

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**

Daniela Beraldo Barbosa

Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

UBERLÂNDIA-MG

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**

Daniela Beraldo Barbosa

**Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética)**

**UBERLÂNDIA-MG**

**2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

B238a Barbosa, Daniela Beraldo, 1981-

Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) / Daniela Beraldo Barbosa. - 2008.

64 f. : il.

Orientador: Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Genética e  
Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Cajuí - Teses. I. Brandeburgo,  
Malcon Antônio Manfredi. II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU:

633.88

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de  
*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**

Daniela Beraldo Barbosa

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

**Examinadores:**

\_\_\_\_\_  
Dra. Danielle Palma de Oliveira

\_\_\_\_\_  
Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

**Data da Defesa: 28 / 02 / 2008**

**As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas**

## DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles que fizeram parte da construção, realização e conclusão deste trabalho. Estes foram os mesmos que fizeram de mim um ser humano melhor pessoal e profissionalmente.

“Não se pode alcançar um novo objetivo pela aplicação do mesmo nível de pensamento que o levou ao ponto em que se encontra hoje”

(Albert Einstein)

## Tocando em Frente – Almir Sater

Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei  
Ou nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs,  
O sabor das massas e das maçãs,  
É preciso amor pra poder pulsar,  
É preciso paz pra poder sorrir,  
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
Compreender a marcha e ir tocando em frente  
Como um velho boiadeiro levando a boiada  
Eu vou tocando dias pela longa estrada eu vou  
Estrada eu sou

Conhecer as manhas e as manhãs,  
O sabor das massas e das maçãs,  
É preciso amor pra poder pulsar,  
É preciso paz pra poder sorrir,  
É preciso a chuva para florir

Todo mundo ama um dia todo mundo chora,  
Um dia a gente chega, no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz

Conhecer as manhas e as manhãs  
O sabor das massas e das maçãs  
É preciso amor pra poder pulsar,  
É preciso paz pra poder sorrir,  
É preciso a chuva para florir

Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso porque já chorei demais  
Cada um de nós compõe a sua história,  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz

## AGRADECIMENTOS

“A carreira profissional, os títulos acadêmicos e o dinheiro só terão valor se houver harmonia na família, afinidade entre os amigos, serenidade no amor e paz de espírito”. (Daniela Beraldo Barbosa)

- ☞ À Deus, por me deixar fazer escolhas e por me ensinar que todas elas têm uma consequência.
- ☞ Ao meu pai, Ismael, por acreditar em meu trabalho e principalmente em meu potencial como profissional, como filha, como mulher e como ser humano. Obrigada por ser um dos meus portos-seguros e por confiar em mim.
- ☞ À minha mamãezinha, Lucila. Você é o motor que move não só a minha, mas a vida de muitas pessoas. Vencer, superar e amar são verbos conjugados em silêncio por essa mulher tão forte. Obrigada por ter orgulho de mim e por nunca me ensinar a desistir.
- ☞ À minha - manhosa - irmãzita, Fernanda (Nanda). Obrigada por ser paciente, compreensiva e por perguntar inúmeras vezes “e aí, irmã, como tá suas ‘coisas’?”. Obrigada por estar ao meu lado, por me amar incondicionalmente e por aceitar o meu modo de ser e de amar.
- ☞ Ao meu irmão Adriano e toda sua família. Mesmo longe, obrigada por me acompanharem e por fazerem parte da minha vida.
- ☞ À Camila. Você é uma das responsáveis por tornar este trabalho realidade. Obrigada por me encaminhar às pessoas certas, por me

acolher em sua casa por várias vezes e durante longos dias; por me levar no “Silvão” e no “Quinta Esquina”. Obrigada por fazer parte da minha vida, por me ensinar, me ouvir, discordar e “filosofar” comigo. Você é um ser humano puro e dono de um coração enorme. Muito Obrigada!

☞ À Aline e à Brenda, amigas de infância, sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Agradeço por estarem comigo em mais esta conquista e, principalmente por fazerem a diferença quando meus “castelos de areia desabavam”.

☞ À Patrícia e Marcela. Meninas, eu consegui! Obrigada pelas horas de “fofoca” no shopping, por me incentivarem a não desanimar, por reforçarem que “é assim mesmo”, “vai dar certo”; por se interessarem pelo meu trabalho e por fazerem parte de momentos bons e das conquistas da minha vida.

☞ Ao Rafael Cezar (Rafa). Apesar do “abuso” da intimidade e da “chatice”, eu sou “obrigada” a agradecer por você nunca dizer não pra mim, por sempre me acompanhar na coletas, por cuidar do laboratório enquanto eu fazia o meu trabalho, e, principalmente por cuidar de mim. Eu tenho a maior consideração pela nossa amizade e te desejo muito sucesso.

☞ Às pessoas que fazem parte da minha vida pessoal e que estiveram comigo de alguma maneira durante estes dois anos de mestrado: Adriela, Cynara, Flávio, Hexaner, Wilton.

☞ Aos companheiros de jornada, o pessoal dos Laboratórios de Genética e Bioquímica do INGEb: Flávia, Carlos Ueira, Renata Santos, Johara, Luiz Henrique, Boscolli, Renato, Isabel, Luciana Londe, Alexandre, Fausto, Fabiana. Cada um de vocês me ajudou

de alguma maneira, fazendo com que eu amadurecesse e aprendesse.

☞ À professora Danielle Palma Oliveira, responsável pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em Ribeirão Preto, por ceder o laboratório para a realização do Teste de Ames. Agradeço não apenas pela concessão do espaço físico, mas por me mostrar que é possível fazer pesquisa de qualidade em um pequeno espaço e com quantidade limitada de reagentes e vidrarias. Você é um exemplo de jovem pesquisadora, que mostra gosto pelo que faz. Isto é um incentivo para que eu continue buscando meios para atingir meu objetivo, andando por este caminho tão incerto e difícil. Agradeço ainda por me colocar em contato com as pessoas que ajudaram nos testes antioxidantes.

☞ À Farah e Elisa, de Ribeirão Preto, por me acolherem de um modo tão simpático no laboratório, e pelos papos e almoços no “bandejão”. À Elisa, em especial, por me ensinar e acompanhar o Teste de Ames, sempre simples e prestativa com as minhas aflições “experimentais”. Sucesso e sorte pra vocês, meninas, vocês estão no caminho certo e chegarão longe!

☞ Ao Laboratório de Bioquímica do professor Carlos Curti na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-Ribeirão Preto, local onde foram realizados os testes antioxidantes.

☞ Ao Daniel e ao Cezar. Daniel, por me ensinar e acompanhar os primeiros testes antioxidantes e pela paciência com meus e-mails. Cezar, pela prestatividade em repetir os experimentos, por emprestar a Tese de Doutorado que me ajudou a escrever, e,

principalmente, pela ajuda com as análises estatísticas e a confecção dos gráficos. Valeu demais!

- ☞ Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica, pelos conhecimentos acadêmicos, técnicos e científicos aprendidos durante as disciplinas.
- ☞ À coordenação, secretarias e técnicos administrativos da Pós Graduação e do Instituto de Genética e Bioquímica.
- ☞ Ao professor Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo, por ter aceitado me orientar como aluna de mestrado.
- ☞ Ao Laboratório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela concessão das cepas de bactérias.
- ☞ À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Apresentação</b>                                                                                                                                                                               | <b>1</b>  |
| <b>Capítulo 1: Fundamentação Teórica</b>                                                                                                                                                          | <b>4</b>  |
| 1. Plantas Medicinais                                                                                                                                                                             | 5         |
| 2. Metabólitos Secundários                                                                                                                                                                        | 7         |
| 3. Antimicrobianos                                                                                                                                                                                | 9         |
| 4. Antioxidantes                                                                                                                                                                                  | 11        |
| 5. Mutagenicidade                                                                                                                                                                                 | 16        |
| 6. Referências Bibliográficas                                                                                                                                                                     | 20        |
| <b>Capítulo 2: Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de <i>Anacardium humile</i> St. Hill (Anacardiaceae)</b> | <b>29</b> |
| Resumo                                                                                                                                                                                            | 30        |
| Abstract                                                                                                                                                                                          | 31        |
| 1. Introdução                                                                                                                                                                                     | 32        |
| 2. Materiais e Métodos                                                                                                                                                                            | 33        |
| 2.1. Material Vegetal                                                                                                                                                                             | 33        |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2. Extração                                                                     | 35 |
| 2.3. Atividade Antimicrobiana                                                     | 35 |
| 2.4. Atividade Antioxidante                                                       | 36 |
| 2.4.1. Preparação das amostras                                                    | 36 |
| 2.4.2. Atividade doadora de íons hidrogênio ao DPPH°                              | 36 |
| 2.4.3. Atividade quelante do íon ferro                                            | 37 |
| 2.4.4. Atividade seqüestradora do radical OH° utilizando o ensaio da desoxiribose | 37 |
| 2.4.5. Análise Estatística                                                        | 38 |
| 2.5. Teste de Ames                                                                | 38 |
| 3. Resultados                                                                     | 40 |
| 3.1. Atividade Antimicrobiana                                                     | 40 |
| 3.2. Atividade Antioxidante                                                       | 40 |
| 3.2.1. Atividade doadora de íons hidrogênio ao DPPH°                              | 40 |
| 3.2.2. Atividade quelante do íon ferro                                            | 42 |
| 3.2.3. Atividade seqüestradora do radical OH° utilizando o ensaio da desoxiribose | 43 |
| 3.3. Teste de Ames                                                                | 44 |

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| 4. Discussão e Conclusões     | 46        |
| 5. Referências Bibliográficas | 53        |
| <b>Anexos</b>                 | <b>58</b> |

## Lista de Figuras

### Lista de Figuras do Capítulo 1:

|          |                                                                                                                       |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (cajuzinho-do-cerrado, cajuí)                                                      | 6  |
| Figura 2 | Produtos do Metabolismo Secundário das Plantas                                                                        | 9  |
| Figura 3 | Redução tetravalente do oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ) na mitocôndria até a formação de H <sub>2</sub> O        | 12 |
| Figura 4 | Mecanismos de ataque de EROs, partindo da redução monoelétrica de O <sub>2</sub> e os sistemas de defesa antioxidante | 14 |
| Figura 5 | Esquema do Teste de Ames                                                                                              | 18 |

### Lista de Figuras do Capítulo 2:

|          |                                                                                                                                             |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Local de coleta de <i>Anacardium humile</i>                                                                                                 | 34 |
| Figura 2 | Atividade de redução do radical DPPH <sup>•</sup> pelo AqAh com equivalente de Trolox (TEAC)                                                | 42 |
| Figura 3 | Atividade quelante de íon ferro pelo AqAh                                                                                                   | 43 |
| Figura 4 | Efeito inibitório da formação de MDA pelo AqAh no dano oxidativo utilizando o ensaio da desoxiribose                                        | 44 |
| Figura 5 | Curva dose-resposta do Teste de <i>Salmonella</i> /microsoma (Teste de Ames) com AqAh na ausência do sistema de metabolização exógena (-S9) | 46 |

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Anacardium humile* sobre bactérias e fungos em meio sólido. Média dos halos de inibição (cm) 40
- Tabela 2 Mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* (AqAh) testado com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na ausência do fator de metabolização (-S9) 45

## Lista de Abreviaturas

|                              |                                                                         |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| µg                           | micrograma                                                              |
| µL                           | microlitro                                                              |
| µM                           | micromolar                                                              |
| 4-NQO                        | 4-nitroquinolina-1-óxido                                                |
| Amp                          | ampicilina                                                              |
| AqAh                         | extrato aquoso das folhas de <i>Anacardium humile</i>                   |
| ATCC                         | American Type Culture Collection                                        |
| BHI                          | Brain Head Infusion                                                     |
| BPS                          | batofenantrolina                                                        |
| Clo                          | clorafenicol                                                            |
| DMSO                         | dimetilsulfóxido                                                        |
| DNA                          | ácido desoxiribonucléico                                                |
| DPPH <sup>•</sup>            | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila                                          |
| EDTA                         | ácido etilenodiamino tetra-acético                                      |
| EROs                         | espécies reativas de oxigênio                                           |
| GSH                          | glutathiona reduzida                                                    |
| GSH-Px                       | glutathiona peroxidase                                                  |
| GSH-Rd                       | glutathiona redutase                                                    |
| HEPES                        | ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina - 1                     |
| HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> | radical hidroperoxila                                                   |
| HUFU                         | Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia |
| MDA                          | malonaldeído                                                            |
| mg                           | miligrama                                                               |
| MG                           | Minas Gerais                                                            |
| mL                           | mililitro                                                               |
| MM                           | Massa Molecular                                                         |
| mM                           | milimolar                                                               |
| nm                           | nanômetro                                                               |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>  | oxigênio singleto                                                       |
| OH <sup>•</sup>              | radical hidroxila                                                       |

|      |                                              |
|------|----------------------------------------------|
| OMS  | Organização Mundial de Saúde                 |
| pH   | potencial hidrogeniônico                     |
| RM   | Razão de Mutagenicidade                      |
| S9   | sistema de metabolização exógena             |
| SOD  | superóxido dismutase                         |
| TBA  | ácido tiobarbitúrico                         |
| TEAC | Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox |
| UV   | ultravioleta                                 |

# Apresentação

As plantas produzem compostos provenientes do metabolismo secundário cuja função é proteção contra herbivoria e ataque de patógenos, além de beneficiá-las na competição com outros vegetais. Além disso, os metabólitos secundários também protegem o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, exposição à luz ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais.

O uso de plantas pelo homem vem desde a antiguidade; enquanto buscava alimentação para sua sobrevivência, a humanidade foi descobrindo as propriedades curativas e tóxicas das plantas. A descoberta dos componentes secundários tornou possível o uso dos vegetais como fonte de princípios ativos para uma infinidade de patologias que acometem o homem. Medicamentos de grande importância na terapêutica atual são provenientes de plantas, como o ácido salicílico, a atropina, a morfina e outros.

São muitas as espécies utilizadas como planta medicinal e o conhecimento popular dos usos terapêuticos é a primeira fonte de informação para que seja feita uma investigação científica acerca das propriedades medicinais de um vegetal. Mas apesar das ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar componentes com esta mesma atividade.

O Cerrado é um tipo fitofisionômico de vegetação, e está localizado basicamente no Planalto Central do Brasil, classificado como o segundo maior bioma do país. Existem várias espécies nativas do Cerrado que são utilizadas pelo homem com fins terapêuticos, porém, o uso ainda é regional e há carência de conhecimento científico acerca das plantas benéficas à saúde humana.

