

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCA DAS CHAGAS DE SOUSA ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE INFUSÕES DE FOLHAS DE  
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* Lin) FRENTE A BACTÉRIA *Streptococcus mutans*

SOBRAL – CE

2011

FRANCISCA DAS CHAGAS DE SOUSA ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE INFUSÕES DE FOLHAS DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* Lin) FRENTE A BACTÉRIA *Streptococcus mutans*

Dissertação submetida à Coordenação de Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos

SOBRAL – CE

2011

FRANCISCA DAS CHAGAS DE SOUSA ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE INFUSÕES DE FOLHAS DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* Lin) FRENTE A BACTÉRIA *Streptococcus mutans*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof.Dr. Jorge Luís Martins  
Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Á Deus por ter me dado força e  
sabedoria para realização deste  
trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, perseverança e sabedoria para conclusão desse trabalho;

Aos meus pais Francisco Alves de Sousa e Maria Lêda de Sousa por investirem nos meus estudos e acreditando no meu esforço para que eu pudesse ter um futuro promissor. Obrigado, vocês são um exemplo na minha vida, sem o apoio de vocês eu não teria estrutura para concluir esse trabalho;

Ao meu irmão Felipe e sua esposa Nayra por ter me ajudado tantas vezes que precisei ao ter que pesquisar artigos e referências bibliográficas, muito obrigado que vocês possam ter as bênçãos de Deus cada vez mais;

Ao meu amor Magdiel Matos Pacheco por não medir esforços nos momentos em que mais precisava, agradeço por seu apoio, por me transmitir segurança e por compreender nos momentos de minha ausência. Obrigado pelo seu companheirismo, amor e fidelidade;

A grande amiga Márcia Machado Marinho, seu esposo Emanuel Marinho e sua filha Emanuelle Marinho por sempre me receber de braços abertos em sua casa em Fortaleza todas as vezes que precisei para que esse trabalho fosse concluído. Obrigado por sua amizade e pela pessoa maravilhosa que você é;

A colega e amiga Eveline Matias Bezerra pela amizade e companheirismo durante o curso nos momentos de alegrias, dificuldades e de descontração que vivemos juntas, jamais esquecerei;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão de bolsa DTI-3 no primeiro ano de mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio;

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, *campus* de Sobral representado pelos docentes e funcionários pelo empenho na formação científica e acadêmica de seus pós-graduandos;

Ao Prof.Dr. Ricardo Pires dos Santos, meu orientador, sou grata pela paciência, pelos conselhos, pelo apoio nas atividades acadêmicas e por grandes ensinamentos o qual tenho profunda admiração;

Ao Prof.Dr. Edson Holanda Teixeira pela oportunidade que me deste em estar fazendo parte do laboratório (LIBS) que acabou sendo uma porta aberta para que eu pudesse ingressar na Pós-Graduação;

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Luzia Kalyne Leal do Laboratório de Farmacognosia- Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, por ter se disponibilizado em realizar os testes de citotoxicidade das infusões de folhas de cajueiro *Anacardium occidentale*;

Ao Prof.Dr. Benildo Sousa Cavada do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC,Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL) por ter concedido seu Laboratório para realização dos testes de toxicidade das infusões de folhas de cajueiro *Anacardium occidentale* em *Artemia salina*;

Ao aluno de doutorado em Bioquímica/UFC Mayron Alves de Vasconcelos que também faz parte do nosso grupo de pesquisa e a aluna de mestrado de Engenharia de Pesca/UFC Suzete Roberta da Silva pelo empenho em realizar os testes de toxicidade das infusões em *Artemia salina* colaborando assim com parte dos resultados desse trabalho;

Ao Dr. Victor Alves Carneiro pelas sugestões, dicas e ensinamentos e por sempre estar disposto em tirar minhas dúvidas para que esse trabalho fosse concretizado;

Aos doutorandos do LIBS Vassilipe (Vavá) e Theodora pela presença contínua no Laboratório e sempre dispostos em ajudar no que for preciso;

A mestranda Verônica de Brito por ter participado dos experimentos e da produção dos resultados deste trabalho, obrigado pelo esforço,empenho e dedicação;

A técnica do LIBS e também mestranda Rafaela Mesquita Bastos e Érika de Menezes Rabelo pela amizade desde que entramos como estagiárias no respectivo laboratório;

As mestrandas Monalysa e Denize e ao bolsista Marcos Éber do Laboratório de Bioquímica/UFC/FAMED por ter se disponibilizado em realizar as liofilizações das amostras de infusões de folhas de cajueiro *A.occidentalle*, assim como também a todos que fazem parte do Laboratório de Farmacologia – LAFSOL por ter disponibilizado também o liofilizador para realizar grande parte dos experimentos;

Enfim a todos que fazem parte do LIBS e que colaboraram direta e indiretamente para produção deste trabalho.

“As mãos preguiçosas  
empobrecem o homem, porém as  
mãos diligentes lhe trazem  
riqueza”. Provérbios 10:4

## RESUMO

O cultivo de *Anacardium occidentale* Lin, mais conhecido popularmente como cajueiro, é uma das atividades agropecuárias mais importantes do Nordeste brasileiro. É utilizada na medicina tradicional para fins terapêuticos, incluindo atividade antimicrobiana. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano da infusão de folhas de cajueiro em diferentes horários de coleta frente à bactéria *Streptococcus mutans* e analisar o potencial tóxico e citotóxico das infusões nas concentrações utilizadas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada nos horários de 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19h utilizando a cepa de *S. mutans* UA159. Também foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e foram realizados testes de toxicidade das infusões em *Artemia salina* Leach e citotoxicidade na presença da enzima LDH em neutrófilo humano. Os resultados dos ensaios antimicrobianos mostraram que as infusões de folhas de cajueiro podem estimular, inibir ou não ter efeito sobre o crescimento bacteriano, conforme a hora de coleta e a concentração. Os valores das CIMs foram de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (7h), 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (9-15h) e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (17 e 19h). Ocorreu estímulo no crescimento bacteriano nas concentrações de 15,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (9-19h), 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (15h) e 62,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (15h). A infusão coletada às 7h não apresentou nenhuma concentração de estímulo. Nos testes de Concentração Bactericida Mínima (CBM) as infusões foram consideradas como bacteriostática. Os testes de toxicidade em *Artemia salina* resultaram em valores para a concentração letal média ( $CL_{50}$ ) de 266,15; 285,48 e 345,15 nos horários de coleta de 11, 17 e 19h, respectivamente. Assim, para esses horários de coleta as infusões foram consideradas atóxicas nos seus valores de CIMs (125 e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os testes de citotoxicidade mostraram que as infusões não são tóxicas nas concentrações de 1, 10, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* Lin, folhas, infusão, *Streptococcus mutans* e toxicidade

## ABSTRACT

The cultivation of *Anacardium occidentale* Lin, more known as cashew tree, is one of the most important agriculture and stock-breeding activities in the northeast of Brazil. It is used in traditional medicine with therapeutic purposes, including antigerm activity. The objective of this work is to check the antigerm potential by infusing the leaves of the cashew tree in different hours of collection before the bacterium *Streptococcus mutans*. Its objective also includes the analysis of the toxical and cytotoxic potential of these infusions in used concentrations. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined in the time-tables 7,9,11,13,15,17 and 19H using the cepa of *S.mutans* UA159. It was also determined the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), when tests of toxicity of infusions were done in *Artemia salina* Leach and cytotoxicity in the presence of LDH enzyme in human neutrophil. The results of the antigerm samples showed that the infusions of the leaves of the cashew tree may stimulate, inhibit or not present effects on the bacterium growth, according to the time of collection and concentration. The values of the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) were 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (7h), 125  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  (9-15h) e 62,5  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  (17 e 19h). Some stimulus occurred in the bacterium growth in the following concentrations: 15,62  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  (9-19h), 31,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (15h) e 62,50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  (15h). The collected infusion at 7 A.M. did not present any stimulus concentration. In the tests of Minimum Bactericidal Concentration (MBC), the infusions were considered bacteriostatic. The tests of toxicity in *Artemia salina* resulted in values for the average lethal concentration ( $\text{CL}_{50}$ ) of 266,15; 285,48 and 345,15 in the collection times of 11, 17 and 19h, respectively. Therefore, for the hours of collection the infusions were considered nontoxic in their values of Minimum Inhibitory Concentration (125 e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The tests of cytotoxicity showed that the infusions were not toxic in the concentrations of 1, 10, 100 e 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

Keywords: *Anacardium occidentale*, leaves, infusion, *Streptococcus mutans* and toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Árvore de cajueiro <i>Anacardium occidentale</i> L.  | 18 |
| Figura 2  | Náuplio de <i>Artemia salina</i> sp.   | 26 |
| Figura 3  | Esquema ilustrativo do preparo de infusões de folhas de cajueiro   | 29 |
| Figura 4  | Esquema da disposição das amostras em microplaca   | 31 |
| Figura 5  | Representação do teste de toxicidade aguda com náuplios de <i>A.salina</i>   | 33 |
| Figura 6  | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 7h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano  | 35 |
| Figura 7  | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 9h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano  | 36 |
| Figura 8  | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 11h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano | 37 |
| Figura 9  | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 13h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano | 38 |
| Figura 10 | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 15h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano | 39 |
| Figura 11 | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 17h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano | 40 |
| Figura 12 | Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro <i>A.occidentale</i> coletadas as 19h frente a bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano | 41 |
| Figura 13 | Tubos com infusão, <i>S.mutans</i> e BHI demonstraram crescimento bacteriano de 7 concentrações utilizadas de infusão de folhas de cajueiro frente a <i>S.mutans</i> | 44 |
| Figura 14 | Tubos com clorexidina,contendo <i>S.mutans</i> e meio de cultura BHI. Após um período de incubação em estufa por um período de 24hs                                  | 44 |
| Figura 15 | Efeito da infusão de folhas de cajueiro (FC) durante a ação catalítica da enzima LDH (lactato desidrogenase) em neutrófilo humano                                    | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cada horário de coleta em $\mu\text{g.mL}^{-1}$     | 42 |
| Tabela 2 | Concentração de estímulo de crescimento bacteriano em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em cada horário de coleta. | 42 |
| Tabela 3 | Teste de toxicidade de infusões de <i>A.occidentale</i> L. contra <i>A.salina</i>                      | 46 |

## LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

|                  |  |
|------------------|--|
| ANOVA            | Análise de Variância                           |
| ANVISA           | Agência Nacional de Vigilância Sanitária       |
| BHI              | <i>Brain Heart Inffusion</i>                   |
| BioMol-LAB       | Laboratrio de Moléculas Biologicamente Ativas |
| C.E              | Concentrao Efetiva                          |
| CBM              | Concentrao Bactericida Mínima               |
| CIM              | Concentrao Inibitria Mínima                |
| CL <sub>50</sub> | Concentrao Letal Média                      |
| DL <sub>50</sub> | Dose Letal Média                               |
| DMSO             | Dimetil Sulfxido                              |
| DP               | Desvio Padro                                  |
| EPM              | Erro Médio Padro                              |
| FC               | Folha de Cajueiro                              |
| INMETRO          | Instituto Nacional de Metrologia               |
| LCC              | Líquido contido no mesocarpo da castanha       |
| LDH              | Lactato desidrogenase                          |
| NADH             | Nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido    |
| OMS              | Organizao Mundial de Saúde                  |
| PAE              | Película Adquirida do Esmalte                  |
| PEC              | Polissacarídeos Extracelulares                 |
| PMN              | Polimorfonucleares                             |
| SDS              | Dodecil Sulfato de Sdio                       |
| SUS              | Sistema nico de Saúde                         |
| TAS              | Toxicidade em <i>Artemia salina</i>            |
| UVA              | Universidade Estadual Vale do Acaraú           |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 14 |
| 1.1 Produtos Naturais.....  | 14 |
| 1.2 Infusão Medicinal.....  | 16 |
| 1.3 O cajueiro <i>Anacardium occidentale</i> LIN.....                               | 18 |
| 1.4 Gênero <i>Streptococcus</i> .....   | 20 |
| 1.5 <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 20 |
| 1.6 Patologia da cárie.....   | 22 |
| 1.7 Toxicidade.....   | 24 |
| 1.7.1 Ensaio de Toxicidade com <i>Artemia salina</i> Leach.....                     | 25 |
| 1.8 Citotoxicidade.....   | 27 |
| 2 OBJETIVOS.....  | 28 |
| 2.1 Objetivos Gerais.....   | 28 |
| 2.2 Objetivos Específicos.....  | 28 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 29 |
| 3.1 Preparo das Infusões.....   | 29 |
| 3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....                       | 29 |
| 3.2.1 Análise estatística.....  | 31 |
| 3.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM).....                                      | 31 |
| 3.4 Teste de Toxicidade com <i>Artemia sp</i> .....                                 | 32 |
| 3.4.1 Obtenção dos náuplios.....  | 32 |
| 3.4.2 Teste de toxicidade.....  | 32 |
| 3.4.3 Teste de sensibilidade.....   | 33 |
| 3.4.4 Análise estatística.....  | 33 |
| 3.5 Teste de Citotoxicidade.....  | 34 |
| 3.5.1 Isolamento de polimorfonucleares.....   | 34 |
| 3.5.2 Teste de citotoxicidade: atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)..... | 34 |
| 3.5.3 Análise estatística.....  | 34 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....  | 35 |
| 4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....                                       | 35 |
| 4.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM).....                                      | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3 Teste de Toxicidade em <i>Artemia salina</i> ..... | 45 |
| 4.3.1 Teste de sensibilidade.....                      | 46 |
| 4.4 Teste de Citotoxicidade.....                       | 46 |
| 5 Conclusões.....                                      | 49 |
| 6 Referências Bibliográficas.....                      | 50 |
| 7 Anexos.....  | 59 |

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Produtos Naturais

Ao longo dos anos o homem busca na natureza a cura para os diversos tipos de doenças, principalmente nas plantas. As plantas por sintetizar seus princípios ativos naturais são consideradas verdadeiros laboratórios bioquímicos complexos. Além disso, a medicina tradicional denominada de fitoterapia tem sido recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) como forma de atendimento primário a saúde (COWAN,1999 apud MOURA, 2006,p.17).

