férrico 2%, a aparição de coloração azul a preto intensa foi interpretada como presença de taninos hidrolisáveis(SIMAGA, 1999; NZI, 2002).

4.2.3 Métodos cromatográficos analíticos

4.2.3.1 Cromatografia em camada delgada

Análise cromatográfica em camada delgada foi realizada de acordo com WAGNER e BLADT (1996).

100g de extrato liofilizado foram fracionados usando sucessivamente como solvente clorofórmio, acetato de etila, etanol, etanol 50%, e água.

A análise cromatográfica em camada delgada foi direcionada aos flavonóides, utilizando as frações obtidas anteriormente.

- *Amostras:*

- Fração clorofórmio
- Fração acetato de etila
- Fração etanol 100%
- Fração etanol 50%
- Extrato bruto em água

- *Padrões:*

Rutina e Quercetina(Concentração: 0,1% em metanol)

- *Fase estacionária*

- Sílica GF
- Espessura: 250µm
- Ativação: 105°C por uma hora
- Suporte: placas de vidro de 15X20 cm

- *Fases móveis*

- Acetato de etila - ácido fórmico- ácido acético glacial- água, 100:11:11:26, (v/v/v/v)
- Clorofórmio - acetona - ácido fórmico, 75:16,5:8,5, (v/v/v)
- Acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético glacial - água, 150:5:5:10, (v/v/v/v)
- Acetato de etila- ácido fórmico - ácido acético glacial - água, 110:5:5:10, (v/v/v/v).

- *Desenvolvimento:*

- Saturação da cuba: total
- Distância de percurso:10cm
- Sentido: ascendente

- *Revelação*

Difenilboriloxietilamina 1% em metanol (NP)

- *Deteção*

UV 365nm

4.2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Uma análise de HPLC-DAD foi realizada. Duas amostras foram analisadas: extrato liofilizado e uma fração do mesmo extrato, obtida de acordo com a figura 5, denominada fração ME (MENSAH, 2000).

2 mg de cada amostra foram dissolvidos em 20 mL de metanol (pureza HPLC), filtrados e alíquotas de 50µL foram analisadas em cromatógrafo HP series II 1090, controlado por um software HP HPLC 3D ChemStation, utilizando-se coluna C₁₈ Spherisorb ODS2 (250 X 4 mm, 5µm). A fase móvel foi constituída de um gradiente de solventes: ácido acético 1% (A) e acetonitrila (B), sendo 0-5 minutos 12% de B em A; 5-8 minutos 12-20% de B em A; 8-28 minutos 20% de B em A; 28-38 minutos 20-50% de B em A; 38-48 minutos 50-65% de B em A. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 40°C. A detecção dos picos foi feita através de sensor DAD (diode-array detector) em 280 e 352 nm e os espectros foram registrados entre 200 a 600 nm (modificado de SCHIEBER *et al.*, 2001). Picos de flavonóides e ácidos fenólicos foram identificados a partir da biblioteca digital de compostos do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências da USP, obtidos nas mesmas condições cromatográficas por comparação de espectros de UV e de tempo de retenção.

Figura 5. Fracionamento do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* para obtenção da fração ME

^a**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada

O liofilizado obtido deste fracionamento foi denominado fração ME.

4.2.3.3 Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa(LC-MS)

O extrato bruto foi extraído em metanol e depois concentrado. A seguir o extrato hidro-metanólico foi submetido a um estudo de LC-MS.

Condições cromatográficas:

HPLC: Shimadzu modelo SPD-M10Avp. Utilizou-se coluna C₁₈ Spherisorb ODS2 (250 X 4 mm, 5µm). A fase móvel foi constituída de um gradiente de solventes:ácido acético 1%(A) e acetonitrila(B), sendo 0-5 minutos 12% de B em A; 5-8 minutos 12-20% de B em A; 8-28 minutos 20% de B em A; 28-38 minutos 20-50% de B em A; 38-48 minutos 50-65% de B em A. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 40°C

Volume de injeção: 20µL

Espectrometria de Massa : Modelo ESQUIRE 3000 plus de Bruker Daltonics

Método de ionização: Electrospray Ionization (ESI)

Analizador de massa: Sistema ION TRAP

Temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v, Skimmer :40,0v

4.2.4 Doseamento dos fenóis totais

4.2.4.1 Fenóis totais no Extrato hidroetanólico de cajueiro(EEAO)

Para a dosagem dos compostos fenólicos totais usamos a metodologia de Folin-Denis modificada por SWAIN e HILLIS (1959).

- *Preparo do reagente de Folin-Denis*

Em 750mL de água destilada dissolveu-se 100g de Na₂WO₄.2H₂O, 20g de ácido fosfomolibdico e 50mL de H₃PO₄. A solução assim obtida foi aquecida sob refluxo

durante 2 horas, e após resfriamento, diluiu-se com água destilada para obter 1000mL em balão volumétrico.

- *Preparo da solução de carbonato de sódio saturado*

Em um balão volumétrico contendo 100mL de água destilada, foram dissolvidos 35g de Na_2CO_3 anidro a 70°C , permanecendo a mistura em repouso uma noite. A solução contendo cristais de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ foi filtrada em lã de vidro.

- *Preparo da solução padrão e curva de calibração*

O padrão usado foi o ácido gálico (Merck). Uma quantidade de 50mg de ácido gálico foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, e o volume completado com água destilada.

Alíquotas de 1 a 20 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100mL e foram adicionados 5mL da solução de Folin-Denis, 10mL da solução de Na_2CO_3 e completados com água destilada para 100mL. Antes da leitura das absorbâncias a 760nm, a solução foi deixada em repouso por 30minutos. A leitura foi realizada, em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1601, munido de cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico.

A seguir, foi determinada a curva de calibração do ácido gálico.

- *Preparo da amostra de EEAO e leitura de absorbância.*

50mg do EEAO foram transferidos para um balão volumétrico de 250mL e o volume completado com água destilada (solução estoque da amostra). Três alíquotas de 8mL em três balões volumétricos de 100mL foram usadas para constituir a dose triplicada para leitura. Como anteriormente, foram adicionados 5mL de Folin-Denis, 10mL de Na_2CO_3 , o volume completado para 100mL com água e as soluções deixadas em repouso de 30min e a absorbância lida a 760nm.

4.2.4.2 Doseamento dos taninos no extrato hidroetanólico de cajueiro

A uma alíquota de 40mL da solução estoque da amostra foram adicionados 0,40g de pó de pele. Esta mistura foi agitada por 60min e em seguida, filtrada a vácuo, através papel de filtro Watman. A 16mL do filtrado foram adicionados o reagente de Folin-Denis, Na_2CO_3 e água e a absorbância foi lida como anteriormente descrito. Sendo que os taninos complexam com as proteínas, a quantidade de taninos é avaliada pela diferença de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele contido no filtrado.

4.2.4.3 Doseamento dos flavonóides no EEAO e na sua fração ME

A curva de calibração foi determinada, usando-se uma solução padrão de quercetina 1mg/mL em etanol absoluto (50mg de quercetina diidratada em 50 mL de etanol). Como reagente foi utilizado o cloreto de alumínio 2,5% em água (5g de cloreto de alumínio em 200mL de água destilada).

- *Preparo da solução padrão de quercetina e curva de calibração da quercetina*

Alíquotas de 1mL a 20mL da solução padrão de quercetina (Merck) foram colocadas em 20 balões volumétricos de 25mL. A seguir, foi adicionado a cada balão 1mL de solução de cloreto de alumínio e os 20 balões completados com etanol absoluto. Em seguida, foram agitados por 1 minuto e deixados em repouso por 30 minutos. Procedeu-se à leitura da absorbância em comprimento de onda de 425nm, utilizando-se espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1601, munido de cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico e acoplado a computador e impressora.

Uma solução de 1mL de cloreto de alumínio em um balão de 25mL, completado com etanol foi usada com branco.

Desta maneira, foi determinada a curva de calibração da quercetina.

- *Preparo da amostra de EEAO e determinação da sua absorbância*

0,100g de extrato liofilizado de *A. occidentale* foram solubilizados em 50mL de etanol absoluto, com auxílio de ultra-som. Alíquotas de 4mL foram colocadas em 3 balões volumétricos de 25mL e, em seguida, foi adicionado a cada balão 1mL de solução de cloreto de alumínio, sendo o volume completado com etanol. O ensaio foi realizado em triplicata e precedeu-se a leitura de absorbância como descrito para a quercetina.

- *Fração ME de EEAO*

Procedimento semelhante ao EEAO foi utilizado, e com alíquotas de 2mL, após solubilização em etanol absoluto.

*4.3 Ensaios farmacológicos com o extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale**

4.3.1 Atividade Antiúlcera Gástrica Aguda

4.3.1.1 Animais

O ensaio foi realizado com ratas Wistar de 129 a 186g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, mantidas no ambiente de experimentação uma semana antes do início dos ensaios. A temperatura da sala era de 22°C e os animais foram nutridos com ração proveniente de NUTRIVITAL NUTRIENTES, Colombo/PRA, Brasil e receberam água *ad libitum*.

4.3.1.2 Ensaio com o extrato bruto

A avaliação da atividade antiúlcera aguda do EEAO foi realizada através do modelo de indução com ácido clorídrico e etanol em ratos fêmeas (modificado de MATSUMOTO e YAMADA, 1991; MIZUI e DOTEUCHI, 1983).

Após o período de adaptação, as ratas foram mantidas em jejum durante 24 horas. Em seguida, foram administrados 400mg/kg de peso corporal do extrato liofilizado em solução aquosa em volume de 10 mL/kg aos animais por via oral (LIU *et al.*, 2001; PAIVA *et al.*, 1998). Ao grupo controle foi administrado o mesmo volume de água (10mL/kg).

Trinta minutos após, foi administrado, via oral, HCL 0,3M em etanol 60%, como agente ulcerogênico. Após uma hora, os animais foram mortos com dose excessiva de éter. Seus estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e fixados entre placas de vidro para que as ulcerações fossem avaliadas.

A avaliação das ulcerações foi realizada através da Área Relativa de Lesão. A Área Total de Lesão Ulcerativa foi calculada somando-se as áreas de todas as úlceras e foi expressa em mm². Para a medida das áreas foi utilizado o software ProPlus.

A Área Relativa de Lesão foi calculada através da fórmula:

$$ARL(\%) = ATL/AT \times 100$$

Onde, ARL= Área Relativa de Lesão expressa em percentagem; ATL=Área Total de Lesão em mm², AT= Área Total de estômago em mm² .

4.3.1.3 Efeito de doses crescentes de EEAO sobre a úlcera aguda

O efeito dose/resposta de EEAO na inibição de úlcera aguda foi realizado como anteriormente descrito. Para isto, foram ensaiados 4 níveis de doses (100 mg/kg, 200 mg/kg, 400mg/kg e 800mg/kg de EEAO) para os grupos testes , um grupo de controle negativo (água), e o grupo de controle positivo tratado com o lanzoprazol 30mg/kg. A

DE50% foi calculada a partir da reta de regressão linear usando-se o software Microsoft Excel (TOMA *et al.*, 2002, MONSEF *et al.*, 2004)

4.3.1.4 Frações do EEAO

O fracionamento foi realizado através de duas metodologias:

1) 70g de extrato hidroetanólico de cajueiro foram lavados com éter de petróleo, seguido de extração à temperatura ambiente com diclorometano e depois, metanol (BACKHOUSE *et al.*, 2002). Depois da evaporação, o produto seco obtido a partir de cada solvente foi respectivamente de 0,69g e 45g. Estas frações foram usadas no ensaio antiúlcera.

2) 60g do extrato bruto de cajueiro foram extraídos com n-hexano e depois com uma mistura de acetato de etila/metanol/água 43:22:35 (v/v/v) (HAZEKAMP *et al.*, 2001). Neste último, após evaporação do acetato de etila e do metanol, a fase aquosa restante foi liofilizada e foram obtidos 38,2g de produto seco. Após evaporação do n-hexano, foi obtido 1,8g de produto seco. Estes produtos foram usados no ensaio antiúlcera, com a mesma metodologia do extrato bruto.

4.3.1.5 Análise estatística

A análise dos resultados foi feita a partir da comparação das Áreas Relativas de Lesão Ulcerativa (ARL) no grupo controle e nos tratados, usando como ferramenta o teste t de Student. Para a hipótese de nulidade, «p» foi considerado significativo quando igual ou menor que 0,05.

4.3.2 Atividade antibacteriana .

A atividade antimicrobiana foi procedida através do isolamento primário das bactérias aeróbicas nos meios ágar sangue (*S. aureus*) e Mac Conkey (*E.coli*, *P.*

aeruginosa) à partir de uma amostra bacteriana mantida em -80° com 3 repiques consecutivos, após realizou-se o estudo de susceptibilidade *in vitro*, através de misturas meio de cultura biocida em placa de *petri*, contendo 90% ágar Mueller-Hinton, 10% do extrato bruto de *Anacardium occidentale* em diversas concentrações e quando necessário para bactérias exigentes, adiciona-se 5% sangue de carneiro. O inóculo foi ajustado na escala 0.5 de Mac Farland, correspondente a 1×10^8 células/mL. Foi depositado 5uL do inóculo bacteriano diluído 1:10 em caldo Mueller-Hinton, equivalente a 1×10^4 células/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas numa atmosfera de aerobiose. A placa cuja menor concentração inibiu o crescimento macroscópico, comparado ao controle positivo, foi considerada a concentração bactericida mínima ou concentração letal mínima. A bactéria microaeróbica (5% CO_2), *Campylobacter coli*, foi incubado em atmosfera microaerófila.

A técnica utilizada descreve o volume e composição do meio de cultura sólido, concentração da espécie bacteriana, cuja sensibilidade deseja-se conhecer, concentração dos antimicrobianos(extratos), temperatura e tempo de incubação padronizados; o método é adaptado de Kirby-Bauer, reconhecido pelo comitê nacional para padronizações de técnicas de laboratórios clínicos (NCCLS, 1990, 2000). Procedimento semelhante ao extrato foi utilizado no caso sua fração ME .

4.4 Ensaios de Toxicidade com o extrato hidroetanólico das folhas de Anacardium occidentale

4.4.1 Toxicidade Aguda

4.4.1.1 Animais

Camundongos da linhagem *Swiss*, com 25 a 35 gramas de peso corporal e ratos *Wistar* de 150 a 240 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, foram distribuídos em grupos de 5, segundo o sexo e ficaram em condicionamento por um período de 1 semana, antes do ensaio.

Os animais foram alimentados com ração padrão proveniente de NUTRIVITAL NUTRIENTES, Colombo/PR, e água.

4.4.1.2 Ensaio

O extrato bruto de *A. occidentale* foi administrado por via oral aos animais. Um grupo de 10 animais (5 fêmeas e 5 machos) foi usado como controle, recebendo água numa proporção de 10ml/kg de peso corporal. No grupo tratado(ou grupo teste), 10 animais (5 fêmeas e 5 machos) receberam a dose limite de 2000 mg/kg de peso corporal(AULETTA, 1999, EPA-OPPTS n°870.1100 08/1998). Os pesos nos grupos tratados e controles eram estatisticamente iguais no início do experimento.

4.4.1.3 Observações

Após administração do extrato, os animais foram observados durante 4 horas, nas 24 horas a seguir e, finalmente, duas vezes por dia, até o décimo quarto dia. O consumo de ração, água e o peso corporal foram medidos diariamente. Os mortos, assim como todas as perturbações sintomáticas, foram anotados. Os mortos durante o experimento foram autopsiados, para a determinação da *causa mortis*. Os sobreviventes foram sacrificados no final do experimento e autopsiados. Os órgãos, fígado, rim, pulmão, baço foram pesados e seu peso comparado ao dos animais controle.

4.4.2 Toxicidade de administração reiterada durante 30 dias

Este ensaio foi feito de acordo com a metodologia descrito no protocolo do EPA-OPPTS n°870.3050 de 08/2000.

4.4.2.1 Animais e doses

O condicionamento e a origem dos animais foram os mesmos do ensaio de toxicidade aguda.

Três doses do liofilizado de EEAO foram testadas em grupos de 10 ratos Wistar por dose. Os animais de peso corporal de 175 a 315 gramas foram distribuídos homogeneamente em 3 grupos, de acordo com o peso. A diferença entre as médias dos pesos corporais entre os grupos era estatisticamente não significativa ($p>0,05$).

Os três grupos tratados (ou grupos teste), constituídos de 5 machos e 5 fêmeas cada, receberam diariamente, durante 30 dias, as doses de 400, 700 ou 1000mg/kg de peso corporal de EEAO, por gavagem. O grupo controle recebeu água (veículo).

4.4.2.2 Ensaio

Os animais foram observados durante 30 dias. O peso corporal e os consumos de ração e de água foram anotados.

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com éter etílico, para coleta do sangue e, em seguida, os órgãos foram retirados e autopsiados. Os pesos dos órgãos, assim como o peso corporal, consumo de ração e água, nos tratados e controles, foram comparados.

O sangue dos animais tratados e controle foi analisado bioquimicamente e hematologicamente.

4.4.2.3 Testes bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram analisados de acordo com as técnicas descritas em BARROS et al.(2005).

Após 30 dias de administração *per os* do EEAO, foram avaliadas as funções renal e hepática, a partir de marcadores, que são enzimas ou metabólitos. Os ensaios consistem na determinação espectrofotométrica destes metabólitos e enzimas.

Para verificação da função hepática, foram avaliadas a fosfatase alcalina, a transaminase oxalacética ou aspartato aminotransferase (AST-GOT) e a transaminase pirúvica ou aspartato aminotransferase (ALT-GPT).

Para a função renal foram avaliadas a uréia e a creatinina. Quanto ao metabolismo dos hidratos de carbono, foi dosada a glicose. Foi também feita a dosagem de ferro.

Para determinação destes parâmetros, foram empregadas 5 amostras de soro, coletadas de ratos que foram submetidos às diferentes doses de EEAO. As amostras que apresentaram traços de hemólise foram descartadas.

4.4.2.4 Testes hematológicos

Amostras de sangue foram obtidas por punção venosa (n=5 por grupo) de ratos previamente anestesiados com éter etílico, utilizando-se EDTA (1,5 mg/mL) como anticoagulante. As mesmas foram utilizadas para a realização do hemograma, de acordo com as técnicas utilizadas no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (BORELLI *et al.*, 1995; BORELLI & NARDINELLI, 2001). Foram realizadas dosagens de hemoglobina, contagem de eritrócitos, de leucócitos e estabelecida a fórmula leucocitária.

4.4.3 Toxicidade de administração reiterada durante 90 dias

O teste foi realizado de acordo com o protocolo do EPA-OPPTS nº870.3100 de 08/1998, intitulado «90-Day Oral Toxicity in Rodents».

4.4.3.1 Animais e doses

Três doses do liofilizado de EEAO foram ensaiadas utilizando-se em cada dose, 10 ratos Wistar machos. O peso dos animais foi de, aproximadamente, 150 gramas. Os três grupos receberam diariamente, por 5 dias na semana, durante 3 meses, as doses de 400, 700 e 1000mg/kg de peso corporal. O grupo controle recebeu a água destilada (veículo).

4.3.3.2 Ensaio

4.4.3.3 Ensaio bioquímico

Após 90 dias da administração *per os* do EEAO, foram avaliadas as funções renal e hepática dos animais, a partir de marcadores, que podem ser enzimas ou metabólitos. Para a função renal, foram analisados o cálcio, a uréia e a creatinina. Estes parâmetros foram analisados de acordo com as técnicas descritas em BARROS *et al.* (2005).

Os animais foram observados durante 90 dias e avaliado o peso corporal a cada semana. Ao final do ensaio, os animais foram anestesiados com o éter etílico, para coleta do sangue e, em seguida, os órgãos foram retirados e autopsiados. Os pesos dos órgãos, assim como o peso corporal nos animais tratados e controle foram medidos.