Dentre as espécies utilizadas, encontra-se o cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* St. Hill.) que, além de muito popular na alimentação, é também utilizado como cauterizante, expectorante, anti-sifílico, para diarreia, glicemia e outros. São poucas as informações contidas na literatura sobre esta espécie e, diante disso, este trabalho testou atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante) e fez uma análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile*.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas da Pós Graduação em Genética e Bioquímica (anexos, página 62). A dissertação foi

dividida em: Capítulo 1 - Fundamentação Teórica; um levantamento bibliográfico acerca dos assuntos gerais que nortearam o trabalho; e Capítulo 2 - Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae); artigo escrito segundo as normas de uma revista científica, para posterior submissão.

# Capítulo 1

## Fundamentação Teórica

## 1. Plantas Medicinais

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento usam quase que exclusivamente a medicina tradicional, sendo as plantas o componente principal deste uso (FARNSWORTH, 1994). São cerca de 3,3 milhões de pessoas utilizando mais de 9.000 espécies de plantas, entre monocotiledôneas, dicotiledôneas, briófitas, pteridófitas e líquens (FARNSWORTH & SOERJATO, 1991).

Várias pesquisas são feitas sobre as propriedades farmacológicas das plantas usadas na medicina popular, demonstradas por meio de análises químicas e atividades biológicas. No entanto, apesar de bastante promissor, este campo ainda ressenete-se da falta de estudos (ALMEIDA et al., 1998).

O Cerrado está localizado basicamente no Planalto Central do Brasil e é o segundo maior bioma do país, superado apenas pela Floresta Amazônica. Caracteriza-se por possuir uma vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre na formação savânica (RIBEIRO & WALTER, 1998). Apesar de toda potencialidade de uso de sua biodiversidade, é uma das áreas do mundo mais críticas de conservação, devido à riqueza biológica e pressão antrópica (BIODIVERSIDADE, 2002).

O uso das espécies nativas pode ser uma alternativa econômica para o aproveitamento sustentado da região. Várias são as espécies que possuem utilização regional e muitas delas enquadram-se em mais de um tipo. Entretanto, o usuário ainda é a população regional cuja atividade é essencialmente extrativista (RIBEIRO et al., 1994).

Dentre as plantas nativas do cerrado, encontra-se *Anacardium humile* St. Hill., conhecida como cajuí, cajuzinho-do-cerrado ou caju-do-campo. Distribui-se pela Bahia, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás, Minas Gerais. É um subarbusto que chega até 80 cm, possui folhas alternas, simples, pecioladas a subsesséis e sem estípulas. Fruto verdadeiro noz, acinzentado, brilhante; semente única; pseudofruto (pedúnculo desenvolvido) vermelho, claviforme; polpa alva, succulenta (Figura 1) (ALMEIDA et al., 1998).

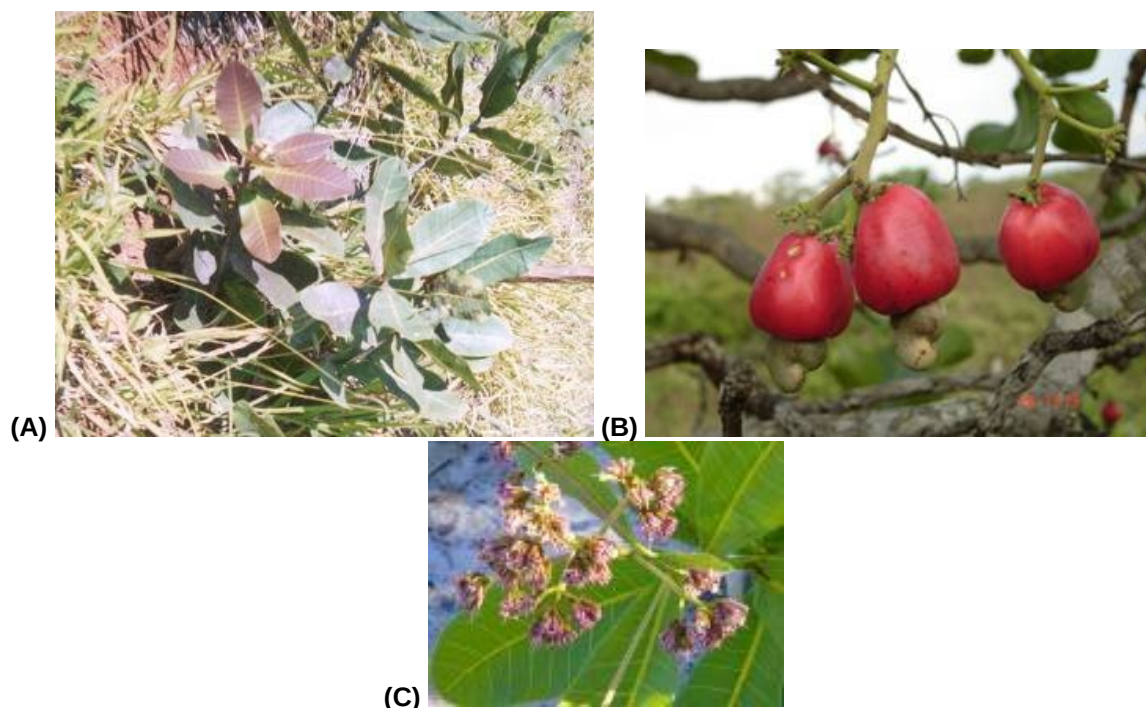


**Figura 1 – *Anacardium humile* St. Hill. (cajuzinho-do-cerrado, cajuí) (A) Folhas; (B) Frutos; (C) Flores (fonte: <http://images.google.com.br>)**

Assim como a grande maioria das espécies do cerrado, *Anacardium humile* tem importância biológica e socioeconômica. Os interesses antagônicos aumentam a necessidade de gerar informações biológicas, na tentativa de adequar a exploração econômica, de modo que não haja utilização predatória ou, até mesmo, a extinção da espécie (LONDE, 2005).

A utilização popular do cajuí abrange praticamente todas as partes da planta. O óleo do pericarpo do fruto verdadeiro (castanha) é vesicante e usado como cautério para afecções da pele. A infusão tanto de suas folhas como da casca do caule subterrâneo (xilopódio) é indicada contra diarreia e como expectorante. O suco do pseudofruto é referido como anti-sifilitico. A infusão das inflorescências é empregada contra tosse e também para glicemia em diabéticos (ALMEIDA et al., 1998; CAJUZINHO-DO-CERRADO - WIKIPEDIA, 2007).

Além dos usos populares medicinais, o uso alimentar também é muito difundido. O pseudofruto apresenta sabor ácido, consumido *in natura* ou mesmo sob a forma de sucos, doces, geléias, sorvetes e compotas. Com a fermentação da polpa, obtém-se uma espécie de vinho ou aguardente. A amêndoa também é

comestível, sendo consumida torrada (ALMEIDA et al., 1998; PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 2007).

A literatura traz poucas referências de estudos de atividades biológicas com *A. humile*, restringindo-se ainda a estudos de germinação (CARVALHO et al., 2005) divergência genética entre populações (LONDE, 2005), atividades inseticidas (PORTAL UNIDERP, 2007).

Investigações fitoquímicas feitas por FERREIRA (2005) levaram ao isolamento de compostos do metabolismo secundário de *A. humile*. Entre eles estão derivados do ácido gálico, catequinas e flavonóides. Neste mesmo estudo o autor constatou que o extrato metanólico das folhas de cajuí foi capaz de inibir significativamente a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos Swiss, atribuindo esta atividade protetora à presença dos componentes encontrados.

## **2. Metabólitos Secundários**

Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, e, diferente dos produtos do metabolismo primário, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presentes em todos eles. Caracterizam-se por apresentarem baixo peso molecular e possuírem características químicas variadas e às vezes complexas (PERES, 2007; ALVES, 2001).

A produção destes componentes tem como função proteger a planta da herbivoria, do ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de dispersores de semente, bem como microorganismos simbiontes. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, exposição à luz ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2007; ALVES, 2001).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários (Figura 2): compostos fenólicos, terpenos e alcalóides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no

cloroplasto). Os alcalóides (também conhecidos como produtos secundários nitrogenados) são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonóides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenóides e a maioria dos hormônios vegetais são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcalóides. As aplicações e uso pelo homem dos componentes do metabolismo secundário das plantas são variados, sendo utilizados principalmente na alimentação, na indústria e na medicina (PERES, 2007; ALVES, 2001).

A combinação da alimentação com a prevenção de doenças busca os chamados alimentos funcionais. Parte considerável das substâncias de origem vegetal que previnem doenças são antioxidantes, e os mais comuns são carotenóides e flavonóides, presentes em frutas e vegetais. Outro exemplo são as alicinas, presentes no alho e os glucosinatos, encontrados em vegetais crucíferos (GRUSAK & DELLAPENNA, 1999; MORAES & COLLA, 2006).

Um dos mais antigos usos industriais dos componentes secundários é a utilização do tanino para curtir couros e os corantes naturais. A capacidade destes compostos em se complexarem com proteínas deixa o couro mais resistente ao calor, à água e micróbios. As espécies *Schinopsis* spp e *Acacia mearnsii* são as mais utilizadas como fontes de taninos. As antraquinonas extraídas de *Rubia tinctorum* e do pau brasil (*Caesalpinia echinata*), bem como flavonóides (principalmente a quercetina) provenientes de *Roseda luteola*, *Genista tinctoria* e *Solidago* spp. são exemplos de substâncias utilizadas como corantes naturais (PERES, 2007).

Os vários compostos provenientes do metabolismo das plantas interessam ao homem principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico. Muitos desses componentes quando utilizados em doses adequadas convertem-se em medicamentos. Desse modo, produtos secundários envolvidos na defesa através de atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes antimicrobianos. Além disso, aqueles envolvidos no combate a herbivoria através da atividade neurotóxica, podem ter efeitos benéficos ao homem, atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (BRISKIN, 2000).

Espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas. Os gêneros *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacam-se pelo número de investigações biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e, principalmente, dos lipídeos fenólicos e derivados. (CORREIA et al., 2006).

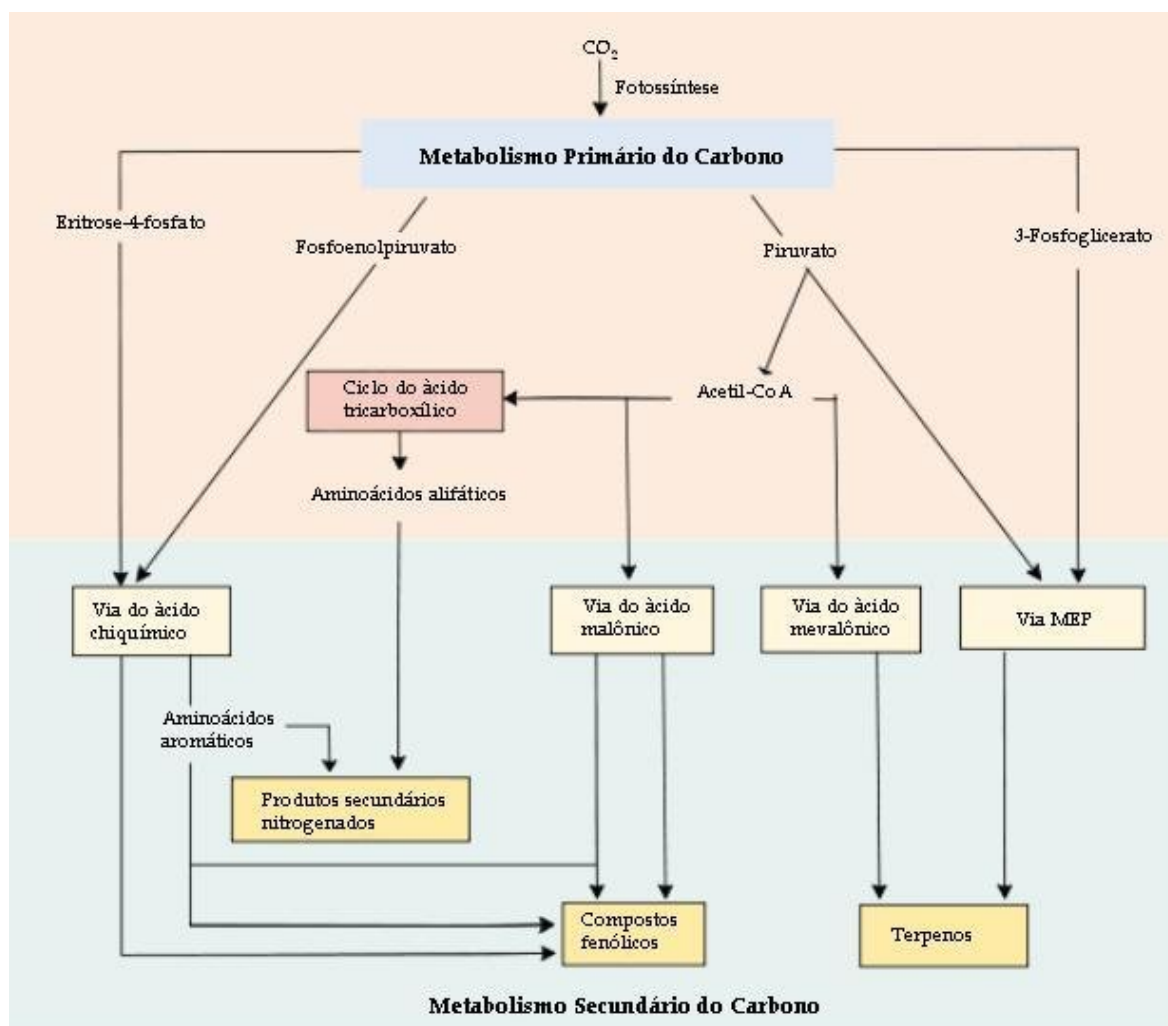


Figura 2 – Produtos do Metabolismo Secundário das Plantas (fonte: modificado de <http://images.google.com.br>)

### 3. Antimicrobianos

Substâncias antimicrobianas ou antibióticas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos

vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, e, além de prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes devem apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química, entre outras características (COWAN, 1999).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais. (WILLIAMS, 2001).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Em amplo estudo sobre plantas medicinais foi feita uma avaliação concreta sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e espécies fúngicas (LIMA, 2001).

Existe uma tendência mundial quanto ao uso de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos (SOUZA et al., 2005), no tratamento de sementes (COUTINHO et al., 1999), no combate a microorganismos causadores de doenças de pele (WECKESSER, 2006; CRUZ et al., 2007), de úlcera gástrica (STEGE, 2006) entre outras doenças (SRINIVASAN, 2001; PESSINI, 2003). Um dos principais interesses, no entanto, é o uso de antimicrobianos naturais no combate a microorganismos resistentes (ARIAS, et al., 2004; NASCIMENTO, 2000).