Com o avanço da química farmacêutica no início do século XIX, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento de processos biotecnológicos e de síntese orgânica, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originados de plantas (CUNICO *et al.*,2004 apud MOURA, 2006,p.18).

As plantas medicinais são de importante auxílio terapêutico para diversos tipos de enfermidade. Estima-se que aproximadamente 20.000 espécies de diversas famílias são utilizadas para esse fim. Cerca de 80% da população mundial se mantém dependente (total ou parcialmente) de medicamentos a base de produtos naturais. No século XIX foi pela primeira vez documentado experiências científicas sobre as propriedades antimicrobianas dos componentes de plantas. Devido a grande quantidade de efeitos colaterais dos medicamentos disponíveis hoje no mercado farmacêutico tem sido impulsionado a descoberta de novos agentes farmacoterapêuticos em plantas medicinais (KUETE *et al.*, 2008).

Pesquisas relacionadas com o aprimoramento de fitoterápicos já existentes e obtenção de novos fármacos a partir de plantas vêm reassumindo um papel muito importante nos últimos anos, no entanto 30% dos medicamentos produzidos pelos países desenvolvidos são provenientes de produtos naturais. No *Annual Reports of Medicinal Chemistry* no período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e nove eram oriundos de plantas medicinais (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende do uso de fitoterápicos aos cuidados básicos de saúde, até 80% da população da África, 71% no Chile, e 40% na Colômbia entre outros (AGRA *et al.*, 2008).

No ano de 1995 passou a existir normatização oficial sobre os medicamentos fitoterápicos no Brasil. A Portaria n.º 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 31/jan./95, foi revogada de acordo com o artigo 4.º da Resolução da Diretoria

Colegiada n.º 17, de 24/fev./00 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. O artigo 1.º da referida resolução aprovou o regulamento técnico, visando a normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos no Sistema de Vigilância Sanitária (JÚNIOR *et al.*, 2005).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas constituem uma importante fonte de substâncias bioativas. O interesse científico destes metabólitos foi impulsionado com a busca de novos agentes terapêuticos de origem vegetal, devido ao crescente desenvolvimento do padrão de resistência dos microorganismos aos mais usados antimicrobianos atualmente (MBOSSO *et al.*, 2010).

A resistência aos antibióticos é uma das principais questões da OMS para o milênio de acordo com o *World Health Report* (Relatório Mundial de Saúde) de doenças infecciosas de 2000, daí na última década ter-se presenciado um aumento na investigação de plantas como fonte de controle de enfermidades. Devido a disponibilidade limitada e os altos preços dos produtos farmacêuticos, aproximadamente dois terços da população mundial são dependentes de remédios tradicionais (MBOSSO *et al.*, 2010).

Portanto uma abordagem para a descoberta de agentes antimicrobianos provenientes de fitoterápicos baseado na avaliação de plantas medicinais tem sido utilizadas por conter compostos biologicamente ativos. Além disso, agentes antimicrobianos que adquiriram resistência aos microorganismos podem causar infecções graves, especialmente em pacientes imunossuprimidos que são tolerantes ao uso de agentes antimicrobianos (ÖZÇELİK *et al.*, 2005).

Antimicrobianos originados de plantas medicinais com um enorme potencial terapêutico tem-se tornado eficazes no tratamento de doenças infecciosas, ao mesmo tempo aliviando muitos dos efeitos colaterais que são frequentemente associados ao uso de antimicrobianos de origem sintética (KOKOSKA *et al.*, 2002).

As plantas utilizadas na medicina popular como fitoterápicos têm contribuído para a produção de vários medicamentos que atualmente são utilizados na clínica. Como exemplo, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, entre outros. Cabe mencionar que, em 1980, dados da literatura demonstraram que os consumidores dos Estados Unidos pagaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos fitoterápicos. (FILHO *et al.*, 1998).

Têm sido relatado na literatura que as especiarias e as ervas possuem propriedades antibacterianas contra bactérias de origem alimentar e fungos, porém existem poucos dados

ou observações sobre a atividade antimicrobiana de chás de ervas contra patógenos orais. As ervas e os extratos vegetais contêm fitoquímicos com diferentes propriedades biológicas favorecendo a saúde humana e ajudando a reduzir o risco de doença crônica (TSAI *et al.*, 2008). Outro aspecto relevante que deve ser levado em consideração é que grande parte das plantas são desconhecidas sob o ponto de vista científico comparado a quantidade de plantas existentes no planeta, onde entre 250 - 50mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudada fitoquimicamente e uma menor porcentagem tem sido avaliada sob os aspectos biológicos (FILHO *et al.*, 1998).

Tem sido observado um considerável aumento no uso de fitoterápicos, no entanto os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de novos fármacos (HOSTETTMAN, *et al.*, 2003 apud POLITI, 2009, p.2).

## 1.2 Infusão Medicinal

Infusão é definida como uma técnica de extração de plantas, muito usada para a obtenção de chás de plantas medicinais utilizando como solvente a água que, após seu aquecimento à temperatura de ebulição, é vertida sobre o material vegetal moído e, então, deixado a esfriar até a temperatura ambiente antes do uso (PACHÚ, 2007).

Uma variação dessa técnica é conhecida como abafado, em que após a adição de água fervente, a mistura extratante é abafada com uma tampa, evitando assim a perda de material volátil com o vapor do solvente, seguindo resfriamento, em repouso (PACHÚ, 2007)

O chá de origem chinesa tem sido cultivado e consumido pelas suas características de aroma e sabor e propriedades medicinais em mais de 160 países, especialmente asiáticos. As propriedades funcionais do chá são devido a presença de polifenólicos em seu conteúdo (NISHIYAMA, *et al.*, 2010), substâncias que têm sido alvo de grande atenção nos últimos anos, especialmente, por apresentarem atividade antioxidante tendo o chá se tornado uma bebida largamente consumida no mundo. (LIMA *et al.*, 2004).

O conceito de chá e infusão segundo a ANVISA e definido da seguinte forma:

Chás: são produtos constituídos de partes de vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519\\_98htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519_98htm). Portaria 519 de 26 de junho de 1998.

Infusão: método de preparação no qual a água potável, em temperatura acima de 90°C, é vertida sobre o chá que deve permanecer em repouso por tempo determinado, conforme a(s) espécie(s) vegetal(ais). Disponível em: [www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519\\_98htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519_98htm). Portaria 519 de 26 de junho de 1998.

O consumo de chá no Brasil está relacionado a cura de enfermidades, tendo suas principais origens em culturas indígenas, negras e européias. O consumo da bebida no país cresceu e se modernizou no final do século XX, surgindo inclusive uma legislação específica, porém ainda convivendo com o comércio de espécies medicinais por feirantes e o plantio em quintais para o consumo familiar (MORAES-de-SOUSA, 2007).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) e o ministério da saúde têm incentivado o consumo de plantas medicinais, evidenciando a importância dessa fonte como alternativa aos medicamentos alopáticos. Percebe-se que, pouco a pouco, a população brasileira vem ampliando seu acesso aos medicamentos fitoterápicos através do SUS (Sistema Único de Saúde), (ANVISA apud PEREIRA, 2010, p.2).

No Brasil o uso de fitoterápicos tem proporcionado uma grande variedade medicinal-aromática que se justifica pela diversidade do solo brasileiro incentivando a valorização da cultura popular, além de movimentar em milhões a economia brasileira. Contudo, há ausência de dados técnicos (especificações de matéria prima nativa e exportada) que asseguram a qualidade de muitos produtos dificilmente rastreados (ANVISA apud PEREIRA, 2010, p.2).

O chá é comumente usado nos seus países de origem como uma bebida benéfica à saúde em diversos aspectos. O aumento do interesse pela bebida deve-se a estudos que a mostram ser rica em uma substância chamada flavonóide e no benefício por ela proporcionado quanto ao seu consumo. Pesquisadores têm se dedicado aos estudos da eficácia do chá sobre o organismo, bem como investigar as substâncias que promovem esses efeitos. É, no entanto, necessário alguns cuidados com relação a estas conclusões, porque não existem praticamente resultados científicos conclusivos (INMETRO).

No Brasil, durante algum tempo o chá era consumido por pessoas com enfermidades, recomendado para gripe ou indisposição. O conceito de chá mudou e nos últimos anos, a busca dos brasileiros por hábitos mais saudáveis consagrou o chá como alternativa ao café. No inverno atinge seu ponto máximo de consumo, onde as vendas chegam a dobrar. O consumo dessa bebida no país, ingerida quente ou gelada, cresceu 45% entre 2005 e 2007, mas ainda representa menos de 5% do total de bebidas. (INMETRO).

### 1.3 O cajueiro *Anacardium occidentale* LIN.

O cajueiro devido à crescente comercialização dos seus principais produtos: a amêndoa e o líquido contido no mesocarpo da castanha, o LCC ocupa um lugar importante entre as plantas frutíferas. A planta está presente na América Central, África e Ásia, destacando-se a Índia, Vietnã e Brasil como maiores produtores de castanha (70% da produção mundial). No nordeste brasileiro o cultivo do cajueiro é uma das principais atividades agropecuárias, sendo que quase a totalidade da produção de castanha concentra-se nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. A maior parte da produção de castanha e do LCC destina-se à exportação e sua utilização é de grande importância na fabricação de resinas fenólicas e pós de fricção para a indústria automotiva, além de apresentar propriedades medicinais antissépticas, vermífugas e vesicantes. A castanha, é comumente utilizada na alimentação humana (SANTOS, 2007).



**Figura 1.** Árvore de cajueiro *Anacardium occidentale* L. do curso de Educação Física da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

O cajueiro (*Anacardium occidentale* LIN.), pertence ao gênero *Anacardium* da família *Anacardiaceae*. Há cerca de 600 espécies descritas, com dois centros vegetativos: um na Malásia e outro na América Andina. Estendem-se da zona quente até ambas as zonas temperadas. No Brasil conhecem-se aproximadamente 40 espécies (SHULTZ, 1963).