O sangue dos animais tratados e controle foi analisado através de ensaios bioquímicos e hematológicos.

Para a função hepática, os níveis séricos de transaminases, a fosfatase alcalina, o colesterol, as proteínas totais e a albumina, foram avaliados.

4.4.3.4 Testes hematológicos

As amostras de sangue, obtidas por punção venosa (n=5 por grupo), foram coletadas para a dosagem de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos e para estabelecer a fórmula leucocitária (BORELLI *et al.*, 1995; BORELLI & NARDINELLI, 2001).

4.4.4 Histopatologia

Nos dois modelos de toxicidade, de administração por 30 e por 90 dias, um estudo histopatológico foi realizado de acordo com a metodologia usada no

Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Após observação macroscópica dos órgãos, foi feito um estudo microscópico. Para isto, fragmentos representativos de fígado, rim, coração, baço, pulmão e pâncreas foram previamente fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina. A seguir foram realizados cortes de 5µm de espessura e foram corados pela hematoxilina-eosina. Estes foram avaliados em microscópio de luz.

4.4.5 Análise estatística

O peso corporal e peso relativo dos órgãos nos grupos controle e teste foram comparados usando-se o teste *t* de student. As diferenças foram consideradas significativas para um valor de $P < 0,05$.

As diferenças nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, baseadas na comparação de médias com desvios padrão, foram avaliadas pelo teste de ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, considerando-se $P < 0,05$ como estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software INSTAT, versão 1993.

4.4.6 Determinação do potencial mutagênico

4.4.6.1 Teste de Ames

O ensaio foi realizado de acordo com o modelo de Maron e Ames (1983), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara sob supervisão da Professora Doutora Eliana Aparecida Varanda.

4.4.6.1.1 Linhagens de Salmonella

Uma vez que não foram encontrados dados na literatura sobre mutagenicidade do EEAO, em nosso experimento usamos as linhagens TA97, TA98, TA100, e TA102 capazes de detectar as diferentes possibilidades de mutação gênica.

4.4.6.1.2 Preparo da placa-mãe

As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram armazenadas permanentemente em freezer a -70°C, em ampolas com 0,9mL de meio de cultura e 0,1 mL de dimetilsulfóxido, como agente crioprotetor.

As culturas para uso rotineiro foram mantidas em placas de ágar mínimo com biotina, histidina e ampicilina(denominadas “ placas-mãe”) conservadas em geladeira,

As placas-mãe foram preparadas a cada dois meses e as características genéticas de cada cepa foram previamente avaliadas, como descrito abaixo.

Uma alíquota de cultura permanente foi inoculada em 30mL de caldo nutriente e após 16 horas de incubação sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente, para isolamento de colônias.

Após incubação por cerca de 48 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em 5mL de caldo nutriente, uma a uma.

Após incubação sob agitação a 37°C, inoculou-se cada cultura na forma de estrias grossas em placas de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e ampicilina, e após incubação, as placas foram seladas com parafilme e mantidas sob refrigeração.

Cada cultura crescida nos 5mL de caldo nutriente foi também inoculada em placas de ágar nutriente para verificação da presença da mutação *rfa*, do plasmídio pKM101 e da deleção de *uvrB*.

- *Mutação rfa*

Foram colocados discos de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebidos com 10µL de solução cristal violeta 0,1% no centro da placa de ágar nutriente inoculada.

Após incubação, as linhagens contendo esta mutação apresentaram um halo de inibição de mínimo 14mm ao redor do disco.

- *Plasmídio pKm101*

Com auxílio de uma alça de inoculação foram aplicadas cinco linhas de solução de ampicilina 8 mg/mL na placa de ágar nutriente inoculada. Após secagem, a linhagem a ser testada foi estriada sobre a linha de antibiótico. Após incubação, as linhagens contendo esta mutação apresentaram crescimento sobre a linha de antibiótico.

- *Deleção uvrB*

Metade de uma placa de ágar nutriente inoculada foi coberta com cartolina e irradiada com lâmpada germicida (UV₂₄₅) de 15 watts a uma distância de 33cm, por 8 segundos.

Após incubação, verificou-se que as linhagens mutantes(exceto a linhagem102) cresceram apenas na parte não irradiada (coberta) da placa.

4.4.6.1.3 *Taxa de reversão espontânea*

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100µL de cada cultura em 2,0 mL de ágar de superfície, mantido em banho-seco a 45°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em duplicata. A taxa de reversão espontânea foi avaliada 48 horas após incubação a 37°C.

4.4.6.1.4 *Ensaio*

As culturas das diferentes cepas foram inoculadas com alça da platina em 30mL de caldo nutriente, utilizando-se as placas-mãe como fonte de inóculo. Após

crescimento por uma noite, a 37°C, sob agitação mecânica, as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

Aos tubos de ensaio, contendo 2 ou 3mL de ágar de superfície, previamente fundido e mantido a 45°C em banho seco, foram adicionadas as diferentes doses da amostra, 100µL de cultura de cada linhagem (10^9 células/mL) e, para o ensaio na presença de ativação metabólica, 500µL da mistura S9. Após homogeneização em agitador, o conteúdo do tubo foi vertido em placas de ágar mínimo. A cada ensaio, todas as doses e controles foram feitos em triplicata. Neste ensaio, as culturas foram submetidas a uma incubação prévia de 20 minutos a 37°C. Esta preincubação acontece antes da adição do Top Agar e da adição do S9.

As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Paralelamente a cada ensaio, foi feito o controle negativo, inoculando-se 100µL de DMSO, também em triplicata. Além do controle negativo, foi feito um controle positivo, utilizando-se substâncias mutagênicas:

2-antramina (2.5µg/placa) para TA100 com S9 e Azida sódica (2.5µg/placa) para TA100 sem S9; Daunomicina (5.0µg/placa) para TA102 sem S9 e Aminofluoreno (10.0µg/placa) para TA102 com S9; 2-antramina (2.5µg/placa) para TA97a e TA98 com S9, 4-nitro-o-fenil-ene-diamina(NPD) (10.0 µg/placa) para TA98 e TA97a sem S9.

O número de revertentes por placa foi avaliado por contagem das colônias.

4.4.6.1.5 *Análise estatística*

Para a análise do presente ensaio foi utilizado um software gentilmente cedido pelo Prof Ames da Universidade de Califórnia Berkley, SALANAL (de Salmonella Analysis) baseado no modelo matemático de BERNSTEIN *et al.*, 1982.

A razão de mutagenicidade (RM) é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos e induzidos) dividido pela média do número de revertentes por placa controle negativo (espontâneos). Uma amostra é considerada positiva quando o RM é maior ou igual a 2 em, pelo menos, uma das doses do ensaio, com diferença significativa entre, pelo menos, uma dose testada e o controle.

Quando um destes critérios é observado, a amostra é considerada como apresentando indícios de mutagenicidade, segundo Mc GEORGE *et al.* (1985) e VALENTE (1990).

4.4.6.2 *Teste do Micronúcleo*

O ensaio foi feito de acordo com a metodologia descrita no EPA-OPPTS n° 870.5395, 08/1998, usando um teste agudo.

4.4.6.2.1 *Animais e doses*

Neste ensaio foram usados camundongos Swiss de 7 semanas, criados no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram aclimatados 5 dias na sala de experimento antes do início do ensaio. Foram constituídos os grupos controle positivo, controle negativo e teste, contendo, cada, 5 fêmeas e 5 machos. O grupo controle negativo recebeu 1mL/100g de peso animal de água. Quanto ao grupo tratado ou grupo teste, os camundongos receberam 2000mg/kg de EEAO em quantidade de 1mL/100g de peso animal, em dose única. No grupo controle positivo, os animais receberam por via intraperitoneal 50mg/kg de ciclofosfamida (CYP) (Fluka Chemie, Suíça).

Depois de 39 horas e 1/2 após a administração, os fêmures foram retirados e, a seguir, o conteúdo ósseo foi obtido, com auxílio de 1ml de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY), previamente colocado em uma seringa. Em um intervalo menor que duas horas, a medula assim obtida foi centrifugada a 1000 RPM durante 10 minutos, a maior parte do sobrenadante descartada e o restante usado para retomar o resíduo. A partir deste, foi realizado esfregaço em lâminas. Para cada animal foram feitas duas lâminas.

As lâminas foram fixadas durante 10 minutos com metanol absoluto e coradas, usando a metodologia do Giemsa, como descrito em GOLLAPUDI e KAMRA (1978).

Para avaliar a genotoxicidade, foi medida a frequência das células micronucleadas (MN) em 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) por animal.

4.4.6.2.2 Análise estatística

Comparação entre controle negativo e grupo teste foi feita a partir do teste *t*, combinando os resultados de machos e fêmeas.

Um aumento no grupo teste em relação ao controle ($p < 0,01$) foi considerado como resultado positivo (BRUSICK, 1982)

5. RESULTADOS

Folhas de Anacardium occidentale L.

5. Resultados

5.1 Farmacobotânica

5.1.1 Características macroscópicas da folha de *Anacardium occidentale*

As folhas adultas do clone CCP76 de *A. occidentale* são simples, glabras, elípticas, obtusas, coriáceas, com 8-20 cm de comprimento por 6-8 cm de largura e de limbo levemente ondulado. O odor é fraco e o sabor adstringente.

5.1.2 Características microscópicas da folha de *Anacardium occidentale*

Em corte transversal, as folhas do clone CCP76 apresentam a nervura central biconvexa, sendo a face abaxial comparativamente proeminente (figura 6).

A epiderme da face abaxial, em vista frontal, apresenta células de paredes, ligeiramente onduladas e estômatos predominantemente anomocíticos (figura 7). As folhas são hipoestomáticas. Nesta face, encontram-se também tricomas glandulares pluricelulares localizados em ligeiras depressões (figuras 7 e 8). A face adaxial é constituída de células de paredes levemente sinuosas e finas (figura 9).

Figura 6. *Anacardium occidentale* L. Aspecto geral da secção transversal do terço mediano inferior da lâmina foliar. **Coloração:** azul de astra

Figura 7. *Anacardium occidentale* L.: Vista frontal da face abaxial, Es (estômato) tg (tricoma glandular). **Coloração:** azul de astra. **X 400.**

Figura 8. *Anacardium occidentale* L. Detalhe da secção transversal da região do mesofilo. **Coloração:** azul de astra e fucsina básica, tg (tricoma glandular), ei (epiderme inferior), pl(parênquima lacunoso).

Figura 9. *Anacardium occidentale* L. Vista frontal da face superior de folha.
Coloração: azul de astra . X 400

A figura 10 mostra a secção transversal da folha constituída de 1 estrato de células epidérmicas aproximadamente quadrangulares, 3 a 4 camadas de células paliádicas, 3 a 4 estratos de parênquima lacunoso, 2 a 3 camadas de células paliádicas proporcionalmente curtas em relação àquelas junto à face adaxial, seguida de 1 estrato de células epidérmicas.

Drusas são evidenciadas principalmente no parênquima lacunoso (figura 10a, 10b).

As células do parênquima lacunoso têm forma irregular (figura 10a e 10b). Algumas vezes, são observadas extensões esclerenquimáticas alcançando a face adaxial (figuras 11b e 12).

a

b

Figura 10. *Anacardium occidentale* L.: Secção transversal do mesofilo. **10a)** x200, **10b)** x400 Es (epiderme superior), pp (parênquima paliçádico), pl (parênquima lacunoso), fv (feixe vascular), ds (drusa), ei (epiderme inferior), tg (tricoma glandular). **Coloração:** azul de astra e fucsina básica.

Figura 11. *Anacardium occidentale* L. Secções transversais em diferentes regiões do mesofilo. a) destaque, às células espessadas na região paliçádica. b) destaque ao feixe vascular com extensão da bainha. Es (epiderme da face superior), pp (parênquima paliçádico), pl (parênquima lacunoso), ce (células esclerenquimáticas), fv (feixe vascular), ei (epiderme da face inferior). Coloração: azul de astra e fucsina básica.

Figura 12. *Anacardium occidentale* L. Detalhe da secção transversal da folha junto à face adaxial, evidenciando extensão da bainha do feixe. ce (células esclerenquimáticas), fv (feixe vascular). **Coloração:** azul de astra e fucsina básica

Na nervura central destacam-se dutos secretores formados por 20 a 30 células secretoras e localizados nas regiões floemáticas e medular (fig. 14a, 15a, 16a, 16b).

Na figura 13b observa-se seqüencialmente a epiderme, camada subepidérmica de células de paredes espessadas, 2 a 3 camadas de parênquima, 5 a 6 camadas de colênquima angular, 2 a 3 camadas de células parenquimáticas e grupos de fibras ladeando o sistema vascular que apresenta disposição assemelhada a um triângulo. Drusas encontram-se principalmente no colênquima e no floema (fig. 16a).

5.1.2 Caracterização histoquímica

Na caracterização histoquímica, as manchas azuis a pretas, características de compostos fenólicos, aparecem, sobretudo nas regiões xilemática esclerenquimática e junto à epiderme (figura 17).

a

b

Figura 13. *Anacardium occidentale* L.. **a)** Secção transversal evidenciando a bainha do feixe vascular. **b)** Secção transversal anterior ampliada, evidenciando os diferentes tecidos. ba (bainha), es (epiderme da face superior), pf (parênquima), col (colênquima), Med (medula) fl (floema), xi (floema), ei (epiderme da face inferior). **Coloração:** azul de astra

Figura 14. *Anacardium occidentale* L. **a)** Secção transversal da lâmina foliar, mostrando as regiões ABCDE analisadas. **b)** Secção transversal na nervura mediana mostrando um aumento da região A. **c)** Secção transversal na nervura mediana mostrando as células colenquimáticas. es(epiderme da face superior), cs(camada subepidérmica), pf(parênquima), col(colênquima), ce(células esclerenquimáticas). **Coloração de b) e c):** azul de astra e fucsina básica.

a

b

Figura 15. *Anacardium occidentale* L. Secção transversal na nervura mediana. **a) e b)** regiões da face abaxial, d(ducto secretor), fl(floema), col (colênquima), pf (parênquima) ei (epiderme da face inferior), fl(floema). **Coloração:** azul de astra e fucsina básica

a

b

Figura 16. *Anacardium occidentale* L. Corte transversal na nervura mediana. **a)** região (B) evidenciando ducto secretor no floema. **b)** região (E) evidenciando a região medular com xilema e parênquima medular. ba(bainha), xi(xilema), d(ducto secretor), pf(parênquima). **Coloração:** azul de astra e fucsina básica

Figura 17. *Anacardium occidentale* L. Corte transversal da lâmina foliar. Corte submetido a tratamento com cloreto de férrico. As regiões xilemática (xi), esclerenquimática (Es) e junto à epiderme (ep) destacam-se pela coloração de azul a preta.

5.2 Estudos químicos

5.2.1 Triagem fitoquímica

Os resultados obtidos na triagem fitoquímica estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Principais grupos químicos presentes nas folhas do clone CCP-76 de *Anacardium occidentale*.

Grupos químicos	Resultados
<i>Alcalóides</i>	<i>Negativo</i>
<i>Compostos fenólicos</i>	<i>Positivo</i>
<i>Flavonóides</i>	<i>Positivo</i>
<i>Taninos</i>	<i>Positivo</i>
<i>Taninos condensados</i>	<i>Positivo</i>
<i>Taninos hidroláveis</i>	<i>Negativo</i>
<i>Cumarinas</i>	<i>Negativo</i>
<i>Saponinas</i>	<i>Positivo (IE=100)</i>
<i>Antraderivados</i>	<i>Negativo</i>
<i>Esteróides</i>	<i>Negativo</i>
<i>Óleos essenciais</i>	<i>Negativo</i>

IE: Índice de espuma

5.2.2 Análise cromatográfica do extrato bruto

5.2.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Nos cromatogramas obtidos (figuras 18 a 20), as manchas exibiram colorações de laranja a amarela. A melhor fase de separação foi a mistura Acetato de Etila-Ácido fórmico-Ácido Acético Glacial-Água 110:5:5:10(v/v/v/v) (Tabela 3).

Figura 18. Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. e frações em sílica gel GF e fase móvel de Acetato de Etila-Ácido Fórmico-Ácido Acético glacial-Água (110:5:5:10, v/v/v/v). Padrões: Rutina e Quercetina 0,1%(m/v) em metanol. Revelador: NP, Visualização: UV365 nm.

Tabela 3. Características cromatográficas em cromatografia em camada delgada do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. e frações em sílica gel GF e em fase móvel de Acetato de Etila-Ácido Fórmico-Ácido Acético glacial-Água (110:5:5:10, v/v/v/v). Padrões: Rutina e Quercetina 0,1%(m/v) em metanol. Revelador: NP, Visualização: UV365 nm.

Frações	Cor da mancha	R_f	R_x (Quercetina)
Clorofórmio	Amarela-laranja	0,75	0,90
Extrato bruto	Laranja	0,42	0,50
	Laranja	0,52	0,62
	Laranja	0,59	0,71
	Laranja	0,67	0,80
	Amarela-Laranja	0,72	0,86
	Laranja	0,79	0,95
Acetato de Etila	Laranja	0,28	0,33
	Laranja	0,36	0,43
	Laranja	0,41	0,49
	Laranja	0,52	0,62
	Laranja	0,59	0,71
	Amarela-Laranja	0,75	0,90
Etanol 100%	Laranja	0,46	0,55
	Laranja	0,56	0,67
	Laranja	0,62	0,74
	Amarela-Laranja	0,77	0,92
	Laranja	0,81	0,97
	Amarela-Laranja	0,86	1,03
	Amarela-Laranja	0,5	0,60

Figura 19: Perfis cromatográficos em camada delgada do extrato hidroetanólico e frações de *Anacardium occidentale* L. **a)** Extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e frações em sílica gel GF e fase móvel de Acetato de Etila-Ácido Fórmico-Ácido Acético glacial-Água (150:5:5:10, v/v/v/v). Padrões: Rutina e Quercetina 0,1%(m/v) em metanol. Revelador: NP, Visualização: UV365 nm. **b)** Extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e frações em sílica gel GF fase móvel de Acetato de Etila-Ácido Fórmico-Ácido Acético glacial-Água (100:11:11:26, v/v/v/v) Padrões: Rutina e Quercetina 0,1%(m/v) em metanol. Revelador: NP, Visualização: UV365 nm.

Figura 20. Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. e frações em sílica gel GF, fase móvel de Clorofórmio-Acetona-Ácido Fórmico (75:16,5:8,5, v/v/v) Padrões: Rutina e Quercetina 0,1%(m/v) em metanol. Revelador: NP, Visualização: UV365 nm

5.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A figura 21 mostra o cromatograma do extrato hidroetanólico de folhas do clone CCP76 do cajueiro.

A partir da cromatografia líquida de alta eficiência, estruturas de espectro UV quase similar aos flavonóides quercetina-3-O-ramnosil-ramnosila, canferol-3-O-metil-éter, miricetina-3-O-ramnosila, canferol-3-O-ramnosil-ramnosila e apigenina ou amentoflavona foram detectados (figura 22). Foram observados também 10 outros picos, exibindo duas bandas de absorção no ultravioleta, geralmente, ao redor de 270 nm (banda II) e outra, ao redor de 360 nm (banda I) (Figuras 24 e 25). Um pico, apresentando características UV de ácido gálico, foi detectado. Um outro pico(12), de banda única de absorção no UV e de λ_{max} entre 270 e 280 nm foi observado no cromatograma (figura 22 e 26). O pico maior apresentou características no ultravioleta similares às da apigenina e de seu polímero, amentoflavona (figura 23). O cromatograma da fração ME, usada no ensaio antibacteriano, exibiu os mesmos picos que o extrato bruto.