Estudos com diversas espécies da família Anacardiaceae exemplificam e comprovam o uso da medicina tradicional no combate a doenças causadas por microorganismos (ELOFF, 2001; OZÇELIK, 2005; LOGUERCIO, 2005; ERAZO et al., 2006). A espécie *Anacardium occidentale*, conhecida como caju verdadeiro, é bastante estudada e o potencial antimicrobiano da casca da árvore é relatado em diversos trabalhos (HIMEJINA & KUBO, 1991; KUDI et al., 1999; AKINPELU, 2001).

O extrato aquoso do caule e folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi, conhecida popularmente por aroeira, mostrou-se positivo na inibição do

crescimento de microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (LIMA et al., 2004).

Atribui-se a flavonóides e taninos a capacidade de inibir o crescimento ou provocar a morte de microorganismos. Os flavonóides podem inibir importantes enzimas virais como transcriptase reversa e proteases, bem como destruir alguns protozoários patogênicos, sendo essas atividades de baixa toxicidade em células animais (HAVSTEEN, 2002).

Os taninos condensados são os componentes que possuem a maior toxicidade em relação aos microorganismos e são diversos os mecanismos de toxicidade: inibição de enzimas extracelulares, privação de substratos, comprometimento do metabolismo – como ação sobre a membrana celular (SCALBERT, 1991).

#### **4. Antioxidantes**

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos e geradas naturalmente nos organismos pelo processo metabólico normal. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$  (Figura 3). Durante esse processo, são formados intermediários reativos, sob a forma de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Além da geração normal de radicais livres, situações não-fisiológicas (como exposição da célula a xenobióticos) podem também levar à formação de EROs (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos e do colesterol, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que, por sua vez, podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado de tal processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. Os hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica têm vida curta e, quando reagem

com metais formam aldeídos (malonaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os quais são reativos e causam novos danos ao DNA (SOUSA et al., 2007).

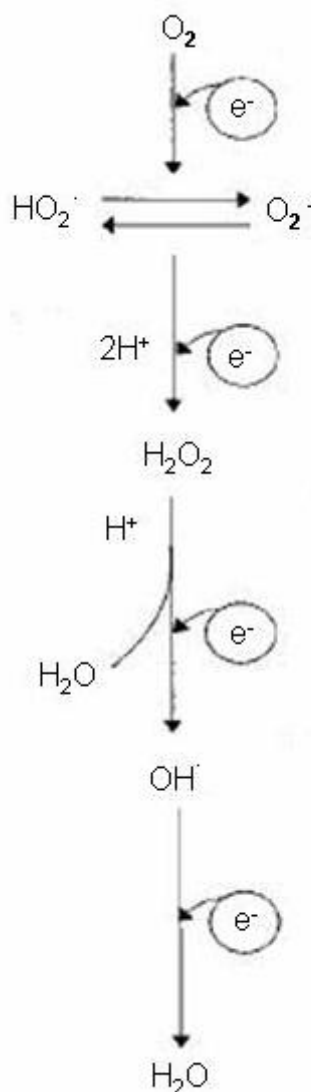


**Figura 3 – Redução tetraivalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de  $H_2O$ . Várias espécies reativas são formadas no processo. (fonte: modificado de FERREIRA & MATSUBARA, 1997).**

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante (Figura 4). A célula possui um sistema de defesa que atua em duas linhas: (1) ação detoxificativa do agente antes que ele cause lesão - sistema constituído pelas enzimas glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e também pela vitamina E; e (2) reparo da lesão ocorrida - constituída pelo ácido

ascórbico, glutathione-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo pode ocorrer na vida moderna como resultado da exposição excessiva ao sol (radiação UV), aumento da poluição do ar, fumo, estresse, dentre outros fatores. É um evento causado pela deficiência do sistema protetor e/ou pelo excesso de agentes oxidantes e apresenta efeitos prejudiciais ao funcionamento das células, tais como agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, prejuízo às enzimas, danos ao DNA. Desta forma, está relacionado a várias patologias, como artrite, câncer, doenças do coração e do pulmão, demência senil, esclerose múltipla entre outras. O envelhecimento também é um evento relacionado com as espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL et al., 1992; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VICEDO & CORREAS, 1997).

Antioxidantes são agentes que retardam ou previnem as lesões causadas pelos radicais livres nas células e são de interesse pela indústria alimentícia por prevenirem a rancidez, ou seja, a oxidação dos alimentos (BIANCHI & ANTUNES, 1999; HALLIWELL et al., 1995). Para HALLIWELL (1997) antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”.

Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia que seria prejudicial à célula; eles são neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário. Atribui-se à presença de compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides, a atividade antioxidante dos componentes produzidos pelos vegetais. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; HALLIWELL et al., 1995).

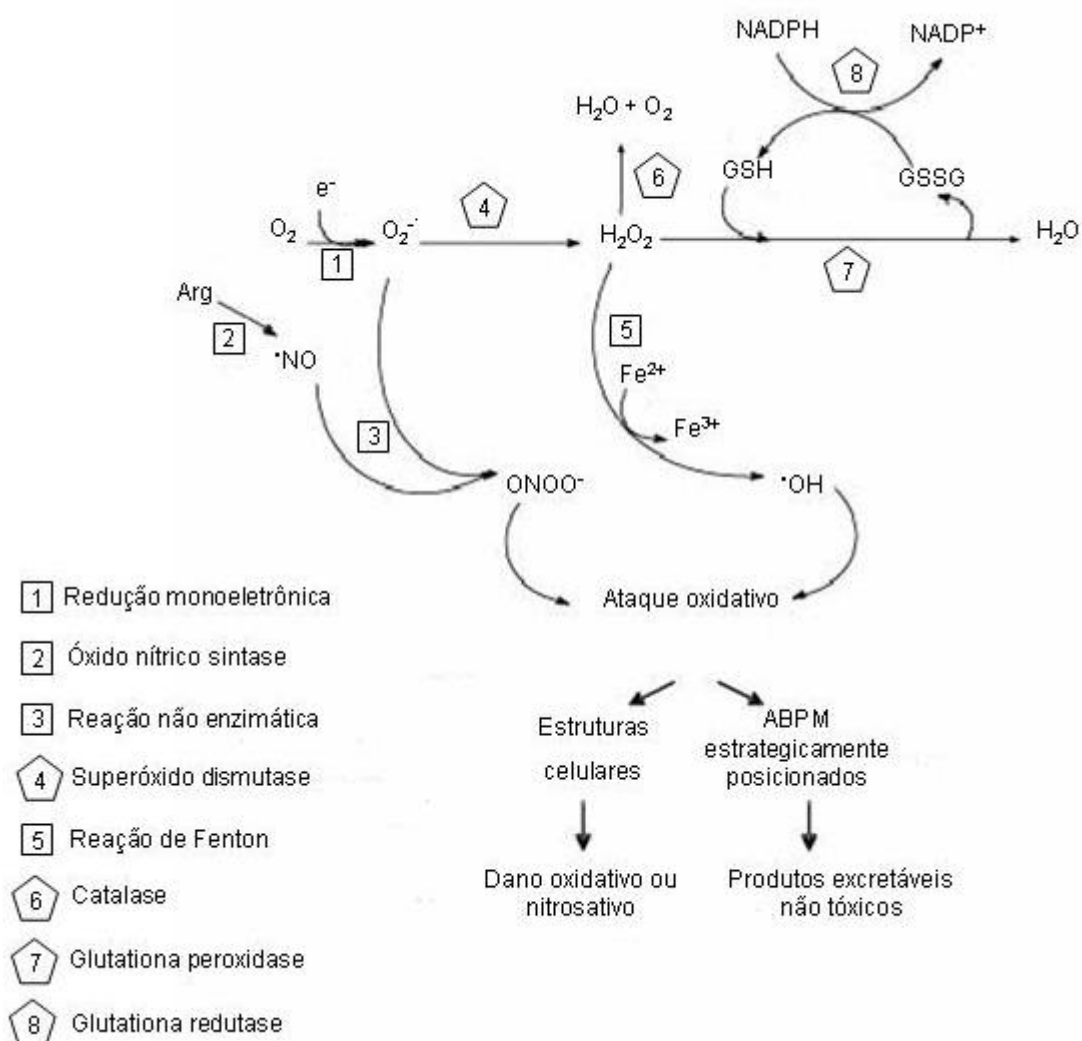


**Figura 4 - Mecanismos de ataque de EROs, partindo da redução monoeletrônica de  $O_2$  e os sistemas de defesa antioxidante. O símbolo  $\square$  refere-se a mecanismos de produção de EROs, e o símbolo  $\diamond$ , às principais enzimas de defesa antioxidante. (fonte: modificado de <http://images.google.com.br>)**

O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário. Atribui-se à presença de compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides, a atividade antioxidante dos componentes produzidos pelos vegetais. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; HALLIWELL et al., 1995).

Experimentos simples podem ser realizados para examinar diretamente a habilidade antioxidante *in vitro* e para testar possível efeito pró-oxidante em diferentes alvos moleculares. Um dos métodos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - o DPPH°. Este teste permite determinar a porcentagem de atividade antioxidante - que corresponde à quantidade de DPPH° consumida pelo antioxidante - ou a atividade sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH° remanescente no meio reacional (SOUSA et al., 2007).

Outro método *in vitro* também utilizado para avaliar atividade antioxidante é o ensaio da desoxirribose. Este açúcar é degradado quando exposto ao radical hidroxil, gerado por uma mistura que contenha  $\text{Fe}^{3+}$ , ascorbato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de uma pequena quantidade de EDTA. Se a mistura resultante for aquecida em condições ácidas, forma-se malonaldeído (MDA), que pode ser detectado por sua habilidade em reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo róseo. Qualquer composto adicionado na mistura reacional capaz de reagir com  $\text{OH}^\bullet$  poderá competir com a deoxirribose por este radical, diminuindo assim a degradação deste açúcar e a formação de MDA. Este método mede a combinação de dois fatores: habilidade em remover íons ferro da desoxirribose e habilidade em tornar tais íons inativos ou pobremente ativos na geração de  $\text{OH}^\bullet$  (HALLIWELL et al., 1987).

O método da atividade quelante de ferro é também muito utilizado para examinar potencial antioxidante. Este experimento avalia a inibição da geração de  $\text{OH}^\bullet$  pela ligação com o metal de transição Fe. Isto pode ocorrer por dois mecanismos: a ligação do antioxidante com íons metal pode alterar seu potencial de oxirredução e/ou a capacidade deste metal em participar da formação do radical  $\text{OH}^\bullet$ . Outra possibilidade é que tal ligação não impediria as reações de oxirredução, mas sim direcionaria essas reações para o antioxidante, poupando o alvo mais importante (ARUOMA et al., 1987; GUTTERIDGE, 1984).

Portanto, a atividade antioxidante pode e deve ser avaliada com diferentes testes envolvendo diferentes mecanismos. A maioria dos métodos químicos utilizados são baseados na habilidade de seqüestrar diferentes radicais livres,

mas também a habilidade de absorver UV e de quelar íons metais de transição podem ser utilizados (MOURE et al., 2001).

Vários trabalhos com plantas da família Anacardiaceae utilizaram métodos *in vitro* para testar atividade antioxidante. KUBO et al. (2006), utilizou o método do DPPH<sup>\*</sup> e o ensaio da xantina-oxidase para testar a capacidade dos ácidos anacárdicos em proteger as células das EROs. O extrato etanólico de *Rhus verniciflua* mostrou altas porcentagens de atividade antioxidante com o uso dos testes DPPH e ensaio da deoxiribose (LIM et al., 2001).

A casca da raiz de *Lannea velutina* foi extraída com diversos solventes e a atividade antioxidante foi testada. Para o ensaio do DPPH<sup>\*</sup>, os autores observaram uma melhor atividade do extrato metanólico, com valores de 90% de atividade antioxidante (MAIGA et al., 2006).

## 5. Mutagenicidade

Os organismos vivos estão freqüentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas tanto em nível celular quanto molecular. Estas lesões podem ser provocadas por agentes químicos, físicos ou biológicos que são prejudiciais às células, uma vez que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica. As alterações podem também causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômeno esse que pode levar ao desenvolvimento de câncer e a morte celular (COSTA & MENK, 2000).

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura ou função (WEISBURGER, 1999). Quando esses danos são transmitidos à descendência diz-se que ocorreu uma mutação (SANTELLI, 2003). As mutações fornecem a variação genética na qual a seleção da evolução opera (GRIFFITHS et. al, 2001).

As fontes de exposição a mutágenos podem ser de vários tipos: (1) endógenos - óxido nítrico, radicais livres de oxigênio; (2) provenientes da dieta - mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos, ou presentes na dieta; (3) radiação - exposição aos raios-X para diagnóstico e radioterapia; (4) poluição -

efluentes industriais, pesticidas, incineração do lixo (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

A utilização de ensaios biológicos para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos químicos isolados têm sido freqüentemente incorporada à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN et al., 2003). O desenvolvimento dos testes de citotoxicidade *in vitro* e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como *Food and Drug Administration* (FDA), em 1993, e *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), em 1987, têm favorecido a substituição dos ensaios que utilizam animais em laboratórios (HUGGET et al., 1996).

De acordo com SILVA et al. (2003), a maioria dos biotestes busca agentes que possam afetar os níveis fisiológico e molecular do organismo exposto e devido à universalidade do código genético, se o agente causar danos ao DNA, ele têm potencial genotóxico em qualquer tipo de células (animal, vegetal ou de microrganismos).

Um número de testes de curta-duração está disponível para a avaliação do perigo genético. Esses modelos são freqüentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação íntima desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, como os mecanismos conhecidos de ativação de protooncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

O teste *Salmonella* / microssoma, também chamado de teste de Ames, é uma das metodologias utilizadas para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas puras e misturas complexas (HENRIQUES et al., 1987). Este teste é realizado *in vitro* e utiliza células procarióticas, as quais diferem das células de mamíferos em fatores como permeabilidade, metabolismo, estrutura dos cromossomos e processo de reparo do DNA. (RABELO-GAY et al., 1991).

O método emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA.

