



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

JOSÉ MARCOS SOUSA RODRIGUES FILHO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DA GOMA DO CAJUEIRO
(*Anacardium occidentale*)

FORTALEZA
2017

JOSÉ MARCOS SOUSA RODRIGUES FILHO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DA GOMA DO CAJUEIRO
(*Anacardium occidentale*)

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à disciplina de Monografia II do
Curso de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luzia Kalyne
Almeida Moreira Leal
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Valéria
Pitombeira Ferreira.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697a Sousa Rodrigues Filho, José Marcos.

Avaliação da Toxicidade in vivo e in vitro da Goma de Cajueiro / José Marcos Sousa Rodrigues Filho. – 2017.
50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará,
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
Coorientação: Prof. Dr. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira.

1. Anacardium occidentale. 2. Citotoxicidade. 3. Toxicidade Aguda. 4. Goma do cajueiro.
5. Estudos não clínicos. I. Título.

CDD 615

JOSÉ MARCOS SOUSA RODRIGUES FILHO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DA GOMA DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*)

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à disciplina de Monografia II do
Curso de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra Suzana Barbosa Bezerra
Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza

Dra Ana Paula Dionísio
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, primeiramente, por todo esforço empregado em me educar e me sustentar. Pela enorme disposição de sempre me ajudar, estando sempre presentes quando precisei e pelo amor a mim dedicado, mesmo em momentos de difíceis compreensões;

Ao meu irmão, Matheus Rodrigues, eu dedico um especial agradecimento a ele, que é, na verdade, uma mistura de pai, terapeuta e amigo. No plano acadêmico, eu não conseguiria nada sem as suas orientações e motivações nas horas mais difíceis. Desde que nasci o maior companheiro que a vida me presenteou;

À minha irmã, Maykyanna Freitas, pelo exemplo de força e superação;

Ao Fábio Menezes, pelo companheirismo, pela paciência e pelo carinho a mim dedicado. Por todo sentimento em mim investido, mesmo quando as fronteiras pareciam ser uma barreira;

Aos amigos que ganhei durante a graduação. Sem dúvidas, sem o companheirismo de vocês, suportar a pesada jornada acadêmica teria sido uma tarefa quase impossível. Obrigado por todos os momentos de lazer, que foram muito importantes para a minha saúde mental. Mesmo que não leve todos comigo para sempre na minha vida, estarão na minha memória e a saudade e gratidão serão sentimentos sempre presentes;

Um especial obrigado aos amigos que ganhei durante a Ocupação de 2016. Construir o movimento estudantil e me construir como ser político com vocês foi um momento inesquecível e um diferencial na minha formação;

Aos amigos do intercâmbio, em especial a Flora Dimitria e Andressa Mourão, por terem sido minha família e terem me acompanhado neste ano de muito aprendizado e experiências. Alguns amigos, apesar da distância, enchem-me de saudade e gratidão;

Ao Leandro Cavalcante, pela amizade, companheirismo e palavras motivadoras nas mais diversas horas. Um verdadeiro amigo.

Aos meus avós, finalizar minha graduação estudando o cajueiro para mim é muito simbólico, pois, foi através do mesmo cajueiro que meu avô, como catador de caju em plantios de empresas da cajucultura do estado, sustentou uma família inteira, esquivando-se, quando possível, da fome. Hoje, finalizo minha graduação também

com o cajueiro, mas, felizmente, numa posição mais privilegiada, mas que não seria possível sem eles. Obrigado pelo exemplo de amor, solidariedade e trabalho;

À Prof.^a Dra. Kalyne Leal, pelo carinho a mim dedicado durante toda minha graduação, desde a disciplina de Farmacognosia I, Monitoria, Iniciação Científica até o presente trabalho. Sempre orientando com muito amor e se dedicando à arte de educar. Obrigado pelo exemplo de docente e de Farmacêutica;

À Lyara Barbosa, pela dedicação e ajuda na construção deste estudo e pela orientação nos mais diversos momentos da iniciação científica. Com certeza, uma Farmacêutica exemplar que inspira a muitos com sua enorme inteligência e disposição em ajudar;

À Prof.^a Dra Márcia Valéria, que abraçou a ideia deste trabalho e sempre foi muito compreensiva, alegre e excelente profissional;

A todos os componentes da banca, pelas horas dedicadas em contribuir com o presente estudo;

Aos colegas do CEFAC, pela ajuda com os experimentos, em especial a Amanda Lopes, Talita Magalhães, Greyce Luri, Mariana Azevedo pela enorme ajuda nos experimentos *in vitro*.

Ao Centro Acadêmico Rodolfo Teófilo, por ter me ensinado a valorizar cada vez mais a profissão farmacêutica. Por contribuir para minha formação acadêmica, política e crítica. Pelos magníficos momentos proporcionados e pelos amigos que ganhei através desta entidade estudantil;

À Universidade Federal do Ceará, concluir um curso de graduação em uma universidade renomada, em um dos melhores cursos de Farmácia do Brasil é motivo de muito orgulho. Sempre defenderei e lutarei por esta instituição;

Aos meus professores, que contribuíram com seus conhecimentos na minha formação. O curso de Farmácia da UFC conta com excelente quadro docente, empenhados em fazer o melhor para a formação de Farmacêuticos cada vez mais preparados;

São muitos agradecimentos, cada pedaço do meu diploma, cada centímetro daquele papel foi construído junto com muitas pessoas, com muitos momentos, com muitas experiências, com muita energia, que sem dúvidas me impulsionarão na próxima etapa.

A todos um forte abraço e obrigado.

RESUMO

A goma de cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo, exsudado especialmente dos troncos da *Anacardium occidentale* L., possuindo aplicações em diversas áreas, tais como alimentícia e farmacêutica. Tem mostrado propriedades que a qualificam como uso alternativo à goma arábica, com ampla possibilidade de emprego pela indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos. Vários estudos têm demonstrado as atividades farmacológicas e o potencial tecnológico da goma de cajueiro, porém o perfil de segurança deste produto ainda não está bem estabelecido. Nesse contexto, estudos não clínicos de toxicidade aguda são importantes para avaliar, primariamente, a segurança de produtos com potencial uso pela sociedade. O objetivo do presente estudo foi iniciar uma avaliação *in vivo* e *in vitro* da toxicidade não clínica da goma de cajueiro. A goma de cajueiro foi cedida pela EMBRAPA, coletada de plantas expostas ou não ao tratamento com Ethrel® [ácido 2cloroetilfosfônico], aditivo utilizado como estimulante químico para aumentar a produção de goma pela planta. A avaliação da toxicidade em ratos Wistar, tratadas por via oral (dose única) por gavagem, foi distribuída em três grupos experimentais: Controle (água 10 ml/kg); Goma sem Ethrel® (2g/kg); Goma com Ethrel® (2g/kg). Os animais foram observados durante um período de 14 dias, sendo o dia 0 (zero) correspondente ao dia anterior ao experimento e o dia 15 corresponde ao último dia de experimento quando os animais foram eutanasiados. Os animais foram avaliados quanto às alterações comportamentais (teste hipocrático, Malone, 1962), parâmetros bioquímicos e hematológicos antes e ao final do ensaio, bem como foram realizadas análises macro e microscópica do pulmão, fígado e rins. A avaliação da citotoxicidade foi realizada em neutrófilos humanos isolados e submetidos aos testes do MTT e do LDH, que avaliam possíveis efeitos nocivos ao metabolismo celular e à membrana plasmática. Após análise estatística, os pesos dos órgãos dos animais dos grupos goma sem Ethrel® e goma com Ethrel® não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo tratado com água. O grupo goma sem Ethrel® apresentou diferença significativa quando comparado ao dia 0 nos valores de ALT e creatinina. O grupo goma com Ethrel® apresentou diferença significativa quando comparado ao dia 0 nos valores de ALT, ureia, hemoglobina, números de plaquetas e na contagem diferencial de neutrófilos. Quanto à avaliação comportamental, nenhum dos grupos dos animais apresentou qualquer alteração

para os parâmetros avaliados. Os órgãos analisados não mostraram alterações significativas em relação ao grupo controle. Nos testes de citotoxicidade, a goma não apresentou nenhuma alteração célula para as dosagens realizadas, corroborando com os resultados *in vivo*. A goma de cajueiro se mostrou segura, mesmo quando tratada com estimulante químico, na fase aguda do estudo. As alterações encontradas não puderam ser relacionadas a um efeito nocivo da goma de cajueiro.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*. Toxicidade aguda. Citotoxicidade. Goma de cajueiro. Estudos não clínicos.

ABSTRACT

Popularly known as cashew tree, *Anacardium Occidentale* is a Brazilian tree which is typical of tropical climate. Cashew's gum is a complex heteropolysaccharides especially extracted from the trunk of *Anacardium Occidentale*, being applied to several fields such as in Food and Pharmacy areas. It has shown properties which qualify it as an alternative use to Arabic gum, what indicates a potentially efficient possibility to be employed by pharmaceutical, food and cosmetic industries. The present study is relevant as there are several studies which indicate Cashew's gum pharmacological activities and its pharmaceutical technology, however its safety profile is still unknown. In this sense, non-clinical acute toxicity studies are important in assessing the safety of products used by society. The pursued objective in this work was to start out an *in vivo* and *in vitro* evaluation of the non-clinical toxicity of cashew gum. The cashew gum was supplied by EMBRAPA and collected from plants exposed to treatment with Ethrel® (2-chloroethylphosphonic acid) (additive). In what regards to the evaluation of toxicity *in vitro* of cashew gum treated with Ethrel®, it was performed on isolated human neutrophils and subjected to both MTT and LDH tests. Whereas, the *in vivo* toxicity evaluation was made in Wistar rats, orally treated (single dose), and it was distributed in three experimental groups: Control (water 10 ml/kg), Gum without Ethrel® (2 g / kg); Gum with Ethrel® (2g / kg). The animals were observed for a period of 14 days, day 0 (zero) corresponds to the day before the experiment and day 15 corresponds to the last day of experiment, when the animals were euthanized. The animals were also evaluated for behavioral changes (Hippocratic test, Malone, 1962), biochemical and hematological parameters before and at the end of tests, as well as macro and microscopic analysis of the lungs, livers and kidneys were done. After statistical analysis, the weights of the organs of the gum groups without Ethrel® and gum with Ethrel® did not show any significant differences when compared to the vehicle. The Ethrel®-free gum group presented a significant difference when compared to day 0 in the ALT and creatinine values. While the Ethrel® gum group presented a significant difference when compared to day 0 in the values of ALT, urea, hemoglobin, platelet numbers and in the neutrophil differential count. Regarding the behavioral evaluation, none of the groups presented any alteration for the evaluated parameters. The organs analyzed did not show significant changes in relation to the control group. In the cytotoxicity tests, the gum did not reveal any significant cell alteration at the dosages performed, what corroborates with the results *in vivo*. Cashew gum was safe in the acute phase of the study. The alterations found were neither significant nor could be related to cashew gum.