Figura 21. Cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L.. Coluna C₁₈ Spherisorb ODS2 (250x4mm, 5µm), Temperatura 40°C. A fase móvel consiste em um gradiente de 1%(v/v)ácido acético /água e acetonitrila. Fluxo: 0,8mL/min. Detecção dos picos feita de 280 a 352nm.

Figura 22. Espectros UV-vis de compostos presentes no extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* (azul) e compostos da biblioteca digital (vermelho).

Figura 23. Cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanolico 70% de *Anacardium occidentale* L. e dos padrões amentoflavona e apigenina.

Figura 24. Espectro UV-vis de picos do cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L.

Figura 25. Espectro UV-vis de picos do cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L.

Figura 26. Espectro UV-vis do pico 12 do cromatograma HPLC-DAD do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L.

5.2.3 Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa(LC-MS)

Os espectros uv-vis visualizados no HPLC exibem dois máximos de absorção característicos de flavonóides.

A análise por LC-MS permitiu obter o cromatograma dos íons totais (TIC) da figura 27.

Nos diferentes espectros de massa aparecem íons de massas organizadas como seguinte:

- Em todos os espectros observamos íons de m/z 149 com diferente nível de intensidades.
- Na maioria dos espectros (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) observamos a massa $m/z=205$. (Figuras 28, 29, 30, 31, 32, 36, 37)
- Aparece nos espectros 1, 2, 6, 7, 8, 9 e 11 a massa m/z 301 (Figuras 28-34).
- No espectro 5 aparece a massa m/z 318,0 (Figura 35)
- No espectro 3, o íon molecular é de massa m/z 608 (Figura 36).
- O espectro 4 não apresenta nenhuma informação além da presença dos íons m/z 205 e m/z 149 observados na maioria dos espectros (Figura 37).
- O espectro 10 é o espectro do pico maior no cromatograma HPLC. Neste, não temos íons característicos de apigenina (m/z 270) nem um íon m/z 538 podendo representar a amentoflavona (Figura 38).

Figura 27. Cromatograma dos íons totais (TIC) do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. obtido por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

Figura 28. Espectro de massa de íons positivos do pico 1 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, NF:m/z 205, Q: m/z 301, [M+H]⁺ m/z 652

Figura 29. Espectro de massa de íons positivos do pico 2 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, NF:m/z 205, Q: m/z 301, [M+H]⁺ m/z 652

Figura 30. Espectro de massa de íons positivos do pico 6 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, Q:m/z 301,[M+H] m/z 696

Figura 31. Espectro de massa de íons positivos do pico 7 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v, A: m/z 149, NF:m/z 205, Q:m/z 301, [M+H]: m/z 740

Figura 32. Espectro de massa de íons positivos do pico 8 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, NF:m/z 205, Q:m/z 301, [M+H] m/z 784

Figura 33. Espectro de massa de íons positivos do pico 9 obtido por LC/ESI-MS usando de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, Q:m/z 301, [M+H] m/z 910

Figura 34. Espectro de massa de íons positivos do pico 11 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A: m/z 149, Q:m/z 301, [M+H] m/z 940

Figura 35. Espectro de massa de íons positivos do pico 5 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, NF:m/z 205, Mi:m/z 318, [M+H] m/z 652.

Figura 36. Espectro de massa de íons positivos do pico 3 obtido de LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, NF:m/z 204,9, $[M+H]$ m/z 652

Figura 37. Espectro de massa de íons positivos do pico 4 obtido de LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, NF:m/z 205, $[M+H]$ m/z 608

Figura 38. Espectro de massa de íons positivos do pico 10 obtido por LC/ESI-MS de fração metanólica do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, usando como temperatura 350°C, fluxo de gás: 7,00 L.min⁻¹, pressão do nebulizer: 30psi, voltagem capilar:4500v. A:m/z 149, [M+H] m/z 938,5

5.2.4 Doseamento dos fenóis

5.2.4.1 Fenóis totais e taninos

A tabela 4 mostra a absorbância correspondente às concentrações de ácido gálico usadas. A mesma tabela é seguida pela curva de calibração, usando as concentrações de 2 a 10 µg/mL e absorbâncias correspondentes (figura 39). Já a tabela 5 mostra as absorbâncias obtidas a partir da dose de extrato bruto e de extrato bruto sem polifenóis. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 4. Relação concentração / absorbância de ácido gálico obtida por leitura a 760 nm. Intervalo de concentração de 1 a 12 µg/mL

Concentração(µg/mL)	Absorbância (760nm)
1	0,0942
2	0,2026
3	0,2845
4	0,3712
5	0,4543
6	0,5450
7	0,6006
8	0,6637
9	0,7231
10	0,7744
11	0,7791
12	0,7650

Figura 39. Curva de calibração do ácido gálico, a partir das concentrações 2,0 a 10µg/mL.

Tabela 5. Relação concentração /absorbância de amostras de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* obtida por leitura a 760 nm.

	Concentração(mg/mL)	Absorbância a 760 nm
Fenóis totais	amostra 1(0,016)	0,4918
	amostra 2(0,016)	0,4893
	amostra 3(0,016)	0,4905
	Média	0,4905±0,00125
Fenóis não adsorvidos pelo pó de pele(Taninos)	amostra 1 (0,032)	0,1296
	amostra 2(0,032)	0,1296
	amostra 3(0,032)	0,1296
	Média	0,1296±0,00000

Considerando a equação obtida, a concentração de fenóis totais é de 5,68µg/mL, o que corresponde a 35,50% no extrato bruto

Os taninos são adsorvidos pelo pó de pele. A concentração de taninos é dada pela diferença entre fenóis totais e fenóis não adsorvidos pelo pó de pele, que corresponde a 0,68µg/mL ou 2,13% no extrato bruto. A concentração de taninos encontrada é de 35,50%-2,13%= 33,37%.

5.2.4.2 Flavonóides

A tabela 6 mostra as absorbâncias exibidas pelas concentrações crescentes de quercetina, usada como padrão. A curva de calibração, usando as concentrações de 4 a 12 µg/mL, é dada pela figura 40.

Tabela 6. Relação concentração / absorbância de quercetina em etanol lida a 425 nm. Intervalo de concentração de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância (425nm)
2	0,1501
4	0,2838
6	0,4414
8	0,5759
10	0,7233
12	0,863
14	1,0125
16	1,152
18	1,2987
20	1,4448

Figura 40. Curva de calibração da quercetina em etanol, obtida a partir das concentrações de 4 a 12 µg/mL.

As absorvâncias, correspondentes à concentração do extrato bruto e da fração ME, em triplicada, são resumidas na tabela 7.

Tabela 7. Relação concentração de EEAO e fração ME /Absorvância lida a 425 nm.

Produto	Concentração (mg/mL)	Absorvância
<i>Extrato Bruto</i>	<i>amostra 1 (0,32)</i>	<i>0,5944</i>
	<i>amostra 2 (0,32)</i>	<i>0,6042</i>
	<i>amostra 3 (0,32)</i>	<i>0,5895</i>
	<i>Média±DP</i>	<i>0,5960±0,0075</i>
<i>Fração ME</i>	<i>amostra 1 (0,16)</i>	<i>0,3247</i>
	<i>amostra 2 (0,16)</i>	<i>0,3329</i>
	<i>amostra 3 (0,16)</i>	<i>0,3118</i>
	<i>Média±DP</i>	<i>0,3231±0,0106</i>

DP: Desvio Padrão

Sendo a concentração inicial 0,32mg/mL (320µg/mL), e a absorvância 0,596nm, a concentração de flavonóides totais no extrato bruto é de 8,25µg/mL, isto é 2,578% da concentração inicial.

Sendo a concentração da amostra ME 0,16mg/mL (160µg/mL), com uma absorvância de 0,3231, a concentração de flavonóides na fração ME é 4,468µg/mL, isto é 2,79%

5.3 Ensaios farmacológicos

5.3.1 Atividade antibacteriana

A tabela 8 resume os resultados obtidos no ensaio de atividade antibacteriana. Ambos, extrato bruto e sua fração ME, exibiram atividade contra a bactéria gram positivo *Staphylococcus aureus*. O CIM e CBM são de 320µg/L.

Tabela 8. Efeito do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. e da sua fração ME sobre as cepas de bactérias estudadas.

Bactérias	EEAO		Fração ME	
	^a CIM	^a CBM	^a CIM	^a CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	320	320	320	320
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b
<i>Campylobacter coli</i> isolado	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b	>2000 ^b

^aConcentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima(CBM) expressas em µg/mL.

^b Maior concentração testada.

5.3.2 Atividade Antiúlcera Gástrica Aguda

O extrato bruto de *Anacardium occidentale* exibiu atividade antiúlcera, no modelo de indução aguda. Como podemos observar nas fotos da figura 42, nos estômagos do grupo teste em relação com o grupo controle, houve várias ulcerações ao passo que nos ratos do grupo teste, houve uma inibição quase total de ulceração. A tabela 9 resume os resultados obtidos. O tratamento com a dose 400mg/kg resultou em uma redução significativa de lesões gástricas induzidas por solução HCl/Etanol. A área relativa de lesão ulcerativa foi diminuída de 98% em relação ao controle positivo. A figura 41 mostra a área relativa de lesão ulcerativa nos grupos controle e teste.

Tabela 9. Efeito da dose 400mg/kg do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. sobre lesões úlcéricas induzidas por HCl/Etanol em ratos

<i>Lesão induzida por HCl/etanol</i>			
<i>Grupos experimentais</i>	<i>n</i>	<i>Área total de lesão(ATL)(mm²)</i>	<i>Área relativa de Lesão(ARL) (%)</i>
Controle (Água)	10	18,29±9,86	2,08±1,24
EEAO (400mg/kg)	10	0,31±0,67*	0,04±0,08*

Os valores são expressos em média ± Desvio Padrão. *P≤0.05: diferença significativa em relação ao controle. n: numero de animais por grupo

Figura 41. Área relativa de lesão ulcerativa (ARL), obtida no grupo de ratos tratados com 400mg/kg do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. e no grupo controle em ensaio de úlcera aguda

Figura 42. Aspectos de estômagos no grupo de ratas tratadas com 400mg/kg (11 a 20) do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e de ratas no grupo controle (1 a 10) em ensaio de úlcera agudo.
1 a 10 apresentam lesões ulcerativas..
As manchas escuras correspondem às ulcerações

5.3.3 Relação dose-efeito

A tabela 10 resume os resultados obtidos a partir de doses crescentes do extrato bruto de cajueiro sobre lesões gástricas induzidas por etanol / ácido clorídrico. Uma dose de extrato bruto de cajueiro superior ou igual a 100mg/kg leva a uma redução muito significativa de lesões ulcerativas ($p < 0,001$). Na dose mais elevada, de 800mg/kg, houve inibição total de ulcerações. O efeito inibitório nestas doses de EEAO, é superior ao efeito inibitório do lansoprazol, utilizado como fármaco de referência (figura 43). Verificou-se um efeito inibitório dose-dependente (figura 44). A dose efetiva 50%, calculada a partir da curva de regressão linear, foi avaliada em $ED_{50} = 150 \text{ mg/kg}$ (figura 44).

Tabela 10. Efeito de doses crescentes de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. sobre lesões gástricas induzidas por HCL/etanol em ratos.

<i>Lesão ulcerativa induzida por HCl/etanol</i>			
<i>Grupos Experimentais</i>	<i>n</i>	<i>Área total de lesão(ATL)(mm²)</i>	<i>Área relativa de lesão (ARL)(%)</i>
<i>Controle(água)</i>	8	30,33±18,59	3,06±1,75
<i>Lansoprazol 30mg</i>	8	9,82 ± 6,21*	1,07 ± 0,68*
<i>100mg.kg⁻¹</i>	8	9,26±8,71*	0,95±0,93*
<i>200mg.kg⁻¹</i>	8	8,41±7,60*	0,89±0,73*
<i>400mg.kg⁻¹</i>	8	6,3±8,82*	0,64±0,79*
<i>800mg.kg⁻¹</i>	6	0*	0*

* $p < 0,001$ em relação ao controle

Figura 43. Efeito de doses crescentes do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. sobre a área de lesão ulcerativa e sobre a área relativa de lesão ulcerativa, induzida por HCL/ etanol 60% em ratos. **Cont.**(Controle), **Lan.** (Lansoprazol 30mg)

Figura 44. Efeito de doses crescentes do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. sobre a área de lesão ulcerativa e sobre a área relativa de lesão ulcerativa, induzida por HCL/ etanol 60% em ratos. ED₅₀ = 150 mg/kg.

5.3.4 Atividade Antiúlcera das frações do EEAO

O rendimento do fracionamento do extrato bruto foi de 0,98% para a fração diclorometano e de 64% para a fração metanólica. No segundo esquema de fracionamento, o rendimento foi de 3% para a fração n-hexano e 63,66% para fração acetato de etila/metanol/água (43:22:35, v/v/v).

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos com as diferentes frações. A fração metanólica inibiu as lesões em 88,20%, em relação ao grupo controle. Já com a fração Acetato de etila/Metanol/Água foi obtida uma fraca inibição de lesão, cuja percentagem corresponde a 65,71%. A menor inibição de úlcera foi obtida com a fração n-hexano (13%) (Figura 45). A figura 46 mostra os estômagos dos grupos controle e das diferentes frações.

Tabela 11. Efeito de frações do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. sobre a lesões gástricas induzidas por HCl/Etanol em ratos

Lesão ulcerativa induzida por HCl/etanol			
Grupos experimentais	n	Área Total de Lesão(ATL) (mm²)	Área relativa de lesão(ARL) (%)
Controle (Água)	8	29,69±30,45	2,80±2,79
Fração AE/M/A	8	21,91±23,03	0,96±1,21*
Fração CH₃OH	8	3,49 ±3,49**	0,33±0,32**
Fração CH₂Cl₂	8	21,42 ±8,79	2,30±0,89
Fração n-Hexano	8	24,67±10,32	2,42±1,03

Os valores são expressos em média ± Desvio Padrão. *P≤0.05 diferença significativa em relação ao controle ** P≤0.01 diferença muito significativa em relação ao controle n: número de animais por grupo.

Figura 45. Área relativa de lesão ulcerativa (ARL), obtida no grupo de ratos tratados com as frações do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. no grupo controle, em ensaio de úlcera agudo. ** $p < 0,01$ redução muito significativa da área de lesão ulcerativa.

* $P < 0,05$ redução significativa da área de lesão ulcerativa

Figura 46. Aspectos de estômagos do grupo de ratos tratados com as frações do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. e de ratos controle (1-5). Fração n-hexano (6-10), fração diclorometano (11-15), fração Acetato de etila/Metanol/Água (43:22:35) (16-20), fração Metanol (21-25). As manchas escuras nos estômagos são ulcerações

5.4 Ensaios toxicológicos

5.4.1 Toxicidade aguda

Sinais de reação adversa visível nos períodos durante e após a administração aos camundongos

Nas fêmeas houve uma morte no segundo dia. Após autópsia, os órgãos não apresentaram modificação macroscópica. Nos outros animais não foram observados sinais de intoxicação. No último dia, não foi obtida diferença significativa entre pesos corporais nos animais teste e controle. A evolução dos pesos corporais seguiu o mesmo perfil.

Sinais de reação adversa visível nos períodos durante e após a administração aos ratos

Tanto durante a administração *per os* como nos dias seguintes, não se observou qualquer mudança de comportamento dos ratos. Não houve mortes. Nos machos, assim como nas fêmeas, não houve um desvio entre curvas de evolução das médias de peso corporal entre grupo teste e controle. No último dia do ensaio não havia diferença estatística entre controle e tratados. Em geral, a evolução de peso se traduziu pelo ganho de peso nas fêmeas e nos machos. As figuras 47 e 48 mostram a evolução de peso corporal nos ratos.

Os órgãos dos animais seguiram o mesmo modelo de evolução e não foi notada diferença significativa entre peso relativo dos órgãos nos dois grupos (Tabela 12).

Nos ratos, o consumo de ração, de água e o peso dos órgãos no último dia, foram investigados. Notamos que em geral, houve um aumento de consumo nos dois sexos. Nos machos este aumento parece ser igual nos grupos controle e teste. No entanto, nas fêmeas, houve um consumo reduzido no grupo tratado, comparado ao controle (Figuras 49 e 50).

Tabela 12. Efeito da administração da dose 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. sobre o peso relativo de órgãos de ratos

Orgãos	Machos(n=5)		Fêmeas(n=5)	
	Controle (Água)	2000 mg/kg EEAO	Controle (Água)	2000 mg/kg EEAO
Pulmões /Peso corporal(%)	1,06±0,19	1,24±0,21	0,71±0,10	0,70±0,12
Fígado /Peso Corporal(%)	8,21±1,44	6,14±2,94	4,42±0,70	3,78±0,29
Baço /Peso corporal(%)	0,50±0,11	0,48±0,12	0,30±0,05	0,36±0,11
Coração/Peso corporal(%)	0,72±0,20	0,65±0,09	0,35±0,04	0,29±0,04
Rins/Peso corporal(%)	1,90±0,28	1,88±0,38	0,91±0,97	0,88±0,92

Os valores são expressos em média ± Desvio Padrão. n: número de animais

O consumo de água, nos dois sexos parece oscilar ao redor de dois valores: 150 mL nas fêmeas e 200 mL nos machos, tanto nos testados como nos controles (Figuras 51 e 52).

Figura 47. Evolução do peso corporal de ratos fêmeas tratadas com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral

Figura 48. Evolução do peso corporal de ratos machos tratados com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral

Figura 49. Evolução do consumo de ração de ratos fêmeas tratadas com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral

Figura 50. Evolução de consumo de ração de ratos machos tratados com dose única de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral

Figura 51. Evolução do consumo de água de ratos fêmeas tratadas com dose única de 2000mg/kg. de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral

Figura 52. Evolução de consumo de água de ratos machos tratados com dose única de 2000mg/kg. de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral.

5.4.2 Toxicidade de administração reiterada durante 30 dias

Sinais de reação adversa visível durante a administração das doses, aspecto dos órgãos e peso corporal

Não foi verificada alteração de comportamento dos animais, durante o período de administração do EEAO. Na observação macroscópica dos órgãos, não foram constatadas modificações. A tabela 13 resume a evolução de peso relativo dos órgãos analisados. Nas fêmeas não houve diferença significativa entre peso de órgãos dos animais controle e teste. No entanto, nos machos, uma só diferença significativa foi notada na dose 1000mg/kg no coração ($p < 0,05$), traduzindo-se por um aumento de peso de coração nos animais testados.

Tabela 13. Efeito da administração de doses de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L.(EEAO) sobre o peso relativo de órgãos de ratos

Órgãos	Dose de EEAO			
	Controle	400mg/kg	700mg/kg	1000mg/kg
Machos(n=5)				
Pulmões /Peso corporal(%)	0,66±0,09	0,76±0,07	0,75±0,08	0,74±0,07
Rins/Peso corporal(%)	0,79±0,07	0,92±0,24	1,05±0,32	0,94±0,25
Fígado /Peso Corporal(%)	6,15±2,98	7,55±2,45	8,46±2,89	7,60±1,25
Coração/Peso corporal(%)	0,37±0,07	0,49±0,12	0,49±0,09	0,67±0,13*
Fêmeas(n=5)				
Pulmões /Peso corporal(%)	0,86±0,12	1,00±0,10	0,89±0,1678	0,95±0,04
Rins/Peso corporal(%)	1,00±0,08	1,01±0,03	1,29±0,28	1,03±0,13
Fígado /Peso Corporal(%)	12,49±2,87	11,05±5,22	11,06±1,89	12,53±3,45
Coração/Peso corporal(%)	0,52±0,15	0,57±0,12	0,52±0,19	0,60±0,10

Os valores são expressos em média ± Desvio Padrão. * $P \leq 0.05$ diferença significativa em relação ao controle, n: número de animais para cada dose.