Essas linhagens não são capazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Suspensões de células bacterianas são expostas à amostra-teste, na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno, e plaqueadas em meio de cultura mínimo. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada (Figura 5) (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

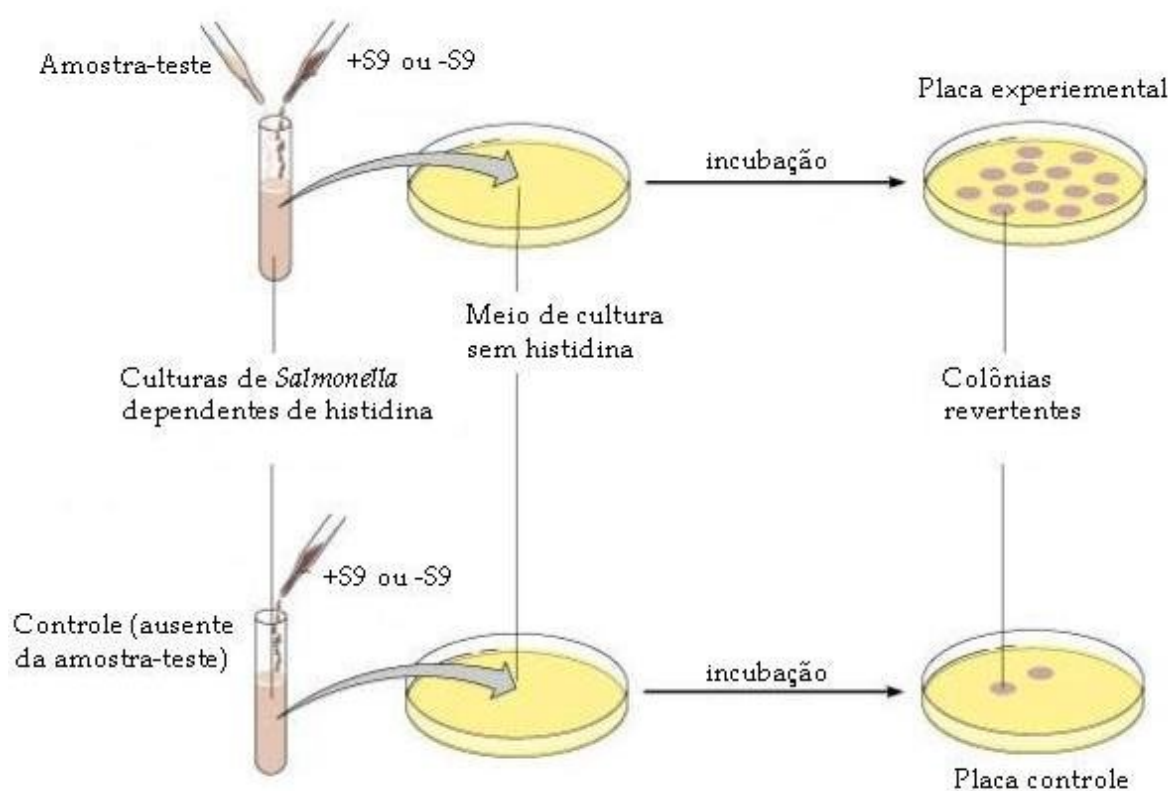


**Figura 5 – Esquema do Teste de Ames. +S9 e -S9 significam presença e ausência do sistema de ativação metabólica, respectivamente. (fonte: modificado de Copyright © 2004 Pearson Education Inc., publishing as Benjamin Cummings)**

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar metabólitos com esta mesma atividade. Seus efeitos fisiológicos, genotóxicos e mutagênicos no organismo humano necessitam de maiores investigações (NUNES & ARAÚJO, 2003). Os estudos de genotoxicidade

e anti-genotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse em comprovar sua eficácia nas mais diversas finalidades farmacológicas (JIMÉNEZ et al., 2005).

Muitas plantas utilizadas por grande número de pessoas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, também estar causando alterações no DNA. Um exemplo é o extrato hidroalcoólico de *Ocotea duckei*, planta encontrada no nordeste brasileiro e utilizada como antialérgico, que se mostrou indutor de mutagenicidade (MARQUES et al., 2003).

VARANDA et al. (2002), verificaram que extratos de *Brosimum gaudichaudii* apresentaram efeitos genotóxicos, utilizando o teste de Ames e culturas de células CHO. FERREIRA & VARGAS (1999) verificaram que os extratos de algumas plantas usadas na medicina popular do sul do Brasil apresentaram atividade mutagênica. Nesses extratos foram encontrados flavonóides, taninos e antraquinonas.

## 6. Referências Bibliográficas

AKINPELU, D. A., 2001. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapia, 72, 286-287.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. RIBEIRO, J. F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina, EMBRAPA – CPAC, p. 464.

ALVES, H. M., 2001. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, 3, 10-15.

ARIAS, M. E.; GOMEZ, J. D.; CUDMANI, N. M.; VATTUONE, M. A. ISLA, M. I., 2004. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill ex Hook et Arn. Life Science, 75 (2), 191-202.

ARUOMA, O. I.; GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B., 1987. The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule. Journal of Inorganic Biochemistry, 29, 289-299.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.; 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev. Nutr. Campinas, 12 (2), 123-130.

BIODIVERSIDADE brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros, 2002 Brasília, MMA/SBF, (Biodiversidade, 5), p. 404.

BRISKIN, D. B.; 2000. Plants and Phytomedicines. Linking Plant. Biochemistry and Physiology to Human Health Plant Physiology, 124, 507-514.

CAJUZINHO-DO-CERRADO - WIKIPEDIA. Disponível em:  
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cajuzinho-do-cerrado>> Acessado em 25/07/2007

CANTERLE, L. P., 2005. Erva- mate e atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, p. 99.

CARVALHO, M. P.; SANTANA, D. G.; RANAL, M. A., 2005. Emergência de plântulas de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) avaliada por meio de amostras pequenas. Revista Brasileira de Botânica, 28 (3), 627-633.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., 2006. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. Química Nova, 29 (06), 1287-1300.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M., 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotecnologia: ciência e desenvolvimento 12 (3), 24-26.

COUTINHO, W. M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F. H. L., 1999. Efeitos de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Ciênc. e Agrotec., 23 (3), 560-568.

COWAN, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 2 (4), 564-82.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O. BARBOSA JR., A.M.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C., 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. Journal of Ethnopharmacology, 111, 409-412.

ELLOF, J. N., 2001. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst subsp. *caffra* (Sond) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark end leaves. Journal of Ethnopharmacology, 76, 305-308.

ERAZO, S.; DELPORTE, C.; NEGRETE, R.; GARCÍA, R.; ZALDÍVAR, M.; ITURRA, G.; CABALLERO, E.; LÓPEZ, J. L.; BACKHOUSE, N., 2006. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. Journal of Ethnopharmacology, 107, 395-400.

FARNSWORTH, N. R.; SOERJATO, D. D., 1991. Global importance of medicinal plants. In: Akerele, O.; Heywood, V.; Synge, H.; (Eds), Conservation of Medicinal Plants. Cambridge University Press, Cambridge, 25-51.

FARNSWORTH, N. R., 1994. Ethnopharmacology and drug development. In: Prance, G.T. (ed), Ethnobotany and the Search for New Drugs. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185), 42-59.

FERREIRA, A L., 2005. Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado, Unicamp, p. 127.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil, 43 (1), 61-68.

FERREIRA, I.C.D.F.; VARGAS, V.M.F., 1999. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella* / microsome assay. Phytot. Res., 13 (5), 397-400.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. A. Genética Moderna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 350.

GRUSAK, M. A.; DELLAPENNA, D., 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 133-161.

GUTTERIDGE, J. M. C., 1984. Reactivity of hidroxil and hydroxyl-like radical discriminated by release of thiobarbituric-acid-reactive material from deoxyribose, nucleosides and benzoate. Biochemical Journal, 224, 761-767.

HALLIWELL, B. AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I., 1995. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. London, 33 (7), 601-617.

HALLIWELL, B., 1997. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv. Pharmacol.*, 38, 3-20.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I., 1987. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, New York, 165 (1), 215-219.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E., 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-560.

HAVSTEEN, B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.

HENRIQUES, J.A. P.; VALSA, J.O, GOMES, R.A., 1987. Utilização de testes de microrganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente mutagênicas. In: PINTO, S.O C.(ed) *Genética molecular de microrganismos*. São Paulo, Manole, 330-350.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I., 1991. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 418-421.

HUGGET, A.C.; SCHILTER, B.; ROBERFROID, M.; ANTIGNAC, E.; KOEMAN, J. H., 1996. Comparative methods of toxicity testing. *Food. Chem. Toxic.*, 34, 183-92.

JIMENÉZ, M.R.; SANCHÉZ, J.C.; MOHAMED ANALLA, M.; ANDRÉS MUÑOSSERRANO, A.M.; MORAGA, A.A., 2005. Genotoxicity and anti-

genotoxicity of some traditional medicinal herbs. Mut.Res/Gen. Toxicol. Env. Mut., 585, 147-155.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; TSUJIMOTO, K., 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. Food Chemistry, 99, 555-562.

KUDI, A. C. UMOH, J. U., EDUVIE, L. O., GEFU, J., 1999. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 67, 225-228.

LIM, K. T.; HU, C.; KITTS, D. D., 2001. Antioxidant activity of *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. Food and Chemical Toxicology, 39, 229-237.

LIMA, E. O., 2001. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, 483-501.

LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L., 2004. *Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. Infarma, 16, 7-8.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A. W. N. M., 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciência Rural, Santa Maria, 35 (2), 371-376.

LONDE, L. N., 2005. Indução de respostas morfogenéticas em *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) e análise da divergência genética entre populações. Dissertação de Mestrado, Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, p. 140.

MAIGA, A.; MALTERUD, K. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S., 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea Velutina* A. Rich

(Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Bent. (Rubiaceae). Journal of Ethnopharmacology, 104, 132-137.

MARQUES, R.C.P.; MEDEIROS, S.R.B.; DIAS, C.S.; FILHO, J.M.B.; LIMA, L.F.A., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. Mutation Research, 536, 117-120.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M., 2006. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. Revista Eletrônica de Farmácia, 3(2), 109-122.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D. DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72, 145-171.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J. FREITAS, P. C.; SILVA, G. L., 2000. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 31, 247-256.

NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A., 2003. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. Química Nova, 26 (3), 331-334.

NUNES, A.P.M.; ARAUJO, A.C., 2003. Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. X Semana de Iniciação Científica da UERJ, Rio de Janeiro, Anais. p.15.

OZÇELIK, B. ASLAN, M; ORHAN, I, KARAOGLU, T., 2005. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. Microbiological Research, 160, 159-164.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>> Acessado em 05/08/2007

PESSINI, G. L.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G., 2003. Antibacterial activity of extracts and neoglicans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. Pallescens (C. DC.) Yunck. Memória Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98 (8), 1115-1120.

PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES. Disponível em: <[http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver\\_1pl.asp](http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp)> Acessado em: 28/07/2007

PORTAL UNIDERP. Disponível em: <[http://www2.uniderp.br/site/noticune.nsf/fe2772b137ea871b0325697a006d4bd9/3d3b3475dfb592380425729200426c2c/\\$FILE/Uniderp%2004.pdf](http://www2.uniderp.br/site/noticune.nsf/fe2772b137ea871b0325697a006d4bd9/3d3b3475dfb592380425729200426c2c/$FILE/Uniderp%2004.pdf)> Acessado em: 01/08/2007

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.P.R.; MONTELEONE NETO, R., 1991. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Revista Brasileira de Genética, 1, 1991, p. 246.

RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. A. da, FONSECA, C.E.I.; ALMEIDA, S. P. PROENÇA, C. B. SILVA, J. A.; SANO, M., 1994. Espécies arbóreas de usos múltiplos na região do Cerrado. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais. Anais. EMBRAPA-CNPQ/CPAF, 1, 335-356.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T., 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Cerrado: ambiente e flora. 1 ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p 47-83.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K., 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana, 21-26. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K., Mutagênese Ambiental, p. 356.

SANTELLI, G.M.M. Mutagênese e Carcinogênese. In Seizi Oga. Fundamentos de Toxicologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003, v. 1, p. 76-88.

SCALBERT, A., 1991. Antimicrobial properties of tannis. *Phytochemistry*, 30 (12), 3875-3883.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P., 2003. Genética Toxicológica. Porto Alegre, Alcance, p. 422.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; FILHO, J. M. B., 2005. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. *Revista de Higiene Alimentar*, 19 (132), 40-45.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P. L., 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 217-220.

STEGE, P. W.; DAVICINO, R. C.; VEGA, A. E.; CASALI, Y. A.; CORREA, S.; MICALIZZI, B., 2006. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine*, 13, 724-727.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. V., 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, 81-112. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese ambiental. Canoas-RS, ULBRA, p. 356.

VARANDA, E.A.; POZETTI, G.L.; LOURENÇO, M.V.; RADDI, M.S.G., 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella* / microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacol*, 81, 257-264.

VICEDO, T. B.; CORREAS, F. J. H., 1997. Antioxidants: una terapéutica de futuro? *Nutr. Hosp.* 12 (3), 108-120.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C. M., 2006. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. Article in Press. Doi:10.1016/j.phymed.2006.12.013.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. *Mutation Research*, v.437, p.105–112, 1999.

WILLIAMS, J. E., 2001. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de Gato and Sangre de Gatro. *Altern. Med. Rev.*, 6 (6), 567-579.

## Capítulo 2

Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)

(Este capítulo foi escrito seguindo as normas da Revista Científica Journal of Ethnopharmacology – [www.elsevier/locate/jethpharm](http://www.elsevier/locate/jethpharm))

## RESUMO

### **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**

*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae), espécie nativa do Cerrado brasileiro é utilizada na alimentação e como planta medicinal. Popularmente são utilizadas todas as suas partes: o óleo da castanha é usado como cautério para afecções da pele, as folhas e a casca do caule são indicadas contra diarreia e como expectorante, o pseudofruto é referido como anti-sifilítico, as inflorescências são empregadas contra tosse e para baixar a glicose sanguínea. Este trabalho testou a atividade antimicrobiana, antioxidante e fez uma análise preliminar do potencial mutagênico do extrato aquoso das folhas de *A. humile*. Utilizou-se o método cavidade em placa para atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos leveduriformes. Os resultados foram negativos em todas as concentrações testadas. Para a atividade antioxidante, foram usados os métodos do DPPH<sup>•</sup>, atividade quelante de ferro e ensaio da desoxiribose. Os valores mais significativos foram encontrados nos testes do DPPH<sup>•</sup> e na atividade quelante de ferro, demonstrando que o extrato aquoso de *A. humile* contém componentes antioxidantes que podem sequestrar radicais livres em condições *in vitro*, sugerindo que existem diferentes mecanismos responsáveis por esta atividade. O potencial mutagênico foi testado utilizando o Teste de Ames apenas na ausência do sistema de metabolização exógeno (fração S9), utilizando as linhagens TA98 e TA100 e, nestas condições, o extrato não apresentou mutagenicidade.