Key words: *Anacardium occidentale*. Acute toxicity. Cashew gum. Nonclinical studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Cajueiro (Árvore, Fruto, Flor e Caule).	12
Figura 02	Produtos Derivados do Cajueiro.	13
Figura 03	Distribuição Geográfica do Cajueiro.	14
Gráfico 01	Avaliação MTT.	26
Gráfico 02	Avaliação LDH - Goma sem Ethrel.	28
Gráfico 03	Avaliação LDH – Goma com Ethrel.	28
Gráfico 04	Avaliação LDH - Ethrel.	29
Gráfico 05	Dosagem sérica de ALT.	32
Gráfico 06	Dosagem sérica de AST.	33
Gráfico 07	Dosagem sérica de creatinina.	33
Gráfico 08	Dosagem sérica de ureia.	33
Gráfico 09	Determinação do CHCM.	37
Gráfico 10	Contagem de plaquetas.	37
Gráfico 11	Determinação VCM.	37
Gráfico 12	Contagem de hemácias.	38
Gráfico 13	Determinação do hematócrito.	38
Gráfico 14	Determinação da HCM.	39
Gráfico 15	Determinação da Hemoglobina.	39
Gráfico 16	Contagem diferencial – Linfócitos.	39
Gráfico 17	Contagem diferencial – Neutrófilos.	40
Gráfico 19	Contagem diferencial - Monócitos	40
Gráfico 20	Contagem diferencial – Leucócitos.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Peso dos órgãos dos animais	31
Tabela 02	Parâmetros Bioquímicos	32
Tabela 03	Parâmetros Hematológicos	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>Anacardium occidentale</i> (Cajueiro)	12
2.2	Polissacarídeo	14
2.3	Gomas	15
2.4	Gomas do Cajueiro	16
2.5	Estudos toxicológicos não clínicos	18
3	JUSTIFICATIVA	19
4	OBJETIVOS	20
4.1	Objetivos gerais	20
4.2	Objetivos específicos	20
5	METODOLOGIA	21
5.1	Materiais	21
5.1.1	<i>Animais</i>	21
5.2.2	<i>Material</i>	21
5.2	Aspectos éticos	21
5.3	Estudos toxicológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	22
5.3.1	<i>Ensaaios de citotoxicidade</i>	22
5.3.1.1	<i>Isolamento de Polimorfonucleares</i>	22
5.3.1.2	<i>Teste do MTT</i>	22
5.3.1.3	<i>Determinação de lactato desidrogenase</i>	23
5.3.2	<i>Ensaaios toxicológicos <i>in vivo</i></i>	23
5.3.2.1	<i>Toxicidade em dose única</i>	23
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1	Ensaaios de citotoxicidade	25
6.1.1	<i>Teste do MTT</i>	25
6.1.2	<i>Teste do LDH</i>	27
6.2	Ensaaios toxicológicos <i>in vivo</i>	31
6.2.1	<i>Avaliação histopatológica</i>	43
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas pela população é uma prática comum desde os primórdios da humanidade. As plantas servem como fonte direta de produtos de interesse para a sociedade; matéria-prima de partida para produção de produtos derivados; moléculas bioativas e protótipos para a síntese de fármacos. Antes da utilização de qualquer substância, seja ela de origem natural ou não, é necessário conhecer sobre a segurança de sua utilização. Existem testes de toxicidade que são realizados com novas substâncias ou novos produtos para se certificar da sua segurança (LAVANDEIRA, 2014).

Testes para avaliação da toxicidade aguda são aqueles em que a exposição à substância em questão é única e pontual. Estudos toxicológicos *in vitro* estão sendo priorizados na atualidade por reduzirem a quantidade de animais utilizados em estudos *in vivo*, obter respostas rápidas e colaborar com o princípio dos “3erres” (redução, refinamento e substituição) (BEDNARCZUK et al., 2010). Contudo, estudos toxicológicos *in vivo* são ainda bastante necessários e utilizados por fornecerem informações importantes acerca da segurança de novas substâncias. Os guias metodológicos para estudos de toxicidade internacionais e nacionais como o guia nº402, que trata sobre toxicidade dérmica aguda da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e o Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológicos Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013) ainda indicam testes em animais para avaliar a segurança de substâncias químicas.

Devido à rica biodiversidade da flora brasileira, muitas pesquisas são realizadas para se obter novas substâncias originárias das plantas nativas brasileiras. A 103ª reunião ordinária do plenário do Conselho Nacional de Saúde já advertia, em 2001, sobre a urgente necessidade do Brasil se desenvolver no âmbito de pesquisa e da tecnologia para a exploração dos recursos naturais nativos, constituindo um mercado de grande relevância (GARCIA e LIMA, 2004).

O cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) é uma planta xerófila, de grande porte, rústica e típica de clima tropical, originária do litoral nordestino do Brasil (LIMA et al, 2004 apud PARENTE et al., 1991).

O cajueiro é uma planta importante para a economia do Nordeste por fornecer

vários produtos, desde o suco obtido do caju (pedúnculo), como a castanha (amêndoa) até as substâncias presentes na planta como lipídeos fenólicos, flavonoides, apigenina, kanferol, quercetina, quercetina-3-O-glicopiranosila, quercetina-3-O-ranminopiranosila, miricetina, agatisflavona, robustoflavona taninos, myoinositol, campesterol, estigmasterol, dentre outros que demonstram a riqueza de compostos químicos encontrados no cajueiro (MOTA, 1982; ARYA 1989). Produtos derivados desta planta despertam interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica como, por exemplo, a goma do cajueiro que é um potencial produto inovador a ser usado como espessante, em substituição à goma arábica que é extensivamente utilizada por diversos segmentos industriais. A goma arábica é importada e possui um custo mais elevado, em relação à goma do cajueiro, além de ser produzida por países localizados em região de conflito, que pode significar um risco de desabastecimento.

A biodiversidade brasileira, bem como de outros países da zona tropical, é rica em polissacarídeos que possuem grande potencial de exploração e aprimoramento tecnológico (FEITOSA, 2009). A goma do cajueiro, que é um polissacarídeo, surge também como mais um produto para estímulo da economia local e desenvolvimento de tecnologias e exploração do potencial da biodiversidade brasileira.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a toxicidade aguda *in vivo* e *in vitro* desse produto obtido a partir da *Anacardium occidentale* a fim de compreender melhor sobre a segurança da utilização da goma em produtos alimentícios e farmacêuticos a serem utilizados pela população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Anacardium occidentale* (Cajueiro)

A *Anacardium occidentale* L., conhecida popularmente por cajueiro, pertence à família *Anacardiaceae*, havendo mais de 12 espécies relacionadas a esse gênero. O cajueiro é uma árvore de grande porte de múltiplo uso, que se desenvolve, geralmente em solos arenosos secos, especialmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (BRAGA, 1960; LORENZI, 2002).

A *Anacardium occidentale* é uma árvore que desperta muito interesse dos pesquisadores e importante para a economia do país. O Brasil é um dos maiores exportadores de castanha de caju do mundo, sendo o Ceará o estado que se destaca neste cenário. Além da tradicional castanha de caju, diversas outras partes da planta são exploradas pela população como, por exemplo, a casca, as folhas, o pedúnculo e o Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC) (Chaves, 2010).

Figura 01 – Cajueiro (Árvore, Fruto, Flor e Caule).

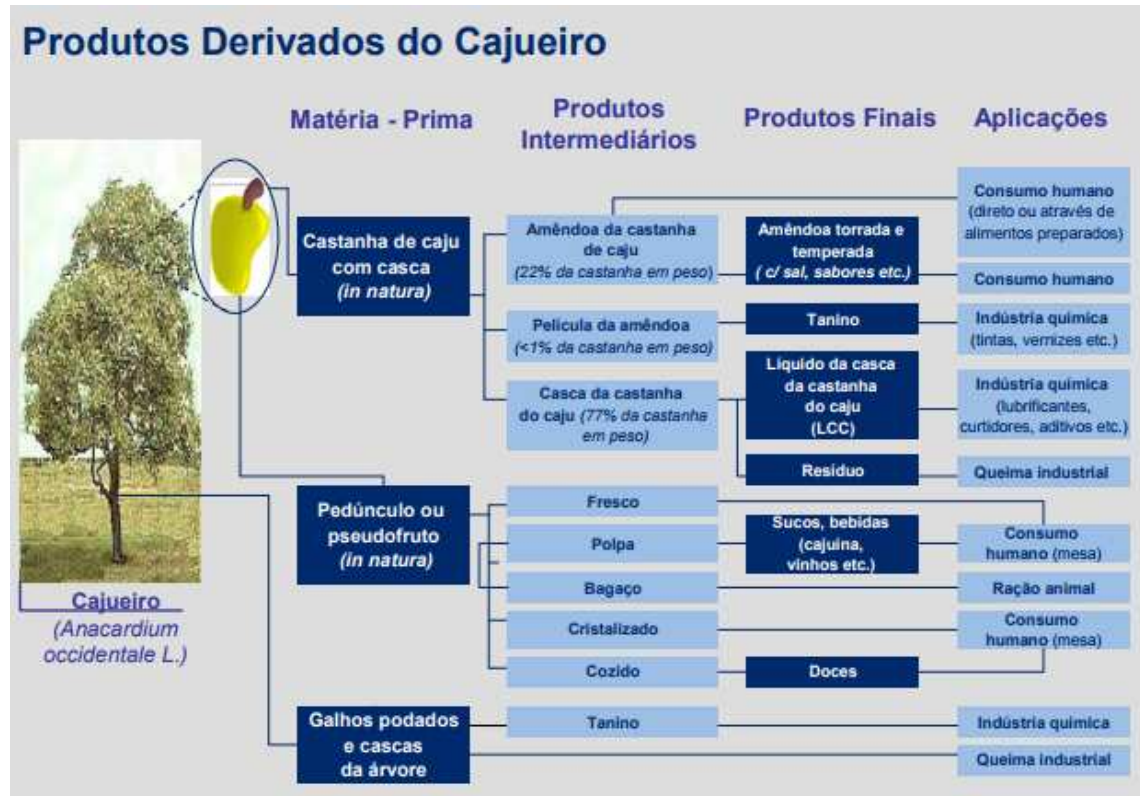


Fonte: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/28/anacardium-occidentale-l/> (Acessado em 22 de novembro de 2017).