As figuras 53 e 54 mostram a evolução do peso corporal nos grupos fêmeas e machos. Observamos um aumento de peso em todos os grupos, tanto nos machos como nas fêmeas. Nos machos controle, a variação de peso entre D0 e D30 foi de

31,57% enquanto com 400mg/kg, foi de 24,19%, com 700mg/kg ,18,39% e com 1000mg/kg, 18,39%, mostrando um ganho de peso inversamente proporcional à dose administrada.

Nas fêmeas, o aumento não foi dose-dependente já que nos controles, 400mg/kg, 700mg/kg e 1000mg/kg, as porcentagens de aumento foram, respectivamente, de 19,69%, 13,07%, 20,3% e 17,4%.

Podemos dizer que, em geral, o aumento de peso nos tratados foi menor que nos animais do grupo controle. Por outro lado, em D30, foi constada uma diferença significativa de peso corporal entre controle e tratados nos grupos machos, nas doses de 700mg/kg e 1000mg/kg ($p<0,05$). Estas diferenças traduziam-se por uma diminuição de peso nos animais testados em relação ao grupo controle.

No grupo fêmeas no final do experimento(dia 30), houve diferença significativa na dose de 400mg/kg ($p<0,05$). Esta diferença se traduzia igualmente por uma diminuição de peso corporal nos animais testados em relação aos controles.

No consumo de água (figuras 55 e 56), tanto nos grupos de machos como de fêmeas, a evolução no grupo controle e nos grupos testados teve o mesmo perfil entre o dia 10 e 28. No último dia houve um desvio do grupo 700mg/kg em relação aos outros grupos.

No consumo de ração (figuras 57 e 58), houve um desvio das fêmeas tratadas com 400mg/kg, em relação às outras doses ensaiadas e controle. Nos machos, o perfil de evolução de consumo de ração dos diferentes grupos foi quase idêntico. No entanto, em alguns dias, houve aumento ou diminuição de consumo nos grupos 700 e 1000mg/kg.

Figura 53. Evolução do peso corporal em ratos fêmeas tratadas com doses diárias de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias.

Figura 54. Evolução do peso corporal em ratos machos tratados com doses diárias de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias.

Figura 55. Evolução do consumo de água em ratos fêmeas tratadas com doses diárias de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias.

Figura 56. Evolução do consumo de água em ratos machos tratados com doses diárias de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias

Figura 57. Evolução do consumo de ração em ratos fêmeas tratadas com doses diárias de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias

Figura 58. Evolução do consumo de ração em ratos machos tratados com doses diárias de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias

5.4.2.1 Testes bioquímicos

A tabela 14 resume os parâmetros bioquímicos, obtidos após 30 dias de administração reiterada a ratos de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L.

Tabela 14. Efeito da administração reiterada de doses de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* L. (EEAO) durante 30 dias sobre parâmetros bioquímicos, em ratos.

Parâmetros	Doses de EEAO			
	Controle(Água)	400mg/kg	700mg/kg	1000mg/kg
Machos^a				
Fe(mg/dl)	264,99±51,88	246,22±20,36	303,48±97,55	278,06±39,61
Glu(mg/dl)	132,00±13,64	124,60±11,55	117,25±15,06	145,25±19,14
BUN(mg/dl)	37,50±3,13	47,09±3,62**	46,21±2,50**	50,80±6,12**
CRE(mg/dl)	0,42±0,13	0,50±0,07	0,46±0,15	0,43±0,14
ALP(UI/L)	179,53±63,95	72,03±28,13*	104,25±33,19	150,82±71,22
AST(UI/L)	180,15±41,61	149,40±28,82	146,48±25,19	150,95±32,53
ALT(UI/L)	27,40±3,49	30,44±9,75	30,34±4,95	22,55±4,75
Fêmeas^a				
Fe(mg/dl)	435,88±29,84	393,48±78,02	392,53±25,32	458,57±51,23
Glu(mg/dl)	103,75±15,97	110,33±16,26	117,25±15,06	125,00±18,00
BUN(mg/dl)	49,14±3,81	47,29±6,52	41,90±0,92	45,21±7,03
CRE(mg/dl)	0,38±0,04	0,42±0,07	0,40±0,16	0,58±0,07*
ALP(UI/L)	58,65±16,79	41,90±18,10	79,37±17,27	59,27±18,50
AST(UI/L)	195,20±42,09	161,60±58,42	156,57±34,98	167,60±14,70
ALT(UI/L)	26,40±14,80	28,07±12,83	28,20±10,86	26,30±7,46

^aOs valores nos machos e fêmeas são expressos em Média ± Desvio Padrão de 3 a 5 amostras de soro para cada dose. *P≤0.05 diferença significativa em relação ao controle

**P≤ 0.01 diferença muito significativa em relação ao controle

Fe(ferro), Glu(Glicose), BUN(Uréia sangüínea nitrogenada) CRE(Creatinina), ALP(Fosfatase alcalina), AST(Aspartato aminotransferase), ALT(Alanina aminotransferase).

5.4.2.1.1 Função hepática

A função hepática foi avaliada, usando como marcadores as transaminases ALT e AST, e a fosfatase alcalina. Não foi observada diferença significativa entre transaminases no controle e nos grupos tratados. Entretanto, na taxa de fosfatase alcalina, foi observada uma diminuição significativa entre fêmeas tratadas com a dose 400 mg/kg e o grupo controle (p<0,05) (figura 59).

Figura 59. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias sobre a Fosfatase alcalina de ratos machos e fêmeas. * $p < 0,05$: diferença significativa em relação ao controle

5.4.2.1.2 Função Renal

Os marcadores escolhidos para avaliar o estado da função renal foram creatinina e uréia. Houve um aumento significativo de creatinina nas fêmeas tratadas com a dose 1000mg/kg de peso ($p<0,01$) (figura 60). Quanto à uréia, a taxa nos machos tratados aumentou muito significativamente ($p<0,01$) (figura 61).

5.4.2.1.3 Metabolismo de Carboidratos

Não houve variação significativa entre controles e animais tratados.

5.4.2.1.4 Ferro

Não houve uma variação no nível sérico de ferro.

Figura 60. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias sobre a creatinina de ratos machos e fêmeas. * $p < 0,05$: diferença significativa em relação ao controle.

Figura 61. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral, durante 30 dias sobre a uréia de ratos machos e fêmeas.

*** $p < 0,01$: diferença muito significativa em relação ao controle

5.4.2.2 Testes hematológicos

A tabela 15 resume a variação dos parâmetros hematológicos, após administração de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral durante 30 dias aos ratos.

Tabela 15. Efeito da administração reiterada de doses de extrato hidroetanólico de *A. occidentale*, durante 30 dias, sobre as fórmulas eritrocitária e leucocitária em ratos.

Parâmetros	Doses de EEAO		
	Controle (Água)	400mg/kg	1000mg/kg
Machos(n=5)			
Eritrócitos($10^6/mm^3$)	6,83±0,06	6,99±0,01	7,06±0,07
Hgb(g/dL)	11,60±0,30	12,20±0,00	12,00±0,60
Hematócrito(%)	35,50±3,50	42,00±0,00	38,50±2,10
Leucócitos($10^2/mm^3$)	54,25±8,13	58,25±7,43	64,50±9,19
Linfócitos(%)	89,00±1,40	77,50±2,10	80,00±0,00
Monócitos(%)	2,00±0,00	5,50±0,70	2,50±0,70
Segmentados (%)	9,00±1,40	16,50±2,10**	16,5±2,10**
Eosinófilos(%)	0,00	0,50±0,70	0,00
Fêmeas(n=5)			
Eritrócitos($10^6/mm^3$)	6,10±0,42	6,62±0,43	6,68±0,83
Hgb(g/dl)	12,30±0,30	11±0,10	11,40±0,20
Hematócrito(%)	39,00±0,00	35,00±1,40	36,00±1,40
Leucócitos($10^2/mm^3$)	45,00±5,66	48,25±4,60	63,25±0,35*
Linfócitos(%)	86,50±2,10	76,50±5	81,50±0,70
Monócitos(%)	4,00±0,00	1,00±0,00	1,00±1,40
Segmentados(%)	9,50±2,10	20,00±4,20**	17,50±2,10**
Eosinófilos(%)	0,00	2,50±0,70	0,00

Os valores nos machos e fêmeas são expressos em Média ± Desvio Padrão.

* $p \leq 0.05$ diferença significativa em relação ao controle, ** $p \leq 0.01$ diferença muito significativa em relação ao controle. n: número de animais. Hgb: Hemoglobina

Não houve diferença significativa entre animais tratados e controle na avaliação de hemácias, da hemoglobina, da taxa de hematócrito.

Nos leucócitos houve uma diferença significativa entre controle e fêmeas testadas, na dose de 1000mg/kg ($p < 0,05$). As figuras 62 e 63 mostram a variação dos leucócitos nos diferentes grupos. Levando em consideração o tipo de célula, os neutrófilos (segmentados) apresentaram maior variação. A taxa, tanto nas fêmeas, como nos machos EEAO, é quase o dobro da taxa controle. Apesar deste resultado, o número total de leucócitos em machos não foi significativamente diferente do controle.

Figura 62. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral, durante 30 dias sobre os leucócitos de ratos machos e fêmeas. * $p < 0,05$ valor significativamente superior em relação ao controle.

Figura 63. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* por via oral, durante 30 dias sobre tipos diferentes de células leucocitárias de ratos machos e fêmeas. **Linfo:** linfócitos, **Mono:** monócitos, **Eosi:** eosinófilos, **Segm:** Segmentados

5.4.2.3 Histopatologia

Fígado, rins, pulmões, coração, baço e pâncreas foram analisados microscopicamente. Não foram observadas modificações, nas doses de EEAO administradas durante o ensaio de 30 dias. As figuras 64 a 69 mostram os cortes de órgãos de animais tratados com a maior dose do experimento (1000mg/kg).

Figura 64. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias. **Coloração: Hematoxilina-Eosina.**

a) Aumento: 40x, mostra arquitetura lobular preservada. Nota-se espaço-porta com arteriola, vênula e ductos biliares. **b) Aumento: 100x,** mostra trabéculas hepáticas, com vasos sinusóides, hepatócitos e espaço-porta com seus elementos componentes, sem alterações dignas de nota. **c) Aumento: 200x,** detalhe em maior aumento da fotografia anterior, evidenciando espaço-porta e trabéculas de hepatócitos.

Figura 65. Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias. **Coloração: Hematoxilina-eosina.**

a) Aumento: 100x, mostra fibras musculares anastomosadas, com arquitetura preservada. **b) Aumento: 200x,** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando fibras musculares estriadas cardíaca em cortes transversal e oblíquo, com miócitos preservados, bem como sua matriz extracelular.

Figura 66. Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**

a) Aumento:40x, mostra vasos, bronquíolos e alvéolos preservados. **b) Aumento:200x**, detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando espaços alveolares, capilares alveolares, septos alveolares, pneumócitos, vasos e bronquíolos preservados. **c) Aumento:400x**, detalhe de área de pulmão da fotomicrografia anterior, evidenciando o revestimento da parede alveolar por pneumócitos, espaços alveolares e epitélio pseudoestratificado colunar ciliado de um segmento de bronquíolo.

Figura 67. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**

a) Aumento: 100x, mostra área cortical com corpúsculos renais, folheto parietal da cápsula de Bowman e seus espaços correspondentes, capilares glomerulares e túbulos contornados proximais e distais, preservados. **b) Aumento:400x**, detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando corpúsculos renais, bem como túbulos preservados.

Figura 68. Fotomicrografia de corte histológico de baço de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento: 40x, mostra a polpa branca e a polpa vermelha, sem alterações. **b) Aumento: 400x**, detalhe da fotomicrografia anterior, evidenciando polpa branca com arteríola centrofolicular, com manguito perivascular, sem alterações..

Figura 69. Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 30 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento: 40x, mostra ácinos serosos e ilhota de Langerhans, preservados. **b) Aumento: 200x**, evidencia uma ilhota de Langerhans, com seus elementos celulares preservados.

5.4.3 Toxicidade de administração reiterada durante 90 dias

Sinais de reação adversa visível, peso corporal, aspecto e peso relativo de órgãos

Não houve alteração no comportamento dos animais, em comparação ao controle. Na observação macroscópica dos órgãos não foram constadas modificações. O peso relativo dos órgãos é resumido na Tabela 16. Houve aumento significativo do peso relativo do coração nas doses 400 mg/kg e 1000mg/kg. Na dose de 700mg/kg não houve alteração significativa em relação ao controle.

Tabela 16. Efeito da administração reiterada de doses de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre o peso relativo de órgãos em ratos.

Órgãos	Doses de EEAO			
	Controle(Água) n=10	400mg/kg n=10	700mg/kg n=10	1000mg/kg n=10
Fígado/Peso corporal (%)	25,92±2,37	26,02±2,83	25,51±3,01	28,04±3,30
Rim/Peso corporal (%)	9,24±0,62	8,87±1,66	9,01±1,42	9,40±1,80
Coração/Peso corporal (%)	3,86±0,89	4,58±0,60*	3,91±1,11	5,01±1,11*
Pulmão/Peso corporal (%)	4,52±0,82	4,47±1,13	4,90±0,84	5,57±1,61
Baço/ Peso corporal (%)	0,28±0,08	0,28±0,08	0,31±0,05	0,32±0,12

Os valores são expressos em média ± Desvio Padrão * $p \leq 0.05$ diferença significativa em relação ao controle. n: número de animais por grupo

A figura 70 mostra a evolução de peso corporal nos grupos. Houve aumento nos grupos teste, assim como no grupo controle. No entanto, o ganho de peso foi decrescente do grupo controle ao grupo de dose maior. Acontece, assim, um fenômeno dose- dependente, isto é, quanto mais a dose de EEAO cresce, menor é o ganho de peso. O fenômeno é claramente observado a partir do dia 42 e permanece até o dia 90 e finalmente, acontece uma diferença significativa entre controle e grupo 700mg/kg($p < 0,05$) assim como no grupo 1000mg/kg($p < 0,01$). A figura 71 exprime a redução de peso em relação ao controle ao longo do teste de administração reiterada do extrato hidroetanólico de cajueiro. Nas doses maiores (700mg e 1000mg), pode ser obtida uma reta de regressão de evolução positiva($a_{1000\text{mg}}=0,79$, $a_{700\text{mg}}=0,41$) com coeficiente de correlação($r_{700\text{mg}}=0,78$ e $r_{1000\text{mg}}=0,87$)(figura 72).

Figura 70. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 90 dias sobre o peso corporal de ratos.

Figura 71. Evolução da porcentagem de redução de peso em relação ao controle, em ratos tratados com doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *A. occidentale*.

Figura 72. Regressão linear das porcentagens de redução de peso, em relação ao controle, entre dia 21 e dia 90, nos ratos tratados com as doses 700 mg e 1000mg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*.

5.4.3.1 Testes bioquímicos

Neste modelo, foram usados os marcadores, glicose (Glu), uréia (BUN), creatinina (CRE), cálcio (Ca), bilirrubina total (BIT), bilirrubina direta (BID), as transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina (ALP), colesterol (CHO), proteínas totais (PRO) e albumina (ALB). Os parâmetros analisados e seus diferentes valores obtidos de acordo com a dose de extrato são resumidos na tabela 17.

Tabela 17. Efeito da administração reiterada de doses de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre parâmetros bioquímicos em ratos.

Parâmetros	Doses de EEAO			
	Controle n=10	400mg/kg n=10	700mg/kg n=10	1000mg/kg n=10
Glu(mg/dL)	104,20±26,01	89,40±17,54	78,60±8,93	92,20±20,90
BUN(mg/dL)	47,40±5,61	43,22±4,28	42,15±4,76	44,66±5,51
CRE(mg/dL)	1,08±0,05	1,07±0,06	1,05±0,07	1,04±0,03
Cal(mg/dL)	9,13±0,61	9,50±0,32	9,58±0,31	9,45±0,42
BIT(mg/dL)	0,09±0,04	0,11±0,07	0,09±0,03	0,12±0,02
BID(mg/dL)	0,09±0,02	0,10±0,03	0,08±0,01	0,08±0,02
ALT(UI/L)	44,83±33,63	66,66±21,88	62±7,31	75,80±21,35
AST(UI/L)	27,44±11,18	30,44±9,24	31,25±8,59	34,17±2,59
ALP(UI/L)	170,38±24,57	179,09±24,15	193,13±33,39	192,84±25,27
CHO(mg/dL)	56,00±6,15	67,65±11,05	66,06±8,94	58,54±4,39
PRO(g/dL)	6,33±0,19	6,43±0,08	6,58±0,17	6,68±0,40*
ALB(g/dL)	3,56±0,08	3,56±0,05	3,70±0,41*	3,66±0,10

Os valores são expressos em média ± Desvio Padrão *P≤0.05 diferença significativa em relação ao controle. n: número de animais por grupo.

5.4.3.1.1 Funções hepática e biliar

Na administração reiterada durante 90 dias, foram acrescentados novos parâmetros bioquímicos, em relação ao experimento anterior, com o objetivo de aprofundar os dados obtidos no modelo em 30 dias. Assim, os parâmetros estudados foram bilirrubina total, bilirrubina direta, transaminases (ALT, AST), fosfatase alcalina, colesterol total, proteínas totais e albumina. Os parâmetros analisados anteriormente no ensaio de 30 dias não sofreram variações, em relação ao controle o que também ocorreu neste ensaio. Nos novos parâmetros, porém, houve variação significativa na

proteína total (figura 73), assim como no nível de albumina(figura 74). O nível da proteína total no grupo tratado com 1000mg/kg aumentou significativamente ($p<0,05$). A albumina aumentou significativamente somente no grupo dos animais tratados pela dose 700mg/kg ($p<0,05$).

Figura 73. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre o nível de proteína total sérica em ratos.

* $p < 0,05$. Diferença significativa em relação ao controle

Figura 74. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre o nível de albumina sérica em ratos.

* $p < 0,05$: Diferença significativa em relação ao controle.

5.4.3.1.2 Função renal

Os parâmetros marcadores da função renal foram uréia (BUN), creatinina (CREA) e cálcio (Ca), sendo o cálcio, o novo parâmetro acrescentado. Contrariamente ao modelo de 30 dias, em que houve modificação da uréia em machos, aqui não foi observada nenhuma modificação da taxa destes parâmetros em relação ao controle.

5.4.3.1.3 Metabolismo de carboidratos

Variações no metabolismo de carboidratos foram verificadas através do nível de glicose no soro, não tendo sido observada variação significativa.

5.4.3.2 Testes Hematológicos

A tabela 18 resume os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros hematológicos.

Tabela 18. Efeito da administração reiterada de doses de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre as fórmulas eritrocitária e leucocitária em ratos

Parâmetros	Doses de EEAO		
	Controle n=5	400mg/kg n=5	1000mg/kg n=5
Eritrócitos($10^6/mm^3$)	6,51±0,50	6,98±0,12	6,86±0,52
Reticulócitos(%)	2,19±0,36	2,05±0,79	2,73±1,07
Hemoglobina(g/dL)	14,20±0,33	13,52±0,56	13,57±0,39
Hematócrito(%)	38,25±2,22	40,00±2,16	43,75±0,50*
Leucócitos(/mm ³)	2400±454,60	5275±350,00**	3350±437,79*
Linfócitos(%)	82,25±4,20	72,50±2,60**	68,75±2,06**
Monócitos(%)	3,75±0,95	2,5±1,29	2,00±0,81
Segmentados(%)	13,75±4,57	25,00±1,63**	28,75±1,50**
Eosinófilo(%)	0,25±0,50	0,00	0,50±1,00

Valores são expressos em média ± Desvio Padrão dos animais. *p≤0.05 diferença significativa em relação ao controle, **p≤0.01 diferença muito significativa em relação ao controle. n: número de animais por grupo.