Palavras-chave: antimicrobiano, antioxidante, mutagenicidade, *Anacardium humile*

## ABSTRACT

### **Valuation of antimicrobial and antioxidant activities and mutagenic potential of aqueous extract from *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) leaves**

*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae), a native species from Brazilian Savanna is used in feeding and as medical plant. Popularly, all the plant parts are utilized: the nut oil is used to cauterize skin injuries, the leaves and stem peel are indicated against diarrhea and as expectorant, the pseudo fruit is reported as antisyphilis medication, the flowers are employed against cough and to lower the blood glucose. This work has tested the antimicrobial and antioxidant activities and the mutagenic potential of the aqueous extract from *A. humile* leaves. The cavity method in dishes was utilized to test the antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria and yeast. The results were negative for all concentrations used. To test the antioxidant activity, the methods DPPH<sup>•</sup>, iron chelating activity and deoxyribose assay were utilized. The most favorable values were found at DPPH<sup>•</sup> and iron chelating activity tests, showing that aqueous extract of *A. humile* is composed by antioxidants that may kidnap free radicals *in vitro*, suggesting that there are different mechanisms responsible for this activity. The mutagenic potential was tested utilizing the Ames Test only in the absence of metabolism factor (S9 fraction) using TA98 and TA100 strains, and in these conditions, the extract didn't present mutagenicity.

Key-words: antimicrobial, antioxidant, mutagenicity, *Anacardium humile*

## 1. Introdução

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido a problemas associados ao uso de diversos antibióticos. As substâncias consideradas como antimicrobianas são provenientes do metabolismo secundário e podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais (LIMA, 2001; WILLIAMS, 2001).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio, são encontradas em todos os sistemas biológicos e geradas nos organismos pelo processo metabólico normal; mas situações não-fisiológicas podem também levar à formação de EROs. O estresse oxidativo é um evento causado pela deficiência do sistema protetor e/ou pelo excesso de agentes oxidantes e apresenta efeitos prejudiciais ao funcionamento das células, tais como agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, prejuízo às enzimas, danos ao DNA. Desta forma, encontram-se relacionados ao envelhecimento e a várias patologias, como artrite, câncer, doenças do coração e do pulmão, demência senil, esclerose múltipla entre outras (HALLIWELL et al., 1992; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VICEDO & CORREAS, 1997).

O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. Atribui-se à presença de compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides, a atividade antioxidante dos componentes produzidos pelos vegetais. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; HALLIWELL et al., 1995).

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar compostos com esta mesma atividade. Seus efeitos

fisiológicos, genotóxicos e mutagênicos no organismo humano necessitam de maiores investigações. Os estudos de genotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse em comprovar sua eficácia nas mais diversas finalidades farmacológicas (NUNES & ARAÚJO, 2003; JIMÉNEZ et al., 2005).

*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae), conhecido como cajuí, é uma espécie vegetal encontrada no Cerrado brasileiro, utilizada tradicionalmente na alimentação e como planta medicinal. A utilização popular medicinal abrange praticamente todas as partes da planta. O óleo do pericarpo do fruto é tradicionalmente utilizado como cautério para afecções da pele; as folhas e casca do caule são indicadas contra diarreia e como expectorante. O suco do pseudofruto é referido como anti-sifilítico; as inflorescências são empregadas contra tosse e para baixar a glicose sanguínea (ALMEIDA et al., 1998; CAJUZINHO-DO-CERRADO - WIKIPEDIA, 2007). O extrato metanólico das folhas de cajuí foi capaz de inibir significativamente a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos Swiss (FERREIRA, 2005).

As informações sobre esta planta ainda são pouco relatadas e não há referências de atividade antimicrobiana, antioxidante e teste mutagênico com a espécie. Visando fornecer maiores informações sobre *A. humile*, este trabalho teve como objetivos testar a atividade antimicrobiana e antioxidante, bem como a fazer uma análise preliminar do potencial mutagênico do extrato aquoso das folhas desta planta do Cerrado.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Material Vegetal**

Folhas de *Anacardium humile* foram coletadas no mês de março de 2006 na Reserva Ecológica do Caça e Pesca Itororó, Uberlândia, MG, Brasil (Figura 1). A Reserva está situada a oeste do município, distando 10 Km do centro da cidade e o tipo fisionômico predominante é o Cerrado (sentido restrito) (FUZETO et al.,

2001). A identificação do material vegetal coletado foi confirmada comparando-o com uma espécie já depositada no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia – HUFU (número do *voucher* 12.069, coletores Leenza, E. O. e Barbosa, A. A. A., 15/09/1995).

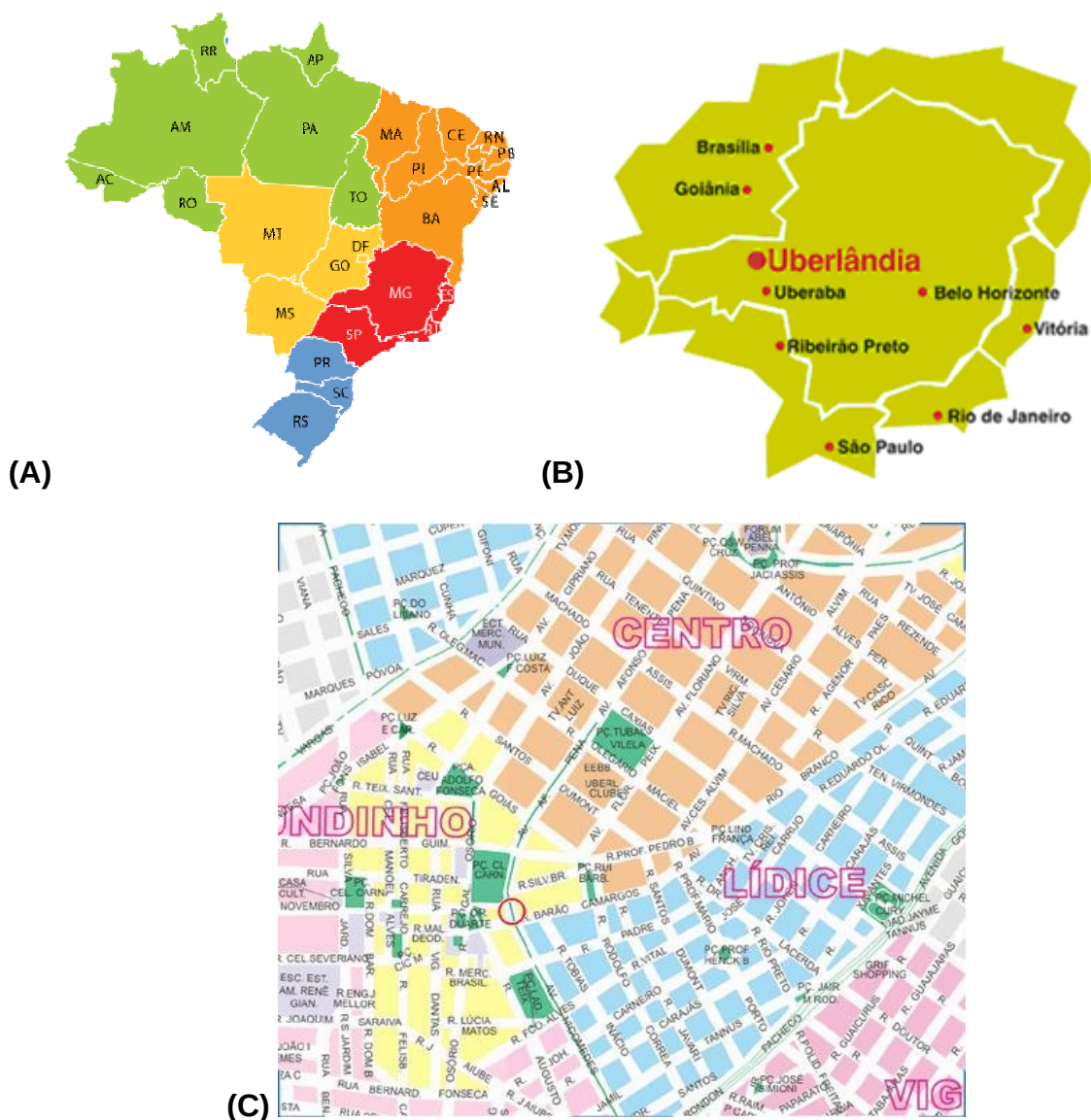


Figura 1 – Local de coleta de *Anacardium humile*. (A) Mapa do Brasil; (B) Mapa de Minas Gerais destacando a cidade de Uberlândia; (C) Mapa de Uberlândia – o círculo vermelho indica o local do Clube Caça e Pesca Itororó (fonte: <http://images.google.com.br>; <http://www.netsabe.com.br/php/index.php>)

## 2.2. Extração

Folhas frescas (100 g) de *Anacardium humile* foram lavadas e homogeneizadas em 1000 mL de água destilada em liquidificador comum, por cerca de 10 minutos. O material foi filtrado em algodão e em seguida centrifugado por meia hora a 21.000 g. O sobrenadante foi liofilizado e estocado a -20 °C até o momento de sua utilização. No momento dos ensaios biológicos, o extrato aquoso (AqAh) era pesado e diluído em solução adequada ao teste em questão.

## 2.3. Atividade Antimicrobiana

As cepas de microorganismos utilizadas nestes testes foram cedidas pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, a saber: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922 e ER 2738), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 750).

Para os testes utilizou-se 5, 2,5, 1,25 mg de AqAh suspensos em 1 mL de água destilada. Os ensaios foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em meio sólido, método cavidade em placa (AMATO NETO et al., 1994; VLIETINCK et al., 1995). Em placas de Petri estéreis foram colocados 25 mL de meio de cultura previamente esterilizados. Utilizou-se ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar BHI para fungos. Após a solidificação destes meios, inoculou-se 500 µL de cada microorganismo em questão, crescidos até a escala de 0,5 Mc Farland (BioMérieux S.A.<sup>®</sup>), que corresponde aproximadamente a  $15 \times 10^6$  bactérias e  $0,5 \times 10^6$  fungos leveduriformes.

Seguido a esse procedimento, foram feitas cavidades de 0,8 cm de diâmetro no ágar, com o auxílio de cânulas de plástico estéreis. Inoculou-se em cada cavidade, as diversas concentrações de AqAh, bem como os antibióticos usados como controle. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas para as bactérias e 72 horas para os fungos leveduriformes. Os padrões utilizados consistiram de ampicilina (5 mg/mL) e cetoconazol (5 mg/mL) para bactérias e

fungos, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi determinado pela média do diâmetro da zona de inibição.

## **2.4. Atividade Antioxidante**

### **2.4.1. Preparação das amostras**

O extrato foi suspenso em água destilada e as concentrações testadas foram 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **2.4.2. Atividade doadora de íons hidrogênio ao radical DPPH<sup>•</sup>**

Este teste utiliza uma solução contendo o radical DPPH<sup>•</sup> (2,2 difenil – 1 – picrilhidrazil) para avaliar a habilidade de diversas moléculas em seqüestrar este radical livre estável, que potencialmente reage com compostos capazes de doar um átomo de hidrogênio.

A redução do radical DPPH<sup>•</sup> foi determinada pela mudança colorimétrica medida em 517 nm, modificando o método descrito por BLOIS (1958). À solução de 1,0 mL de acetato de sódio 100 mM, 500 µL de DPPH<sup>•</sup> 0,5 mM e 1mL de etanol 96%, foram adicionados 2,5 µL das diferentes concentrações de AqAh. Em seguida, procedeu-se a agitação por inversão e leitura da absorbância no tempo inicial (tempo zero) e 5 minutos depois.

O branco consistiu de acetato de sódio 100 mM e etanol 96%. A atividade de seqüestro do radical foi medida com a diminuição na absorbância do DPPH<sup>•</sup> e foi calculada usando a seguinte equação: Redução de DPPH<sup>•</sup> (%) =  $1 - (A_{\text{amostra}}(517\text{nm}) / (A_{\text{controle}}(517\text{nm})) \times 100$ .

Utilizou-se o Trolox (6 - hidroxi - 2, 5, 7, 8 – tetrametilcromo – 2 – ácido carboxílico 97%), um antioxidante sintético e hidrossolúvel análogo à vitamina E, como controle positivo a fim de comparar a porcentagem de atividade do AqAh com as quantidades deste padrão. Os resultados foram apresentados em porcentagem de Redução de DPPH<sup>•</sup> e TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox).

### 2.4.3. Atividade quelante do íon ferro

A quelação do íon ferro pelo antioxidante foi determinada pela mudança colorimétrica medida em 530 e 700 nm, modificando o método descrito por BOLANM & ULVIK (1987). Para a medida da atividade, as diferentes concentrações de AqAh foram adicionadas a 2 mL do meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2) e 4 µL de sulfato ferroso 50 µM. Em seguida, colocou-se 4 µL de BPS (batofenantrolina) 0,2 mM, incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente e procedeu-se então as leituras. O controle positivo continha todas as soluções com exceção do AqAh e o branco continha apenas meio de reação. A habilidade dos extratos em quelar o íon ferro foi calculada usando a seguinte equação: Atividade quelante de ferro (%) =  $1 - (A_{\text{amostra (700-530nm)}}) / (A_{\text{controle (700-530nm)}}) \times 100$ .

### 2.4.4. Atividade sequestradora do radical OH<sup>•</sup> utilizando o ensaio da desoxiribose

A medida da atividade seqüestradora do radical hidroxil pelo AqAh foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas ao TBA (ácido tiobarbitúrico) provenientes da degradação do açúcar desoxiribose pelo radical hidroxil (HALLIWELL et al., 1987).

A mistura de reação contendo os extratos foi incubada com tampão fosfato monobásico de potássio 20 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), ascorbato 100 µM, desoxiribose 2,8 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM e Fe-EDTA 50 µM por 20 minutos a 37 °C. Para terminar a reação, adicionou-se TBA 1%, NaOH 10M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20%, incubados por 20 minutos à temperatura de 75 °C. A absorbância foi determinada por espectrofotometria em 535 nm modificado pelo método descrito por HALLIWELL et al. (1987). O branco não continha desoxiribose, o controle negativo não continha ferro, e no controle positivo não havia amostra.

O açúcar desoxiribose é degradado quando exposto ao radical hidroxil, gerado pela mistura de Fe<sup>3+</sup>, ascorbato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de uma pequena quantidade de EDTA. Se a mistura resultante for aquecida em condições ácidas, forma-se malonaldeído (MDA), que pode ser detectado por sua habilidade em

reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo róseo. Qualquer composto adicionado na mistura reacional capaz de reagir com OH poderá competir com a desoxiribose por este radical, diminuindo assim a degradação deste açúcar e a formação de MDA (HALLIWELL et al., 1987).

A seguinte equação foi utilizada para avaliar a atividade seqüestradora do radical hidroxil: Inibição da formação de MDA (%) =  $1 - (A_{\text{amostra (535nm)}}) / (A_{\text{controle (535nm)}}) \times 100$ .

#### 2.4.5. Análise Estatística

A análise estatística dos testes antioxidantes foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguido de comparações múltiplas de Tukey. Os dados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ . Todas as análises foram feitas utilizando o programa GraphPrism versão 4.0 (® 1994-2003 GraphPad Software, Inc.).