Através do conhecimento popular, diversas partes do cajueiro são utilizadas tradicionalmente pela população para tratar diferentes morbidades. A casca é utilizada como antidiabético e também em gargarejos para tratar aftas e infecções da garganta. Não somente o suco do pseudofruto é explorado pela população, o suco

das folhas novas é utilizado como antiescorbuto e no tratamento de cólicas intestinais e a raiz como purgante. (Pio Corrêa, 1926)

Figura 02 – Produtos Derivados do Cajueiro.



Fonte: USAID 2006.

Figura 03 – Distribuição Geográfica do Cajueiro.



Fonte: Silva-Luz, C.L.; Pirani, J.R. 2015 Anacardiaceae na Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4381>. (Acessado em 22 de novembro de 2017)

2.2 Polissacarídeo

Os polissacarídeos podem ser definidos como polímeros, mas, diferentemente de diversos polímeros sintéticos, os polissacarídeos são polímeros naturais.

A palavra polímero deriva do grego poli (muitos) e mero (unidade de repetição). O que caracteriza um polímero são as unidades de repetição, chamadas de monômeros. No caso dos polissacarídeos, as unidades de repetição são os carboidratos, denominados muitas vezes de monossacarídeos que estão ligados entre si repetidamente por ligações glicosídicas. Os monossacarídeos podem formar também pequenas cadeias de carboidratos, sendo chamados de oligossacarídeos (Sebastião, 2002).

Os polímeros são macromoléculas, ou seja, possuem alto peso molecular devido à extensa repetição dos monômeros que se encontram ligados por ligações covalentes. Em um polímero, os monômeros podem se ligar ou interagir de diferentes formas, gerando estruturas completamente diferentes com aplicações igualmente diferenciadas (Sebastião, 2002).

A natureza é uma rica fonte de polímeros, do qual o homem historicamente faz uso. As plantas, algas, animais e minerais podem representar fontes de polissacarídeos com uso na indústria farmacêutica, alimentícia, química e dentre outras.

Estudo realizado por Feitosa e colaboradores (2009) levanta a discussão da agregação de valor econômico à biodiversidade brasileira em especial aos polissacarídeos originários de plantas que compõem a biodiversidade do país, apontando como estratégico o desenvolvimento de tecnologias na área e a exploração sustentável desses recursos.

Existem diversas fontes de obtenção de polissacarídeos. Ainda segundo Feitosa e colaboradores (2009) pode-se extrair polissacarídeos da natureza de diversas fontes como, por exemplo, de algas, animais, fungos, fermentação microbológica ou ainda a partir do exsudato de plantas.

2.3 Gomas

As gomas podem ser definidas, num sentido amplo como qualquer polissacarídeo solúvel em água extraído a partir de vegetais terrestres, marinhos ou microrganismos, possuindo a capacidade de aumentar a viscosidade ou formar géis (FERNNEMA, 1996).

As gomas são substâncias químicas de elevado peso molecular, hidrofílicas, com propriedades coloidais, produzindo em solventes orgânicos como clorofórmio, acetona, etanol, suspensões altamente viscosas, com funções espessantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e aglutinantes. Quimicamente, as gomas são caracterizadas por apresentar sempre ácidos glucurônico, além de açúcares comuns (POSER, 2000).

As gomas são bastante heterogêneas em sua composição, porém a maioria modifica a viscosidade de soluções promovendo um aumento da viscosidade devido à incorporação de água da solução. Na indústria farmacêutica, as gomas são amplamente utilizadas devido a esta característica no preparo de emulsões, suspensões, em sistemas de liberação de fármacos, bem como em cosméticos (SBFgnosia).

As gomas podem ser obtidas a partir de diversas fontes: obtidas de exsudatos como, por exemplo, goma arábica e goma do cajueiro; obtidas de sementes a exemplo de goma locusta e goma guar; extraídas de plantas marinhas como os alginatos e goma ágar; a partir de processos microbiológicos como a goma xantana e por modificação química como as modificações químicas da celulose (SBFgnosia).

Com exceção do amido e seus derivados, a maioria dos polissacarídeos, apesar de sofrer hidrólise ácida e enzimática liberando diversos açúcares como arabinose, glucose e galactose, passam pelo trato gastrointestinal com pouca ou nenhuma modificação não apresentando valor calórico (SBFgnosia).

2.4 Goma de cajueiro

Um promissor produto oriundo do cajueiro é a goma extraída do exsudato do caule da planta. Segundo Paula et al. (1995), a goma do cajueiro, extraída de árvores da região Nordeste, é um heteropolissacarídeo ramificado que contém β -D-

galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4-6,5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa.

Diversos pesquisadores estudam as utilizações desta goma. Leite et al. (2013) estudou a utilização da goma do cajueiro como redutor e estabilizador de nanopartículas de prata com potencial efeito antibiótico, demonstrando significativa atividade sobre bactérias gram-negativas.

Outra importante empregabilidade da goma do cajueiro bastante estudada é como carreador de fármacos e na microencapsulação, a exemplo de Rodrigues et al. (2008) que estudou a microencapsulação do café utilizando a goma do cajueiro para proteger os aromas com resultados satisfatórios e comparáveis a microencapsulação realizada utilizando goma arábica.

Além da clássica utilização das gomas para fins farmacotécnicos como agentes que alteram a viscosidade como, por exemplo, agentes espessantes, estabilizadores, suspensores, gelificantes e dentre outros, outras funções mais modernas e tecnológicas estão sendo investigadas para uso farmacêutico dessas gomas de origem vegetal. No caso da goma do cajueiro, estudos anteriores mostram a sua aplicação principalmente como carreadores de fármacos. Segundo Paula (2010), “A goma do cajueiro possui propriedades semelhantes à goma arábica, podendo ser empregada como agente encapsulador em sistemas de liberação de princípios ativos com aplicações variadas nas indústrias de alimentos, médica, farmacêutica e na agricultura”.

Estudo realizado por Porto et al. (2006) avaliou a utilização de uma emulsão contendo polissacarídeos extraídos do cajueiro no processo cicatricial durante a fase inflamatória de lesões cutâneas, obtendo resultados positivos e estatisticamente significativos, sugerindo uma possível utilização clínica desta emulsão. Este estudo reafirma o conhecimento popular que já utiliza o cajueiro para tratamento de processos inflamatórios.

É possível encontrar diversos estudos avaliando as propriedades técnicas, as características e o desenvolvimento tecnológico da goma do cajueiro, já que esse produto apresenta grande potencial de exploração pelo mercado. Para ser utilizado e comercializado pelo setor farmacêutico é necessária avaliação da segurança na utilização desta goma, logo, faz-se necessário estudo nesta área também.

O polissacarídeo extraído do cajueiro é termossensível e um estudo realizado por Silva (2007) relaciona esta característica à presença de proteínas na

estrutura que compõe o polissacarídeo. Estas proteínas além de serem responsáveis pela estabilidade da estrutura polissacarídica, estão presentes na estrutura devido ao mecanismo de produção da goma pela planta, já que se trata de uma resposta à injúria mecânica ou por microrganismos. Entender a composição e as características do polissacarídeo que compõe a goma é importante tanto no desenvolvimento de tecnologias, utilizando este insumo, quanto para entender possíveis efeitos toxicológicos ou farmacológicos da goma do cajueiro.

Existem na literatura diversas metodologias para isolamento da goma do cajueiro. Estudo realizado por Rodrigues et al. (1993) comparou os principais métodos de isolamento, concluindo que o método de Rinaud-Milas é o mais adequado e satisfatório, principalmente para o meio acadêmico.

Para melhorar o rendimento na produção de goma pelo cajueiro, diversos compostos comercializados como estimulantes de crescimento para plantas são empregados. Um destes compostos é o Ethrel®, que possui como princípio ativo o etephon (ácido 2cloroetilfosfônico) sendo um excelente estimulante químico para a extração da goma do cajueiro. Lima et al. (2001) comparou a utilização de alguns agentes químicos estimulantes na extração de goma de cajueiro, obtendo que o etephon 15% promove a melhor resposta em produção de gomas quando comparado a outros estimulantes químicos como, por exemplo, ácido dimetilsulfônico ou o ácido sulfúrico que não apresentou resultados estimulantes satisfatórios.

2.5 Estudos toxicológicos não clínicos

Segundo o Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários para o Desenvolvimento de Medicamentos da Anvisa de 2013, os estudos não clínicos de segurança propostos neste documento incluem: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética.

A Anvisa preconiza no guia acima citado, que métodos alternativos *in vitro* podem ser considerados aplicáveis em substituição aos que utilizam animais pela

questão ética animal envolvida. Métodos, tais como teste do MTT e LDH, são exemplos de métodos *in vitro* que avaliam a toxicidade de substâncias.

São a partir dos ensaios toxicológicos não clínicos que se pode evidenciar se uma substância a qual se pretende utilizar na sociedade possui algum risco associado. Estes estudos são realizados antes do desenvolvimento final de um medicamento ou produto a ser comercializado, pois evita a perda de investimento em substâncias que, embora sejam eficazes, não podem ser utilizadas devido aos efeitos deletérios associados.

Existem diversos guias para condução de estudos toxicológicos não clínicos disponibilizados por agências reguladoras. Internacionalmente, tem-se a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Na Europa, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) define os protocolos para a região. O Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológicos Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária é o guia nacional em que constam protocolos para realização deste tipo de estudo no país.