O nível de hematócrito e de leucócitos nos animais tratados com a dose 1000mg/kg p.c. aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle (figura 75 e 76). Houve, também, um aumento muito significativo de leucócitos nos animais tratados com a dose 400mg/kg ($p < 0,01$). Em geral, houve um aumento dose-dependente no nível de hematócrito, já que este aumentou do grupo controle ao grupo de dose maior (1000mg/kg), com um valor intermediário para a dose de 400mg/kg. Não foi constatada modificação no nível de eritrócitos e de reticulócitos nos grupos.

Figura 75. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre a taxa de hematócrito em ratos, * $p < 0,05$: diferença significativa em relação ao controle.

Figura 76. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre a quantidade de leucócitos em ratos.

** $p < 0,01$: Diferença muito significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$: Diferença significativa em relação ao controle.

A partir da fórmula leucocitária absoluta, podemos observar que dentro dos tipos celulares de leucócitos, o nível de neutrófilos (segmentados), particularmente, aumentou consideravelmente ($P < 0,01$). Os neutrófilos dobraram com a dose 400 e 1000mg/kg. Podemos, assim, dizer que o aumento dos leucócitos é devido, principalmente, ao aumento dos neutrófilos, pois houve uma redução dose-dependente do nível dos linfócitos e os níveis de monócitos e eosinófilos não sofreram modificação nos diferentes grupos (Figura 77).

Figura 77. Efeito de doses reiteradas de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias, sobre a contagem de tipos de células leucocitárias em ratos. **Linfo:**linfócitos, **Mono:** monócitos, **Eosi:** eosinófilos, **Segm:** Segmentados.

5.4.3.3 Histopatologia

A análise microscópica de fígado, rim, pulmão, baço e coração foi realizada em diferentes aumentos. Não foi observada alteração de tecidos. Particularmente no coração cujo peso relativo aumentou do controle na dose de 1000mg/kg, não foi observada alteração de tecidos deste órgão. As Figuras 78-83 mostram cortes de regiões dos órgãos analisados, obtidos dos animais tratados com a maior dose de EEAO (dose 1000mg/kg).

Figura 78. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato tratado com 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 90 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento:40x, mostra arquitetura lobular preservada. Nota-se espaço-porta com arteríola, vênula e ductos biliares. **b) Aumento:100x**, mostra trabéculas hepáticas, com vasos sinusóides, hepatócitos e espaço-porta com seus elementos componentes, sem alterações. **c) Aumento: 200x**, Detalhe em maior aumento da fotografia anterior, evidenciando espaço-porta e trabéculas de hepatócitos.

Figura 79. Fotomicrografia de corte histológico de coração de rato tratado com dose 1000 mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, durante 90 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento:40x, mostra miocárdio, espaço luminal ventricular, com membrana endocárdica, preservados. **b) Aumento:200x**, mostra fibras musculares estriadas cardíacas, anastomosadas, núcleos em posições centrais e espaço intersticial, preservados..

Figura 80. Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de rato tratado com dose de 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 90 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento: 40x, mostra bronquíolos e alvéolos preservados. **b) Aumento: 100x,** mostra detalhe da foto anterior, de bronquíolo, vasos e alvéolos, todos preservados. **c) Aumento: 200,** detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando bronquíolo, com epitélio colunar simples ciliado, com musculatura lisa peri-bronquiolar, vasos e alvéolos preservados.

Figura 81. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rato tratado com dose de 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 90 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento: 40x, mostra região cortical renal com corpúsculos renais, vasos e túbulos contornados proximais e distais, preservados. **b) Aumento: 200x,** detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando o córtex renal, com seus corpúsculos renais e túbulos contornados proximais e distais.

Figura 82. Fotomicrografia de corte histológico de baço de rato tratado com dose de 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 90 dias. **Coloração :hematoxilina-eosina.**
a) Aumento:40x, mostra as polpas branca e vermelha, com vasos sinusóides dilatados e congestos.
b) Aumento:100x, detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando nódulo linfático da polpa branca, com arteríola centrofolicular.

Figura 83. Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de rato tratado com dose de 1000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* durante 90 dias. **Coloração: hematoxilina-eosina.**
a) Aumento: 100x, mostra ácinos serosos e ilhotas de Langerhans, preservados. **b) Aumento:200x**, detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando os acinos serosos do pâncreas, bem como uma ilhota de Langerhans, e seus diferentes tipos celulares, ambos preservados.

5.4.4 Potencial mutagênico

5.4.4.1 Teste de Ames

As tabelas 19 e 20 mostram os resultados de mutagenicidade a partir do teste de Ames. O extrato hidroetanólico do cajueiro exibiu indícios de mutagenicidade nas doses elevadas com duas linhagens de *Salmonella*. TA98 sem ativador metabólico, na dose de 0,56mg/placa e TA102 com ativador metabólico, nas doses 0,56 e 0,83mg/placa, exibiram atividade mutagênica significativamente elevada em relação ao controle negativo. A mutação com a linhagem TA98 traduz a existência de “frameshift”, ao passo que TA102 permite a detecção de substituição de pares de bases.

Tabela 19 Taxa de reversão da mutação his^- nas linhagens TA100 e TA102 de *S. typhimurium* com ou sem ativador metabólico (S9) em presença de doses de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*.

EEAO mg/placa	Número de revertentes/placa(RM)			
	TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	136,3 ± 6,0	132,71 ± 5,8	81,0 ± 13,1	373,7 ± 37,1
0,07	66,0 ± 5,2 (0,5)	127,0 ± 5,0(1,0)	83,3 ± 12,3 (1,0)	330,7 ± 32,4 (0,9)
0,14	128,7 ± 5,1 (0,9)	108,3 ± 15,8(0,8)	66,0 ± 14,7 (0,8)	379,0 ± 10,2 (1,0)
0,28	142,0 ± 8,5 (1,0)	144,7 ± 19,7(1,1)	85,7 ± 12,5 (1,1)	373,0 ± 27,7 (1,0)
0,56	91,0 ± 7,2 (0,7)	145,7 ± 17,9	88,0 ± 2,7 (1,1)	525,7 ± 32,8(1,4)*
0,83	120,0 ± 20,5 (0,9)	164,3 ± 10,3(1,2)	93,3 ± 4,9 (1,2)	485,0 ± 24,0(1,3)*
Controle +	1187	1464	1505	1633

RM = Razão de mutagenicidade, * $P \leq 0,05$, Controle negativo = 75.0µL de DMSO, Controle positivo → 2-antramina (2.5µg/placa) – TA100 +S9, Azida sódica (2.5µg/placa) – TA100 –S9 Daunomicina (5.0µg/placa) – TA102 –S9, Aminofluoreno (10.0µg/placa)- TA102 +S9)

Tabela 20 Taxa de reversão da mutação his⁻ nas linhagens TA97 e TA98 de *S. typhimurium* com ou sem ativador metabólico(S9) em presença de dose de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*.

EEAO mg/placa	Número de revertentes/placa (RM)			
	TA97a		TA98	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	174,0 ± 28,0	288,5 ± 26,2	32,3 ± 2,1	34,3 ± 4,2
0,07	137,0 ± 36,4 (0,8)	298,5 ± 3,5 (1,0)	35,7 ± 0,6 (1,1)	39,7 ± 16,7 (1,2)
0,14	177,3 ± 17,6 (1,0)	275,0 ± 0,17 (0,9)	32,0 ± 2,0 (1,0)	32,7 ± 1,5 (1,0)
0,28	172,3 ± 1,5 (1,0)	298,5 ± 6,4 (1,0)	36,3 ± 3,1 (1,1)	33,7 ± 3,2 (1,0)
0,56	202,3 ± 15,1 (1,2)	297,5 ± 14,8 (1,0)	38,7 ± 0,6 (1,2)*	34,3 ± 4,9 (1,0)
0,83	215,7 ± 8,1 (1,2)	308,0 ± 12,3 (1,1)	32,7 ± 2,1 (1,0)	34,3 ± 4,9 (1,0)
Controle +	1499	1307	965	1004

RM = Razão de mutagenicidade, * $P \leq 0,05$, Controle negativo = 75.0 μL de DMSO
Controle positivo $\rightarrow$ (2-antramina (2.5 μg /placa) – TA97a e TA98 +S9, NPD (10.0 μg /placa) – TA98 e TA97a –S9)

5.4.4.2 Teste de micronúcleo de medula óssea (depois de 39h $\frac{1}{2}$)

O tratamento de camundongos com uma dose única elevada (2000mg/kg) de EEAO mostrou, comparativamente ao controle negativo, uma elevação significativa da frequência ($P < 0,05$) de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea coletada 39h $\frac{1}{2}$ após administração por via oral. Porém, o efeito do EEAO parece extremamente inferior ao que um agente mutagênico como a ciclofosfamida induziria ($P < 0,001$). A tabela 21 resume os resultados obtidos.

Tabela 21. Frequências de policromáticos micronucleados induzidos na medula óssea em camundongos tratados com a dose de 2000mg/kg de extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*.

Treatmento	n° de Camundongos	n° de PCE	n° de MNPCE	MN(%)
Controle negativo(água)	10	10000	11	0,11
EEAO (2000mg/kg)	10	10000	26	0,26*
CYP (50mg/kg)	10	10000	126	1,26**

PCE = Eritrócitos policromáticos, MN = frequência de micronúcleos, Ciclofosfamida (CYP), ** $P \leq 0,001$ diferença extremamente significativa em relação ao controle negativo * $P \leq 0,05$ diferença significativo em relação ao controle negativo .

6. DISCUSSÃO

Folhas de Anacardium occidentale L.

6 Discussão

A análise microscópica das folhas do clone CCP76 de *Anacardium occidentale* revelou algumas diferenças em relação a uma outra variedade de cajueiro descrita pelos autores FERREIRA e colaboradores (1996). Por efeito, como foi evidenciado nos resultados, o clone CCP76 apresenta na face inferior principalmente estômatos de tipo anomocítico enquanto nestes autores, aparecem estômatos paracíticos. CRONQUIST (1981) também cita a presença nas folhas das Anacardiaceae, de estômatos anomocíticos. Quanto a METCALFE (1950), existe em *Anacardium occidentale* estômatos de tipo “ranunculaceous” chamado também de anomocítico. A nervura mediana do cajueiro de FERREIRA e colaboradores é bi-convexa e pontiaguda na face inferior, com aspecto de triângulo equilátero. Já no clone CCP76, mesmo que a nervura mediana seja bi-convexa, não é pontiaguda na face inferior. Outra variação relevante é dada pela presença no clone CCP76, de um tecido colenquimático super desenvolvido e sua ausência nas folhas de FERREIRA e colaboradores. Observamos ductos no floema como nos últimos autores. METCALFE fala de canais de resinas no floema quando CRONQUIST usa o termo de ductos de resinas no floema. As duas camadas de células de parênquima paliçádico observadas no mesófilo do clone CCP76 e em FERREIRA e colaboradores, foram evidenciadas por METCALFE. Foi observada também, hipoderme em folhas de gêneros da mesma família como em *Gluta*, *Mangifera*, *Melanorrhoea* ou de pseudo-hipoderme em *Protorhus*. FERREIRA e colaboradores evidenciaram hipoderme nas folhas do cajueiro. Observamos uma camada subepidérmica, mas como não foi feito um estudo de ontogênese, falar de hipoderme parece inadequado. Drusas são observadas na maior parte dos tecidos. De acordo com CRONQUIST (1981), existe cristais de oxalato de cálcio em tecidos parenquimáticos no gênero *Anacardium*.

A presença de compostos fenólicos foi evidenciada pelo estudo histoquímico. E estes compostos devem ser localizados majoritariamente no parênquima do floema e do xilema. Para CRONQUIST (1981), as Anacardiaceae produzem 5-dioxiflavonoides, biflavonoides, taninos particularmente proancianidinas e ácido gálico a partir células especializadas localizados no tecido parenquimático.

Os resultados do estudo químico confirmam a riqueza das folhas do clone CCP76 em compostos fenólicos usando seu extrato hidroetanólico 70%.

Estes compostos incluem principalmente duas classes de polifenóis, os flavonóides e os taninos condensados. Os fenóis totais foram avaliados em 35,50%, sendo que os flavonóides representam quase 2,5% desta proporção. Quanto aos taninos, foram avaliados em 33,37%. Assim, o extrato contém mais taninos do que flavonóides. Tanto no nosso trabalho, como em estudos prévios feitos por LAURENS *et al.* (1982), estes taninos foram identificados como proantocianidinas, que são polímeros formados a partir de unidades de flavonóides, flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis (BRUNETON, 1993, De MELO, 2002). No fruto de cajueiro os taninos identificados pelos autores MACHEIX *et al.* (1990) foram associados a proantocianidinas.

Estudos também mostram a presença no cajueiro de ácidos fenólicos e fenóis lipídicos na castanha ou nos frutos. Estes abrangem o ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico, os cardanóis, os cardóis, os ácidos anacardícos e os cardóis metilados (TYMAN, 1979; HIMEJIMA e KUBO, 1991; KUBO *et al.*, 1999). No ensaio químico realizado por nós, foi identificado no extrato de folhas um composto de absorção ultravioleta similar ao ácido gálico. Foi verificada a presença um outro composto, que exibiu uma única banda de absorção no ultravioleta, com λ_{max} situado entre 270 e 280 nm, que deve estar associado a molécula de ácido fenólico simples, como o ácido benzoico. De acordo SHAHIDI e NACZK (2004), tais componentes apresentam λ_{max} entre 220 e 280nm. O λ_{max} do ácido benzoico é encontrado entre 270 e 280nm.

As manchas, na cromatografia em camada delgada, exibiram cores laranja a amarela, indicando a riqueza do extrato em flavanóis e flavonas, de acordo com a descrição de WAGNER e BLADT (1996).

Através da análise de cromatografia de alta eficiência, estruturas de espectro ultravioleta similar dos flavonóides quercetina-3-O-ramnosil-ramnosideo, canferol-3-O-metil-éter, miricetina-3-O-ramnosideo, canferol-3-O-ramnosil-ramnosideo e apigenina ou amentofavona foram identificados. Os outros dez picos que apresentaram duas bandas de absorção ao redor de 270nm e 360nm são, provavelmente, moléculas de flavonóides já que os flavonóides são caracterizados pela presença de dois máximos

nos seus espectros UV-vis, um situado entre 240-285 nm (banda II) e o outro, entre 304-400 nm (banda I) (ZUANAZI, 2002).

A partir da análise de LC-MS de íon positivo do liofilizado de EEAO, extraído com metanol, verifica-se que os picos presentes no cromatograma de HPLC eram de flavonóides, de acordo com suas absorções exibidas no UV-vis. Na maioria dos espectros (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) observamos a massa m/z 205. Esta pode ser atribuída ao núcleo fundamental (NF) dos flavonóides após perda de um grupamento OH, de acordo com o esquema 1.

Assim, a presença deste íon nos espectros de massa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 confirmaria a presença de flavonóides.

Em todos os espectros, observou-se íon de massa m/z 149 com diferentes níveis de intensidade. Tal massa pode ser associada a uma molécula de açúcar (A) que perdeu um CH_2OH (esquema 2). Usando-se o modo de fragmentação dos carboidratos que formam ligações osídicas com os flavonóides, sugerido pelos autores DOMON e COSTELLO, citados por FERRERES et al. (2004), podemos obter vários fragmentos. Particularmente, os fragmentos de tipo $\text{Z}_1\text{C}_2\text{-Y}_0\text{B}_3$ como indicado no esquema 3, dão íons de massa m/z 147. Assim podemos considerar que são estes que representam o íon m/z 149 nos espectros, talvez após alguns rearranjos.

Em função do exposto, os flavonóides podem ser considerados como estando associados a açúcares, sendo, portanto, heterosídeos flavonoidicos.

A massa m/z 301 aparece nos espectros 1, 2, 6, 7, 8, 9 e 11. Esta pode ser associada a uma molécula de quercetina (Q) sem um átomo de H (esquema 4).

Assim, os espectros 1, 2, 6, 7, 8, 9 e 11, que contêm uma massa m/z 301, podem ser considerados como heterosídeos da quercetina.

Núcleo fundamental dos flavonóides

Esquema1. Obtenção hipotética do íon m/z 205

Esquema 2: Obtenção hipotética do íon m/z 149

Esquema 3: Fragmentação dos carboidratos de acordo com Domon e Castello (1988)

Esquema 4. Obtenção hipotética do íon m/z 301

Nestes espectros verifica-se a possibilidade elevada de obter o íon m/z 149 associado ao açúcar. No espectro 7 por exemplo, o açúcar (íon m/z 149) representa o pico de base (pico maior do espectro). De acordo com a massa de seu íon molecular podemos atribuir ao composto 7 ($[M+H]^+$, m/z 740) a estrutura da quercetina 3-O-ramnosideo; propomos no esquema 5 um mecanismo de fragmentação.

Quanto ao composto do espectro 8 ($[M+H]^+$, m/z 784), um dos heterosídeos de peso molecular próximo é a quercetina 3-O glicopiranosil-glicopiranosil glicosideo (esquema 6).

O espectro 5 que contém a massa m/z 318 e a presença do íon m/z 149 (açúcar), pode ser um heterosídeo da miricetina (Mi) (esquema 7).

Esquema 5. Modelo hipotético de fragmentação do íon de massa m/z 740

Quercetina 3-O-glicopiranosil- glicopiranosil-glicosideo (m/z 788)

Esquema 6. Estrutura da quercetina 3-O-glicopiranosil- glicopiranosil-glicosideo

Mi: Miricetina m/z 318

Esquema 7: Estrutura da miricetina

O composto do espectro 11 tem o maior peso molecular de todos os espectros já que o íon molecular tem como massa m/z 940 e contém o íon m/z 301, atribuído a quercetina, assim como o íon m/z 149. Um dos heterosídeos da quercetina mais próximo é o glicopiranosilramnosideo, de massa m/z 936. A variação de massa de íons obtidos em estudos de LC-MS em relação à massa molecular real é observada por vários autores (PETSALO et al., 2005, FERRERES et al., 2004, ALONSO-SALCES et al., 2004, STOBIECKI, 2000, KAZUNO et al., 2005, ROMANI et al., 2000). Partindo deste fato, o mecanismo de fragmentação no esquema 8 pode ser proposto.

O espectro 3 tem um íon m/z 205 que foi atribuído ao íon derivado do núcleo principal dos flavonóides. Além disto, observou-se um íon molecular de massa $m/z=608$, que corresponde à massa do canferol 3-O-glicopiranosil ramnopiranosideo ou da quercetina 3-O-glicopiranosil glicopiranosideo (esquema 9). Não temos, porém, íon indicando a massa do canferol ou da quercetina. Talvez um estudo de íon negativo, revelaria estas massas.

Esquema 8: Fragmentação hipotética do composto de íon molecular m/z 940

Quercetina 3-o-glicopiranosil ramnopiranosideo m/z 611

Canferol 3-o-glicopiranosil glicopiranosideo m/z 611

Esquema 9: Estruturas possíveis para o íon molecular de massa m/z 611

O esquema 10 representa o espectro de massa do composto de pico maior no HPLC. A este foi atribuída a estrutura provável de um derivado da apigenina ou da amentoflavona, no estudo HPLC-DAD. No espectro, entretanto, não foram observados íons característicos de apigenina (m/z 270) nem o íon m/z 538 podendo representar a amentoflavona.

Concluindo, estudos com HPLC-DAD e LC-MS indicam a presença de heterosídeos flavanoidicos no extrato, principalmente com alta frequência de heterosídeos da quercetina, evidenciada a partir do LC-MS.