#### 2.5. Teste de Ames

A avaliação da atividade mutagênica do AqAh foi realizada usando o Teste de Ames, método de incorporação em placa, segundo MARON & AMES, 1983. As linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas foram TA98 e TA100 na ausência do sistema de metabolização exógeno (-S9).

A Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) estabelece que a amostra-teste deve ser dissolvida em solvente apropriado (água, DMSO, outros) e a dose máxima a ser testada por placa é 5 mg ou até o limite de sua solubilidade (SBMCTA, 2007). Seguindo estas recomendações, o AqAh foi suspenso em DMSO (Dimetilsulfóxido) e as quantidades testadas foram 2, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 mg/placa. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Incubou-se 100 µL de cultura de *Salmonella typhimurium* em 20 mL de caldo nutriente e as bactérias foram colocadas para crescer durante 16 horas a 37°C sob agitação. Após crescimento, as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

Em tubos previamente esterilizados foram colocados 100  $\mu$ L de cultura para cada linhagem separadamente ( $10^9$  células/mL), 100  $\mu$ L do AqAh nas diferentes quantidades e 500  $\mu$ L de tampão fosfato 0,2M. Após incubação a 37°C por 30 minutos, foram adicionados 2,0 mL de ágar de superfície, e a mistura foi vertida em placa de Petri contendo 20 mL de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas a temperatura de 37°C, tempo necessário para obter o resultado do teste. DMSO foi empregado como controle negativo e o controle positivo consistiu de 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L.

Concomitantemente foram feitos testes para avaliar a taxa de reversão espontânea e a viabilidade das linhagens. Cada linhagem tem uma frequência característica de mutação espontânea, que é avaliada pela contagem de colônias crescidas no controle negativo. Os valores aceitáveis em revertentes por placa na ausência de ativação metabólica deveriam estar entre 20-50 para a linhagem TA98 e 75-200 para TA100 (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

Para avaliar a viabilidade das linhagens, foram transferidos 100 $\mu$ L das culturas de bactérias para um frasco contendo 90 mL de água de diluição (diluição -3). Após proceder a homogeneização por 30 vezes em ângulo de 45°, 100 $\mu$ L foram adicionados em outro frasco com 90 mL de água de diluição (diluição -6). Foram adicionados 100  $\mu$ L deste último frasco em uma placa contendo ágar nutriente. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a viabilidade deveria estar na faixa de  $1,0 - 2,0 \times 10^9$  células.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Salanal e foram expressos em razão de mutagenicidade, utilizando a seguinte equação:  $RM = E/C$ , onde E= número de colônias revertentes na placa-teste (revertentes espontâneos + revertentes induzidos) e C= número de colônias revertentes na placa de controle negativo (revertentes espontâneos).

As amostras são consideradas positivas quando a ANOVA é significativa ( $p < 0,05$ ) e o número de colônias revertentes induzidas é igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas presentes no controle negativo ( $RM=2$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Atividade Antimicrobiana

O extrato aquoso das folhas de *A. humile* não apresentou capacidade de inibir o crescimento dos microorganismos nas concentrações testadas. Os resultados das atividades antimicrobiana e antifúngica são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Anacardium humile* sobre bactérias e fungos em meio sólido. Média dos halos de inibição (cm).

| Microorganismos               | AqAh <sup>a</sup> (mg/mL) |     |     | Controles        |                  |                  |
|-------------------------------|---------------------------|-----|-----|------------------|------------------|------------------|
|                               | 5,0                       | 2,5 | 1,3 | Neg <sup>b</sup> | Clo <sup>c</sup> | Amp <sup>d</sup> |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922     | 0,0                       | 0,0 | 0,0 | 0,0              | *                | 3,4              |
| <i>E. coli</i> ER 2738        | 0,0                       | 0,0 | 0,0 | 0,0              | *                | 3,4              |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923   | 0,0                       | 0,0 | 0,0 | 0,0              | *                | 2,0              |
| <i>S. aureus</i> ATCC 6538    | 0,0                       | 0,0 | 0,0 | 0,0              | *                | 1,6              |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 0,0                       | 0,0 | 0,0 | 0,0              | 2,3              | *                |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 | 0,0                       | 0,0 | 0,0 | 0,0              | 2,5              | *                |

a: extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile*; b: controle negativo (água); c: clorafenicol (5 mg/mL); d: ampicilina (5mg/mL); \* não testado

#### 3.2. Atividade Antioxidante

##### 3.2.1. Atividade doadora de íons hidrogênio ao radical DPPH<sup>•</sup>

O potencial de redução do radical DPPH<sup>•</sup> pelo extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* (AqAh) está representado na Figura 2. Nesta figura é possível observar que houve atividade antioxidante e esta foi dependente da

concentração, isto é, quanto maior a concentração, maior a porcentagem de redução do DPPH<sup>\*</sup>, com valor aproximado de 30% para a maior concentração testada (100 µg/mL) (Figura 2A). Além disso, a análise estatística mostrou que existem diferenças significativas entre as quantidades testadas ( $p < 0,05$ ).

Os valores-padrão do controle positivo utilizado como comparação estão representados na Figura 2B. Em 2C encontram-se plotadas as concentrações de AqAh equivalentes às quantidades de Trolox, onde pode-se observar que houve uma correlação positiva entre elas. Comparando tais quantidades é possível observar que a concentração necessária para obter 30% de redução do DPPH para Trolox ( $C_{14}H_{18}O_4$ , MM= 250,3) é aproximadamente 0,45 mM, que corresponde a 112,63 µg/mL. Para que se obtenha o mesmo efeito com AqAh é necessário 100 µg/mL. Isto significa que para alcançar um efeito antioxidante similar ao Trolox, é necessária uma quantidade equivalente do AqAh.

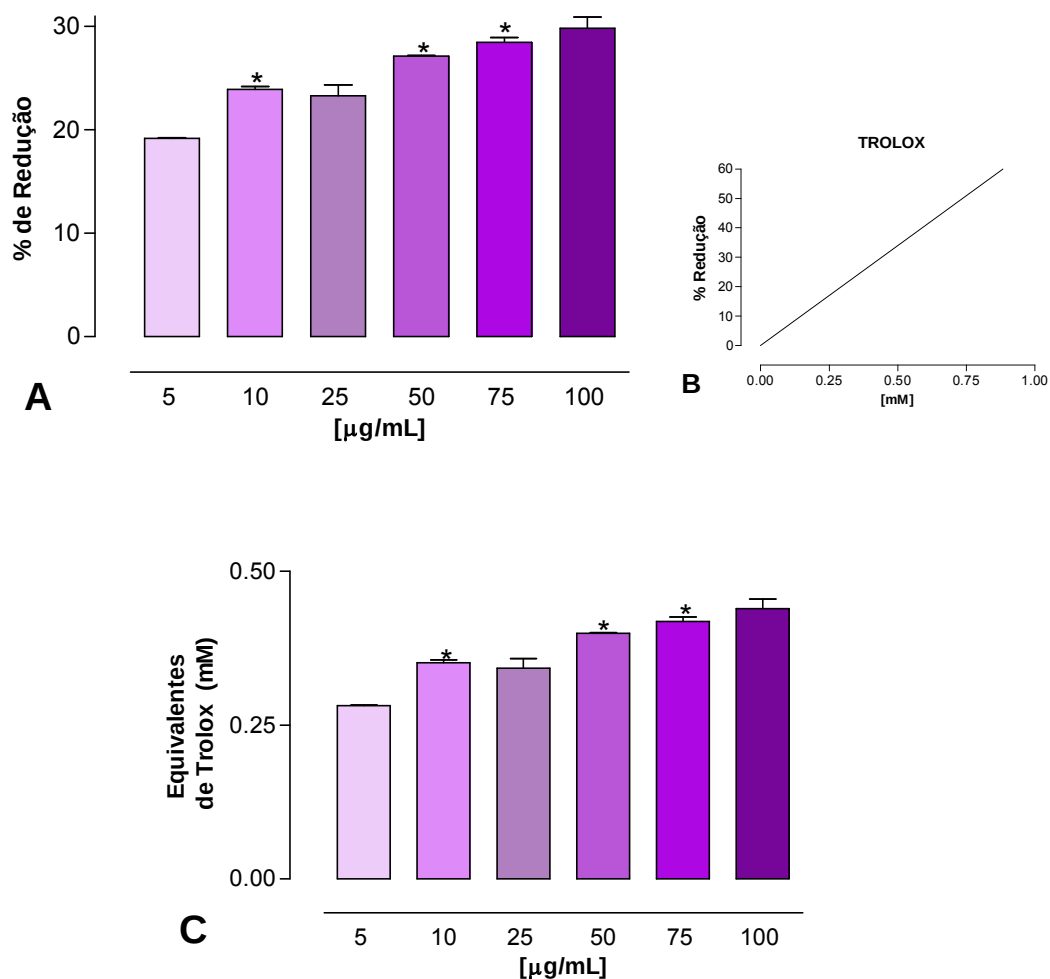


**Figura 2 – Atividade de redução do radical DPPH' pelo AqAh com equivalente de Trolox (TEAC). (A) Porcentagem de redução do AqAh nas diferentes concentrações. (B) Porcentagem de redução do controle positivo (Trolox) e (C) Equivalentes de Trolox. Valores de média  $\pm$  erro padrão da média de três valores. \* Indica diferença estatística significativa em relação à concentração anterior ( $p < 0,05$ ).**

### 3.2.2. Atividade quelante do íon ferro

Os resultados deste experimento são expressos em porcentagem de atividade em função das diferentes concentrações de AqAh. A Figura 3 mostra que a habilidade quelante do extrato foi relativamente alta e dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração, maior atividade, com valores de 81,72% para 100 µg/mL. Observando a figura é possível ainda inferir que,

numa concentração relativamente baixa (25  $\mu\text{g/mL}$ ) ocorre 50% de atividade antioxidante pela quelação do íon ferro. A análise estatística indicou que houve diferença significativa entre as concentrações testadas ( $p < 0,05$ ).

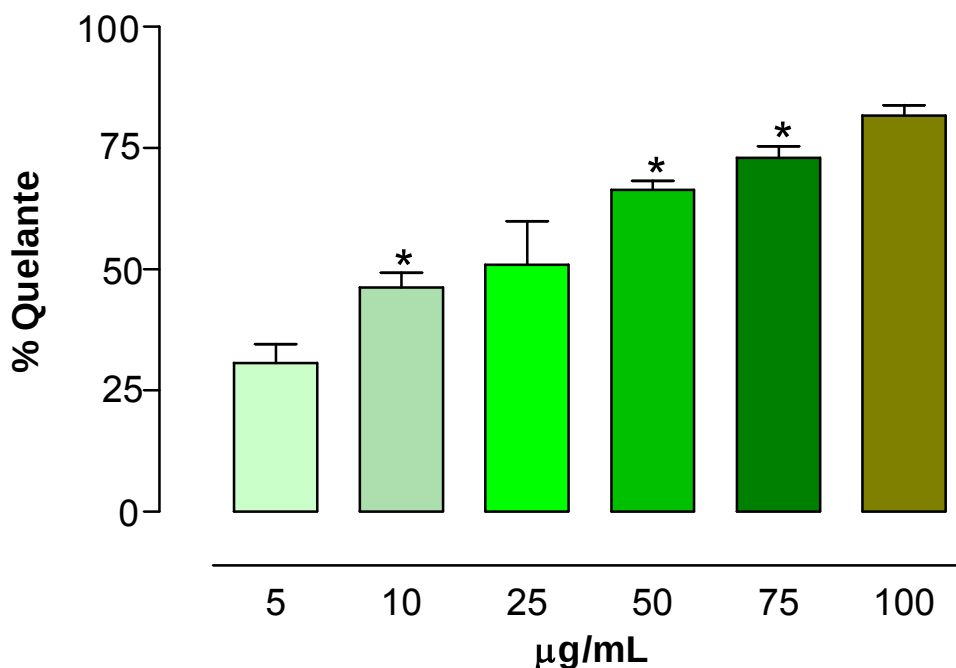


Figura 3 – Atividade quelante de íon ferro pelo AqAh. Valores de média  $\pm$  erro padrão da média de três valores. \* Indica diferença estatística significativa em relação à concentração anterior ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. Atividade sequestradora do radical $\text{OH}^\bullet$ utilizando o ensaio da desoxirribose

Os resultados para este teste estão representados na Figura 4, e mostram a porcentagem de inibição da formação de MDA. Isto significa que quanto maior é a reação de AqAh com o radical livre que se forma no meio reacional, maior será a porcentagem de inibição da formação do MDA. Embora o extrato aquoso de *Anacardium humile* tenha apresentado uma baixa atividade, com aproximadamente 40% de inibição na maior concentração testada (100  $\mu\text{g/mL}$ ), pode-se observar que houve um efeito dependente da concentração. Além disso, a análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre as concentrações testadas ( $p < 0,05$ ).

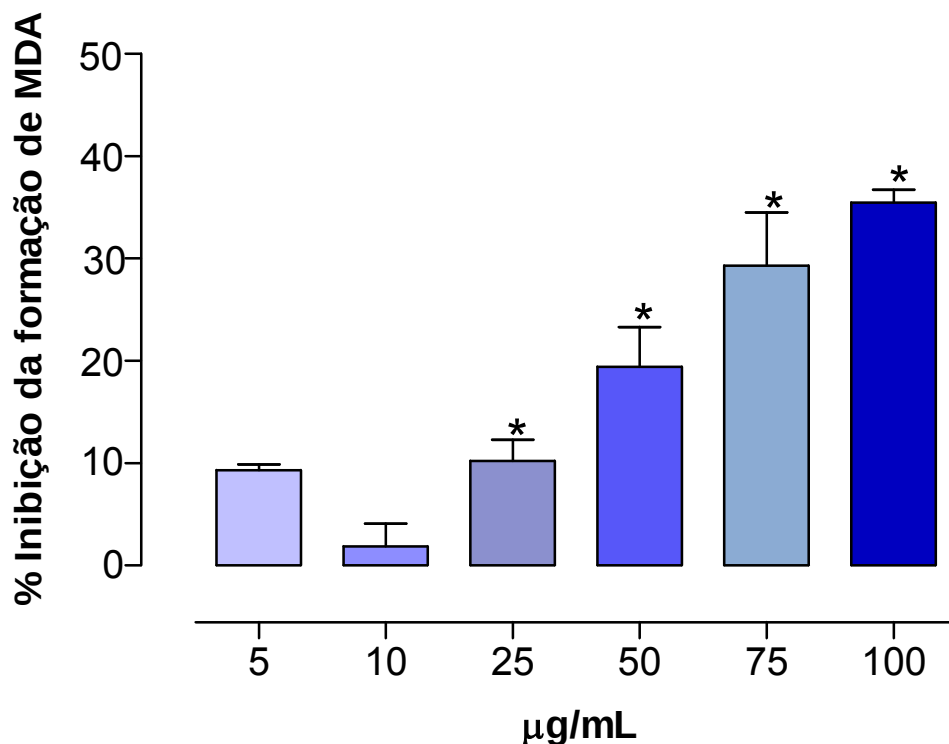


Figura 4 – Efeito inibitório da formação de MDA pelo AqAh no dano oxidativo utilizando o ensaio da desoxiribose. Valores de média  $\pm$  erro padrão da média de três valores. \* Indica diferença estatística significativa em relação à concentração anterior ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Teste de Ames

Os resultados deste teste de mutagenicidade para o extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* são preliminares. O ensaio foi realizado com as linhagens TA98 e TA100 na ausência do sistema de metabolização endógena (-S9). Até a conclusão deste trabalho não foi possível realizar os testes na presença de S9, pois o Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local onde foram realizados os experimentos, encontrou problemas com o lote do produto (Lote nº 2151). Tais problemas foram detectados, pois os testes se mostraram não repetitivos e não constantes.