3 JUSTIFICATIVA

Polímeros naturais têm despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, devido ao seu grande campo de aplicação, particularmente como substitutos de polímeros sintéticos, devido ao baixo custo, baixa toxicidade, boa disponibilidade e excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (TANG, DOU, SUN, 2006). A goma do cajueiro possui característica semelhante à goma arábica, podendo substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica, em cosméticos, e como aglutinante de cápsulas e comprimidos. Já na indústria alimentícia podem ser utilizados como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes. Dessa forma, o polissacarídeo do cajueiro representa uso alternativo, não convencional, podendo ser utilizado para diferentes finalidades, e ser um produto genuinamente nacional e com impacto econômico para o Brasil.

Estudos que atestem a segurança da utilização do polissacarídeo extraído do cajueiro (goma do cajueiro) são extremamente necessários para que esta possa ter suas várias aplicabilidades exploradas pela indústria, como ocorre para a goma arábica ou goma xantana e os produtos finais usufruídos beneficemente pela população.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral:

Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*) (toxicidade aguda) em ratos.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a toxicidade da goma de cajueiro em neutrófilos humano investigando seus efeitos sobre a membrana plasmática e metabolismo celular;
- Avaliar a toxicidade aguda da Goma de cajueiro em ratas Wistar através de estudo comportamental, bioquímico, hematológico e histológico.

5. METODOLOGIA

5.1 Materiais

5.1.1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar fêmeas, pesando aproximadamente 200-350 gramas, de mesma idade e provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina-UFC, alojados em gaiolas com água e ração *ad libitum* e aclimatados com ciclos naturais dia/noite de 12/12h. A alimentação foi retirada 3 horas antes dos experimentos, tendo os animais livre acesso à água.

5.1.2 Materiais

A goma do Cajueiro foi extraída a partir de uma plantação de cajueiro (Pacajus, Brasil), e tratada através de uma metodologia adaptada e descrita por Torquato e colaboradores. Os espécimes foram submetidos a tratamentos com Ethrel® (12% e 24%) para aumentar o rendimento da produção de goma pelo cajueiro.

5.2 Aspectos éticos.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará com o número 79/2014

5.3 Estudos toxicológicos *in vivo* e *in vitro*.

5.3.1 Ensaios de citotoxicidade

5.3.1.1 Isolamento de Polimorfonucleares (PMN)

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %), com viabilidade de $90 \pm 2,0$ % (exclusão com azul de tripan) foram obtidos do subproduto de sangue humano cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE (buffy coat) e isolados de acordo com o método de Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5 % (p/v) para formar gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

5.3.1.2 *Teste do MTT*

A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio MTT (MOSMANN, 1983), que se baseia no fato do brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) ser reduzido pelas mitocôndrias das células viáveis a um sal (formazan), sendo a quantidade deste sal um indicativo da viabilidade celular. As gomas com Ethrel® 24% foram incubadas com os neutrófilos isolados em concentrações crescentes até 200µg/mL de goma. Decorridos 30 minutos de incubação, o meio foi descartado e incubado um novo meio (200µL) contendo 5% de MTT, na concentração de 5mg/ml, em seguida, estas células foram incubadas por mais 3h. Por fim, foi descartado o sobrenadante e adicionado então 150 µL de dimetilsulfóxido puro para a lise das células e solubilização do formazan, nesse instante as placas foram agitadas durante 15 minutos com auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. A ausência da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em triplicata, repetidos em três dias diferentes. Possuindo como controle negativo a solução salina balanceada de Hanks (HBSS) e água, já como controle positivo foi utilizado o triton X – 100 (0,2%, v/v).

5.3.1.3 *Determinação de Lactato Desidrogenase (LDH).*

A citotoxicidade das gomas, com e sem Ethrel® (100µg/mL), e do composto Ethrel® (12 % e 24 %, v/v), sem a presença da goma, foi avaliada pela medida da LDH, enzima presente no sobrenadante após incubação com neutrófilos ($2,5 \times 10^6$

células/mL) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos, através de Kit de detecção (Roche Molecular Biochemicals, UK) de acordo com as instruções do fabricante, tendo o HBSS e a água como controles negativos e o Triton X – 100 (0,2%, v/v) como padrão citotóxico. Os resultados foram expressos como percentual de atividade da enzima LDH.

5.3.2 Ensaios toxicológicos *in vivo*.

Os estudos foram realizados conforme o Guia para Estudos Pré-clínicos da Anvisa (2013) e o GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS – Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. (OECD).

5.3.2.1 Toxicidade de Dose Única.

Grupos de ratos Wistar fêmeas (n=6) foram tratados por gavagem com a goma sem Ethrel® (2g/kg) ou com a goma com Ethrel® (2g/kg) em dose única durante um período não superior a 24 horas, seguindo-se de observação para realização do teste hipocrático. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo (água, 10 ml/kg). Os animais foram observados diariamente durante o período de 15 dias quanto à ocorrência de algum sinal tóxico, inclusive com registro do seu peso corporal semanalmente no decorrer do tratamento. Para avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à coleta de sangue pelo plexo retro-orbital antes do tratamento e no 14º dia após a administração da goma. Após a coleta, os animais foram sacrificados.

5.3.3 Avaliação Anatomopatológica.

Os órgãos dos animais foram pesados, seccionados, analisados macroscopicamente e colocados para fixação em formol a 10% tamponado.

Os órgãos selecionados para análise histológica foram os pulmões, fígado e rins por serem os principais alvos de efeitos tóxicos no que se refere à metabolização e excreção de fármacos.

Os fragmentos dos órgãos foram incluídos em parafina, feitos cortes histológicos de 4,0 micrômetros de espessura, corados por hematoxilina e eosina e examinados por patologista do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará em microscópio óptico comum Olympus BX50 com ocular de 10x e objetivas 10X, 20X e 40X.

5.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Graphpad prism 05 (USA). A comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas usando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo envolveu a avaliação preliminar da segurança da goma do cajueiro exposto ou não ao Ethrel®, composto químico empregado para otimizar a produção de goma pela planta, em neutrófilo humano e em ratas tratadas por via oral.

6.1 Ensaios de Citotoxicidade.

6.1.1 Teste do MTT

O Gráfico 01 representa a porcentagem de células viáveis após exposição a concentrações crescentes (10, 50, 100 e 200 µg/mL) da goma do cajueiro com Ethrel® 24%, comparando com os controles negativos (HBSS e água) e controle positivo (Triton X – 100) com emprego do teste do MTT.

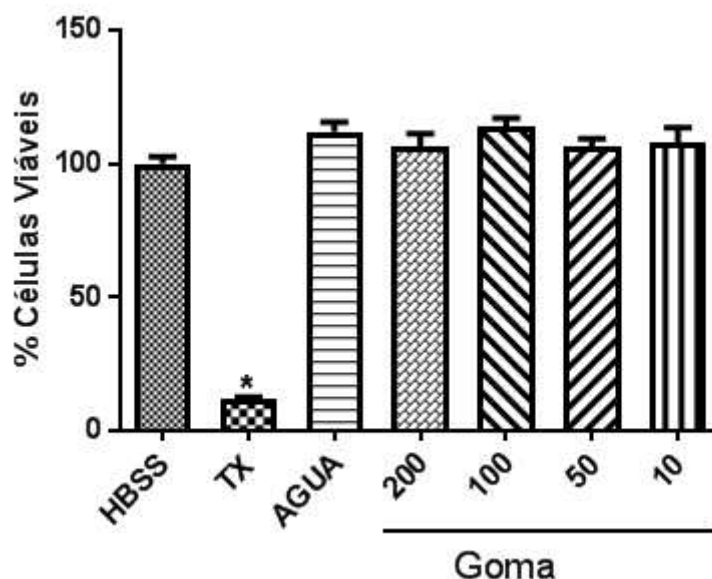
O teste do MTT é um método colorimétrico quantitativo rápido e preciso, com leitura em espectrofotômetro e utilizado para detectar células viáveis, ou seja, capaz de proporcionar a redução do MTT ao sal de formazan através do sistema enzimático succinato-tetrazol redutase que compõe a cadeia respiratória da mitocôndria. Dessa forma, uma concentração de formazan no meio comparável ao grupo não tratado (controle negativo) é indicativa de ausência de citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

Dentre as concentrações da goma de cajueiro investigadas, nenhuma após 30 min de incubação provocou redução da concentração do sal de formazan (10 µg/mL: $108,06 \pm 5,4 \%$; 50 µg/mL: $106,6 \pm 2,7 \%$; 100 µg/mL: $114 \pm 3,1 \%$; 200 µg/mL: $106,5 \pm 4,7 \%$.) em relação ao grupo controle (HBSS: $100 \pm 2,6$ e água: $112,1 \pm 3,4$). Não se observou diferenças significativas entre as concentrações da goma.

Para a solução salina balanceada de Hanks (HBSS) bem como para a água, espera-se que a viabilidade celular ao final do experimento seja alta, já que não apresentam nenhuma substância com efeito citotóxico, funcionando como controle negativo do experimento. A solução salina balanceada de Hanks é um meio nutritivo utilizado para manutenção das células no cultivo celular.

O grupo Triton X – 100 promoveu redução significativa da viabilidade celular ($12,17 \pm 0,5$) em relação ao grupo controle. Este resultado também era esperado, considerando que o triton X- 100 é um surfactante não iônico que promove a lise celular, diminuindo assim a viabilidade celular, razão do seu emprego como controle positivo/padrão citotóxico.

Gráfico 01. Avaliação da toxicidade da Goma do Cajueiro em neutrófilos humano mensurada através do teste do MTT.



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com concentrações crescentes da goma do cajueiro e em seguida foi mensurada a redução do MTT ao sal formazan, relacionada à viabilidade celular. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: água. ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Para a goma, a elevada viabilidade das células encontrada ao final do experimento, comparada ao meio de cultivo e a água (controles negativos) indica a ausência de toxicidade, mesmo em concentrações mais elevadas (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), sobre o metabolismo de neutrófilos humano, não interferindo no sistema enzimático das células.

O presente estudo empregou apenas a goma tratada com Ethrel® em sua maior concentração (24%) para avaliar primariamente algum efeito citotóxico e, caso fosse encontrada alguma diminuição da viabilidade celular significativa, seria realizado o mesmo estudo com a goma sem Ethrel® e com a goma em concentrações diferentes do aditivo.