ARYA *et al.* (1989) isolaram das folhas do cajueiro 9 moléculas de flavonóides: miricetina, agatisflavona, robustaflavona, amentoflavona, quercetina, canferol, apigenina, quercetina-3-O-ramnosil-ramnosídeo e quercetina-3-O-glucosídeo.

O extrato hidroetanólico do cajueiro e sua fração metanólica foram ativos no ensaio antiúlcera, realizado por nós. A seguir avaliamos a dose efetiva 50% do extrato bruto como sendo 2,5 mg/kg de peso corporal com um coeficiente de correlação linear razoável de 0,77.

O metanol é um solvente inapropriado à extração dos taninos (BRUNETON, 1993; WATERMAN e MOLE, 1994). Um solvente como o acetato de etila e os solventes aquosos podem permitir a separação dos taninos. O acetato de etila deve possuir afinidade com as proantocianidinas dimericas e a maioria dos taninos hidrolisáveis, ao passo que as fases aquosas reteriam os polímeros de proantocianidinas e os taninos hidrolisáveis de alta massa (BRUNETON, 1993; WATERMAN e MOLE, 1994). Sendo assim, já que a maior inibição de úlcera foi obtida a partir da fração metanólica (88,2%), obtida após extração com éter de petróleo e diclorometano, o princípio ativo da atividade antiúlcera seria provavelmente outro, e não, os taninos. Além disso, usamos num segundo fracionamento, uma mistura de solventes com mais afinidade para os taninos, isto é, uma mistura contendo acetato de etila e água, obtendo-se redução de úlcera menor (65%) do que na fração metanólica. O ou os princípio(s) ativo(s), responsável (is) pela atividade antiúlcera deve, portanto, ser majoritariamente encontrado na fração metanólica.

As úlceras pépticas podem ser tratadas por anti-secretores ou protetores da mucosa gástrica. O primeiro grupo envolve fármacos como a cimetidina, o omeprazol e o lansoprazol. A cimetidina, um anti-histamínico H_2 , estimula a secreção de peptídeos gástricos, que inibem a produção de ácidos gástricos (HAVSTEEN, 2002). Os fármacos anti-histamínicos H_2 são inibidores competitivos da histamina pelo receptor H_2 , ligando-se a este através do anel heterocíclico e da longa cadeia lateral (KOROLKOVAS, 2003). Os fármacos inibidores da bomba protônica, como o lansoprazol e o omeprazol, reagem com os grupos tiólicos da enzima H^+ , K^+ -ATPase, a bomba protônica, e assim, inibem a secreção de H^+ pela célula parietal. Esta secreção ocorre por estímulo dos receptores colinérgicos, histaminérgicos e de gastrina (DELFOSE, 2000; KOROLKOVAS, 2003).

Os fármacos protetores da mucosa gástrica contêm moléculas como o derivado sintético da prostaglandina E1, o misoprostol, que inibe a secreção de ácido, atuando diretamente sobre as células parietais, possuindo, também, um efeito protetor na mucosa gástrica. O misoprostol também corrige a deficiência endógena de prostaglandina E1, resultante da ação destrutiva de certos fármacos, como o ácido acetilsalicílico e outros antiinflamatórios não-esteróides (DELFOSE, 2000).

Diferentes mecanismos foram propostos para elucidar a ação de gastro-proteção dos flavonóides. Estes abrangem o aumento do conteúdo em prostaglandina da mucosa gástrica, a redução da secreção da histamina pelos basófilos, por inibição da histidina descarboxilase. Os flavonóides também são conhecidos como seqüestrantes de radicais livres, que desempenham um papel importante na indução de lesões ulcerativas e erosivas do trato gastrointestinal (BORRELLI e IZZO, 2000).

Foi relatada a presença efetiva de quercetina nas folhas. Este componente foi citado na prevenção de lesões na mucosa gástrica a partir de vários modelos de testes antiúlcera (MARTIN *et al.*, 1993; IZZO *et al.*, 1994; DI CARLO *et al.*, 1994). De acordo com MARTI-BONMATI e colaboradores, em 1980, as glicoproteínas neutras devem ser as mais importantes na mucosa gástrica. A quercetina favoreceria o aumento destas proteínas e a substituição quantitativa das mesmas, facilitaria o reestabelecimento da capacidade defensiva contra ações agressivas da mucosa gástrica (BORRELLI e IZZO, 2000). A quercetina também estimula a enzima ciclooxigenase e a estimulação da

produção de prostaglandina local resultante, sendo este um outro mecanismo de proteção (MORONEY *et al.*, 1988). Além desses mecanismos, outros foram propostos e incluem a inibição da bomba protônica gástrica, a inibição da via da lipoxigenase e a inibição da peroxidação lipídica (DI CARLO *et al.*, 1999; MORONEY *et al.*, 1988; De La LASTRA *et al.*, 1994).

O extrato hidroetanólico do cajueiro mostrou também, na análise fitoquímica, a presença de saponina. Várias espécies vegetais, contendo saponinas exibiram atividade antiúlcera em modelos experimentais (MATSUDA *et al.*, 1998; HOUNG *et al.*, 1998; YESILADA e TAKAISHI, 1999).

Embora admitamos hipoteticamente o fato de que o princípio ativo da atividade antiúlcera deva ser diferente dos taninos, na literatura, muitos trabalhos citam a ação positiva destes polifenóis na obtenção da mesma atividade. Por exemplo, 9 moléculas de taninos condensados, classificados em estruturas diferentes (monômeros, dímeros, tri e tetrâmeros), exibiram experimentalmente atividade antiúlcera (EZAKI *et al.*, 1985).

O extrato em estudo e sua fração ME mostraram atividade antibacteriana contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a quase ausência de atividade contra as bactérias gram-negativa ensaiadas. A inibição de *Staphylococcus aureus* pelo óleo da casca de castanha do Clone CCP-76 do cajueiro foi anteriormente obtida por LIMA *et al.* (2000). Outros ensaios de atividade antibacteriana dos compostos fenólicos provenientes da castanha e das folhas de cajueiro são relatadas na literatura (HIMEJIMA e KUBO, 1991; VAN DER WATT e PRETORIUS, 2001; KUBO *et al.*, 1999; KUDI *et al.*, 1999).

De acordo com os resultados obtidos nas duas espécies (ratos e camundongos), a DL50 pode ser estimada como maior que 2500mg/kg. Segundo o esquema de AULETTA (1999), a morte de 0 a 1/3 dos animais numa primeira espécie, na dose de 2000mg/kg e a morte de 0 a 1/3 numa segunda espécie leva a classificar a DL50 do produto como sendo superior a 2500 mg/kg. Caso os sobreviventes não apresentem efeitos adversos, não há necessidade de outros ensaios agudos. Como podemos constatar nos resultados, não houve sinais de intoxicação ligados ao comportamento dos animais. Os ensaios com ratos, com a finalidade de estudo mais aprofundado da morte dos camundongos, mostraram que EEAO, na dose limite de

2000, não levam os ratos à morte. Este fato é sustentado pelos perfis de evolução de peso durante o ensaio agudo. Pode-se verificar que nas duas espécies animais houve ganho de peso durante o tempo de avaliação.

Para a interpretação da DL50, alguns autores sugerem DL50 maior que 2000mg/kg. Seja a DL50 estimada em 2000 como 2500mg/kg, como limite máximo, estes valores ficam no intervalo de 500 a 5000 mg/kg dos autores SOIEFER e RAUCKMAN (2001). Para estes autores, este intervalo corresponde aos produtos de toxicidade moderada.

Na avaliação da toxicidade de administração reiterada em 30 dias, o EEAO não impediu um aumento de peso corporal. Entretanto, houve um ganho de peso maior nos controles do que nos tratados, constatado, principalmente, nos machos, durante a prova de toxicidade em 30 dias. Este efeito não é suprimido totalmente no final do experimento já que existe uma redução significativa de peso corporal dos animais no grupo controle comparado aos animais dos grupos teste (400mg/kg, nas fêmeas e 700mg/kg e 1000mg/kg, nos machos). O aumento do tempo da administração para 90 dias confirmou os resultados de 30 dias. De fato, o extrato de cajueiro mostrou uma redução de ganho de peso corporal, seguindo um efeito dose-dependente. Quanto mais a dose aumenta, menos os animais aumentam de peso. Esta inibição de ganho de peso corporal pode ser explicada em TYMAN (1999). De acordo com este autor, os fenóis de cadeia longa como o (15:0) cardol ou adipostatina A, o 5-isopentadecilresorcinol ou adipostatina B e os ácidos anacardicos (13:0; 15:1; 17:1 e 17:2), isolados do cajueiro, inibem altamente a glicerol-3-fosfato dihidrogenase (GPDH). O GPDH é a principal enzima da síntese do triacilglicerol, cujo acúmulo excessivo juntamente com o colesterol no tecido adiposo explica os casos de obesidade.

Tanto no ensaio em 30 dias como em 90 dias houve uma alteração nos pesos relativos do coração. Porém, esta modificação não parece levar a uma resposta inconveniente, já que na análise histopatológica, não foi constatada alteração na morfologia cardíaca nos diferentes grupos, que pudesse sugerir uma possível disfunção do órgão devido ao extrato. No corte histológico de miocárdio de ratos

tratados foram observados fibras musculares estriadas cardíacas, anastomosadas, núcleos em posições centrais e espaço intersticial preservados.

Em relação à função hepática, foi constada uma diminuição significativa da taxa de fosfatase alcalina durante o ensaio em 30 dias nos machos, na dose de 400mg/kg, enquanto no teste de 90 dias não foi constada esta alteração. Sendo assim, a diminuição do ALP deve ser um efeito temporário, que pode ser devido ao crescimento rápido dos animais neste período e clinicamente esta variação pode não ser significativa quanto à alteração da função hepática. De acordo com os autores WINGARD e colaboradores (2000), estudando os efeitos adversos da anfotericina B, os pacientes apresentaram doenças hepáticas moderadas ou agudas somente quando a taxa da fosfatase alcalina era 5 vezes maior do que o valor limite. Considerando aqui o grupo controle como valor normal, a variação observada na dose 400mg/kg parece ser não significativa. De acordo com FERNANDES e colaboradores (2003), o efeito oxidativo é a causa principal da intoxicação do fígado, sendo induzido por vários agentes hepatotóxicos. EEAO, sendo rico em flavonóides, grupo de substâncias antioxidantes, deveria auxiliar na proteção ao fígado, atuando com hepatoprotetor. Os mesmos autores, estudando a hepatoproteção dos flavonóides a partir de indução em ratos de hepatotoxicidade pelo tert-butilidroperóxido (tBHP), observaram que esta proteção é devida a uma redução de glutathione tBHP-induzida e da peroxidação lipídica, considerada como a chave das reações de dano celular (HAVESTEEN, 2002).

Foi observado, também, durante o ensaio de 90 dias, aumento de proteína total na dose 1000 mg/kg e da albumina, na dose 700mg/kg. A proteína total é a soma da albumina e dos componentes da globulina. Geralmente, a variação da albumina é paralela à proteína total, exceto em alguns casos, quando a proteína total varia devido à gamoglobulina (WALLACH, 1999; QUE HEE, 1993). Notamos que nas duas doses não houve variação concomitante de proteína total e de albumina. Além disso, o valor significativo de $6,68 \pm 0,40$ g/dL de proteína total, na dose de 1000mg/kg e de $3,70 \pm 0,41$ g/dL, de albumina, na dose de 700mg/kg, estão dentro dos limites definidos por RINGLAR e DABICH, citados por MATSUDA e colaboradores (2000). De acordo com estes autores, nos ratos normais a proteína total é situada entre 5,9 e 8,4g/dL e a albumina, entre 3,2 e 4,3g/dL. As variações obtidas, portanto, parecem clinicamente

insignificantes. A disfunção hepatocelular, como descrita em SACHER e colaboradores (2002), não é ligada ao aumento dos níveis séricos da albumina ou da proteína total mas, ao contrário, à diminuição destes marcadores da função sintética do fígado. Também não foi constada modificação no peso relativo do fígado e nas análises, macroscópica e microscópica, nos dois ensaios de administração reiterada. No corte histológico de fígado de ratos tratados foi observada arquitetura lobular preservada. Notou-se também espaço-porta com arteríola, vênula e ductos biliares preservados.

Quanto à função renal, observamos um aumento significativo da taxa de creatinina nas fêmeas 1000mg/kg, em relação aos controles. Nos machos não houve modificações da creatinina; já na uréia foi constado um aumento significativo. O aumento de creatinina nas fêmeas não pode ser relacionado a um ganho ponderal, já que em D30, o peso deste grupo foi estimado igual ao peso nos controles.

Os valores de referência normais de creatinina nos ratos, citados pelos autores MATSUDA *et al.* (2000) é 0,39 – 2,29 mg/dL. Verificamos, portanto que, tanto controles como fêmeas 400mg/kg mantêm as taxas de creatinina neste intervalo. Segundo os autores WINGARD e colaboradores (2000), para que a variação de creatinina seja considerada clinicamente significativa, é preciso que o valor obtido seja 2 vezes maior que o valor de base. No nosso experimento, o valor do controle é $0,38 \pm 0,004$ e o do teste é $0,58 \pm 0,07$, parecendo, portanto, a variação de creatinina clinicamente insignificativa.

Aparece um aumento significativo da uréia nos machos mas, já que este aumento não foi verificado juntamente com a creatinina neste sexo, não podemos conjecturar a existência de um dano renal. A uréia e a creatinina são dejetos nitrogenados, derivados das proteínas e eliminados pelo rim. Se a taxa dos mesmos aumenta no sangue, há uma retenção de nitrogênio, que leva às doenças renais. PRYCE e DURNFORD, em 1979, mostraram que a correlação entre uréia e creatinina é muito evidente, principalmente nos homens ($r=0,83$). Nos trabalhos de SATYANARAYANA e colaboradores (2001), o dano renal é observado com aumento da creatinina e da uréia. É por isto que podemos sugerir que esta modificação na uréia não deve ser clinicamente importante. No ensaio em ratos de 90 dias não foram observadas modificações em relação ao controle, tanto no nível sérico da creatinina

como no nível sérico da uréia. Na análise histopatológica, tanto no modelo de 30, como de 90 dias, a morfologia do rim não sofreu de modificação e mostrou córtex renal com corpúsculos renais, vasos e túbulos contornados proximais e distais preservados. Isto pode ser devido aos flavonóides e aos taninos, que parecem inibir a nefrotoxicidade. Para SATYANARAYANA e colaboradores (2001), os flavonóides, devido às suas propriedades antioxidantes, concorreriam para o bloqueio da nefrotoxicidade. Os autores obtiveram com a quercetina uma redução considerável da taxa de t-BARS ou Thiobarbituric acid reacting substances, representando a resposta da peroxidação lipídica, induzida pela administração da ciclosporina, um agente conhecido como nefrotóxico. ZAVODNIK, (2003) relata a inibição da transformação do citocromo P-450 na sua forma inativa P-420 assim como a sua destruição pela genisteína-8-C-glicosídeo, uma isoflavona. Este flavonóide inibiria ao mesmo tempo a peroxidação lipídica e a oxidação SH das membranas microsomais, submetidas ao estresse oxidativo, induzido pelo tert-butil-hidróxido. Com a quercetina, NIKOLIC e colaboradores (2003) suprimiram o aumento da taxa da uréia, induzida pelo glicerol nos ratos.

Efeitos benéficos dos taninos contra os danos renais são citados pelos autores YOKOZAWA e colaboradores (1991). De maneira geral, os polifenóis parecem dotados de uma atividade protetora contra os danos renais. TAKAKO e colaboradores (2003), estudando a influência dos polifenóis do chá verde, concluíram que estes melhoram os danos renais induzidos pela arginina (reduzindo as toxinas formadas a partir da uréia e da produção de óxido nítrico), e aumentando a atividade das enzimas responsáveis pela “limpeza” dos radicais livres.

Sobre o metabolismo dos carboidratos, medido pela taxa de glicose, tanto no ensaio em 30 como em 90 dias, não houve alteração, e os valores obtidos ficam na faixa de glicose dos ratos de Ringlar e Dabich como descrito em MATSUDA e colaboradores (2000). Estes valores são de 89,5 – 183,5 mg/mL.

Quanto aos resultados hematológicos, no ensaio em 30 dias, não houve alterações no ferro, na hemoglobina, na taxa de hematócrito e nos eritrócitos, ao comparar controles e testes, sugerindo ausência de anemia ou de distúrbio na produção de hemácias ou de hemoglobina. Os três últimos parâmetros, porém, são inferiores aos valores de referência de Bailly e Duprat (1993), citados por MATSUDA e

colaboradores (2000). De acordo com estes autores, para um rato de 7 a 10 semanas, como em nosso estudo, os valores de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina, nos machos e fêmeas são, respectivamente, $7,69.10^6/\mu\text{L}$ e $7,77.10^6/\mu\text{L}$; 45,1% e 46,0%; 16,6g/dL e 16,6g/dL. Estes autores, entretanto, não definem as margens de variação. Fica difícil, portanto, basear-se nestes valores. As modificações em relação aos valores de referência destes autores podem ser explicadas pelo desenvolvimento dos animais ou pela raça. Como descrito na literatura, outros modelos murinos também têm demonstrado uma grande variabilidade (SCHIMID e VON FOSTER, 1986, DERALANKO, 1995), muitas vezes estabelecendo critérios interpretativos para diferentes etapas de crescimento (segundo a idade, o modelo). Quanto ao ensaio em 90 dias, foi descrita a taxa de hemácias jovens dentro da quantidade total de hemácias. Observamos que tanto no valor total de eritrócitos como na frequência de reticulócitos, não houve alteração. As porcentagens de reticulócitos são 2,19%, 2,05% e 2,73%, respectivamente, nos grupos controle, teste 400 e 1000mg/kg, sendo acompanhados de valores estaticamente iguais de hemoglobina entre controle e grupos teste. Sendo assim, podemos dizer que existe uma atividade normal da medula óssea nos ratos do grupo controle, como nos grupos teste. De acordo com SACHER e colaboradores (2002), uma contagem de reticulócitos de 0,5 a 2,5% indica uma atividade normal da medula óssea, desde que os níveis de hemoglobina estejam normais. Embora, o nível de hemoglobina estivesse inalterado em todos os grupos teste em relação ao controle, foi observado um aumento significativo da taxa de hematócrito no grupo teste 1000mg/kg. Em geral, houve um aumento dose-dependente da taxa de hematócrito ($38,25 \pm 2,22$ no grupo controle, $40 \pm 2,16$ no grupo 400mg/kg e $43,75 \pm 0,50$ no grupo 1000mg/kg), sendo que na dose menor de 400 mg/kg, o aumento não foi significativo em relação ao controle. Além disso, no grupo 1000mg/kg, houve uma menor variabilidade nos valores dos animais já que o desvio padrão neste grupo foi de 0,5. Os valores do hematócrito ou da hemoglobina são comumente utilizados na determinação do grau de anemia. Estas duas determinações geralmente apresentam uma relação constante, que pode ser alterada se houver anormalidades no tamanho e forma dos eritrócitos ou na produção da hemoglobina (SACHER *et al.*, 2002). Tanto a taxa de

hematócrito como o valor da hemoglobina aumentam nos casos de poliglobulia (CRIMAIL *et al.*, 1985).