Na literatura tem sido descrita uma série de atividades biológicas para os ácidos anacárdicos dentre elas estão: atividade antitumoral, habilidade em inibir as enzimas tirosinase, prostaglandina sintase e lipooxigenase, também são conhecidos por suas atividades antiacne, antibacteriana, moluscocida e antifúngica. Foram realizados testes com 16 compostos fenólicos isolados de *A.occidentale*, dentre estes, 4 ácidos anacárdicos exibiram

considerável atividade inibitória contra as bactérias Gram-positivas *Streptococcus mutans*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium acnes* levando em consideração o comprimento das cadeias alquílicas destes ácidos que influi na atividade, sendo comparado a atividade destas substâncias com a do ácido salicílico, que também apresentou atividade contra a maioria dos microorganismos mencionados acima. Embora os ácidos anacárdicos apresentem um espectro de atividade limitado contra bactérias, as atividades foram consideravelmente maiores que as apresentadas pelo ácido salicílico. O exemplo que reflete a importância da cadeia lateral dos ácidos anacárdicos para atividade foi dada pelo ácido 6-[8-(Z), 11(Z), 14-pentadecatrienil] salicílico. Quando avaliado contra *S. mutans* e *S. aureus*, mostrou-se 2048 e 64 vezes mais efetivo que o ácido salicílico, respectivamente. Isto sugere que a cadeia alquílica exerce papel importante no aumento da atividade (CORREA *et al.*, 2006).

Para muitos países, incluindo Índia e alguns países africanos a produção de cajú é de importância social e econômica elevada devido a força necessária no campo e para o processamento. Portanto, a identificação de componentes químicos benéficos a saúde poderiam favorecer a sua utilização apresentando um impacto significativo (BRITO *et al.*, 2007).

O cajueiro é uma fonte de compostos fenólicos, incluindo lipídios fenólicos encontrados nas frutas, nas folhas foram identificados dois grupos químicos principais (flavonóides e taninos). Na medicina popular na África Ocidental, bem como na América do Sul usa-se infusão ou decocção das folhas para tratar doenças gastrointestinais (gastrite aguda, diarreia), úlceras na boca, problemas de garganta e hipertensão (KONAN *et al.*, 2007).

É muito comum o uso de decocção ou infusão e extratos alcoólicos ou hidroalcoólicos de plantas medicinais pela população brasileira. Os efeitos cardiovasculares estudados sobre a pressão arterial de coelhos foi reduzido significativamente (89%) pelo extrato aquoso de folhas de cajueiro. Contudo esse efeito não foi inibido pela antropina e adrenalina, e não foi mediada por receptores colinérgicos muscarínicos. Outro ensaio dos extratos aquosos das folhas relataram a inibição *in vitro* de 25% do rotavírus humano e 84,5% de rotavírus símio (KONAN *et al.*, 2007).

Ensaio de citotoxicidade de extrato de folhas de cajueiro em ratos utilizando células tumorais de leucemia linfoblástica humana e a proliferação de células foi inibida de forma dependente da concentração com inibição máxima de 96% nas células tratadas com  $250\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato etanólico de folhas de cajueiro (KONAN *et al.*, 2010).

#### **1.4 Gênero *Streptococcus***

*Streptococcus* são cocos gram-positivos habitualmente ovalados (0,5 a 1,5 $\mu$ m) que se apresentam dispostos isoladamente, em diplococos, cadeias e pequenas massas. Anaeróbico facultativo com metabolismo predominantemente fermentativo. É o gênero predominante da cavidade bucal e algumas espécies elaboram cápsulas e diferentes polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares a partir, exclusivamente, da sacarose. A maioria é denominada de “viridante”, pois suas hemolisinas causam lise parcial de hemácias (LORENZO, 2004).

Por constituírem um conjunto de microrganismos que são uma parte importante da flora normal da cavidade oral, os estreptococos do grupo viridans são conhecidos como estreptococcus orais podendo ser isolados de áreas como a faringe, pele, vagina ou intestino, onde normalmente não são considerados patogênicos, podendo estar envolvidos na sepse e pneumonia em indivíduos que são imunodeprimidos, na sepse e meningite de recém-nascidos e, particularmente na endocardite subaguda, muitas vezes associada a bacteriemia após procedimentos odontológicos. Esses microorganismos têm sido tradicionalmente considerados uniformemente sensíveis a uma ampla gama de antibióticos sendo isolados de infecções piogênicas invasivas em hospedeiros imunocompetentes (CASTILLO *et al.*, 2005).

Embora façam parte da microbiota oral residente, muitas das espécies de *Streptococcus* são considerados agentes infecciosos para o homem e para os animais. É considerado o principal agente etiológico da cárie dentária, além de ser um importante agente na ocorrência de endocardite infecciosa (LOESHE, 1986 apud BEVILACQUA, 2006, p.6).

#### **1.5 *Streptococcus mutans***

No início do século XX os estreptococos do grupo mutans foram primeiramente isolados em crianças inglesas e descritos como estreptococos “mutantes”, visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros estreptococos (MATTOS – GRANER, 1999 apud BARBIERI, 2005, p.9).

Os estreptococos do grupo mutans têm sido considerado como importante agente patogênico, habita na cavidade bucal estando predominantemente associados ao início e a patogenia da cárie dental (BARBIERI, 2005). Apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença de sacarose no meio bucal que permitem a sua aderência e conseqüente colonização da superfície lisa do esmalte dental, favorecendo seu posterior acúmulo

(TEIXEIRA, 2005). Assim a superfície dos dentes, destinada a formar cárie estão freqüentemente associadas com a placa em que *S.mutans* constitui uma elevada porcentagem do total da flora cultivável (ALALUUSUA *et al.*, 1995).

Apesar dos estreptococos do grupo mutans serem encontrados em praticamente todos os indivíduos desde alta, baixa ou muito baixa prevalência de cárie, deve-se levar em consideração a concepção de sua natureza multifatorial como doença, as quais estão sujeitas às próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população, porém a simples detecção destes microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento de cárie. Dentre as condições envolvidas na prevalência da cárie destacam-se a dieta com alto teor de sacarose e a qualidade dos hábitos de higiene bucal como fatores fundamentais para a ocorrência da patologia da cárie (CARLSSON *et al.*, 1985; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; BRATTHAL *et al.*, 1992 apud BARBIERI, 2005, p. 8).

*Streptococcus mutans*, além de ser conhecido por ser uma das principais bactérias causadoras da cárie dental em humanos tem sido relatado como causador de 2 a 14% de endocardite infecciosa por estreptococcus em ratos. Numerosos estudos de diversas populações constataram que *S.mutans* tem sido isolado mais frequentemente do que *S.sobrinus* da saliva e placa dental. (TAKADA e HIRASAWA, 2005). Estas bactérias possuem habilidade em sintetizar glucanos insolúveis em água a partir da sacarose, que medeiam a sua adesão em superfícies de dentes contribuindo para a formação do biofilme dental. A formação do biofilme é fundamental para a progressão da cárie dentária e, assim, a inibição deste fator é uma das estratégias usadas atualmente para prevenir esta doença (ANTONIO *et al.*, 2010).

Relatos na literatura sobre microorganismos relacionados com a cárie mostraram que alguns fitoterápicos podem interferir na sobrevivência e fatores de virulência de *S.mutans*. Assim as plantas medicinais representam uma fonte de biomoléculas que devem ser investigadas como terapia adjuvante para controlar cárie dental. Um notável potencial anticariogênico também foi observado para compostos naturais bioativos testado *in vitro* e *in vivo* (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Desta forma, os pesquisadores têm se dedicado ao estudo de fitoterápicos e produtos químicos que oferecem em seus componentes um certo grau de proteção contra o crescimento de bactérias e formação de biofilme (ANTONIO *et al.*, 2010).

## 1.6 Patologia da Cárie

A cárie dentária é causada por um distúrbio na via oral denominado de homeostase, caracterizado por um aumento no crescimento de patógenos oportunistas como por exemplo *Streptococcus mutans*. Tem sido verificada a ocorrência da colonização da superfície do esmalte pela bactéria cariogênica como o início do apego a um filme de condicionamento de derivados de saliva, película adquirida do esmalte (PAE). A PAE é formada em grande parte por adsorção de muitas proteínas salivares heterogêneas sobre a superfície do esmalte ocasionando a aderência de *S.mutans* por mecanismos específicos e inespecíficos, seguido por formação e multiplicação de exopolissacarídeo pelas bactérias para formar um biofilme. Os ácidos liberados pelas bactérias aderidas levam a descalcificação dos minerais no esmalte do dente. Assim, a inibição do crescimento excessivo e formação de biofilme de *S.mutans* é uma das estratégias para prevenção da cárie dentária (ISLAM *et al.*, 2008).

A cárie é uma doença infecciosa, doença transmissível no qual diversos fatores patológicos foram identificadas e que estão relacionados com a progressão da cárie, como por exemplo: a presença de bactérias acidogênicas, como *Streptococcus mutans* e os lactobacilos, disfunção salivar e carboidratos dietéticos (HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008).

A patologia da cárie é caracterizada por ser uma infecção microbiana dos tecidos calcificados dos dentes, um processo dinâmico ocasionado pela perda do mineral que ocorre sempre que há uma alteração no equilíbrio entre a superfície dentária e o fluido da placa, como resultado da metabolização de carboidratos fermentáveis pelos microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Placa dentária é um termo utilizado para as diversas comunidades microbianas, principalmente bactérias, encontradas na superfície do dente e embutido em uma matriz de polímeros de origem bacteriana desenvolvendo naturalmente nos dentes fazendo parte do sistema de defesa do hospedeiro, ajudando a prevenir a colonização do esmalte por microrganismos exógenos e muitas vezes patogênicos (BABPOUR *et al.*, 2009).

A cárie dentária é causada pela interação de diversos fatores que envolvem diretamente o hospedeiro: microrganismo, substrato e tempo, dentre os quais são de grande importância para o estabelecimento da doença, sendo também caracterizada pela perda de minerais dos dentes (hidroxiapatita), devido a ação de ácidos inorgânicos produzidos durante a fermentação bacteriana. Uma dieta rica em carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose, leva a formação de um biofilme dental cariogênico, que consiste de um conjunto

estruturado e não calcificado de microrganismos incorporando em uma matriz orgânica formada por substâncias a partir da saliva e da dieta (LIBÉRIO *et al.*, 2009).

Cerca de 95% da população mundial é afetada por cárie dentária em épocas diferentes de suas vidas o que torna a cárie como uma das doenças mais generalizadas da humanidade, sendo considerada um problema de saúde pública tanto em países pobres quanto em países desenvolvidos. No entanto, desde a descoberta do *Streptococcus mutans* como o agente etiológico da cárie dentária, a atenção dada a esta bactéria tem sido proporcionado ao uso de agentes antimicrobianos como um alvo na prevenção da doença. O consumo de alguns antimicrobianos e a adição de flúor à vários suplementos dietéticos consequentemente leva a uma diminuição na prevalência da cárie dentária, de acordo com a literatura os antibióticos e bactericidas químicos, muitas vezes incomodam a flora bacteriana da cavidade oral e trato digestivo e o desenvolvimento de cepas resistentes a múltiplas drogas, e em alguns casos o uso de flúor não é muito eficaz. (ESPINOSA-CRISTÓBAL *et al.*, 2009).

A cárie dentária é conhecida por ser uma das doenças orais mais comuns por formar um biofilme dental na superfície do dente. Embora a flora oral humana seja bastante complexa e diversa, duas espécies de estreptococos do grupo mutans, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* tem estado envolvidos como os principais agentes etiológicos da cárie dentária. Sua capacidade de produção de glicosiltransferase (GTF) e água para sintetizar glucanos insolúveis a partir da sacarose tem sido um dos fatores de virulência mais importantes destas espécies, o que permite que as bactérias que aderem firmemente à superfície do dente contribuam para a formação da placa dental (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

A placa dental é formada principalmente em duas fases, a fixação inicial e reversível de várias bactérias orais para a superfície do dente, seguido por atividade de glicosiltransferase dependente de sacarose para sintetizar uma camada de glucano insolúvel em que a adesão firme e irreversível de *S. mutans* ocorre formação de microrganismos ácido, incluindo *Lactobacillus spp.*, na placa de ácido láctico eluindo por metabolizar a frutose como fonte de carbono, o que finalmente resulta em cárie dental (CHUNG *et al.*, 2006).

A cárie dentária tem se revelado como uma doença predominante, influenciando desfavoravelmente a saúde geral do indivíduo podendo implicar na diminuição da função mastigatória, alteração do desenvolvimento e da estética facial, além de provocar perturbações fonéticas, causar dor e originar complicações infecciosas com repercussões locais e gerais que podem implicar não somente comprometimentos individuais, mas também em grande

repercussões sócio-econômicas, pelo elevado custo do seu tratamento, pelas suas seqüelas e pela ausência no trabalho ou na escola atingindo um grande número de pessoas, independentemente da raça, sexo, idade ou condição social. (MELO, DOMINGUES, TEIXEIRA,2006; PEREIRA,1990; WHO,1987 apud TAJRA, 2010,p.19).