Nas condições em que foi realizado o teste, nenhuma das concentrações testadas de AqAh foram mutagênicas (Tabela 2). O teste estatístico mostrou-se não significativo, com valores de  $p=0,171$  para TA98 e  $p=0,150$  para TA100. Isto significa que o número de colônias revertentes da amostra e do controle negativo foi inferior ao dobro da taxa de reversão das colônias revertentes espontâneas e não foi observado nenhuma relação dose-resposta nas concentrações de AqAh testadas (Figura 5). A viabilidade das células ficou dentro da faixa esperada para o teste, com valores de  $1,56 \times 10^9$  para a linhagem TA98 e  $0,92 \times 10^9$  para TA100.

Tabela 2 – Mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* (AqAh) testado com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na ausência do sistema de metabolização exógena (-S9).

| AqAh<br>(mg/placa) <sup>a</sup> | Colônias Revertentes (UFC/placa) <sup>b</sup> |                 |                |                 |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
|                                 | TA98                                          | RM <sup>c</sup> | TA100          | RM <sup>d</sup> |
| 2,0                             | 22,33 ± 8,33                                  | 0,60            | 184,00 ± 11,31 | 1,23            |
| 0,5                             | 22,00 ± 3,61                                  | 0,59            | 142,67 ± 4,51  | 0,96            |
| 0,1                             | 21,50 ± 4,95                                  | 0,57            | 144,50 ± 3,54  | 0,97            |
| 0,05                            | 17,00 ± 4,00                                  | 0,45            | 153,50 ± 7,78  | 1,03            |
| 0,01                            | 24,00 ± 8,49                                  | 0,64            | 130,67 ± 29,26 | 0,88            |
| C <sup>-e</sup>                 | 37,50 ± 0,71                                  | 1,00            | 149,00 ± 12,77 | 1,00            |
| C <sup>+f</sup>                 | 905,00 ± 148,49                               | 50,20           | 850,50 ± 44,55 | 5,71            |

a: extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile*; b: valores de média ± desvio padrão da leitura de três placas; c: razão de mutagenicidade para TA98 ( $p=0,171$ ); d: razão de mutagenicidade para TA100 ( $p=0,150$ ); e: controle negativo (DMSO), revertentes espontâneos/placa; f: controle positivo (4-NQO), 0,05 µg/µL.

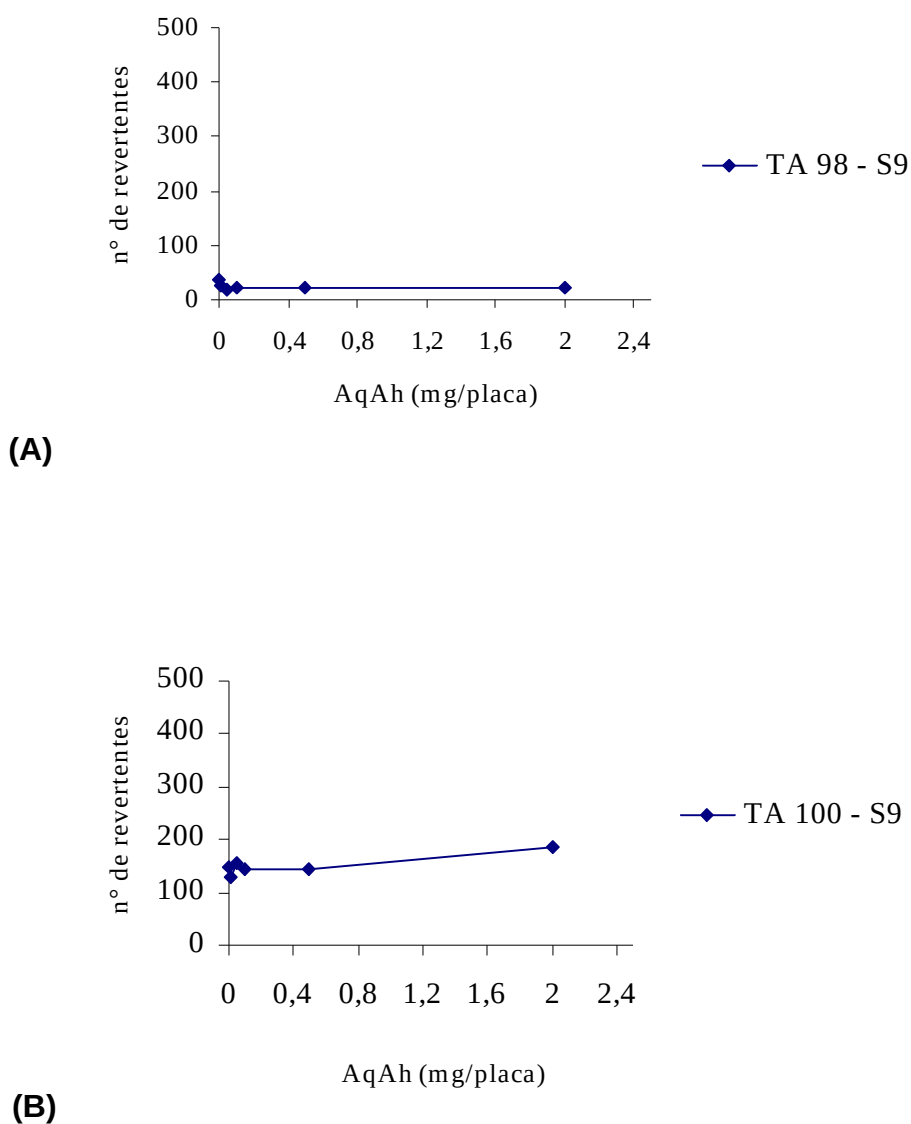


**Figura 5 – Curva dose-resposta do Teste de *Salmonella*/microsoma (Teste de Ames) com AqAh na ausência do sistema de metabolização exógena (-S9). (A) Linhagem TA98. (B) Linhagem TA100.**

#### 4. Discussão e Conclusões

Os resultados apresentados para atividade antimicrobiana (Tabela 1) do AqAh, foram negativos nas concentrações testadas. OZÇELIK et al. (2004) testando extratos lipofílicos de *Pistacia vera*, observaram que não houve inibição significativa do crescimento de microorganismos comparado com os agentes

utilizados como controle. Porém, todos os extratos testados tiveram mais atividade sobre bactérias Gram positivas do que sobre Gram negativas.

A parte da planta usada neste trabalho (folhas) e o tipo de extração podem ter resultado na ausência de tal atividade. SRINIVASAN et al. (2001) testaram extrato aquoso das folhas de 50 plantas sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras. Dentre todas as espécies testadas, 14 não tiveram atividade sobre nenhum microorganismo em questão.

O extrato hexânico e metanólico das partes aéreas de *Schinus polygamus* não demonstrou atividade antimicrobiana sobre 9 microorganismos testados por ERAZO et al. (2006). Os óleos essenciais das folhas desta mesma planta foram efetivos contra bactérias, em concentrações de 100 e 200 µg/mL, porém, nenhuma atividade foi encontrada no tratamento de leveduras *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*.

FERREIRA (2005) isolou compostos do extrato metanólico das folhas de *Anacardium humile* e as substâncias encontradas foram o ácido gálico, galato de metila, catequina, derivados da quercetina e amentoflavona. A fração aquosa, obtida também do extrato metanólico, revelou uma grande concentração de taninos.

Os taninos são compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e possuem atividade antimicrobiana. Sugere-se que os mecanismos responsáveis pela toxicidade destes compostos estejam relacionados à inibição de enzimas extracelulares, privação de substratos e ao metabolismo dos microorganismos. Apesar destes compostos possuírem tais propriedades, alguns microorganismos podem secretar substâncias que possuem alta afinidade pelos taninos ou algumas enzimas – como tanases ou invertases – podem ser resistentes a estes compostos, mantendo a atividade microbiana mesmo em altas concentrações de taninos (SCALBERT, 1991).

Diante da ausência de atividade antimicrobiana encontrada no extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile*, sugerimos que tal fato pode estar relacionado a fatores como o modo de extração e quantidade de componentes presentes, bem como a fatores que influenciam no metabolismo secundário da planta.

Segundo GOBBO-NETO & LOPES (2007), fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade ou estágio de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, estímulo mecânico e ataque de patógenos, podem influenciar na quantidade e natureza dos constituintes ativos na planta. As variações sazonais podem alterar o conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como os óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonóides, saponinas, alcalóides, taninos, entre outros. Existe ainda uma correlação entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, tais como flavonóides, taninos e antocianinas.

O DPPH<sup>•</sup> é um composto que possui um radical próton com característica de absorção, que diminui significativamente quando exposto a um composto que sequestre estes radicais (YAMAGUCHI et al., 1998). Os resultados apresentados na Figura 2 para o método do DPPH<sup>•</sup> com *Anacardium humile* mostraram que o extrato aquoso foi capaz de atuar como antioxidante, doando H<sup>+</sup> ao radical estável em questão. A porcentagem de atividade corresponde à quantidade do radical consumida pelo AqAh (Figura 2A) e, comparado com o controle utilizado, o extrato apresenta boa porcentagem de redução (Figura 2C).

O efeito antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de folhas e caules de *Zanthoxylum ailanthoides* foi testado utilizando diversos métodos *in vitro*. Para o método de DPPH<sup>•</sup>, encontrou-se uma maior atividade para o extrato aquoso das folhas, porém, em comparação com o antioxidante comercial  $\alpha$ -tocoferol, todos os extratos testados tiveram baixa atividade (CHUNG et al., 2006).

MAIGA et al. (2006) realizou extração da casca da raiz de *Lannea velutina* com diversos solventes e testou atividades antioxidante por um método enzimático (inibição da 15-lipoxigenase) e por um não enzimático (método do DPPH<sup>•</sup>). O teste de inibição do DPPH<sup>•</sup> encontrou uma melhor atividade para o extrato metanólico, com valores altamente significantes para a menor concentração testada (10,4  $\mu$ g/mL).

O extrato etanólico de *Rhus verniciflua* Stokes apresentou boa atividade de redução do DPPH<sup>•</sup>, com valores considerados baixos, em torno de 5 a 30  $\mu$ g/mL para 18 e 100% de inibição, respectivamente. Tais resultados são evidências da

capacidade do extrato em remover radicais livres do meio reacional (LIM et al., 2001).

Embora a habilidade do AqAh em reduzir DPPH<sup>•</sup> seja menor do que o antioxidante sintético Trolox, por não alcançar uma porcentagem alta, na maior concentração testada, fica evidente que o extrato aquoso das folhas de *A. humile* serve como inibidor de radical livre, atuando como um antioxidante natural.

A inibição da geração de OH<sup>•</sup> pela ligação com um metal de transição, testada neste trabalho pelo método da atividade quelante de ferro, pode ocorrer por dois mecanismos. Um deles, é que a ligação com o metal pode alterar seu potencial de oxirredução e/ou a capacidade deste metal em participar da formação do radical OH. Outra possibilidade é que a ligação do metal com uma substância antioxidante não impediria as reações de oxirredução, mas sim direcionaria essas reações para o antioxidante, poupando o alvo mais importante (ARUOMA et al., 1987; GUTTERIDGE, 1984).

A habilidade demonstrada pelo AqAh em quelar metais, apresentada na Figura 3, pode indicar a presença de compostos capazes de inativar o íon ferro por complexação do composto com o metal, suprimindo dessa forma a geração de OH<sup>•</sup>, podendo então, ser um agente protetor contra o dano oxidativo na célula (ARORA et al., 1998).

O ensaio da desoxiribose mede a combinação de dois fatores: habilidade em remover íons ferro deste açúcar e habilidade em tornar tais íons inativos ou pobremente ativos na geração de OH<sup>•</sup>. As únicas substâncias que podem inibir o OH<sup>•</sup> neste ensaio são aquelas que se ligam a íons ferro forte o suficiente para retirá-los da desoxiribose (HALLIWELL et al., 1995).

Embora os resultados deste teste para *Anacardium humile* tenham apresentado baixa porcentagem em inibição de MDA (Figura 4), observa-se um efeito dependente da concentração. Tais resultados são semelhantes aos encontrados para extratos de *Echinacea sp* por HU & KITTS (2000).

Vários autores demonstraram a atividade antioxidante de diversas plantas e/ou de seus componentes isolados. A família Anacardiaceae está incluída dentre

os vegetais que possuem tal atividade (KUBO et al., 2006; PARDO-ADREU et al., 2006).

O extrato metanólico de *Rhus verniciflua* Stokes foi testado quanto à sua atividade antioxidante através de diferentes métodos. Os resultados para o teste *in vitro* do seqüestro do radical hidroxil demonstrou uma alta atividade, com valor de 98% para a maior concentração testada (100 µg/mL) (LIM et al., 2001).

KAMATH & RAJINI (2007) testaram a capacidade antioxidante do extrato etanólico da castanha de *Anacardium occidentale* (CSE). O resultado do experimento da desoxiribose mostrou-se dependente da concentração testada (0-20 µg/mL), com atividade de 0-50%. Para a atividade quelante de ferro, o CSE teve uma baixa capacidade de ligação com o metal de transição, se comparado com o controle utilizado no experimento. Os resultados para AqAh apresentados neste trabalho mostram-se semelhantes para o ensaio da deoxiribose e melhores para a atividade quelante de ferro.

Os métodos do ensaio da desoxiribose e da atividade quelante de ferro foram utilizados por SINGH & RAJINI (2004), que demonstraram a atividade do extrato aquoso da casca da batata em seqüestrar o radical hidroxil, bem como quelar o íon ferro, com porcentagens de inibição de 75 e 50%, respectivamente, para 5 mg de extrato testado.