A partir do ensaio em 30 dias, houve aumento dose-dependente de leucócitos nos grupos de fêmeas tratadas, mas o aumento foi significativo unicamente no grupo 1000mg/kg, neste sexo. Entretanto, no modelo em 90 dias, este fenômeno acontece em todos os grupos tratados. Em ambos modelos, o aumento de leucócitos é seguido de aumento muito significativo de segmentados e particularmente no modelo de 90 dias o aumento foi dose-dependente. Um número importante de leucócitos compreende as células fagocitárias, dentre as quais, os neutrófilos polimorfonucleares. Estas células ligam-se aos microrganismos, corpos estranhos; englobam estes agentes e os destroem (CRIMAIL *et al.*, 1985). As células fagocitárias são responsáveis pelas respostas imunes inatas. Assim, o aumento do número destas células parece estar ligado à administração de EEAO, entretanto, poderia ser considerado como uma resposta normal frente à administração continuada do extrato. Foi observada, também, uma diminuição dose-dependente (com o aumento da dose) de linfócitos no ensaio em 90 dias. As catequinas são flavonóides que participam da biogênese das proantocianidinas e originam da leucocianidina, sob ação catalítica da nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase (NADPH) (De MELLO e SANTOS, 2002). Vários trabalhos relatam o efeito inibidor potencial das catequinas sobre o crescimento celular (AHMAD *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998), explicando, talvez, sua atividade anti-tumoral conhecida (FUJIKI *et al.*, 1992). KIRSZBERG e colaboradores, em 2003, estudando o efeito das catequinas de *Cocos nucifera* sobre a proliferação dos linfócitos, a partir de um ensaio anti-tumoral, observaram uma redução dose-dependente significativa dos linfócitos normais. Não foi identificada, especificamente, a presença de catequinas em nossa triagem química porém, como foi indicado inicialmente, os dados da literatura mostram a presença deste grupo de substâncias no fruto do cajueiro e sua castanha (DUKE, 1992). Verificamos anteriormente que os taninos presentes no extrato são proantocianidinas, que podem ter como monômeros moléculas de catequina (De MELO e SANTOS 2002). Caso haja ausência efetiva da catequina no extrato, a sua presença ainda poderia ser explicada pela biotransformação das proantocianidinas em catequinas, já que a degradação das

proantocianidinas, sob catalise ácida, leva à cianidina, uma estrutura próxima da catequina (De MELO e SANTOS , 2002).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados parecem, na sua maioria, inalterados ou, quando alterados, não parecem ser clinicamente significativos. Além disso, na análise histopatológica, todos os órgãos examinados apresentaram-se histopatologicamente preservados.

O ensaio de mutagenicidade foi realizado para estudar as interações do extrato hidroetanólico com o genoma e predizer a possibilidade de indução de tumor a longo prazo. Obtivemos indícios de indução de “frameshift” (pequenas deleções e adições de pares de bases) e de substituição de pares de bases em presença de ativador metabólico. Em CAVALCANTE e colaboradores (2003), que trabalharam com o suco do cajueiro, contendo compostos fenólicos, entre os quais, taninos condensados, quercetina e ácidos anacardicos, notamos unicamente a indução de “frameshifts” acentuados com a adição de ativador metabólico (S9mix). O extrato hidroetanólico induziu também clastogenicidade nas doses elevadas, mas extremamente inferior ao efeito da ciclofosfamida, usada como referência. Em geral, nos dois modelos, as induções de mutagenicidade foram observadas nas doses elevadas de extrato total.

EEAO, como indicado nos ensaios químicos, contém, principalmente, compostos fenólicos, como os flavonóides e os taninos.

A mutagenicidade dos flavonóides é largamente discutida na literatura, já que os resultados de vários testes de mutagenicidade são opostos. Muito cedo, os autores BJELDANES e CHANG (1977), SUGIMURA e colaboradores (1977); MacGREGOR e JURD (1978); NAGAO e colaboradores (1981), utilizando as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella Thyphimurium*, obtiveram resultado positivo de mutagenicidade com a quercetina. Tal resultado foi comprovado pelos experimentos de MELTZ e MacGREGOR (1981), a partir do teste de células de linfoma L5178Y de camundongo e por NAKAYASU e colaboradores (1986), a partir do teste de células da língua de hamster chinês. Um dos mecanismos, associado a este efeito, é dado pelos autores SILVA e colaboradores (1996), que relacionam a clastogenicidade do canferol à sua biotransformação em quercetina, pelo citocromo P450. Usando células V79, capazes

de expressar as atividades dos citocromos P450 1A1, 1A2 e 2B1 de ratos, os autores verificaram o mesmo efeito na miricetina.

Em oposição, EDENHARDER e colaboradores (2000) verificaram que doses de 0,03 mmol/kg, de quercetina e de seu glicosídeo isoquercitrina, por via oral, reduziram a taxa de eritrócitos policromáticos micronucleados de medula óssea de camundongos, previamente tratados por via intraperitoneal com benzo[a] pirona (BaP), respectivamente, de 73% e 33%. Concentrações 10 vezes mais altas de quercetina e de isoquercitrina reverteram o mesmo efeito.

Trabalhos na literatura tendem a elucidar o efeito mutagênico ou anti-mutagênico dos flavonóides. Assim, KANG e colaboradores (2004), utilizando a linhagem de *S. Typhimurium*, TA1538 modificada, comprovam um efeito modulador dos flavonóides sobre o citocromo P450, levando a uma supressão da mutagenicidade de mutagénos. No trabalho destes autores, a nova linhagem TA1538 possuía, além dos caracteres originais, a possibilidade de expressar as atividades do citocromo P450 1A2 humano, da NADPH-P450 redutase e do citocromo b5 humano, graças à presença na célula bacteriana de dois plasmídios. Com esta nova bactéria podendo expressar a atividade deste sistema enzimático, foi observada uma resposta positiva à mutagenicidade, na presença de fracas doses de quercetina e de naringenina, associada ao mutágeno 2-amino-3,4-dimetilimidazol[4,5f]quinolina (MeIQ). Entretanto, na presença de maiores doses dos dois flavonóides, a mutagenicidade do MeIQ foi totalmente inibida. O citocromo P450 1A2 possui duas atividades conhecidas como, 7-etoxiresorufina-O-dietilase (EROD) e metoxiresorufina-O-dimetilase (MROD). Estas foram estimuladas ou inibidas, respectivamente, nas baixas doses de flavonóides e nas doses elevadas. De acordo com SIESS e colaboradores (1995), este efeito bifásico dos flavonóides parece ser específico aos flavonóides altamente hidroxilados. Assim, parece que a presença de pequenas quantidades de flavonóides altamente hidroxilados é estimuladora de efeito mutagênico, enquanto altas quantidades inibem o mesmo efeito.

Os taninos condensados, particularmente, foram suspeitos como responsáveis pelo câncer de esôfago em uma boa parte da população mundial, que consome alimentos com alto teor de taninos, como chá, vinho e plantas medicinais. Entretanto,

outros estudos, como os de GUPTA e colaboradores (2002), relatam o efeito anti-mutagênico do chá, baseando-se no teste de Ames com as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102.

Nos ensaios usando extratos brutos de folhas, uma etapa a resolver nos isolamentos de compostos puros é a remoção da clorofila. Os extratos totais contêm sempre uma quantidade elevada de clorofila. As moléculas de clorofila atuam na síntese da matéria orgânica das plantas. Elas absorvem nos comprimentos de ondas situados entre 650 a 700nm (VACHA *et al.*, 1995). Os autores SARKAR e colaboradores (1996) mostraram que a clorofila na forma pura, administrada, isoladamente, por via oral a camundongos, levava a uma quebra significativa dos cromossomos da medula óssea.

Afinal, o efeito mutagênico moderado observado pode ser oriundo de vários compostos presentes no extrato bruto não tendo ainda possível esclarecer o grupo químico.

7. CONCLUSÕES

Folhas de Anacardium occidentale L

7 Conclusões

Neste trabalho realizamos o estudo botânico, químico, farmacológico e toxicológico das folhas do clone CCP76 de *Anacardium occidentale*, coletado no campo experimental de EMBRAPA, situado a 15 km de Fortaleza (Nordeste do Brasil).

A partir deste estudo, observamos que em geral, os caracteres anatômicos das folhas citados na literatura são observados no clone CCP76. Particularmente, podemos identificar a variedade, pela presença de ductos no floema, presença de estômatos unicamente na face inferior sendo estes, de tipo anomocítico. Temos também a presença de extensões de fibras no mesófilo.

As folhas do clone CCP76 são ricas em compostos fenólicos, principalmente, em heterosídeos da quercetina.

Farmacologicamente, o extrato hidroetanólico apresentou atividade antiúlcera significativa, através da indução de úlcera por ácido clorídrico em etanol 60%. Esta atividade está presente, em grande parte, na fração metanólica. A DE50% foi calculada como 150 mg/kg.

O extrato hidroetanólico e uma fração rica em flavonóides exibiram atividade bactericida na dose de 320 µg/mL sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

O extrato mostrou uma toxicidade aguda moderada, já que a DL50 foi avaliada como sendo maior que 2000mg/kg. Na avaliação da genotoxicidade, o extrato mostrou indução de “frameshifts” e uma clastogenicidade muito fraca em relação à ciclofosfamida. De maneira geral, o extrato parece ser bem tolerado nos ratos, a longo prazo. Este estudo vem confirmar a longa história do uso de folhas de cajueiro na medicina popular em várias regiões do mundo, sem relato de intoxicação.

Havendo ausência de toxicidade a curto como a longo prazos, o extrato tem potencial para ser usado como fitoterápico, após complementação dos estudos químicos e elaboração de uma formulação galênica bem apropriada. Este poderia constituir a matéria-prima de um agente antiúlcera. Para isto, deverá ser realizado fracionamento biodirecionado da fração metanólica, para elucidação do princípio ativo da atividade antiúlcera.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Folhas de Anacardium occidentale L.

8 Referências Bibliográficas

- AHMAD, N, FEYES, DK, NIEMINEN, A. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. J Natl Cancer Inst, Bethesda, v. 89, n°24, p1881–1886, 1997.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapia, Milan, v.72, p.286-287, 2001.
- AKISSU, G., AKISSU, M.K., OLIVEIRA, F., Farmacognosia-Curso de identificação de drogas vegetais, São Paulo:ed. Do Autor (Pharmakon), 1991, p.2, 3, 8, 11, 21, 23-4, 42
- AMES, B.N, DURSTON, W.E, YAMASAKI, E. LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Natl Sci USA, Washington, v.70, p.2281-2285, 1973.
- AMES, B.N, M.C CANN, J, YAMASAKI, E, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res, Amsterdam, v.31 p347-364, 1975.
- ALONSO-SALCES, R.M., NDJOKO, K., QUEIROZ, E.F., IOSET, J.R., HOSTETTMANN, K., BERRUETA, L.A., GALLO, B., VICENTE, F. On-line characterization of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. J Chromatogr A, Amsterdam, v.1046, p.89-100, 2004.
- ARYA, R., BABU, V., ILYAS, M., NASSIM, K. T. Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. J Indian Chem Soc, Kolkata, v.66, n°1, p.67-68, 1989.
- AULETTA, C.S. Acute systemic toxicity testing in Product safety evaluation handbook, 2th edition, edited by Shane Cox, G, p42-86, New York, 1999.
- BACKHOUSE, N., DELPORTE, C., FELICIANO, A.S., LOPEZ-PEREZ, J.L. Bioactive phenolic derivatives from *Acaena splendens* methanol extract, Phytother Res, London, v.16, p.562-566, 2002.

- BARROS, S., ROPKE, C.D., SAWADA, T.C.H., Da SILVA, V.V., PEREIRA, S.M.M., De MORAES, S.B. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). Reva Bras Cien farmacêuticas, São Paulo, v.41, n.1, p.53-61, 2005.
- BARRY, A.B., BERTRAM, G.K. Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas. IN Farmacologia Básica e Clínica, 8ª edição Guanabara Koogan, Rio De Janeiro 2003, p.55-63
- BENEDICT, W.F., BAKER, M.S., HAROUN, L., CHOI, E., AMES, B.N. Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in Salmonella/ microsome test, Cancer Res, New York, 37(7Pt1) p.2209-13, 1977.
- BERNSTEIN, L., KALDOR, J., McCANN, J., PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. Mutat Res, Amsterdam, v.97, p.267-281, 1982.
- BERESWILL, S., KIRST, M. Molecular microbiology and pathogenesis of Helicobacter and Campylobacter updated: a meeting report of 11th conference on Campylobacter, Helicobacter and related organisms. Mol Microbiol, Oxford, v. 45, p.255-262, 2002.
- BJELDANES, L.F. and KANG, G.W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds, Sciences, Washington, v.197, p.577-8, 1977.
- BORELLI, P., MARIANO, M., BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: Effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. Nutr Res, New York, v.15, p.1477 -1485, 1995.
- BORELLI, P., NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition: decrease in the peritoneal macrophages. Rev Bras Cien Farm, São Paulo, v.37. p.51 – 60, 2001.
- BORRELLI, F., IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of Anti-ulcer remedies, Phytother Res, London, v.14, p.581-591, 2000.
- BRASILEIRO, G.F. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular in Biogliolo patologia geral, 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998, p149-192.

- BRUNETON, J. Pharmacognosie: Phytochimie , Plantes médicinales . 2nd edition, Paris,1993. p.314-327
- BRUSICK, D. Genetic Toxicology. *in* Principles and methods of toxicology, p.222-271 Raven Press New York, 1982.
- CAVALCANTE, A.A.M., RUBENSAM, J.N.P., DA SILVA, E.G., MOREIRA, J.C.F., HENRIQUES, J.A.P. Mutagenicity, Antioxidant Potential, and Antimutagenic Activity Against Hydrogen Peroxide of Cashew(*Anacardium occidentale*) Apple Juice and Cajuína. *Environ Mol Mutagen*, New York, v.41, p.360-369, 2003.
- CHRISTOPHER, B. and KIT, A.K. Multidose toxicity and Carcinogenicity Studies in Toxicology Testing Handbook, Principles, Applications and Data Interpretation. New York, 2001, p.33.
- CRIMAIL, P., DUPOUX, P., DE GALARD, D. , PATTE, D., ROBERT, S., VIGNERO, C ; BOUNEUF, H., VAN CAMEKBEKE. Dictionaire de la Medecine. Les editions françaises, Paris, 1985 , 693p.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University press. New York, 1981, 1262p.
- DE LA LASTRA, ALCATRON, C. MARTIN, M.J., MOTLVA, V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*, Basel, v. 34, p.2477-2482,1994.
- DE LIMA, J.P. e DAVID, J.M. Plantas Medicinais. Fármacos Derivados de Plantas *IN* *IN* Farmacologia 7^a edição Guarabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002, p135-145.
- DE MELLO, J.C.P. SANTOS, S.C. Taninos *in Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ed. Florianópolis;UFSC, Porto Alegre: UFRGS, 2002. p.527-554
- DELFOSSÉ, M. Ulcere peptique et reflux gastro-oesophagien. *J Pharm Belg*, Bruxelles, v.55, n.2, p.33-39, 2000.
- DERELANKO, M. J., HOLLINGER, M. A. Handbook of toxicology. CRC Press. Boca Raton, New York, London, Tokyo, 1995.
- DI CARLO, G., MASCOLO N., IZZO, A.A., CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of a natural therapeutic drug. *Life Sci*, Oxford, v.64, 337-353, 1999.

- DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A., CAPASSO, F., AUTORE, G. Effect of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytother Res*, London, v.8, 42-45, 1994.
- DOMIGUEZ, X.A. Metodos de investigación fitoquímico. México: Limusa, 1983. 277p.
- DOMIGUEZ, X.A. Analise fitoquimico. *Ciencia*, México, v.21, p.125-135, 1961.
- DO PRADO, F.C., DE ALMEIDA, R.J., DO VALE, J.R. Atualização terapêutica, Manuel pratico de diagnostico e tratamento, 16ª edição Artes medicas, São Paulo, 1993, pp.223-230
- DUKE, JAMES, A. Handbook of phytochemical Constituents of Gras herbs and other economic plants, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1992.
- ECOBICHON, D.J. The basis of toxicity testing, Ecobichon CRC Press, Boca Raton 1992. p35-137.
- EDENHARDER, R., KRIEG, H., KOTTGEN, V., PATT, K.L. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice in vivo by fruits, vegetables, and flavonoids. *Teratog Carcinog Mutagen*, New York, v.16. n.5, p.253-268, 2000.
- ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY(EPA)-OFFICES OF PREVENTION, PESTICIDES AND TOXIC SUBSTANCES(OPPTS): Guidelines nº 870.3050/08-2000, nº870.1100/08-1998, nº870.3100/08-1998, nº870.3100/08-1998, 870.5395/08-1998, baixados a partir do site: www.epa.gov/OPPTS_Harmonized.
- EZAKI, N., KATO, M., TAKIZAWA, N., MORIMOTO, S., NONAKA, G., NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* ramus IV. Effects of condensed tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. *Planta Med*, Stuttgart, v.51, p.34-38, 1985.
- FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemistry screening of plants, *J.Sc.*, Washington, v.55, n.3, p.225-276, 1966.
- FARNSWORTH, N. R, SOEJARTO, D D. Potential consequences of plant extinction in the United States, on current and future. Availability of prescription drugs. *Econ. Bot.* New York, v.39, p.231-240, 1985.

- FERNANDES, E., CARVALHO, M., CARVALHO, F., SILVA, A.M., PINTO, D.C., CAVALEIRO, J.A., DE LOURDES, B.M. Hepatoprotective activity of polyhydroxylated 2-stryrylchromones against ter-butylhydroperoxide induced toxicity in freshly isolated rat hepatocytes, Arch Toxicol, Berlin, n. 23, 2003
- FERREIRA, E. I. Como nascem e se desenvolvem os Novos Medicamentos. *IN Farmacologia* 7ª edição Guarabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002, p.201-207
- FERREIRA, J. L. I, Da SILVA, G.A., De OLIVEIRA FERRO, V. Diagnose laboratorial dos frutos e folhas de *Anacardium occidentale* L.(Caju). Rev Bras Farmacogn, São Paulo, v.1, p.55-69, 1996.
- FERRERES, F., LLORACH,R., GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the nterglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Mass Spectrom, Chichister, v. 39, p.312-321, 2004.
- FRANCA F., LAGO, E.L., MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to Leishmania (Viannia) braziliensis in an endemicarea of Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Top. Rio de Janeiro, v. 29 n. 3, p229-232, 1996.
- FRANCA, F., CUBA, C.A., MOREIRA, E.A., MIGUEL, O., ALMEIDA, M., DAS VIRGENS, M. de L., MARSDEN, P.D. An evaluation of the effect of a bark extract from the cashew(*Anacardium occidentale* L.) on infection by Leishmania(Viannia) braziliensis. Rev Soc Bras Med Trop, Rio de Janeiro, v.26, n.3, p.151-155,1994.
- FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., KINSELLA, J.E. Inhibition of human LDL oxydation by resveratrol. Lancet , London, v.341, p.1103-1104, 1993.
- FREITAS, P.C.D., BACCHI, E.M. Praticas de farmacognosia, São Paulo, Faculdade de ciências Farmacêuticas-USP, São Paulo, p.12, 24, 28-9, 31-2, 36, 1990.
- FUJIKI, H., YOSHIZAWA, S., HORIUCHI, T. Anticarcinogenic Effect of (-)-Epigallocatechin Gallate. Prev Med, New York, v. 21, p 503–509, 1992.
- GILLHAM, B., PAPACHRISTODOLOU, D.K., HYWEL, J.T. Wills Biochemical Basis of Medicine, 3ª Edição, Woburn, p367-377, 2000.