Estudo epidemiológico da distribuição da cárie também considera uma mudança na população demográfica. Por exemplo, em 2005 um relatório sobre cárie nos Estados Unidos foi relatado que 31% dos adultos com mais de 60 anos tinham cárie radiculares (tratados e restaurados), enquanto a presença de cárie radicular foi inferior a 9%, aos menores de 40 anos. Embora o número de adultos com mais de 60 anos tenham aumentado desde 1988, também fez o número de adultos maiores de 60 anos que manteve os dentes. Progressos significativos foram atingidos na prevenção da cárie na população mais jovem, mas a tendência da doença a nível internacional indica que a prevalência de cárie na vida adulta continua a ser significativo, com 91% dos adultos dentados com idade superior a 20 anos ter experiência de cárie (FONTANA *et al.*, 2010).

Muitos ensaios foram feitos para eliminar *S. mutans* a partir da flora oral. Antimicrobianos como a ampicilina, a clorexidina, eritromicina, penicilina, tetraciclina e vancomicina tem sido muito eficaz na prevenção da cárie dental. No entanto o uso excedente desses produtos químicos podem resultar em desarranjos da flora intestinal e oral e causar efeitos colaterais indesejáveis, como suscetibilidade de microrganismos, vômitos, diarreia e dentes de marcação (CHUNG *et al.*, 2006).

## 1.7 Toxicidade

Toxicidade é definida como sendo os resultados nocivos à saúde provenientes do sistema composto por substâncias químicas e substâncias próprias do organismo, que se evidenciam sobre organismos vivos. Logo, na toxicidade o objetivo de análise é o organismo, onde é determinado o efeito causado por uma substância química ou uma mistura, levando em consideração o tempo de exposição e a concentração (GOLDSTEIN,1988 apud RODRIGUES, 2005,p.41).

Existem três tipos de sistema para realizar testes de toxicidade que são estático, semiestático e de fluxo contínuo. Os de sistemas de teste estático são os mais utilizados para teste de toxicidade agudo, que consiste em não haver troca da solução-teste no período em que os organismos ficam em contato com a solução sendo recomendado para testes com substâncias estáveis, quando o teste é feito tendo período curto de exposição dos organismos à

solução-teste, ou quando a espécie utilizada possui tamanho reduzido, impossibilitando o uso do fluxo contínuo, por provável perda (mortalidade e/ou escape) dos organismos na renovação da solução (ZAGATO e BERTOLLETTI, 2008 apud SILVA,R.S.,2010,p.29).

Toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um curto período após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24hs, tendo como objetivo caracterizar a ação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL<sub>50</sub> (dose letal média). Este parâmetro que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população, é útil para identificar a toxicidade relativa da substância. A CL<sub>50</sub> (concentração letal média) é utilizado para testes de letalidade no caso de inalação ou para peixes no meio aquático (OGA, 2003).

Os testes de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos por conta da facilidade de execução, rapidez e por ser relativamente barato e, por esse motivo, constituem a base de dados ecotoxicológicos. Nestes ensaios geralmente são avaliados a mortalidade ou a efetividade que pode verificar imobilidade ou algum tipo de comportamento apresentado pelos organismos (BIRGE; BLACK; WESTERMAN, 1985 apud SILVA,R.S.,2010,p.29).

Portanto os testes de toxicidade baseiam-se em encontrar uma estimativa da concentração-teste que cause efeito de 50% da mortalidade da população exposta, durante um determinado período de tempo. Tal concentração corresponde à CE (Concentração Efetiva) ou CL<sub>50</sub>, obtidas a partir de dados quantais, como número de vivos e de mortos (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004 apud SILVA,R.S.,2010,p.29).

A fase de náuplio II das artêmias são utilizadas nos testes de toxicidade por ser nesta fase que os indivíduos se alimentam do meio, o que não ocorre com os náuplios na fase I que possuem reserva de vitelo, sendo assim, mais resistentes aos testes e não mostrando dados precisos (VEIGA E VITAL, 2002 apud SILVA,R.S.,2010,p.29).

### 1.7.1 Ensaio de toxicidade em *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* é um microcrustáceo que vive em lagos de água salgada e salinas em todo o mundo pertencente a ordem Anostraca (ausência de carapaça), podendo tolerar salinidades que variam de 3,5 a 70% estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais. Seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas devido ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos. Os ovos de artêmia quando não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a

baixas temperaturas. Quando os ovos de *Artemia salina* são re-hidratados podem eclodir por cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegam à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Por apresentar um ciclo de vida relativamente curto o seu uso é favorecido em testes de toxicidade aguda e crônica (MILANI e ZIOLLI, 2005).

A *Artemia* sp, é um braquiópoda, pertencente ao filo Arthropoda conhecida também como camarão de salmoura. Devido à relativa resistência a fatores de estresse ambiental como variações abruptas de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido esta espécie está distribuída ao longo dos cinco continentes, sendo considerada cosmopolita e adaptada a vários ambientes. Ainda, devido à ampla distribuição geográfica e resistência ambiental desde a década de 50, *Artemia* sp é usada em inúmeros estudos sobre ecotoxicidade (TAS) e na avaliação de produtos como pesticidas, derivados petroquímicos e dispersantes, metais pesados, derivados carcinogênicos e metabólitos de microrganismos. (BEVILACQUA, A.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. 2008).



**Figura 2:** Náuplio de *Artemia* Sp. (Retirado de Google imagens. Palavra-chave fornecida: Náuplios de *Artemia*. Jan. de 2011)

Há trabalhos que tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* em atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras. No intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas, muitos laboratórios de Produtos Naturais vêm inserindo dentro de suas rotinas o isolamento, purificação e elucidação estrutural em diversos ensaios biológicos simples. (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

*Artemia spp* ganhou popularidade como um organismo de ensaio devido à sua facilidade de cultura, tempo de geração curto, de distribuição cosmopolita e da

disponibilidade comercial de seus ovos dormentes (cistos). Dado que os animais de teste de eclosão de cistos são da mesma idade, genótipo e condição fisiológica, o teste de variabilidade é significativamente reduzida (KOUTSAFTIS e AOYAMA, 2007)

O teste de letalidade com *Artemia salina* L. possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo*. O procedimento determina valores de concentração letal média (CL<sub>50</sub>), em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste (SILVA *et al.*, 2009). Uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL<sub>50</sub> estabelecida por Meyer et al. (1982) apresentada em extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, considera-se que quando são verificados valores acima 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , estes, são considerados atóxicos (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

O teste de toxicidade aguda com náuplios de *Artemia sp* é um dos principais ensaios no mundo para medir a toxicidade de substâncias químicas (PIMENTEL *et al.*, 2009)

### **1.8 Citotoxicidade**

Ensaio de citotoxicidade tem sido desenvolvidos em diferentes parâmetros associados a morte e proliferação celular (WEYERMAN; LOCHMAN; ZIMMER, 2005) são amplamente utilizados em estudos de toxicologia *in vitro* (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006) como um parâmetro para a morte celular e a integridade da membrana celular, que pode ser medido pelo citoplasma a atividade da enzima liberada pelas células danificadas. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima estável presente em todas as células, é rapidamente liberado para o sobrenadante de cultura de células a um dano da membrana plasmática (WEYERMANN; LOCHMAN; ZIMMER, 2005).

A LDH é um tetrâmetro de quatro subunidades, podendo existir de cinco diferentes formas, dependendo da origem de subunidades. Um aumento de qualquer forma de LDH no sangue indica algum tipo de dano tecidual (CAMPBELL, 2000).

Ensaio com LDH é comumente empregado para detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após exposição de substâncias tóxicas, o ensaio de fuga da LDH é baseado na medição da atividade de lactato desidrogenase no meio extracelular (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Investigar o potencial antimicrobiano de infusões de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* LIN.) em diferentes horários de coleta frente a bactéria *Streptococcus mutans* a partir da cepa UA159.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de diluição em caldo pelo método de microdiluição em placa a atividade de infusões de folhas de cajueiro (IFC) em diferentes horários de coleta frente a *S. mutans*;
- Determinar Concentração Bactericida Mínima (CBM) das infusões de folhas de cajueiro (IFC);
- Avaliar o potencial tóxico de folhas de cajueiro em *Artemia salina* Leach;
- Avaliar o potencial citotóxico das infusões de folhas de cajueiro em teste *in vitro* em células de neutrófilo humano utilizando a enzima lactato desidrogenase (LDH).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo das Infusões

Para o preparo das infusões foram utilizadas 5g de folhas de cajueiro *A.occidentalle* coletadas no prédio do curso de Educação Física da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA e colocadas em um becker contendo 100mL de água com temperatura de aproximadamente 100°C. A infusão foi deixada em repouso por um período de 10 minutos e em seguida foi filtrada com o auxílio de um funil e filtro de papel Whatman N°1 (adaptado de ALMAJANO *et al.*, 2007). As infusões foram colocadas em tubos de falcon para posterior liofilização. As folhas de cajueiro foram coletadas em sete horários diferentes: 7hs, 9hs, 11hs, 13hs, 15hs, 17hs e 19hs (NASCIMENTO *et al.*, 2006).



**Figura 3:** Esquema ilustrativo do preparo de infusões de folhas de cajueiro.

#### 3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A cepa bacteriana utilizada *S. mutans* UA159 foi retirada do freezer -80°C e em uma câmara de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e descontaminada por luz ultravioleta durante um período não inferior a 15min foi retirada uma alíquota de 50µL de bactéria e fez-se um inóculo em um tubo de vidro com tampa contendo 5 mL de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*), em seguida a bactéria foi incubada a 37° C em uma estufa a 10% de CO<sub>2</sub> por um período de 24h. Passado esse tempo foi retirado a bactéria da estufa a

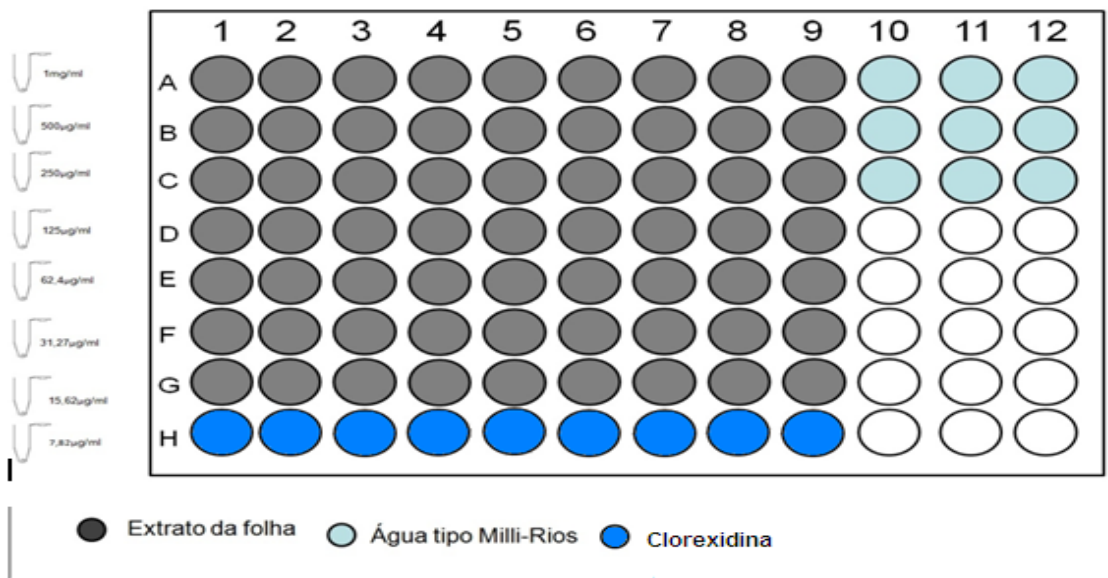
10% de CO<sub>2</sub> e o mesmo procedimento foi realizado sendo a bactéria incubada por um período de 18 h.

Após o período de 18 h de crescimento bacteriano foi distribuído 1 mL de bactéria em tubos (Eppendorf®) estéreis e submetida a um processo de centrifugação a 12000g durante 5 minutos em microcentrífuga previamente refrigerada e mantida a uma temperatura a 4°C. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante era descartado e o pellet da bactéria era ressuspenso em 1mL de água Milli-Rios e submetidas ao mesmo processo de centrifugação anteriormente descritas por mais duas vezes.