Extratos de plantas possuem grande quantidade de compostos fenólicos. Tais compostos, com destaque aos flavonóides, são capazes de seqüestrarem radicais livres, bem como se complexarem e estabilizarem com íons metais de transição, participando na catálise inicial do metal e nas reações de decomposição de hidroperóxidos. Estas propriedades são dependentes das estruturas específicas e do número e posição dos grupos hidroxil dos compostos fenólicos (KAMATH & RAJINI, 2007; ZHAO et al., 2006). Embora não tenham sido isolados os componentes presentes em AqAh, sugerimos a presença de compostos fenólicos no AqAh, levando em consideração os dados obtidos por FERREIRA (2005).

Em geral o uso popular de plantas com fins terapêuticos não leva em consideração o aspecto da toxicidade. Este trabalho apresenta resultados preliminares do efeito genotóxico do extrato aquoso das folhas de *Anacardium*

*humile*, planta usada popularmente como antimicrobiano, antiinflamatório e para diabetes. O teste de *Salmonella* / microsossoma na ausência do sistema de metabolização exógena (fração S9) foi negativo nas concentrações testadas (Tabela 2 e Figura 5).

Estes resultados são diferentes daqueles encontrados por KONAN et al. (2007), que, testando o efeito genotóxico do extrato etanólico do caju verdadeiro (*Anacardium occidentale* L), encontrou mutagenicidade para a linhagem TA98 na ausência de S9 com valores de 0,56 mg/placa. A análise fitoquímica deste extrato indicou presença, em sua maioria, de flavonóides. Diante disso, os autores não puderam concluir quais componentes podem estar envolvidos na mutagenicidade, já que os flavonóides, em sua maioria não são mutagênicos.

Porém, muitas espécies vegetais foram avaliadas quanto a mutagenicidade, apresentando resultados negativos. Como exemplo temos o *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. utilizada tradicionalmente para tratar doenças cardíacas e problemas ósseos. O extrato aquoso e etanólico das folhas e caule desta planta não apresentaram atividade mutagênica para as linhagens TA98, TA100, TA102, TA97, TA1535 em nenhuma das concentrações testadas, tanto na ausência como na presença da fração S9 (CHUNG et al., 2006)

ELGORASHI et al. (2003) realizou um extenso estudo de mutagenicidade utilizando o Teste de Ames com o extrato diclorometano e metanólico de diferentes partes de plantas medicinais tradicionalmente usadas na África do Sul. Das 50 espécies estudadas, apenas três apresentaram mutagenicidade na ausência da ativação metabólica, para todas as outras, o teste foi negativo inclusive para espécies da família Anacardiaceae (*Harpephyllum cafrum*, *Rhus gueinzii*, *Sclerocarya birrea*).

Não é possível inferir discussão sobre mutagenicidade do AqAh na presença do sistema de metabolização exógena, já que não foi realizado o teste com S9 até a conclusão do trabalho em questão. Mas é válido ressaltar que o extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* possui componentes com atividade antioxidante e que não funcionam como mutágenos diretos, e, mesmo não tendo sido isolados tais compostos do extrato aquoso, é possível que em AqAh estejam presentes flavonóides e terpenos.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que o extrato aquoso de *Anacardium humile* contém componentes antioxidantes que podem seqüestrar diversas EROs/radicais livres, em condições *in vitro*. Os testes realizados sugerem que existem diferentes mecanismos responsáveis pela atividade antioxidante de AqAh. As porcentagens mais favoráveis foram encontradas nos testes do DPPH<sup>•</sup> e na atividade quelante de ferro. Estas atividades podem estar envolvidas em possíveis propriedades medicinais desta planta; porém, são necessários testes *in vivo*, bem como investigação dos compostos isolados do extrato. O Teste de Ames com o extrato aquoso do cajuí na ausência do sistema de metabolização exógena (fração S9) não apresentou atividade mutagênica.

## 5. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. RIBEIRO, J. F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina, EMBRAPA – CPAC, p. 464.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C. LOPES, H. V. MENDONÇA, J. S. BALDY, J. L. S., 1994. Antibióticos na prática médica. São Paulo, Roço, p. 358.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M., 1998. Structure-actitivity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a lipossomal system. *Free Radical Biology & Medicine*, 9 (24), 1355-1363.

ARUOMA, O. I.; GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B., 1987. The role of iron in ascorbate-dependent deoxiribose degradation. Evidence consistent with a site specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 29, 289-299.

BLOIS, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 4617 (181), p.1199-1200.

BOLANM, B. J.; ULVIK, R. J., 1987. Release of iron from ferritin by xantine oxidase. Role of the superoxide radical. *Biochemical Journal*, Colchester, 243, 55-59.

CAJUZINHO-DO-CERRADO – WIKIPEDIA. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cajuzinho-do-cerrado>> Acessado em 25/07/2007.

CANTERLE, L. P., 2005. Erva- mate e atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, p. 99.

CHUNG, Y. C.; CHIEN, C. T.; TENG, K. Y.; CHOU, S. T., 2006. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. *Food Chemistry*, 97, 418-425.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOS, J. L. S.; MAES, A.; van STADEN, J.; KIMPE, N. D.; VERSCHAEVE, L., 2003. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicology Letters*, 143, 195-207.

ERAZO, S.; DELPORTE, C.; NEGRETE, R.; GARCÍA, R.; ZALDÍVAR, M.; ITURRA, G.; CABALLERO, E.; LÓPEZ, J. L.; BACKHOUSE, N., 2006. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 395-400.

FERREIRA, A L., 2005 Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado, Unicamp, p. 124

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 43 (1), 61-68.

FUZETO, A P. BARBOSA, A A A; LOMÔNACO, C., 2001. *Cabralea canjerana* subsp *Polytrichia* (Adri. Juss.) Penn (Meliaceae), uma espécie dióica. *Acta Botânica Brasileira*, 15, 167-175.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P., 2007. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2), 374-381.

GUTTERIDGE, J. M. C., 1984. Reactivity of hidroxil and hydroxyl-like radical discriminated by release of thiobarbituric-acid-reactive material from deoxyribose, nucleosides and benzoate. *Biochemical Journal*, 224, 761-767.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E., 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-560.

HALLIWELL, B. AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I., 1995. The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology. London, 33 (7), 601-617.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I., 1987. The deoxyrrribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analytical Biochemistry, New York, 165 (1), 215-219.

HU, C.; KITTS, D. D., 2000. Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* Root Extract. J. Agric. Food Chem., 48, 1466-1472.

JIMENÉZ, M.R.; SANCHÉZ, J.C.; MOHAMED ANALLA, M.; ANDRÉS MUÑOSSERRANO, A.M.; MORAGA, A.A., 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. Mut.Res/Gen. Toxicol. Env. Mut., 585, 147-155.

KAMATH, V.; RAJINI, P. S., 2007. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. Food Chemistry, 103, 428-433.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M.; LINCOPAN, N.; VARELA, S. D.; VARANDA, E. A., 2007. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). Journal of Ethnopharmacology, 110, 30-38.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; TSUJIMOTO, K., 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. Food Chemistry, 99, 555-562.

LIM, K. T.; HU, C.; KITTS, D. D., 2001. Antioxidant activity of *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. Food and Chemical Toxicology, 39, 229-237.

LIMA, E. O., 2001. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, 483-501.

MAIGA, A.; MALTERUD, K. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S., 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea Velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Bent. (Rubiaceae). Journal of Ethnopharmacology, 104, 132-137.

NUNES, A.P.M.; ARAUJO, A.C., 2003. Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. X Semana de Iniciação Científica da UERJ, Rio de Janeiro, Anais. p.15.

OZÇELIK, B. ASLAN, M; ORHAN, I, KARAOGLU, T., 2005. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. Microbiological Research, 160, 159-164.

PARDO-ANDREU, G. L.; SÁNCHEZ-BALDOQUÍN, C.; ÀVILA-GONZÁLEZ, R.; YAMAMOTO, E. T. S.; REVILLA, A.; UYEMURA, S. A.; NAAL, Z.; DELGADO, R.; CURTI, C., 2006. Interaction of Vimag (*Mangifera indica* L. Extract) with Fe (III) improves its antioxidant and cytoprotecting activity. Pharmacological Research, 54, 389-395.

SBMCTA. Disponível em: <<http://www.sbmcta.org.br/serie-documentos.pdf>> Acessado em 11/02/2008.

SCALBERT, A., 1991. Antimicrobial properties of tannis. Phytochemistry, 30 (12), 3875-3883.

SINGH, N.; RAJINI, P. S., 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. Food Chemistry, 85, 611-616.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P. L., 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 217-220.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. V., 2003. Teste de mutagenecidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, 81-112. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagênese ambiental*. Canoas-RS, ULBRA, p. 356.

VICEDO, T. B.; CORREAS, F. J. H., 1997. Antioxidants: una terapéutica de futuro? *Nutr. Hosp.* 12 (3), 108-120.

VLIETINCK, A. J. VAN HOOFF, L., TOTTE, J. LASURE, A. VANDEN BERGE, D. RWANGABO, P. C. MVUKIUMWAMI, J. 1995. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 31-47.

WILLIAMS, J. E., 2001. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de Gato and Sangre de Gatro. *Altern. Med. Rev.*, 6 (6), 567-579.

YAMAGUCHY, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J., 1998. HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazil. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62, 1201-1204.

ZHAO, G. R.; XIANG, Z. J.; YE, T. X.; YUAN, Y.J.; GUO, Z. X., 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, 99, 767-774.

ANEXOS

## PROTOCOLOS

### Meios de Cultura e Reagentes utilizados no Teste de Ames

#### Caldo Nutriente

Caldo nutriente nº 2 (OXOID) - 25 mg  
Água destilada - 1000 mL

- Esterilizar a 121°C por 15'

#### Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M pH 7,4

Solução A\* – 176 mL  
Solução B\* – 24 mL

- Misturar soluções, ajustar pH com solução A ou solução B  
- Autoclavar 121°C por 15'  
- Solução estoque válida até 60 dias em frasco escuro à temperatura ambiente

##### \* Solução A

Fosfato de Sódio Dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) - 2,84 g  
Água destilada (q.s.p.) - 100 mL

##### \* Solução B

Fosfato de Sódio Monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) - 2,76 g  
Água destilada (q.s.p.) - 100 mL

#### Ágar de Superfície

Bacto Ágar - 6 g  
Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ) - 5 g  
Água destilada (q.s.p.) - 1000 mL

- Esterilizar a 121°C por 15'

### **Àgar Mínimo (AM)**

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| Solução de Glicose 10%*      | - 200 mL |
| Solução de Agar*             | - 780 mL |
| Solução de Vogel Bonner*     | - 20 mL  |
| Solução de Biotidina 0,5 mM* | - 12 mL  |

- Esterilizar a 121°C por 15 minutos
- Estabilizar temperatura das soluções em banho maria a 55°C
- Distribuir 20 mL em placas de Petri previamente esterilizadas

#### \*Solução de Glicose 10%

|                |          |
|----------------|----------|
| Glicose        | - 20 g   |
| Água destilada | - 200 mL |

#### \*Solução de agar

|                |          |
|----------------|----------|
| Bacto àgar     | - 15 g   |
| Água destilada | - 780 mL |

#### \*Solução de Vogel Bonner (50x)

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )                   | - 10 g    |
| Ácido Cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )                                  | - 91,43 g |
| Fosfato de Potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                           | - 500 g   |
| Fosfato de Sódio e Amônio ( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) | - 175 g   |
| Água Destilada (q.s.p.)                                                             | - 1000 mL |

- Solução estoque válida por 6 meses em frasco escuro na geladeira

#### \*Solução de Biotidina 0,5 mM

L-histidina - 0,078 g  
D-biotina - 0,122 g  
Água destilada (q.s.p.) - 1000 mL

- Solução estoque válida por 60 dias armazenada em frasco escuro na geladeira

### **Ágar Nutriente**

Caldo Nutriente nº 2 (OXOID) – 25 g  
Bacto Ágar - 15 g  
Água destilada (q.s.p.) - 1000 mL

- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15'

### **Água de diluição**

Solução A\* - 1,25 mL  
Solução B\* - 5 mL  
Água destilada (q.s.p.) - 1000 mL

- Distribuir 90 mL em 2 frascos de vidro e autoclavar a 121°C por 15'

#### \*Solução A

Fosfato de Potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 34 g  
Água destilada (q.s.p.) - 1000 mL

#### \*Solução B

Cloreto de Magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) - 81,1g  
Água destilada (q.s.p.) - 1000 ML

**Normas para confecção da versão final da Dissertação de Mestrado**  
(Fonte: [www.cogeb.ufu.br](http://www.cogeb.ufu.br))

## **I. Capa**

Deve constar:

- Universidade Federal de Uberlândia
- Instituto de Genética e Bioquímica
- Pós Graduação em Genética e Bioquímica
- Título da Tese
- Nome do Aluno
- Uberlândia - MG
- Ano da Defesa

## **II. Papel: Tamanho A4**

### **Margens:**

Superior 3,0 cm

Inferior 2,5 cm

Esquerda 3,0 cm

Direita 2,5 cm

**Fonte:** Arial 12, espaço 1,5

## **III. Ordenação do Conteúdo**

O Mestrado e o Doutorado serão escritos sob a forma de capítulo (s). Tanto o boneco como a versão final deverão ter a seguinte forma:

- Capa
- Contracapa, identificando: curso, aluno, orientador, informes sobre a titulação, cidade e ano

- Ficha Catalográfica: deve ser colocado nas costas da contra capa. A ficha catalográfica será elaborada pela Biblioteca do Campus Sta. Mônica.
- Palavras-chave: devem ser colocadas abaixo da ficha catalográfica na contra capa
- Folha de rosto com: curso, título, aluno, comissão examinadora, cidade e data
- Dedicatória
- Agradecimentos
- Índice / Sumário
- Apresentação:
  - o Deverá ser uma síntese do tema pesquisado, situando-o em um contexto geral sobre o conhecimento atual do assunto
  - o Não deverá trazer citações bibliográficas
  - o Será finalizada com a apresentação dos capítulos com enfoque nos objetivos dos capítulos
- Capítulo I: Fundamentação Teórica: este capítulo é composto pela fundamentação teórica e suas referências bibliográficas
- Capítulo (s):
  - o Título
  - o Resumo e Abstract referentes ao capítulo
  - o Se o capítulo foi publicado, pode ser apresentado tanto na forma de separata quanto na forma de texto original do editor do texto, se foi ou está para ser submetido, constar a revista.
  - o Cada capítulo deve ser escrito em conformidade com uma revista de divulgação científica escolhida pelo aluno e o orientador

- o O capítulo deverá ser escrito em Português ou Inglês
- Opcional:
  - o Anexar, ao final da Dissertação/Tese os protocolos utilizados em metodologia para o desenvolvimento da pesquisa
  - o Fazer um capítulo para resultados complementares - para resultados que ainda serão completados para fins de publicação, mas que são relevantes e merecem nota prévia