Estudo realizado em 2011 por Kubo e colaboradores avaliou a toxicidade em células de melanomas de camundongos para dois compostos isolados da *Anacardium occidentale* pelo método do MTT. O estudo mostrou que o ácido anacárdico apresentou citotoxicidade moderada ($IC_{50} = 8 \mu M$), atribuindo este fato a característica surfactante do ácido anacárdico. Já o cardol, também avaliado, não apresentou citotoxicidade no estudo.

Tal estudo, embora não seja realizado com a goma do cajueiro, reforça a necessidade da avaliação da citotoxicidade de produtos derivados do cajueiro, já que o ácido anacárdico é um dos principais compostos presentes em diversas partes da planta.

6.1.2 Teste da LDH

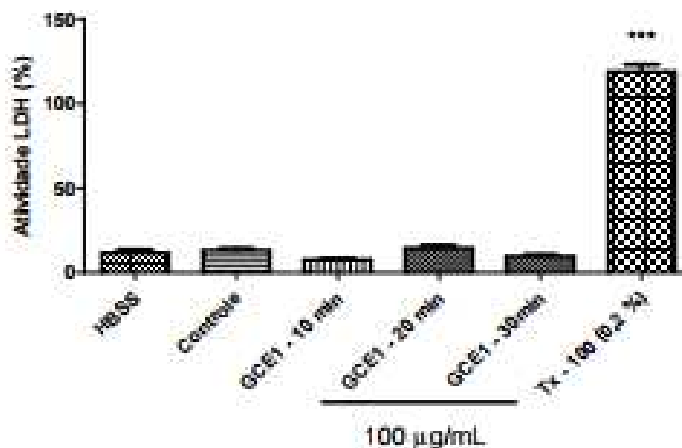
Os gráficos 2, 3 e 4 representam o efeito da goma do cajueiro GCE1 (sem tratamento com Ethrel®), GCE2 (tratamento com 12 % de Ethrel®) e GCE3 (tratamento com 24 % de Ethrel®) nas concentrações de 100 $\mu g/mL$, respectivamente, sobre os neutrófilos.

Observou-se que a suspensão de neutrófilos à goma do cajueiro G0 ($9,84 \pm 0,79 \%$), GE1 ($24,41 \pm 2,49 \%$) e GE2 ($21,67 \pm 2,26 \%$) não promoveu um aumento significativo da atividade da LDH, em relação ao HBSS.

Quando se avaliou o composto Ethrel® sem a presença da goma (12 % e 24 %, v/v), após 30 minutos de incubação, não houve aumento significativo da atividade da LDH ($3,43 \pm 0,68 \%$; $13,61 \pm 2,25 \%$, respectivamente) quando comparado ao grupo HBSS. Por outro lado, o grupo Triton X -100 (0,2 %; v/v), referência citotóxica, elevou em $108,20 \pm 8,60 \%$ a atividade da LDH no meio em relação ao grupo HBSS (Gráfico5).

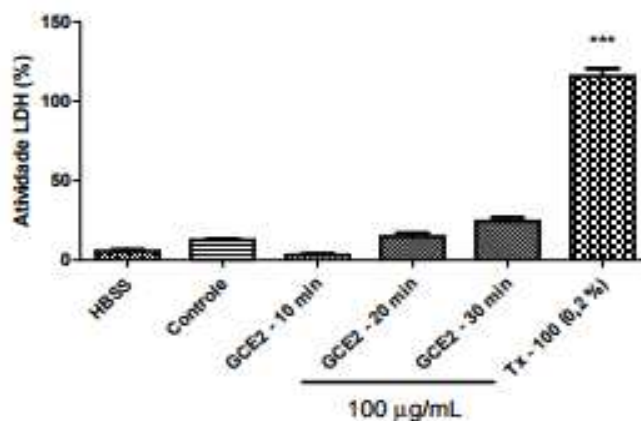
Os resultados encontrados são condizentes com o trabalho realizado por Yurdakok e colaboradores em 2014 que determinou que os valores de IC_{50} do ethephon foi maior que 100 $\mu g/mL$.

Gráfico 02. Avaliação da toxicidade de GCE1 em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



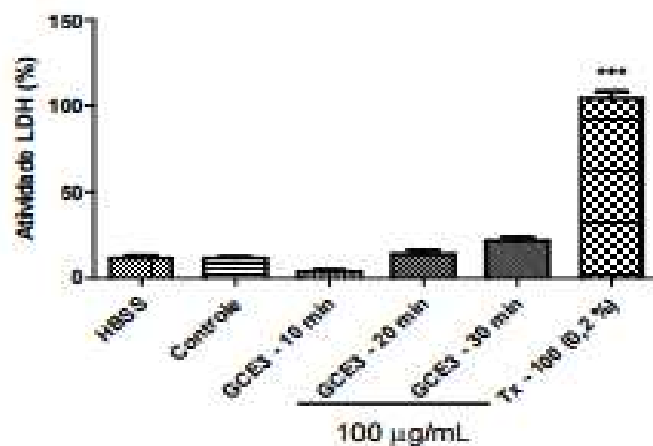
Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com GCE1 (100 µg/mL) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos e em seguida foi determinada a atividade da enzima LDH. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: água. Os resultados estão sendo expressos como percentual de atividade da enzima LDH. * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Gráfico 03. Avaliação da toxicidade de GCE2 em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



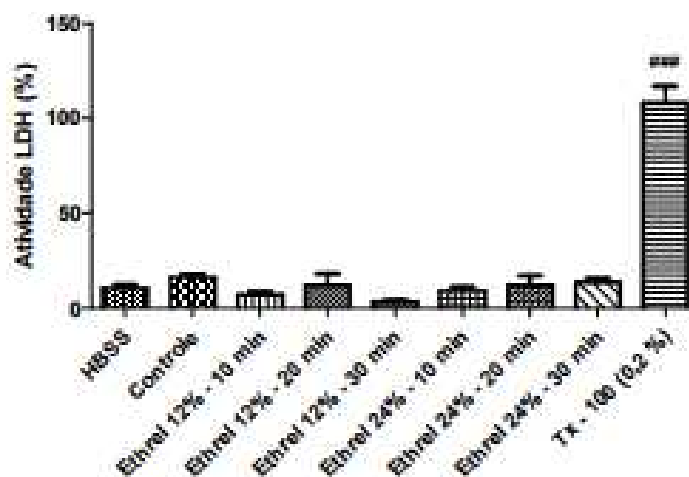
Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com GCE2 (100 µg/mL) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos e em seguida foi determinada a atividade da enzima LDH. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: água. Os resultados estão sendo expressos como percentual de atividade da enzima LDH. * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Gráfico 04. Avaliação da toxicidade de GCE3 em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com GCE3 (100 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos e em seguida foi determinada a atividade da enzima LDH. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: água. Os resultados estão sendo expressos como percentual de atividade da enzima LDH. *** vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Gráfico 05 Avaliação da toxicidade do Ethrel® em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com Ethrel® (12 % e 24 %, v/v) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos e em seguida foi determinada a atividade da enzima LDH. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: água. Os resultados estão sendo expressos como percentual de atividade da enzima LDH. * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente no citoplasma de neutrófilos, responsável pela conversão do piruvato em lactato na presença de

NADH e, somente em circunstâncias em que há uma alteração na integridade da membrana plasmática, esta é encontrada no meio extracelular. Dessa forma, a ausência de aumento significativo da atividade da LDH na suspensão de neutrófilos expostos à goma do cajueiro (tratado ou não com Ethrel®) ou ao Ethrel® sugere que estes não são tóxicos a membrana plasmática dessas células. (BERGMEYER; BERNT, 1963; METCALF *et al.*, 1986).

Diante dos resultados obtidos, a goma do cajueiro parece não alterar o metabolismo e a membrana plasmática de neutrófilos humano, mesmo quando a planta foi exposta ao Ethrel®.

6.2 Ensaios Toxicológicos *in vivo*.

O estudo de avaliação da toxicidade da goma de cajueiro exposto ou não ao Ethrel® foi realizado somente com ratas, pois, segundo consta no guia da OECD nº 423, fêmeas demonstram mais sensibilidade aos efeitos nocivos, com investigação de possíveis interferências desta sobre o comportamento, peso ponderal, parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais, além de análises histopatológicas.

A avaliação da toxicidade aguda de um produto novo em roedores com pretensão de uso em humano, como alimento ou medicamento, é imprescindível e quando realizada à luz das recomendações de guias oficiais para avaliação não clínica (Anvisa, OECD) pode predizer possível toxicidade desse produto com dados relacionados ao seu índice/risco de letalidade, a indução de perda de peso, toxicidade em órgãos alvos e há alterações comportamentais.

Na análise comportamental, não foi evidenciado nenhuma alteração no período de observação (14 dias), não havendo alteração na motilidade, frequência respiratória, sedação, catatonia, analgesia, ptose palpebral, resposta ao tato, diarreia, contorção, agressividade, ereção da cauda, convulsão, coma ou morte.

Quando analisados os pesos dos órgãos coletados dos animais, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos expostos à goma com e sem Ethrel® e o grupo veículo.

Tabela 01 – Peso dos órgãos.

Parâmetros	Veículo (g/100g animal)	G0 (g/100g animal)	GE (g/100g animal)
Pulmão	650,3± 54,24	654,7± 61,23	683,6± 37,17
Baço	201,2± 8,549	201,5± 7,661	214,9± 9,007
Coração	329,4± 17,41	321,4± 11,59	346,1± 12,15
Rins	377,8± 14,86	381,2± 10,27	399± 12,52
Fígado	3805± 198,8	3709± 136,7	3348± 84,77

Veículo: solução salina 0,9%. Goma sem Ethrel® (G0). Goma com Ethrel® (GE)

Os valores dos pesos dos órgãos dentro da normalidade permite analisar primariamente que a goma do cajueiro não apresentou efeitos deletérios evidentes macroscopicamente aos principais órgãos dos camundongos, pois não foi evidenciado aumento de peso significativo, que poderia estar relacionado a algum processo patológico como acúmulos celulares e extracelulares (líquido, gordura, glicogênio), processos inflamatórios ou proliferação celular regenerativa ou neoplásica.