Após a realização dessas etapas foram feitas medidas de absorvância da bactéria por meio de leitura em espectrofotômetro a 620nm. De início foram acrescidos 7mL de água Milli-Rios e 1 mL de bactéria em um tubo de falcon estéril e retirado 1mL e acrescido em uma cubeta para leitura no espectrofotômetro. As leituras foram repetidas até ser obtido o valor de absorvância desejado ou aproximado de 0,192 para *S. mutans*.

A etapa subsequente consistia na inoculação das amostras em meio de cultura. Para isso utilizava-se uma placa estéril de microtitulação contendo 96 poços com tampa e em seguida, com o auxílio de pipetador multicanal (Eppendorf®) a placa foi preenchida com 100 µL de meio de cultura 2 vezes concentrado por poço e em seguida era acrescentado 100 µL de infusão e inoculava-se 4 µL de bactéria, foram utilizados clorexidina a 0,12% como controle positivo e água Milli-Rios como controle negativo. Foram realizadas nove repetições de cada concentração de infusão liofilizada (7, 9, 11, 13, 15, 17, e 19h), clorexidina a 0,12% e água Milli-Rios por placa.

Após o processo de inoculação, a microplaca era mantida em estufa bacteriológica com temperatura constante de 37°C a 10% de CO<sub>2</sub>. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi então determinada através de monitoramento espectrofotométrico realizando-se leituras por um período de 24 horas. Foi utilizado o método de espectrofotometria, realizada em equipamento leitor de placa Biotrak II Reader da Amersham Biosciences (GE Healthcare).



**Figura 4:** Esquema da disposição das amostras em microplaca

### 3.2.1 Análise estatística

O efeito das diferentes concentrações de cada infusão preparada com folhas coletadas em diferentes horários, juntamente com o controle positivo (clorexidina), foram comparadas com o controle negativo (água). Todos os ensaios foram realizados em nove repetições e os resultados das medidas de absorbância foram expressos através de seu valor médio  $\pm$  desvio padrão. O teste não-paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para determinar a existência ou não de diferenças estatísticas significativas entre dois grupos (infusão e clorexidina *versus* água). O nível de significância utilizado foi de 0,01 ( $P \leq 0,01$ ).

### 3.3 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (MBC)

Para verificação da concentração bactericida mínima, foram retiradas alíquotas das respectivas concentrações em que não houve um crescimento visível da cultura e inoculado em tubos de ensaios contendo meio BHI caldo incubados com CO<sub>2</sub> (10%) a 37°C por 24 h.

### 3.4 Teste de Toxicidade em *Artemia sp.*

O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular no BIOMOL/UFC (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) sob coordenação do Prof.Dr. Benildo Sousa Cavada.

#### 3.4.1 Obtenção dos náuplios

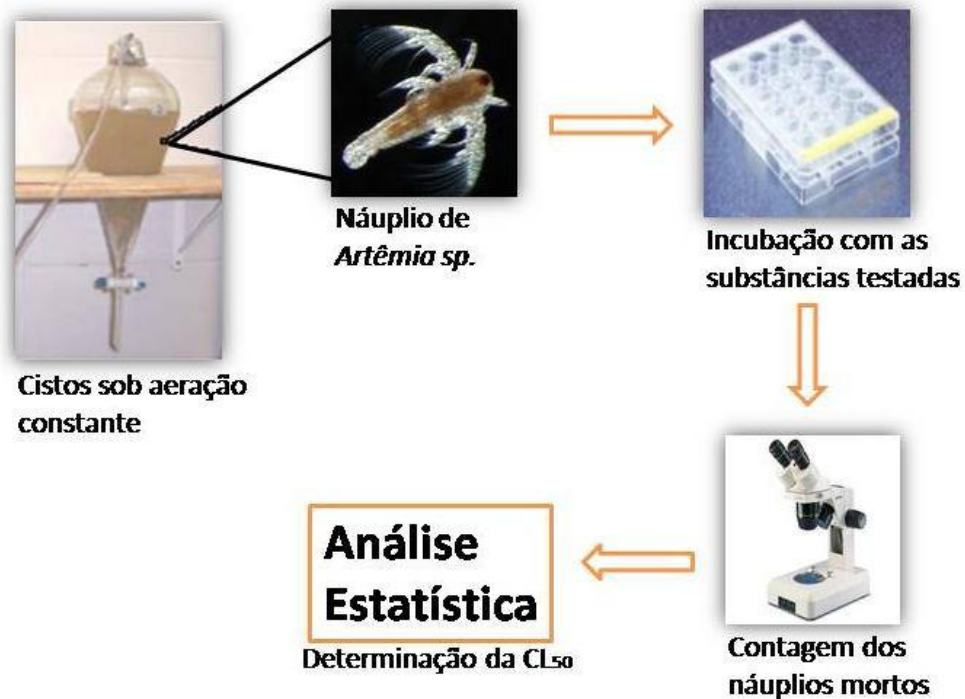
Os cistos de *Artemia salina* Leach foram adquiridos em lojas de aquaristas. Para obtenção dos náuplios pesou-se 30 mg de cistos que foram hidratados durante uma hora em água destilada sob aeração constante. Esse procedimento permite que os cistos desidratados, que possuem forma bicôncava, passem a apresentar uma forma mais esférica e dessa forma sofrer melhor a ação do hipoclorito de sódio por ser um agente desencapsulante.

Após a hidratação os cistos passaram por um tratamento com hipoclorito de sódio na concentração de 50 %, sob agitação constante, até passarem da cor marrom para a cor alaranjada. O hipoclorito de sódio além de diminuir da camada do córion, facilitando a eclosão, também promove a assepsia dos cistos.

Ao atingirem a cor alaranjada os cistos foram imediatamente lavados com água corrente, sem deixar resíduos do agente desencapsulante para que a solução de hipoclorito de sódio não atingisse o embrião, e em seguida lavados com água destilada e posteriormente foram transferidos para um recipiente com fundo cônico com água do mar filtrada, recebendo aeração constante, e após 48 h, os náuplios estavam na fase II, prontos para serem utilizados nos testes de toxicidade.

#### 3.4.2 Teste de toxicidade

As infusões liofilizadas de folhas de cajueiro dos horários de 11,17 e 19h, foram solubilizados em água destilada obtendo-se uma solução estoque na concentração de  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$  e a partir dessa solução estoque fez-se diluições obtendo as concentrações para o teste (1000, 500, 250, 125 e  $62,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e o controle foi utilizado apenas água do mar filtrada. Todas as concentrações e o controle foram feitos em triplicata. Em cada réplica foram adicionados 10 náuplios na fase II. O ensaio foi montado em placas de acrílico estéreis com 24 poços, sendo verificada a mortalidades dos náuplios a cada 24 horas com auxílio de uma lupa. O tempo de duração dos testes foram de 48 horas. Para a aceitabilidade do teste admitiu-se 10% de mortalidade no controle. O esquema do teste de toxicidade está representado na Figura 5.



**Figura 5.** Representação do teste de toxicidade agudo com náuplios de *Artemia sp.* Imagem retirada de Silva, R.S., 2010.

### 3.4.3 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado com o objetivo de verificar se os organismos utilizados estavam dentro do padrão de sensibilidade descrito por (Veiga; Vital, 2002). Nos testes foram utilizados SDS (Dodecil Sulfato Sódio) e as concentrações usadas no teste foram 9, 12, 16, 21, 27, e 35 mg.L<sup>-1</sup>, sendo obtidas a partir da diluição de uma solução estoque com concentração de 1,5g.L<sup>-1</sup>. Para controle do teste, foi utilizado apenas água do mar filtrada. O teste foi realizado em triplicata e cada réplica recebeu 10 náuplios na fase II. Em 24 horas foi determinada a CL<sub>50</sub> contando os náuplios mortos com auxílio de uma lupa.

### 3.4.4 Análise estatística

O cálculo da CL<sub>50</sub> foi realizado com o programa estatístico TSK (Trimmed Spearman-Kärber). O critério de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

### 3.5 Teste de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Farmacognosia localizado no Departamento de Farmácia/UFC sob orientação e coordenação da Prof<sup>a</sup>.Dra. Luzia Kalyne Leal.

#### 3.5.1 Isolamento de polimorfonucleares

Polimorfonucleares (PMN), predominantemente neutrófilos (80-90 %) humano foram isolados de acordo o método de Henson (1971) e modificado por Lucisano & Mantovani (1984). Para tanto, foi empregado um sub-produto obtido durante a produção de *buffy coat* humano realizada pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE.

#### 3.5.2 Teste de citotoxicidade: atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima citosólica, assim sua detecção no fluido extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade celular e, na avaliação da viabilidade celular constitui num método mais sensível do que a técnica de exclusão com azul tripan. O princípio do ensaio constitui numa medida espectrofotométrica do consumo de NADH durante a ação catalítica da LDH que reduz o piruvato a lactato (BERGMEYER & BERNT, 1963; METCALF et al., 1986). A citotoxicidade da infusão da folha de cajueiro (FC) foi avaliada pela medida da LDH em neutrófilo humano, utilizando o kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostica). Para tanto, Neutrófilos ( $2,5 \times 10^6$  células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença do FC nas concentrações de 200, 100, 10 e 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , DMSO (veículo – 1%, controle), Solução salina tamponada de Hanks (HBSS – células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico). A seguir, os tubos foram centrifugados a 755 x g, por 10 minutos a 4°C e ao sobrenadante foi determinada a atividade da LDH.

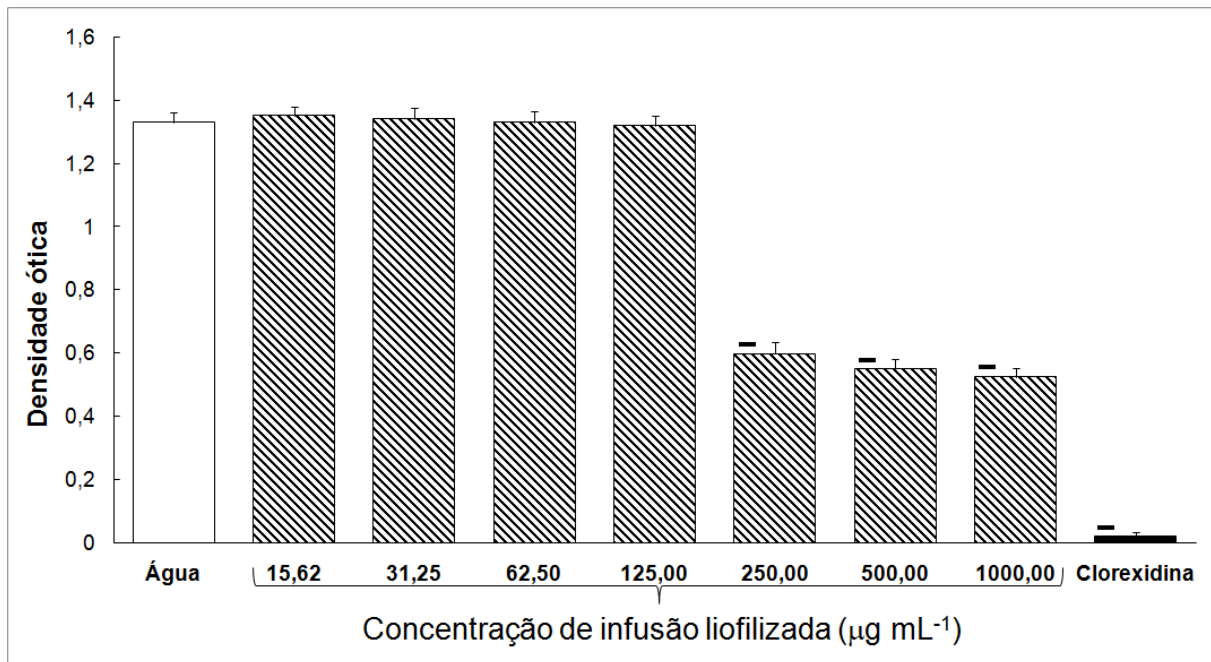
#### 3.5.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou desvio padrão (DP), ou ainda como média e coeficiente de variação (%). As médias foram comparadas utilizando o teste "t" de Student, comparação entre duas médias, ou a análise de variância (ANOVA), onde a significância dos contrastes entre as médias serão estudadas pelo teste de Tukey. O critério de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