- GOLLAPUDI, B. and KAMRA, O.P. Application of a simple Giemsa-staining method in the micronucleus test, *Mutat Res*, Amsterdam, v. 64 , p. 45-46, 1979.
- GRANVILLE, G.O. Os Ensaios Clínicos *IN Farmacologia* 7ª edição Guarabara Koogan, Rio de Janeiro, p.147-155, 2002
- GRINGAUZ, A. Introduction to Medicinal Chemistry: How Drugs Act And Why. Wiley-VCH, Inc. New York, 1997, p77-139.
- GUERRA, M.P., NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e ético. In *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ed. Florianópolis;UFSC, Porto Alegre: UFRGS, 2002. p.13-26.
- GUPTA, S., CHAUDHURI, T., GANGULY, D.K., GIRI, A.K. Antimutagenic effects of black tea(World blend) and its two active polyphenols theaflavins and thearubigins in Salmonella assays. *Phytother Res*, London, v.16, p.655-661,2002.
- HAVESTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol Ther*, Oxford, v.96, p.67-202, 2002.
- HAYASHI, M., SOFUNI, T. ISHIDATE Jr, M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat Res*, Amsterdam, v.120, p.241-247,1983.
- HAZEKAMP, A., VERPOORTE, R., PANTHONG, A. Isolation of bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*, *J Ethnopharmacol*, Lausane,v.78, pp. 45-49, 2001.
- HERBARIO: Site web: www.herbario.com.br/cultivar.htm, 10 de maio 2006
- HICKEY, L.J. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *Am J Bot*, Columbus, v.60, n.1, p.17-33,1973.
- HIMEJIMA, M., KUBO, I. Antimicrobial agents from the cashew *Anacardium occidentale*(Anacardiaceae) nut shell oil. *J Agric Food Chem*, Washington, v.39, p.418-421,1991.
- HODGSON, E., LEVI, P.E. Introduction to biochemical toxicology. Appleton and Lange, Norwalk, 1994. 588p.

- HOFNUNG, M. :Test à court terme en toxicologie génétique : Principes et techniques , Institut Pasteur, Paris, 1984 . p.14-133.
- HOUNG, N.T., MATSUMOTO, K., WATANABE, H.. The antistress effect of majonoside-R2, a major saponin component of Vietnamese ginseng: neuronal mechanisms of action. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, Barcelona, v. 20, p.65-76, 1998.
- ISONO, K. e YOURNO, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, v. 71, p.1612-1617, 1974.
- IZZO, A.A., DI CARLO, G., MASCOLO, N., AUTORE, G., CAPASSO, F. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytother Res*, London, v.6, 179-181, 1994.
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York : Mc Grew Hill, 1940, 523p.
- KANG, IH; KIM, HJ; OH, H; PARK, YI, DONG, MS. Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino-3,5-dimethylimidazol[4,5-f]quinoline by Salmonella typhimurium TA1538 co-expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b₅. *Mutat Res*, Amsterdam. v.545, p37-47, 2004.
- KASTEN, F.H. Cytochemical studies with Acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acid . *Int Rev Cytol*, New York, v.21, p.141-202, 1967.
- KAZUNO, S., YANAGIDA, M., SHINDO, N., MURAYAMA, K. Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Anal. Biochem*, New York, v.347, p182-192, 2005.
- KIRSZBERG, C., ESQUENAZI, D., ALVIANO, C.S., RUMJANEK, V.M. The Effect of a Catechin-rich Extract of *Cocos nucifera* on Lymphocytes Proliferation. *Phytother Res*, London, v.17, p1054-1058, 2003.
- KOROLKOVAS, A; Dicionário terapeutico Guanabara, ed. 2003-2004, Guanabara Koogan, Capítulo 12, Rio de Janeiro, 2003.

- KUBO, J., JEA RAN, L., KUBO, I. Anti-Helicobacter pylori Agents from the Cashew Apple, J Agric Food Chem, Washington, v.47, p.533-537, 1999.
- KUDI, AC; UMOH, JU; EDUVIE, LO; GEFU, J: Screening of some Nigerian medicinal plants for antimicrobial activity, J. Ethnopharm, Lausanne, v.67, p225-228, 1999.
- LAURENS, A., MBOUP, S., GIONO-BARBER, S.O., DAVID, P.M. Etude de l'action antibactérienne d'extraits d'*Anacardium occidentale* L., Ann. Pharm Fr, Paris, v.40, n.2, p. 443-446, 1982.
- LEVIN, D.E., HOLLSTEIN, C., CHRISTMAN, M.F., SCHWIERS, E.A., AMES, B.N. A new Salmonella tester strain(TA102) with A : T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc Natl Acad Sc USA, Washington, , v.79, p.7445-7449, 1982a.
- LEVIN, D.E., YAMASAKI, E., AMES, B.N. A new Salmonella tester strain for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot, Mutat Res, Amsterdam, v. 94, p. 315-330, 1982b.
- LIMA, C. A. A., PASTORE, G. M., LIMA, E. D. P. A. Study of the antibacterial activity of anacardic acids from the cashew(*Anacardium occidentale*) nut Shell oil of the clone of cashew-midget-precocious CCP-76 and CCP-09 in five stages of maturation on oral microorganisms. Ciênc Tecnol Aliment, Campinas, v. 20, n.3, p.558-362, 2000.
- LIU, X. M., ZAKARIA, M.N.M., ISLAM, M. W., RADHAKRISHNAN, R., ISAIL, A., CHEN, H.B., CHAN, K., AL-ATTAS, A. Anti-inflammatory and antiulcer activity of *Calligonum comosum* in rats. Fitoterapia, Milan, v.72, p.487-491, 2001.
- MacGREGOR, J.T and JURD, L. Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* , Mutat Res. Amsterdam, v.54, p297-309, 1978.
- MACHEIX, J.J., FLEURIET, A., BILLOT, J. Fruit phenolic: Phenolic composition of individual fruits. CRC Press, Boca Raton, 1990, p.105.
- MARON, DM; AMES, BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res, Amsterdam, v.113, p173-215, 1983.

- MARTI-BONMATI, E., ALINO, S.F., Llorisy., S.M., ESPLUGUES, J. Effects of cimetidine, atropine and prostaglandin E2 on rat mucosal erosions produced by intragastric distension. Eur J Pharmacol, Amsterdam, v.69, p.49-53,1980.
- MARTIN, M.J., MOTILVA, V., ALARCON De La LASTRA, C., Quercetin and naringenin: Effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. Phytother Res, London,v.7, p.150-153, 1993.
- MASAKY, H., KUBO, I. Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut shell oil, J Agric Food Chem, Washington, v.39, p.418-421, 1991.
- MATOS, F.J.A., SOUZA, M.P., BARROS, M., LIMA, M.E. Marcha sistemática de abordem fitoquímica. Rev. Brás. Farm., Rio de Janeiro,v.46, n.3, p.151-412,1965.
- MATSUDA, H., LI, Y., MURAKAMI, T., YAMAHARA, J., YOSHIKAWA, M. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesion in rats. Life Sci, Oxford, v.63, PL245-250, 1998.
- MATSUDA, H; TANAKA, A; ITAKURA, A. Immunology and hematology in The laboratory Rat, Georg J Krinke, Academic press, London, 2000, p.437-446.
- MATSUMOTO, T., YAMADA. H. Effects of polyssacaride fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. J Pharm Pharmacol, Wallingford, v.43, p.699-704, 1991.
- McCANN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E., AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, Proc Nat Acad. Sci USA, Washington. v.72, n.12. p.5135-5139,1975.
- McGEORGE, L.S., LOUIS, J.B., ALTRERHOLT, T.B., McGARRITY, G.J. Mutagenicity analysis of industrial effluents: Results and consideration for integration into water pollution control programs. In: Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures., WATER, *et al.*, Plenum, USA, 1985, v.4, p.247-267.
- MEIJER, A.A.R. de, LAUS,C.B, SCHEFFER, M.C., PEROZIN, M.M. Plantas Medicinais e Cuidados Primários de Saúde: um Plano de Ação. Curitiba/1989. In Fitoterapia. [www. cesamep.hpg.ig.com.br/ftakerel.htm](http://www.cesamep.hpg.ig.com.br/ftakerel.htm)(23/10/2005. 13h).
- MELO, C.,De . Biotransformações das drogas In Farmacologia; Penildon Silva, 7ª edição,Guanaba Koogan, Rio de Janeiro, 2002, p.61-67.

- MELTZ, M.L. and MacGREGOR, J.T. Activity of plant flavanol quercetin in the mouse lymphoma L5178YTK^{+/-} mutation DNA single-strand break, and Bal b/c 3T3 chemical transformation assays, *Mutat Res*, Amsterdam. v.88, p317-24, 1981.
- MENSAH, J. Cours de pharmacognosie et matière médicale DEA de conception, réalisation et évaluation de médicaments : Extraction végétale. Université de Cocody. Abidjan, 2001. Chapitre 1.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. CTTAWAY, M.M., HARE, C.L., RICHARDSON, F.R., SLATTER, E.M. Anatomy of the Dicotyledons, Leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford at the Clarendon press, v.1, p452-462, 1950.
- MIGUEL, M.D e MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de fitoterápicos. Tecmedd Editora. Ribeirão Preto, 2004, p.18.
- MITCHELL, A.D. Genetic Toxicology testing in Product safety evaluation handbook, 2th edition, edited by Shane Cox, G, New York, 1999. p.167-200.
- MIZUI, T., DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, Kyoto, v.33, p.939-945, 1983.
- MONSEF, H.R., GHOBADI, A., IRANSHAHI, M., ABDOLLAHI, M. Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. *J Pharm Pharmacol Sci*, Edmonton, v.7 n°1, p.65-69., 2004
- MORONEY, M.A., ALCARAZ, M.J., FOLDER, R.A., CAREY, F., HOULT, S.R.S., Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by anti-inflammatory flavonoid-glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol*, London, v.40, p.787-792, 1988.
- MOTA, MLR, THOMAS, G, BARBOSA, JM, Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L, *J Ethnopharmacol*, Lausanne, v.13 p.289-300, 1985.
- NAGAO, M., MOUTA, N., YAHAGI, T., SHIMIZU, M., KUROYANAGI, M., FUKUOKA, M., YOSHIHARA, K., NATORI, S., FUJINO, T., SUGIMURA, T. Mutagenicity of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ Mutagen*, New York, v.3, p401-19, 1981.

- NAKAYASU, N., SAKAMOTO, H., TERADA, M., NAGAO, M., SUGIMURA, T. Mutagenity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture, *Mutat Res*, Amsterdam, v.174, p79-83, 1986.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS(NCCLS). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, 3rd ed. NCCLS document M11-A3. NCCLS, Villanova, 1990
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS(NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standards-5th ed., M7-A5; National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Wayne, (2000).
- NIKOLIC, J., CVETKOVIC, T., SOKOLOVIC, D. Role of quercetin on hepatic urea production in acute failure. *Ren Fail*, New York, v.25, n.2, p149-55, 2003.
- NZI, A.K. Etude comparative de la toxicité aigüe de deux préparations médicamenteuses à base de feuilles sèches de *Persea americana Mil.*(Lauraceae). Memoire de Diplôme d'Etudes Approfondies en conception realisation et evaluation de médicaments d'origine africaine. UFR Sc. Pharm et Biol. Université de Cocody, 2002. 85p.
- OLIVERA, F. de, AKISSUE, G. Fundamentos de farmacobotânica , 2^a ed, São Paulo, 2000, 178p.
- PAIVA, L.A.F., RAO, V.S.N., GRAMOSA, N.V., SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langdorffii* óleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacol*, Lausane, v.62, p.73-78, 1998.
- PETSALO, A., JALONEN, J., TOLONEN, A. Identification of flavonoids of *Rhadiola rosea* by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J Chromatogr* ^a Artigo em imprensa(disponivel no www.sciencedirect.com) ,Amsterdam, 2005.
- PRYCE, JD, DURNFORD, J, Laboratory test for kidney function. Urea or creatinine, *Lancet*. V2, p481-482(1979) in Interpretation des examens de laboratoire. Valeurs de reference et variations biologiques, 2^e tirage, Paris p171-185, 1981.

- PUTMAN, DL, GUDI, R, WAGNER III, VO, SAN, RHC, JACOBSON-KRAM, D. Genetic toxicology in Toxicology Testing Handbook, Principles, Applications and Data Interpretation, Marcel Dekker, Inc, New York, 2001. p.169.
- QUE HEE, S. S. Biological Monitoring, An introduction, Van Nostrand Reinhold, 1993. p. 223-299.
- ROMANI, A., PINELLI, P., MULINACCI, N., VINCIERI, F.F. HPLC analysis of flavonoids and secoiridoids in leaves of *Ligustrum vulgare* L.(Oleaceae). J Agric Food Chem, Washington, v.48, p.4091-4096,2000.
- SACHER, R.A., McPHERSON, R.A., CAMPOS, J.M., Widmann, Interpretação clínica dos exams Laboratoriais, 1ª edição Brasileira, Editora Manole Ltda, Barueri 2002.,1090p,.
- SARKAR, D., SHARMA, A., TALUKDER, G. Chlorophyll and chromosome breakage. Mutat Res, Amsterdam,v.360, n.3. p187-191, 1996.
- SATYANARAYANA, P.S., SINGH, D., CHOPRA, K. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxididative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats, Methods Find Exp Clin Pharmacol, Barcelona. v.34 , n.4. p.175-181, 2001.
- SCHIEBER, A., KELLER, P., CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A, Amsterdam, v.910, p265-273, 2001.
- SCHMID, M. and Von FORSTNER. Laboratory testing in veterinary medicine diagnosis and clinical monitoring. Bohringer, Mannhein GmbH, Mannhe, 1986.
- SHAHIDI, F., NACZSK., M. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press Inc., Boca Raton , 2004. p.502.
- SIESS, MH; LECLERC, J; CANIVENC-LAVIER, MC, RAT, P, SUSCHETET, M. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. Toxicol Appl Pharmacol, New York, v.130, n.1, p73-78, 1995.
- SILVA, I.D., RODRIGUES, A., GASPARD, J., MARIA, R., LAIRES, A., RUEFF, J. Mutagenicity of Kaempferol in V79 cells: The role of cytochromes P450. Teratog Carcinog Mutagen, New York. v.16, n.4. p229-41, 1996.

- SIMAGA, D. Essais pharmacognosiques du décocté de feuilles sèches d'une plante antihypertensive : *Persea americana* Mill.(Lauraceae) Memoire de Diplôme d'Etudes Approfondies en conception realisation et evaluation de medicaments issus des pharmacopées africaines. UFR Sc. Pharm. et Biol. Université de Cocody, Abidjan, 1999. 42p.
- SOIEFER, A. I., RAUCKMAN, E.J. Toxicity associated with single chemical exposures. In: Toxicology testing handbook. Principles, applications, and data interpretation. Ed. David Jacobbson-Kram, Kit A. Keller. New York, 2001, p.19-22.
- SOUZA, H. C., LUQUE, R., KRAUS, J.E. Revisão e padronização das metodologias de dupla coloração com azul de astra ou azul de alcian versus fuscina básica ou safranina. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 46, Rebeirão Preto. 995. Resumos, Ribeirão Preto, 1995, p.32.
- STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoids glycosides. Phytochemistry, Oxford, 2000, v.54, p.237-256.
- SUGIMURA, T; NAGAO, M; MUTSUSHIMA, T; YAHAGI, T; SEINO, Y; SHIRAI, A; SAWAMURA, M., NATORI, S., YOSHIHIRA, K., FUKUOKA, M., KUROYANAGI, M. Mutagenicity of flavone derivatives, Proc Jpn Acad, Tokyo, v.56, Ser.B, p194-197, 1977.
- SWAIN, T. and HILLIS, W.E., Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analyse of phenolic constituents. J Sci Food Agric, Washington v. 10, p. 63-68, 1959.
- TAKAKO, Y; EUN, JC, TAKAKO, N . Influence of green tea polyphenol in rats with arginine-induced renal failure. J. Agric. Food Chem. v.51, 2421-2425, 2003
- TAYLOR, L.N.D. The healing power of rainforest herbs: A guide to understand herbal medicinals. Square one publishers, inc. Garden City Park, 2005, 535p.
- TCHIKAYA, F.O. Etude des effets physiologiques et pharmacologiques de l'extrait aqueux de *Anacardium occidentale* L.(Anacardiaceae) sur les paramètres cardiovasculaires. Memoire de Diplome d'Etudes Approfondies(DEA) de Pharmacologie et Nutrition. Université de Cocody. Abidjan, 2000. 52p.

- TCHIKAYA, FO, DATTE, VJ ; BANTSIELE, GB ; OFFOUMOU, AM. Effets Pharmacologiques de l'extrait aqueux de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) sur la pression sanguine arterielle de Lapin et sur l'artère aorte de cobaye. Revue Méd. Pharm. Afri., Paris, v.17, p. 41-46, 2003.
- TIMBRELL, J. A., Introduction to toxicology 2nd edition, Taylor & Francis London, 1995, p.30-44
- TOMA, W., GRACIOSO, J.D.S., ANDRADE, F.D.P.D., HIRUMA-LIMA, C.A., VELEGAS, W., BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L.(Simaroubaceae). Biol Pharm Bull, Tokyo v.25, n°9, p.1151-1155, 2002.
- TYMAN, J.H.P. Biodegradable Surfactants Derived from Phenolic Lipids, *in* Surfactants in lipid chemistry: Recent synthetic, physical, and biodegradative studies, Royal society of chemistry, edited by TYMAN, J.H.P, Cambridge, 1992. p159-177.
- TYMAN, JHP, Lipids and obesity *in* Lipids in health and nutrition , Royal society of chemistry, edited by TYMAN, JHP, Cambridge, 1999 , p.76-101.
- TYMAN, JHP:Non-Isoprenoid Long Chain Phenols, Chem. Soc. Rev, London, v.8, p.499-537, 1979.
- VACHA, F. JOSEPH, D.M., TELFER, J.R., KLUG, D.R., PORTER, G., BARBER, J. Photochemistry and spectroscopy of five-chlorophyll reaction center of photosystem II isolated by using a Cu affinity column. Plant biology - Proc Natl Sci USA, Washington, v. 92 , p.2929-2933, 1995.
- VALENT, G.U. Avaliação da atividade mutagênica de extratos organicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames. Campinas, 1990. 134p.(Tese de Doutorado-Instituto de Biologia- UNICAMP).
- VAN DER WATT E., AND PRETORIUS, J.C., Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. J. Ethnopharm, Lausane. v.76, p.87-91, 2001.

- WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography Atlas. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1996. 384p.
- WALLACH, J. Interpretação de exames de laboratório, 6ª edição, Medica e Cientifica Ltda, Rio de Janeiro, 1999, ,p.63.
- WATERMAN, PG; MOLE, S. Methods in ecology: Analysis of phenolic plant metabolites, Blackwell Scientific Publication, 1rst Edition, Oxford, 1994, p.74 e 145.
- WEPIERRE, J. Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire, Masson. Paris, p151-177,1983.
- WILCHTL, M. Die pharmakognostisch Chemische Analyse. Frankfurt: Akademische Verlagsgesellschaft, 1971, p. 103-104
- WINGARD, JR; WHITE, MH; ALAISIE, E; RAFFALI, J; GOODMAN, J; ARRIETA, A, A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia, Clin Infect Dis, Chicago, v.31, p.1155-63, 2000.
- YANG, G.Y., LIAO, J., KIM, K. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. Carcinogenesis, New York, v.19, n°4, p.611–616, 1998.
- YESILADA, E., TAKAISHI, Y. A saponin with antiulcerogenic effect from the flowers of *Spartium junceum*. Phytochemistry, Oxford, v.51, p.903-908, 1999.
- YOKOZAWA, T; FUJIOKA, K; OURA, H; NONAKA, G; NISHIOKA, I. Effects of rhubarb tannins on uremic toxins. Nephron, Basel, v.58, n.2, p155-60, 1991.
- ZAVODNIK, L.B. Isoflavone genistein-8-glycoside prevents the oxidative damages in structure and function of rat liver microsomal membranes, Radiats Biol Radioecol, Moskava Nauka, v.43, n.4, p432-8, 2003.
- ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides in *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ed. Florianópolis;UFSC, Porto Alegre: UFRGS, 2002. p.499-554.