A ausência de redução dos pesos dos órgãos evidencia que não houve morte de células significativa. Tais informações concordam com as obtidas pelas análises in vitro realizadas pelo presente trabalho que mostrou nenhum dano celular substancial em decorrência do uso da goma do cajueiro sobre os neutrófilos sanguíneos.

Na avaliação bioquímica do sangue de ratas tratadas sistemicamente com a goma de cajueiro (dose única), foram evidenciadas diferenças significativas no grupo goma sem Ethrel® com diminuição dos níveis de ALT e dos níveis creatinina. No grupo goma com Ethrel®, observaram-se diminuição dos níveis de ALT e aumento dos níveis de ureia. No grupo veículo, a alteração bioquímica encontrada foi a diminuição dos níveis de AST.

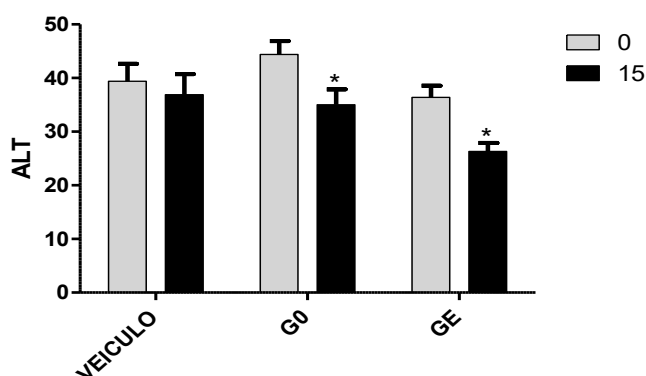
Os resultados dos testes bioquímicos estão representados nas figuras de 8 a 11 e resumidos na tabela 2.

Tabela 02 – Parâmetros Bioquímicos de ratas tratadas por via oral com a goma de cajueiro exposto ou não ao Ethrel® – aditivo agrícola.

Parâmetros	GRUPOS					
	Veículo		G0		GE	
	D0	D15	D0	D15	D0	D15
ALT	39,38 ±3,262	36,88 ±3,852	44,40 ±2,482	35,00 ±2,906*	36,40 ±2,177	26,30 ±1,599*
AST	114,9 ±11,84*	85,33 ±6,946	88,10 ±3,507	88,00 ±9,865	80,50 ±5,598	77,11 ±4,846
Creatinina	0,5000 ±0,023	0,4875 ±0,03	0,5110 ±0,03	0,3940 ±0,03*	0,5311 ±0,02	0,5320 ±0,02
Ureia	53,63 ±2,299	51,25 ±2,491	52,40 ±2,050	51,50 ±2,182	53,33 ±1,772	64,70 ±2,781*

Veículo: solução salina 0,9%. Goma sem Ethrel® (G0). Goma com Ethrel® (GE). D0 e D15: dia zero e dia 14. *=p<0,05 (Teste t de Student).

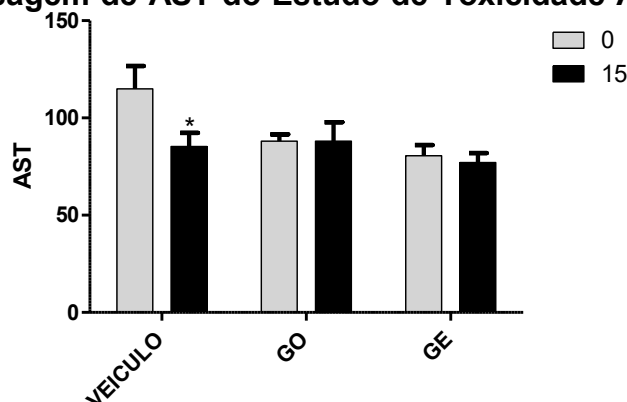
Gráfico 06 – Dosagem sérica de alanina transferase (ALT) do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. das

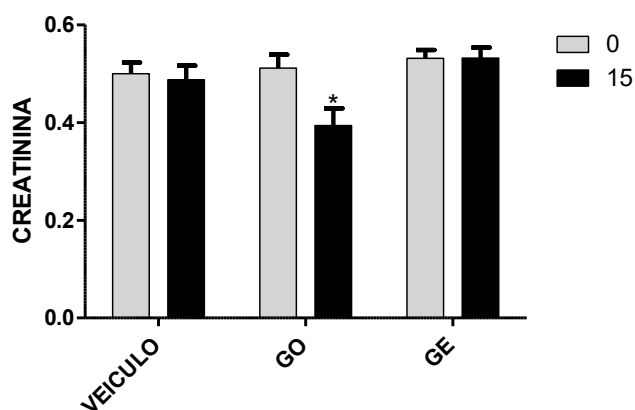
dosagens de ALT. * Indica significância estatística quando comparado ao respectivo grupo no dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test)

Gráfico 07 – Dosagem de AST do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



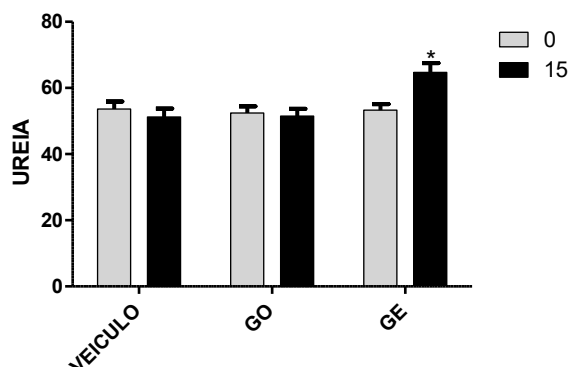
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das dosagens de AST. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 08 – Dosagem de Creatinina do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das dosagens de Creatinina. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 09 – Dosagem de Ureia do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das dosagens de Ureia. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o alfacetoglutarato, sendo enzimas de interesse clínico. Elas estão presentes em diversos órgãos, porém a maior relevância e onde se encontram em maior quantidade, é no fígado e no miocárdio. Quando há um aumento nos níveis destas transaminases pode significar, por exemplo, um dano hepatocelular ou um infarto do miocárdio (MOTTA, 2003).

No caso dos grupos expostos as gomas com Ethrel® e sem Ethrel® houve uma diminuição da ALT e no grupo veículo houve diminuição do AST. Tais informações não demonstram efeitos deletérios na utilização da goma, pois os efeitos tóxicos promovem um aumento nos níveis séricos destas enzimas que são intracelulares, mas que na presença de alguma substância tóxica ou outra desregulação promove um extravasamento e consequente aumento e não uma diminuição. Porém, um efeito inibidor da excreção ou da síntese das enzimas pelo fígado devem ser melhor investigado.

Creatinina é resultado da desidratação da creatina muscular sendo um resíduo metabólico de bastante interesse clínico para se avaliar danos renais, já que sua concentração plasmática reflete a condição de filtração dos rins. Quando há

algum dano renal, observa-se uma diminuição na taxa de filtração glomerular e consequente elevação dos níveis plasmáticos de creatinina. A diminuição dos níveis plasmáticos não apresenta significação clínica (MOTTA, 2003).

No caso do grupo exposto goma sem Ethrel® houve uma diminuição dos níveis de creatinina o que não representa um efeito tóxico agudo da goma do cajueiro.

A ureia é um resíduo do catabolismo proteico e o seu aumento está relacionado a danos renais, porém sua significância clínica é limitada, pois diversas situações promovem o aumento do nível de ureia como, por exemplo, a dieta e o nível de hidratação (MOTTA, 2003). O grupo exposto à goma com Ethrel® após 15 dias apresentou um aumento significativo na dosagem de ureia em comparação ao dia antes da exposição à goma. Porém, este dado não permite isoladamente concluir um dano renal devido ao tratamento do cajueiro com Ethrel®, pois os demais parâmetros de comprometimento renal como, por exemplo, a creatinina foi mantida dentro da normalidade, ou seja, comparável aos animais não tratados (grupo veículo).

Devido a não ter sido evidenciado neste estudo diminuição nos pesos dos animais, não se pode inferir que a elevação nos níveis de ureia seja devido a um possível aumento do catabolismo.

Quando analisados os resultados das avaliações hematológicas dos animais tratados com a goma do cajueiro (com ou sem Ethrel®), foram evidenciadas diferenças significativas no grupo goma com Ethrel® (após 15 dias de tratamento) com aumento do número de plaquetas, aumento do nível de hemoglobina e aumento do número de neutrófilos em relação ao dia zero (início do estudo, sem tratamento). No grupo veículo houve aumento no nível do VCM. O grupo goma sem Ethrel® não apresentou diferenças significativas em nenhum parâmetro hematológico.

Os resultados dos testes hematológicos estão representados nas figuras de 12 a 22 e na tabela 3.

O aumento no número de plaquetas em relação aos valores normais é chamado de trombocitose e pode ser causado por diversas morbidades, desde anemias até neoplasias na medula óssea, porém pode se elevar também em situações de estresse e medo em que o baço se contrai (contração esplênica) e há uma elevação do número de plaquetas na circulação sanguínea. Deste modo, a elevação das plaquetas no grupo goma com Ethrel® pode ser relacionado ao

estresse do experimento no qual os animais estão submetidos, já que não foi evidenciado nenhum outro sinal clínico relevante. A elevação da quantidade de neutrófilos no grupo goma com Ethrel® pode estar relacionado à infecção subjacente dos animais tratados.

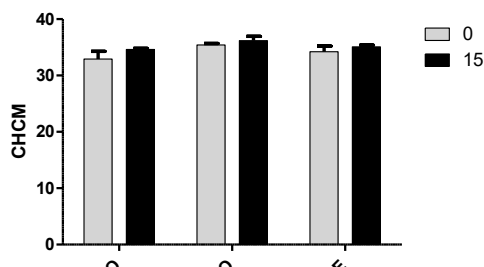
Estudo realizado por Mahshid Hodjat e colaboradores em 2017 avaliou o potencial efeito genotóxico do ethephon (princípio ativo do Ethrel) em linhagem celular de fibroblasto embrionário de camundongos. Concluindo que o composto demonstrou um aumento significativo na proliferação celular 24 horas após o tratamento com 10, 40 e 160 µg/ml de ethephon, enquanto que nas maiores concentrações avaliadas foram observados também efeitos citotóxicos avaliados pelos testes do MTT e LDH. Embora esses efeitos tenham sido observados em células não sanguíneas, estes justificam a importância de estudos adicionais com a goma em associação ao aditivo Ethrel®, com emprego de um protocolo de tratamento dos animais por um período mais prolongado (toxicidade doses repetidas).