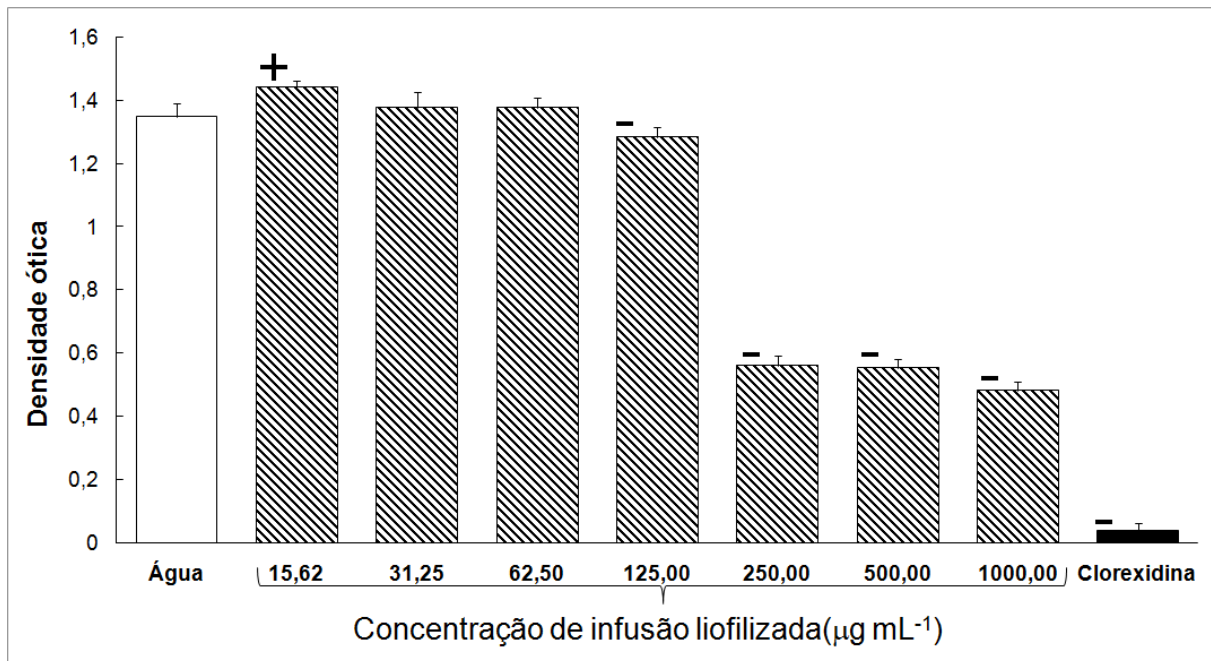
### 4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após a análise podemos observar que há uma diferença na atividade antibacteriana de folhas de cajueiro *Anacardium occidentale* em diferentes horários de coleta frente a *Streptococcus mutans*.



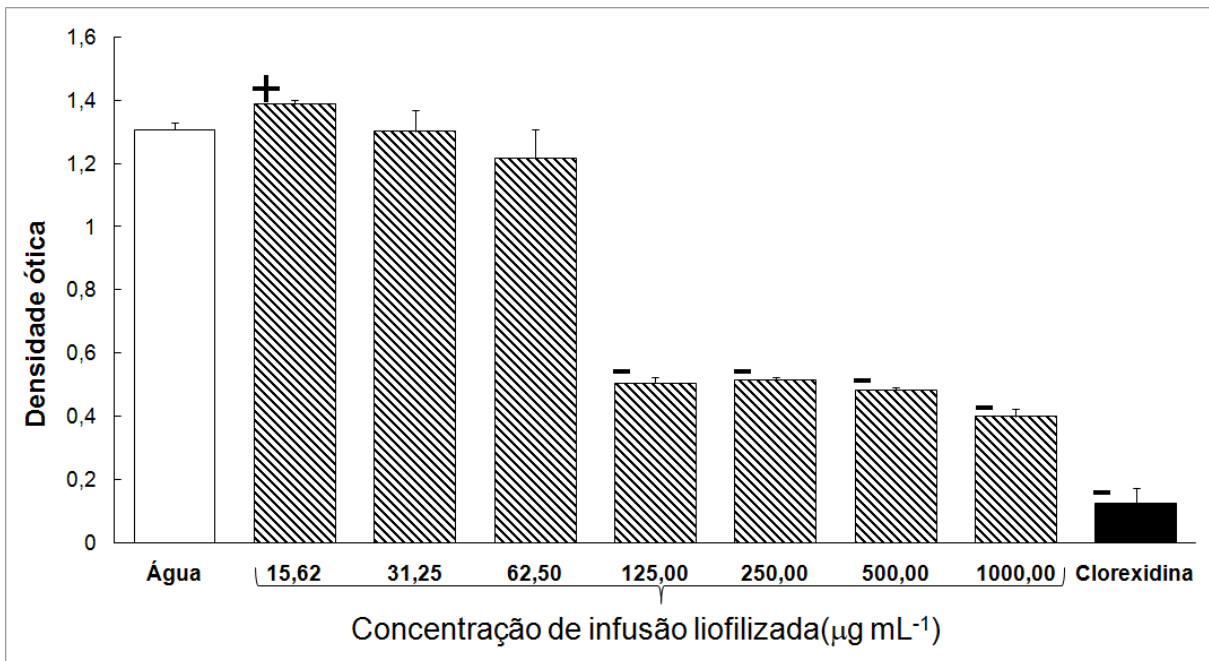
**Figura 6:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 7h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, (-): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo). A clorexidina 0,12% foi usada como controle positivo.

A infusão de folha de cajueiro *A.occidentale* L. coletada as 7h da manhã (Figura 6) apresentou inibição frente a *S.mutans* apenas nas concentrações de 1000,500 e 250µg.mL<sup>-1</sup> comparado com a água (controle negativo) e a clorexidina usada como controle positivo apresentou-se como bactericida a 0,12% comparada com a infusão de folhas de cajueiro, onde (-)  $p < 0,01$ .



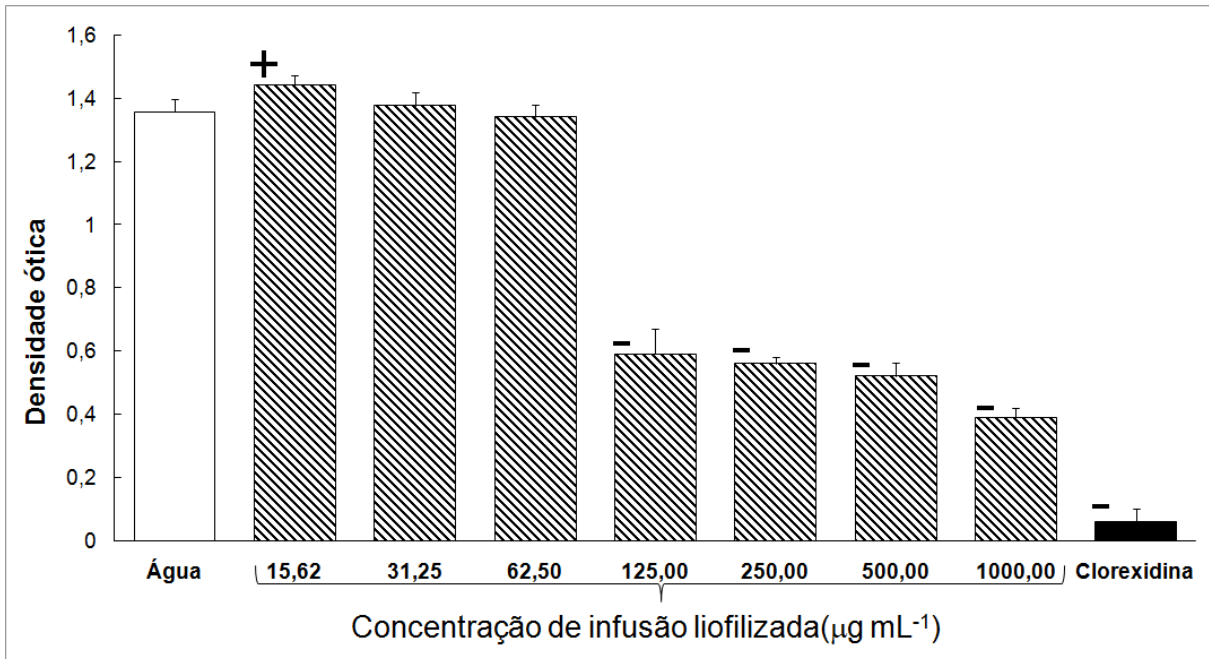
**Figura 7:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 9h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, ( - ): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo) e (+): indica a concentração em que ocorreu estímulo em relação a água (controle negativo). A clorexidina 0,12% foi usada como controle positivo.

As folhas de cajueiro coletadas as 9h da manhã (Figura 7) para preparo das infusões apresentou inibição até a concentração de  $125\mu\text{g.mL}^{-1}$  comparado com a água (controle negativo), no entanto a concentração de  $15,62\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou estímulo de crescimento bacteriano em relação a água e a clorexidina 0,12% apresentou-se como bactericida comparado com a infusão de folhas de cajueiro, onde  $(-) p < 0,01$ .



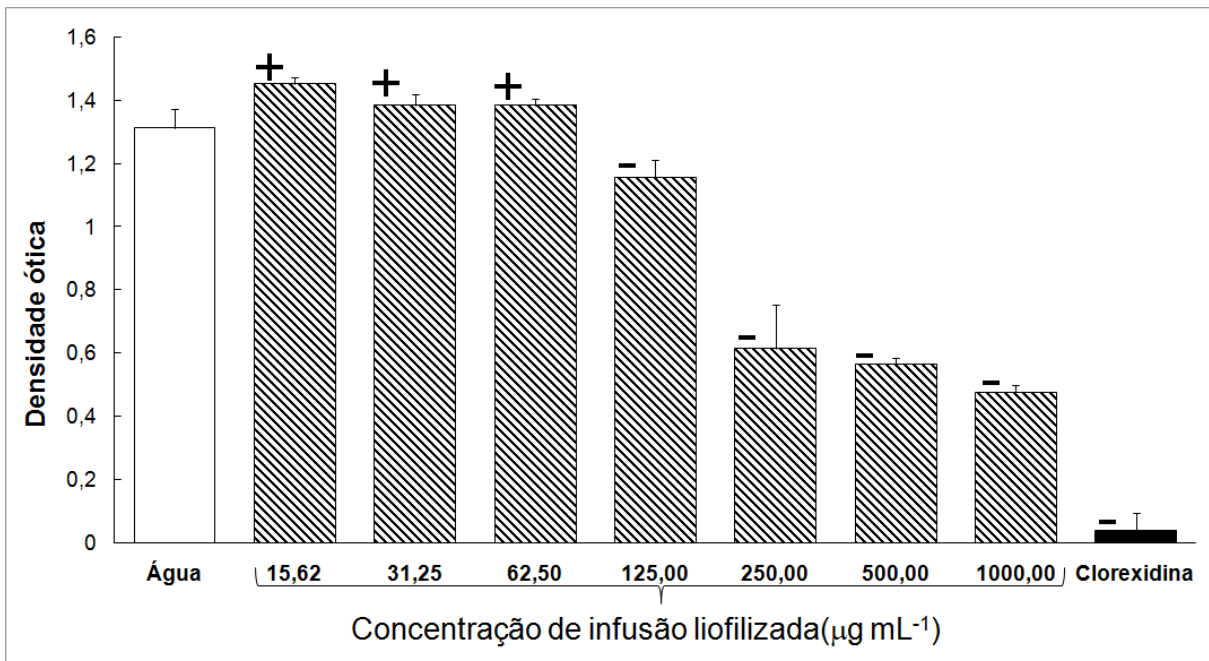
**Figura 8:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 11h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, (-): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo) e (+): indica a concentração em que ocorreu estímulo em relação a água (controle negativo). A clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo.

As folhas de cajueiro coletadas as 11h (Figura 8) apresentou inibição até a concentração de  $125\mu\text{g.mL}^{-1}$  comparado com a água (controle negativo) sendo que obteve o mesmo padrão de inibição de 1000, 500 e  $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ , no entanto a concentração de  $15,62\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou estímulo de crescimento bacteriano em relação a água e a clorexidina 0,12% apresentou-se como bactericida comparado com a infusão de folhas de cajueiro, onde (-)  $p < 0,01$ .



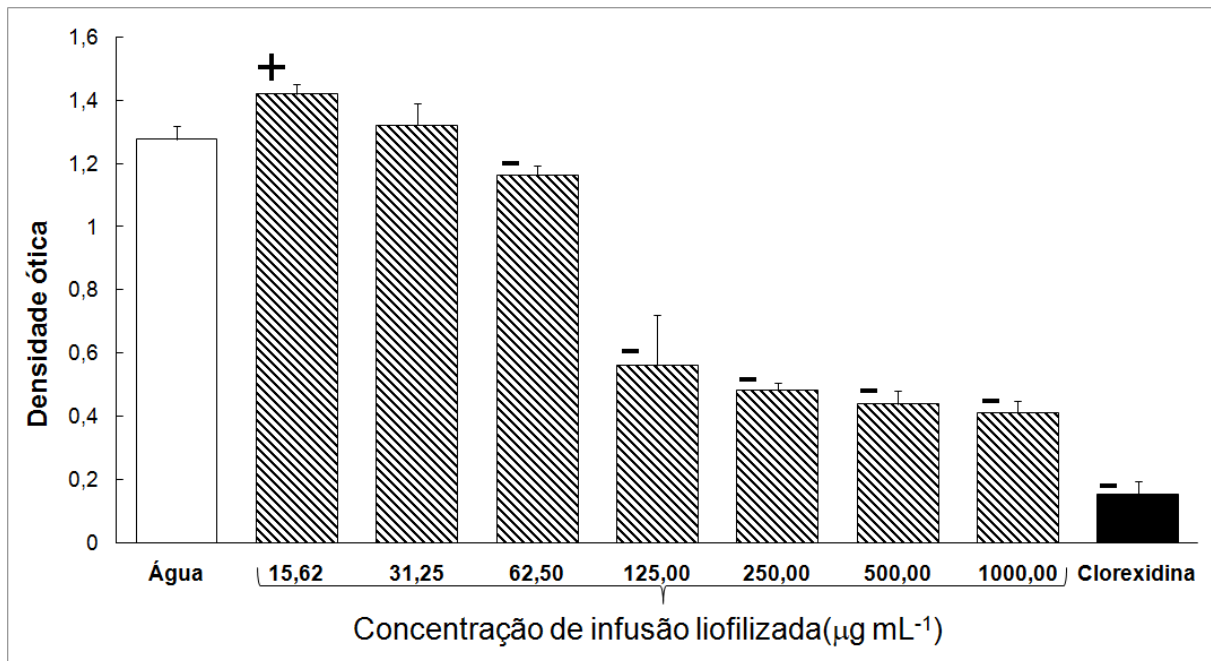
**Figura 9:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 13h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, ( - ): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo) e (+): indica a concentração em que ocorreu estímulo em relação a água (controle negativo). A clorexidina 0,12% foi usada como controle positivo.

A infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 13h (Figura 9) apresentaram resultados semelhante a infusão coletadas as 11h (Figura 8), onde (-)  $p < 0,01$ .



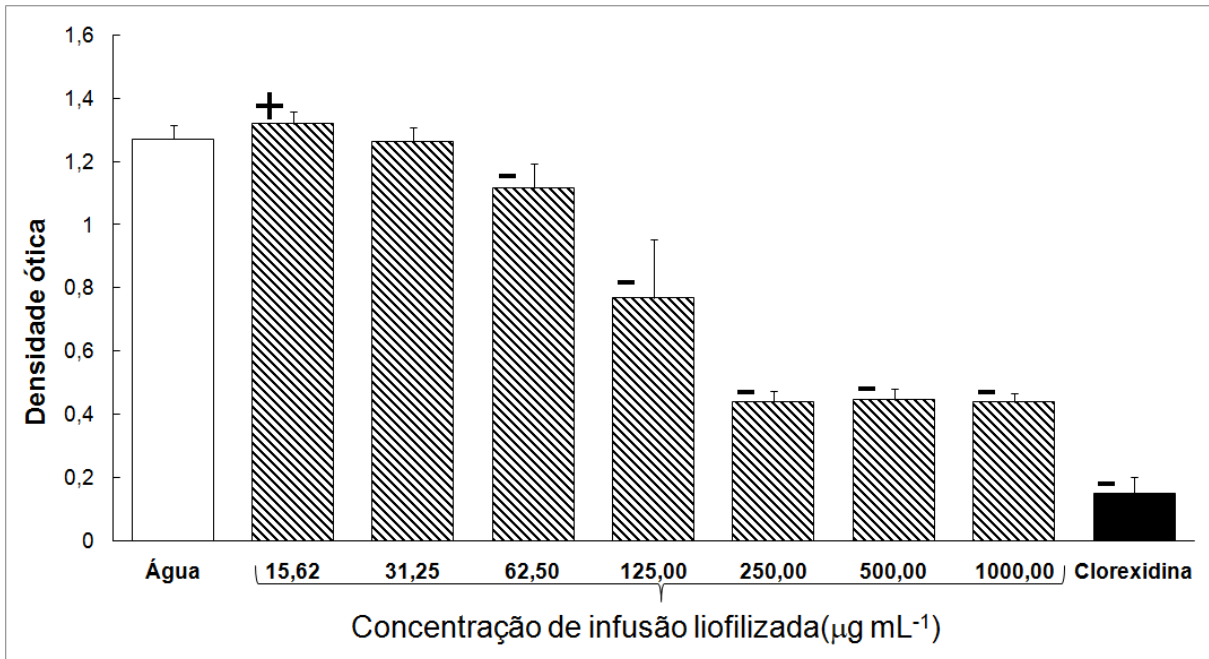
**Figura 10:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 15h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, ( - ): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo) e (+): indica a concentração em que ocorreu estímulo em relação a água (controle negativo). A clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo.

As folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 15hs (Figura 10) para o preparo das infusões apresentou inibição até a concentração de  $125\mu\text{g.mL}^{-1}$  comparado com a água (controle negativo), no entanto as concentrações de  $62,50; 31,25$  e  $15,62\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram estímulo de crescimento bacteriano em relação a água e a clorexidina 0,12% apresentou-se como bactericida comparado com a infusão de folhas de cajueiro, onde (-)  $p < 0,01$ .



**Figura 11:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 17h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, ( - ): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo) e (+): indica a concentração em que ocorreu estímulo em relação a água (controle negativo). A clorexidina 0,12% foi usada como controle positivo.

As folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 17hs (Figura 11) para o preparo das infusões apresentou inibição até a concentração de  $62,50\mu\text{g.mL}^{-1}$  comparado com a água (controle negativo), no entanto a concentração de  $15,62\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou estímulo de crescimento bacteriano em relação a água e a clorexidina 0,12% apresentou-se como bactericida comparado com a infusão de folhas de cajueiro, onde (-)  $p < 0,01$ .



**Figura 12:** Atividade antimicrobiana de infusão de folhas de cajueiro *A.occidentale* L. coletadas as 19h frente a bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano, ( - ): indica a concentração que ocorreu inibição em relação a água (controle negativo) e (+): indica a concentração em que ocorreu estímulo em relação a água (controle negativo).

As folhas de cajueiro coletadas as 19h (Figura 12) para o preparo das infusões obteve um resultado semelhante em relação ao horário de 17h (Figura 11), onde (-)  $p < 0,01$ .

Com base nesses resultados podemos observar que o horário de coleta das folhas de cajueiro influencia na atividade antimicrobiana da bactéria *S.mutans*.

A sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude, disponibilidade de nutrientes, exposição à patógenos, são alguns de diversos fatores que podem influenciar no conteúdo dos metabólitos secundários de plantas medicinais, outro fator seria a falta de uniformidade nos critérios que são um dos maiores problemas relacionados com pesquisas sobre atividade antimicrobiana de plantas, frequentemente acarretando em relevantes contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e até para o mesmo autor estudando a mesma amostra com diferentes métodos (GOBBO – NETO e LOPES,2007; RIOS e RÉCIO,2005 apud NADER, 2010, p.37).

Estudos com óleos essenciais de folhas de *Virola surinamensis* demonstraram que as folhas coletadas em diferentes horas do dia 6h, 9h, 18h e 19h e durante os meses de fevereiro, junho e outubro demonstraram que houve uma diferença na composição de componentes presente na planta devido a variações sazonais e ciclos circadianos (LOPES *et al.*, 1997).

Segundo os autores Martins e Santos (1995) existem horários em que são encontrados grandes quantidades de princípios ativos de acordo com a substância ativa de cada planta (NASCIMENTO *et al.*, 2006)

Tabela 1: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cada horário de coleta em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

| Hora da coleta | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|----------------|-------------------------------|
| 7              | 250,00                        |
| 9              | 125,00                        |
| 11             | 125,00                        |
| 13             | 125,00                        |
| 15             | 125,00                        |
| 17             | 62,50                         |
| 19             | 62,50                         |

Tabela 2: Concentração de estímulo de crescimento bacteriano em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em cada horário de coleta.

| Hora da coleta | Contração de estímulo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|----------------|---|
| 7              | -   |
| 9              | 15,62   |
| 11             | 15,62   |
| 13             | 15,62   |
| 15             | 15,62, 32,25 e 62,50                            |
| 17             | 15,62   |
| 19             | 15,62   |

Um dos problemas encontrados à terapia antimicrobiana é a resistência bacteriana aos antimicrobianos por este motivo estudos buscam novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, como as bacterianas. Plantas medicinais são de grande importância para a descoberta de novas drogas tornando-se uma alternativa extremamente viável por ser fornecedoras de princípios ativos e também por ser econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento, onde a maioria das drogas é importada (SILVA *et al.*, 2007).

Devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, sendo realizadas avaliações concretas 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 apud BARBOSA, 2008,p. 10).

O *screening* para atividade antibacteriana de várias plantas medicinais foi realizado na Nigéria, e o extrato da folha e casca do *Anacardium occidentale* mostraram atividade contra bactérias Gram- negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (KUDI *et al.*, 1999).

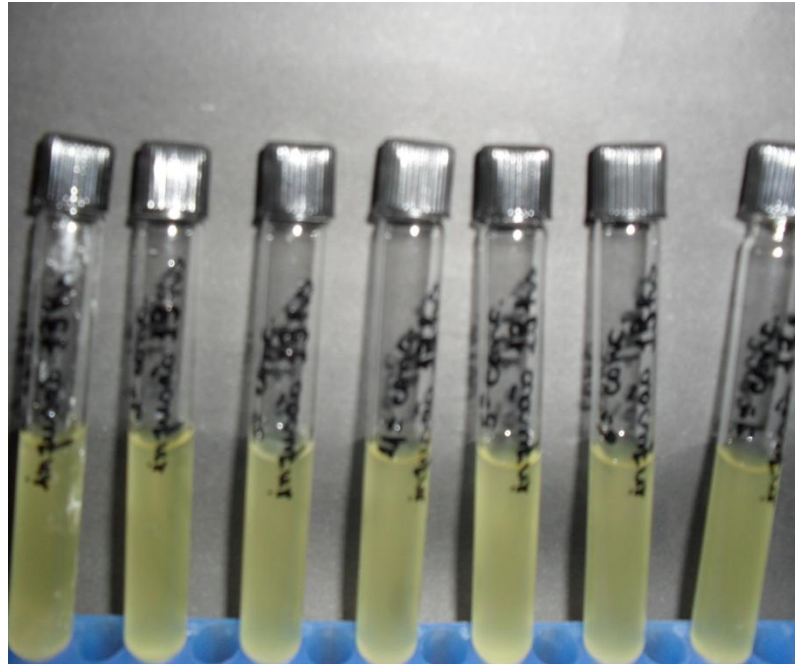
Por contribuir com o desequilíbrio da microbiota oral, *Streptococcus mutans* está diretamente envolvido na etiopatogenia da cárie, doenças periodontais, estomatites e outras infecções orais, na medida em que criam condições favoráveis à aderência de microorganismos oportunistas às superfícies dentárias, mucosas orais e próteses (JESUS *et al.*, 2010).