Tabela 03 – Parâmetros Hematológicos de ratas tratadas por via oral com a goma de cajueiro exposto ou não ao Ethrel® – aditivo agrícola.

Parâmetros	GRUPOS					
	Veículo		G0		GE	
	D0	D15	D0	D15	D0	D15
CHCM	32,92 ±1,376	34,61 ±0,2165	35,40 ±0,2786	36,17 ±0,7945	34,20 ±1,003	35,08 ±0,3183
HCM	17,88 ±0,8412	19,66 ±0,2918	19,24 ±0,1730	21,09 ±1,085	18,79 ±0,4363	19,50 ±0,2246
HCT	28,02 ±1,967	34,51 ±0,8498	30,67 ±1,074	27,87 ±1,155	24,31 ±1,419	30,76 ±1,012
HG	9,250 ±0,8298	11,96 ±0,3272	10,86 ±0,4253	9,557 ±0,5541	8,350 ±0,5883	10,78 ±0,342*
PLT	529,6 ±97,82	742,8 ±47,11	404,8 ±70,32	502,0 ±28,61	231,2 ±32,23	555,9 ±26,55*
RBC	5,167 ±0,3676	6,081 ±0,1135	5,641 ±0,1993	4,647 ±0,4127	4,432 ±0,2765	5,535 ±0,1774
VCM	54,28 ±0,7821	56,73 ±0,636*	54,40 ±0,4158	58,09 ±1,779	55,01 ±0,5891	55,58 ±0,4582
WBC	6,575 ±0,4090	7,150 ±0,9102	6,150 ±0,7877	5,633 ±1,105	3,111 ±0,1409	5,790 ±0,6579
Monócito	0,7143 ±0,2857	1,125 ±0,2266	0,4286 ±0,2974	0,2857 ±0,1844	0,7000 ±0,2603	1,100 ±0,3786
Neutrófilo	17,83 ±1,990	11,00 ±1,140	10,43 ±1,587	14,17 ±1,851	10,63 ±1,085	22,89 ±2,360*
Linfócito	83,29 ±2,358	82,57 ±3,810	88,71 ±1,392	83,57 ±2,515	85,00 ±2,749	78,20 ±2,943

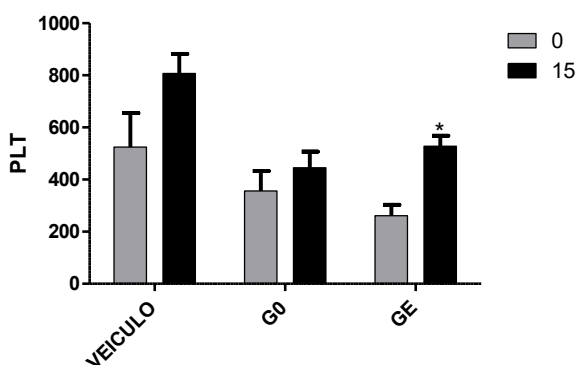
Veículo: solução salina 0,9%. Goma sem Ethrel® (G0). Goma com Ethrel® (GE) . D0 e D15: dia zero e dia 15. *=p<0,05 (Teste t de Student).

Gráfico 10 – Determinação do CHCM do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



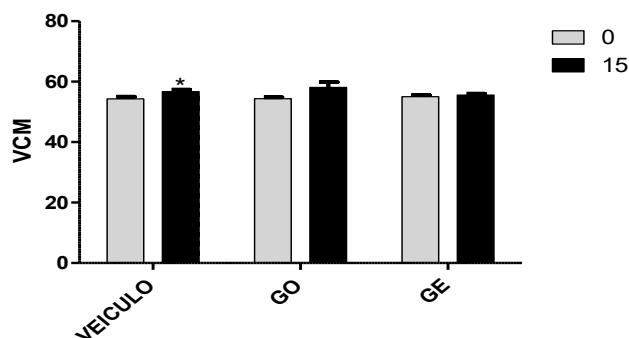
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das determinações de CHCM (g/dL) dos animais. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 11 – Contagem de Plaquetas do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



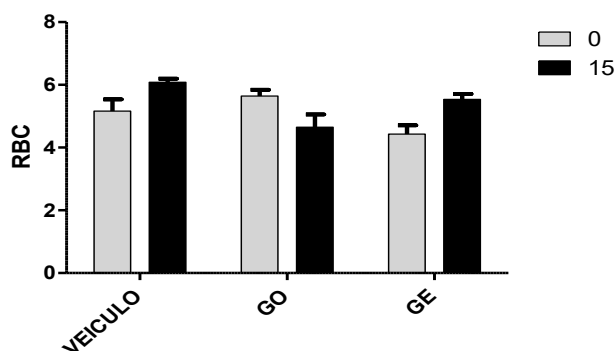
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. quantidade de plaquetas. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 12 – Determinação do Volume Corpuscular Médio (VCM) do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



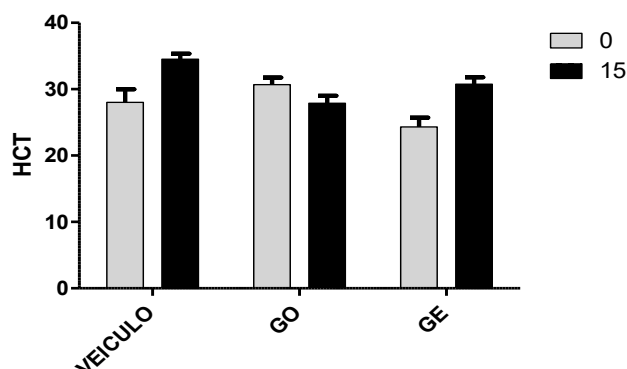
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das determinações do VCM (fl). * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 13 – Contagem de hemácias (RBC) do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



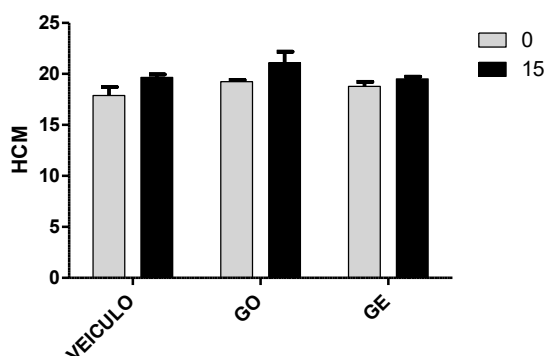
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. de hemácias (106/ μ l). * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 14 – Determinação do Hematócrito (HCT) do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



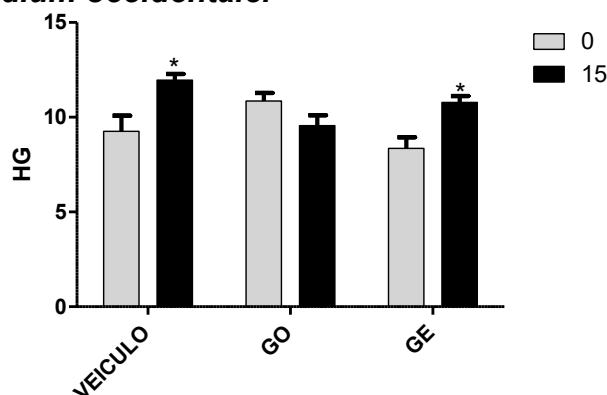
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. dos valores do hematócrito (%). * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 15 – Determinação da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



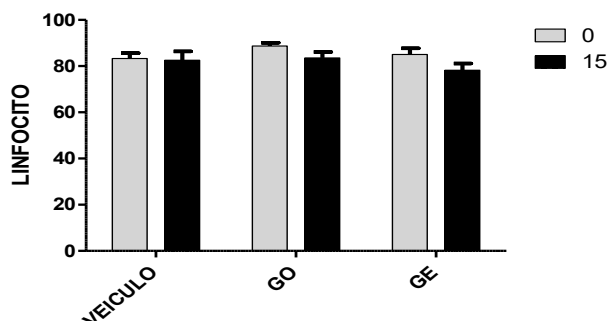
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das determinações de HCM (pg). * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 16 – Determinação da hemoglobina (HGB) do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



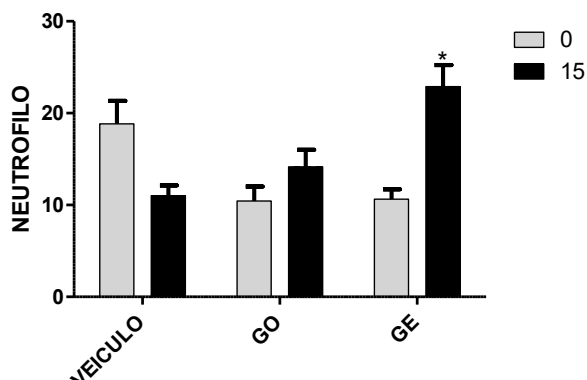
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. das determinações de hemoglobina (g/dl). * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 17 – Contagem diferencial de linfócitos do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



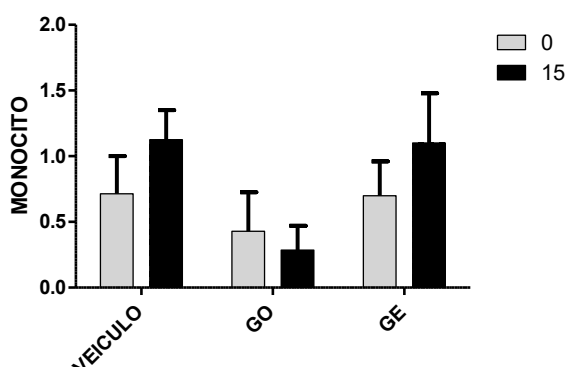
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. da quantidade de linfócitos. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 18 – Contagem diferencial de neutrófilo do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



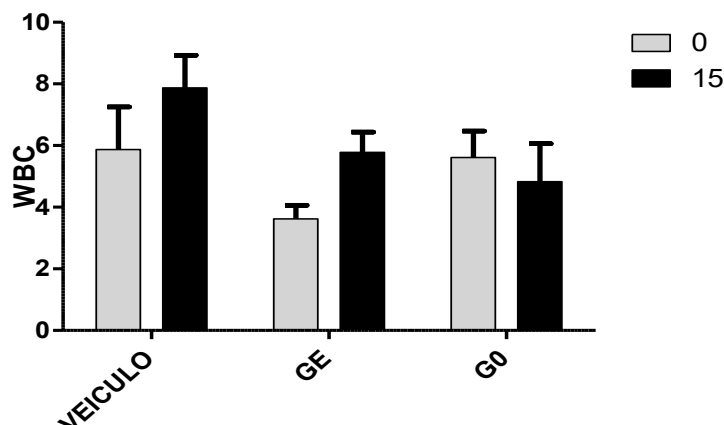
Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. da quantidade de neutrófilos. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 19 – Contagem diferencial de Monócitos do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. da quantidade de monócitos. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

Gráfico 20 – Contagem de Leucócitos do Estudo de Toxicidade Aguda da *Anacardium occidentale*.



Veículo (água 10 mL/Kg v.o.), Goma sem Ethrel® (G0) (2g/Kg v.o.), Goma com Ethrel® (GE) (2g/Kg v.o.) foram administrados no primeiro dia de experimento. O Dia 0 corresponde ao dia anterior às administrações e o Dia 15 ao 14º dia após as exposições às doses agudas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. quantidade de plaquetas. * Indica significância estatística quando comparado com ao dia 0. (n=6, $p < 0,05$; Paired t test).

6.2.1 Avaliação Histopatológica

Nos cortes histológicos dos pulmões dos animais do grupo veículo, que receberam apenas solução salina 0,9%, foi possível observar agregados linfocitários, tecido linfático associado ao brônquio (BALT) e macrófagos xantomizados, consistente com pneumonia aspirativa. Associado a causa de morte havia congestão vascular acentuada, áreas de hemorragia e de atelectasia.

Nas lâminas dos pulmões dos animais do grupo que foi administrada a goma do cajueiro em sua maior concentração (2000mg/kg), foi possível observar aglomerados linfocitários, macrófagos xantomizados, necrose de parede brônquica e alveolar associada à exsudação granulocitária, células gigantes multinucleadas, consistente com bronquiolite aguda intensa e broncopneumonia aspirativa. Associado ao evento de morte havia congestão vascular acentuada, áreas de hemorragia e de atelectasia.

Os achados histopatológicos nos pulmões dos animais sinalizam para eventos inflamatórios decorrentes da broncoaspiração possivelmente no momento da administração por gavagem. Houve histiócitos xantomizados nos pulmões de

todos os grupos, inclusive no grupo controle, sendo que no grupo que recebeu a goma o processo inflamatório foi mais severo e no grupo com a maior concentração da goma foi mais intenso. Para afastar totalmente que estes achados sejam devidos à ação sistêmica da goma nos pulmões e não devido à broncoaspiração seria necessária mudança na maneira de administração da goma.

Nos cortes histológicos de fígado dos animais do mesmo grupo controle foi possível observar aglomerado linfocitário discreto, células apoptóticas isoladas, esteatose discreta de microgotas.

Nos cortes histológicos de fígado dos animais do mesmo grupo que se administrou a goma do cajueiro, foi possível observar discreta esteatose de microgotas. Não se observou necrose, inflamação ou fibrose.

Tanto no grupo controle quanto no grupo da Goma, o fígado mostrou arquitetura preservada, sem alterações significativas que possam ser associadas à substância analisada. Todos os achados histológicos são discretos, sem repercussão na função e vistos no grupo controle. Possivelmente estão relacionados à dieta e a alimentação dos animais

Nos cortes histológicos dos rins dos animais do grupo controle observaram-se congestão cortical e medular, poucos cilindros hialinos, fibrose isolada de glomérulos, pequeno número de linfócitos e deposição de cálcio medular e cortical no interstício. São achados inespecíficos, discretos, provavelmente sem repercussão na função. Podem estar associados à idade dos animais, condições adversas prévias e alimentação. Nos cortes histológicos dos rins dos animais do grupo Goma (2000mg/kg) não foi observada nenhuma alteração.

Estudo realizado por Eber e colaboradores em 2012 demonstrou que a DL50 da goma extraída do cajueiro em coelhos foi superior a 5000mg/kg do animal, evidenciando a segurança da utilização da goma. Tais resultados corroboram com os encontrados no presente.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a goma do cajueiro, oriunda da planta exposta ou não ao Ethrel®, e nas concentrações investigadas não afetou significativamente a viabilidade de neutrófilo humano, quanto ao seu metabolismo e integridade de membrana plasmática.

Na avaliação da toxicidade aguda sistêmica da goma de cajueiro oriunda da planta exposta ou não ao Ethrel®, esta não provocou alterações clínicas nos animais, bioquímicas, e hematológicas importantes. Contudo, é salutar realizar estudos de toxicidade doses repetidas com atenção especial ao efeito da goma sobre os parâmetros hematológicos.

Na avaliação histopatológica de alguns órgãos vitais dos animais tratados com a goma de cajueiro, não foi evidenciado nenhum achado histopatológico significativo que possa ser relacionado ao efeito nocivo da goma do cajueiro.

A avaliação da toxicidade aguda da goma do cajueiro exposta ao Ethrel® (aditivo agrícola) coletada da cidade de Pacajus-Ce é inédito, e propiciou dados que fundamentam o prosseguimento do estudo desse insumo com potencial aplicação em vários ambientes indústrias, incluindo alimentício e farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- ANDRADE, K. C. S. et al. Goma de Cajueiro (*Anacardium occidentale*): Avaliação das Modificações Químicas e Físicas por Extrusão Termoplástica. **Polímeros**, vol. 23, n. 5, p. 667-671, 2013
- Arya R, Babu V, Ilyas M. Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. **J Indian Chem Soc** 66: 67-68. 1989
- BANDEIRA, C. T. **Métodos de extração da goma do cajueiro**. EMBRAPA N°06, jun./91, p.1-, 1991
- BOTELHO M.L. **Propriedades físico-químicas do exsudato de *Anacardium occidentale* L. para a indústria de alimentos**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1999. 113p.
- BRAGA R. **Plantas do Nordeste – Especialmente do Ceará**. 4ª ed. Editora Universitária UFRN. 1960.
- BRASIL. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos**. ANVISA, 2013.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.44, 2010.
- CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(1): 106-112 jan. /Mar. 2010.
- EBERE et al. Solid State Characterization of *Anacardium occidentale* Gum. **Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology** 4(19): 3709-3716 2012.
- FEITOSA, J. P. A. et al. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 649-660, 2009.
- FERNNEMA, O.R.; **Food Chemistry**, Third Edition, Vol 76, Marcel Dekker, Inc, 1996.
- KUBO, I., NITODA, T., TOCOLI, F. E. AND GREEN, I. R. Multifunctional cytotoxic agents from *Anacardium occidentale*. **Phytother. Res.**, 25: 38–45. 2011

LAVANDEIRA, F. M. F.; **Ensaio toxicológicos não clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014.

LEITE, J. R. S. A. et al. Development and Antibacterial Activity of Cashew Gum-Based Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**. 14, 4969-4981, 2013.

LIMA, A. C. Et al. Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (*anacardium occidentale*, L.) **Ciência Rural**, Santa Maria. V.31, nº3, p409-415, 2001

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B.B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-2020, 1984.

Mahshid Hodjat, Maryam Baeeri, Mohammad Amin Rezvanfar, Mahban Rahimifard, Mahdi Gholami & Mohammad Abdollahi. On the mechanism of genotoxicity of ethephon on embryonic fibroblast cells. **Toxicology Mechanisms and Methods** Vol. 27, Iss. 3, 2017.

Malone MH, Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**. 1962; 25: 320-332.

Mota, M. L. R. **Estudo anti-inflamatório e análise química da casca do *Anacardium occidentale* L.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 1989.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório**: princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods** 65, 55-63. 1983

NELSON, D. L.; COX, M.M. 2002. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, Brasil.

OECD (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, **OECD Publishing**, Paris.

Oliveira, L. A. **Caracterização do sistema bifásico aquoso polietilenoglicol-goma do cajueiro**. Dissertação (Mestrado Sistemas de Processamentos e Informática) Campinas, SP. 1999.

PAULA, H. C. B. et al. Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm **Polímeros**, vol. 20, nº 2, p. 112-120, 2010.

PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. Carbohydrate. **Polymer**. v. 26, p. 177-181, 1995.

PARENTE, J.I.G.; PESSOA, P.F.A. de P.; NEMEKATA, Y. **Diretrizes para a recuperação da cajucultura do Nordeste**. Fortaleza: Embrapa-CNPc, 1991. 51p.

Pio Corrêa M 1926. **Dicionário de plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.

PORTO, A. L. F. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria. V.36, nº1. P 149 – 154. Jan-fev. 2006

POSER, G.L; **Farmacognosia - da planta ao medicamento**; Polissacarídeos, Cap. 19, p. 417-431, 2º Edição, Editora da UFSC, 2000.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), **Polímeros: ciência e tecnologia**, ano III, nº1, p. 31-36, 1993.

RODRIGUES, R. A. F. et al. Cashew gum microencapsulation protects the aroma of coffee extracts. **Journal of Microencapsulation**, February 2008; 25(1): 13–20.

SBFgnosia.(Sociedade Brasileira de Farmacognosia) Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/Gomas.html> Acessado em: 21 de dezembro de 2017 às 14h.

SILVA, T. M. **Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) da região centro - oeste: uma análise bioquímica**. 2007.

SEBASTIÃO, V. C. J. ; **Ciências dos Polímeros**: um texto para tecnólogos e engenheiros. São Paulo – Artliber Editora 2002.

TANG, M.; DOU, H.; SUN, K. One-step of dextran stable nanoparticles assisted by self-assembly. **Polymer**, 47, 728-734, 2006.

USAID. **Inserção de Micro e Pequenas empresas no mercado internacional**. Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional. 2006.

Yurdakok et al. Cytotoxic effects of etephon and maleic hydrazide in Vero, Hep2, HepG2 cells. **Drug Chem Toxicol**; 37(4): 459–465 2014.