#### **4.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

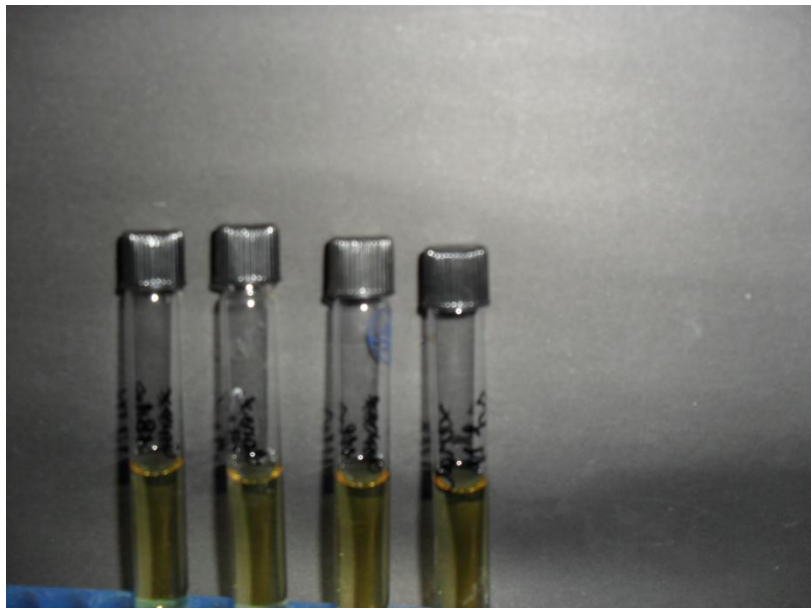
Segundo (BARON e FINEGOLD, 1990) a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana. Quando os valores da CBM são comparados com o CIM, pode-se avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático (NADER, 2010).

No presente estudo a Concentração Bactericida Mínima (CBM) das infusões de folhas de cajueiro (*A.occidentale* L.) coletadas nos horários de 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 horas não demonstraram nenhuma inibição de crescimento bacteriano, apresentando-se no entanto como bacteriostático após um período de 48hs em todas as concentrações testadas 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 e 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo apresentando-se como bactericida frente a *S.mutans* (UA159).

*S.mutans* (UA159) demonstrou sensibilidade as infusões de folhas de cajueiro (*A.occidentale* L.) apenas por um período de 24hs quando determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), após 24hs quando retirada uma alíquota de 50 $\mu\text{L}$  das infusões e adicionadas em novo meio de cultura BHI e incubadas em estufa a 37°C a 10% de CO<sub>2</sub> por um período de 24hs as infusões não apresentaram atividade bactericida.



**Figura 13:** Tubos com infusão, *S.mutans* e BHI demonstraram crescimento bacteriano de 7 concentrações utilizadas de infusão de folhas de cajueiro frente a *S.mutans* após um período de incubação em estufa por 24hs a 37°C e 10% de CO<sub>2</sub> para análise da Concentração Bactericida Mínima.



**Figura 14:** Tubos com clorexidina, *S.mutans* e meio de cultura BHI. Após um período de incubação em estufa por um período de 24hs a 37°C e 10% de CO<sub>2</sub> para análise da Concentração Bactericida Mínima. Os tubos com clorexidina não demonstraram crescimento bacteriano.

De acordo com a literatura extrato de cajueiro tem sido demonstrada atividade antibacteriana em altas concentrações em bactérias Gram-negativas *Proteus morgani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* (SILVA *et al*, 2007).

O extrato da casca de *Anacardium occidentale* Lin na concentração de 20mg.mL<sup>-1</sup>, tem demonstrado atividade antibacteriana por ser eficaz contra *Klebsiella pneumoniae* (NCIB 418) cepa resistente a estreptomicina (AKINPELU,A.D., 2001).

Extratos da casca de *Anacardium occidentale* Lin tem demonstrado eficácia na inibição de aderência em biofilmes de espécies de *Streptococcus* (MELO *et al*,2006).

#### **4.3 Teste de Toxicidade com *Artemia salina* .**

O microcrustáceo *A.salina* tem sido empregado na triagem de compostos bioativos de produtos naturais, embora não tendo sido examinados os mecanismos bioquímicos de toxicidade aguda subjacente (FORTUN- SANCHEZ e BARAHONA, 2009).

No presente estudo verificou-se a toxicidade das infusões em *A.salina* coletadas nos horários de 11,17 e 19h apresentando-se tóxicas nas concentrações testadas obtendo efeito tóxico após 48h de início do teste, os valores de CL<sub>50</sub> estão dispostos na Tabela 3.

Segundo (Meyer *et al.*, 1982) na avaliação de toxicidade de compostos ativos e extratos vegetais para *Artemia salina*, um valor de CL<sub>50</sub> inferior a 1000µg.mL<sup>-1</sup> permite considerar o composto como tóxico (SILVA *et al*,2009). Deve ser levado em consideração que esta técnica é adequada para determinação de toxicidade provenientes de produtos naturais correlacionando os valores de CL<sub>50</sub> em ensaios *in vivo* em camundongos constituindo uma ferramenta útil para um prognóstico de toxicidade de extratos de plantas (SGARIGLIA *et al.*, 2010).

O uso de fitoterápicos vem ganhando popularidade nos países em desenvolvimento, medicamentos provindos de produtos naturais são geralmente considerados inofensivos por grande parte da população e são comumente usados para auto-medicação sem supervisão. Este aumento da popularidade e da escassez de estudos científicos sobre sua eficácia e segurança levantaram preocupações de toxicidade e efeitos adversos relacionado a esses fármacos (OBICI *et al*, 2008).

A maioria das plantas produzem muitos compostos biologicamente ativos como parte normal de seu crescimento e desenvolvimento ou em resposta ao ataque de patógenos ou estresse, dentre esses compostos destacam-se: antimicrobianos, alelopáticos, antioxidante e propriedades bio-reguladoras (SGARIGLIA,*et al.*, 2010). No entanto o uso de produtos

naturais também podem resultar em efeitos tóxicos salientando a necessidade de compreender os efeitos biológicos de compostos naturais (LIMA *et al.*, 2006).

Tabela 3. Teste de toxicidade de infusões de *A.occidentale* L. contra *A.salina*

| Infusões de cajueiro | Toxicidade ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|----------------------|--------------------------------------|
| Horário de Coleta    | CL <sub>50</sub> [IC <sub>90</sub> ] |
| Infusão 11h          | 266,15 [194,96 - 363,34]             |
| Infusão 17h          | 285,48 [227,92 - 357,57]             |
| Infusão 19h          | 345,15 [304,10 - 391,74]             |

CL: Concentração letal; IC: Intervalo de confiança

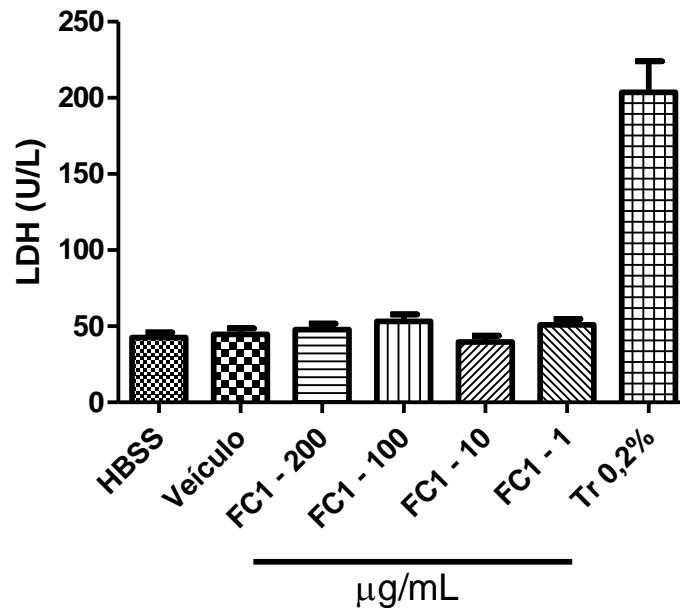
#### 4.3.1 Teste de sensibilidade

As CL50 ficaram dentro do valor de referência, tendo valor médio de 18,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Para o teste de toxicidade ser aceitável a CL50 encontrada no período de 24h para a substância tóxica de referência (SDS) deve estar contida no intervalo entre 13,1 e 30,9  $\text{mg.mL}^{-1}$  (Veiga;Vital,2002).

#### 4.4 Teste de Citotoxicidade

No presente estudo a infusão de folhas de cajueiro (*A.occidentale*) coletadas no horário de 11h nas concentrações de 1, 10, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram diferença estatística com 50 U/L em relação ao Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) com 200 U/L, no entanto quando comparado a solução salina tamponada de Hanks (HBSS – células não-tratadas) e DMSO a 1% (veículo) as infusões de folha de cajueiro denominada de FC não houve nenhuma diferença significativa.

As infusões de folhas de cajueiro (FC) nas seguintes concentrações testadas não apresentaram nenhum efeito tóxico em células de neutrófilos humano.



**Figura 15:** Efeito da infusão de folhas de cajueiro (FC) durante a ação catalítica da enzima LDH (lactato desidrogenase) em neutrófilo humano nas concentrações de 1,10,100 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  comparado com HBSS (células não tratadas), DMSO 1% (Veículo) e Tr 0,2% (padrão citotóxico).

Nos últimos 20 anos, o interesse em plantas medicinais tem aumentado juntamente com o número de investigações e seus efeitos biológicos em seres humanos e animais, o cajueiro *Anacardium occidentale* L. tem sido estudado dentre as plantas usadas para fins terapêuticos (BARCELOS *et al.*, 2007).

Em geral, na medicina popular são utilizados extratos vegetais, sem levar em consideração o aspecto de toxicidade. *Anacardium occidentale* é utilizada como planta medicinal na América do Sul bem como na África Ocidental, entretanto estudos de toxicidade desta planta são raros (KONAN *et al.*, 2007).

Estudos de citotoxicidade dos flavonóides do cajú para linhagens de células malignas demonstraram que as folhas causam linfopenia *in vivo* e seletivamente inibiu o crescimento de células leucêmicas por indução de apoptose nessas células (KONAN *et al.*, 2010).

O recrutamento e ativação de neutrófilos polimorfonucleares tem sido considerado um dos principais mecanismos de defesa da imunidade inata, proteinases, espécies reativas de oxigênio e eosinóides liberado de neutrófilos polimorfonucleares ativado podem intervir em numerosas doenças inflamatórias tais como asma, efisema pulmonar e síndrome do desconforto respiratório em adultos (LEAL *et al.*, 2008).

Ensaio *in vitro* são fundamentais para compreender os mecanismos de uma ação tóxica e constituem um pré-requisito para uma abordagem mais racional para avaliação de risco toxicológico (GIULIANO *et al.*, 2009). Enzimas tem sido comumente utilizadas em ensaios de citotoxicidade de um agente a ser testado em estudos toxicológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (XU *et al.*, 2003). A Lactato Desidrogenagenase (LDH) é uma isoenzima armazenada em células viáveis, em que um aumento da LDH em fulga indica que a estabilidade da célula na membrana é danificada possivelmente devido a oxidação e injúria celular (ISSA *et al.*, 2004).

O presente estudo mostrou que as infusões de folhas de cajueiro *A. occidentale* não provocou nenhuma perda na integridade e nem na viabilidade celular em células de neutrófilos humano apresentando-se como ausente de toxicidade nas concentrações estudadas.

## 5. CONCLUSÕES

- Os resultados dos ensaios antimicrobianos mostraram que as infusões de folhas de cajueiro *Anacardium occidentale* Lin. podem estimular, inibir ou não ter efeito sobre o crescimento bacteriano, conforme a hora de coleta e a concentração.
- Os valores das CIMs foram de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (7h), 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (9-15h) e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (17 e 19h).
- Ocorreu estímulo no crescimento bacteriano nas concentrações de 15,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (9-19h), 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (15h) e 62,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (15h).
- A infusão coletada às 7h não apresentou nenhuma concentração de estímulo.
- Foi considerada como bacteriostática por um período de 24h após o CIM.
- Os testes de toxicidade em *Artemia salina* resultaram em valores para a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) de 266,15; 285,48 e 345,15 nos horários de coleta de 11, 17 e 19h, respectivamente. Assim, para esses horários de coleta as infusões foram consideradas atóxicas nos seus valores de CIMs (125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).
- Os testes de citotoxicidade mostraram que as infusões não são tóxicas nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18(3), p. 472-508, 2008.

AIKINPELU,A.D. Antimicrobial activity of *Anarcadium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v.72,p.286-287,2001

ALALUUSUA,S.; MÄTÖ.J.; GRÖNROOS,L.; INILLÄ,S; TORKOO,H; ASIKAINEN,S; JOUSIMIES-SOMER,H; SAARELA,M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Archs. Oral Biol.**, v.41(2), p.167-173,1996.

ALMAJANO,P.M.; CARBÓ,R.; JIMÉNES,L.A.J.; GORDON,H.M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry** ,v.108 p.55–63,2008

ALMEIDA, L. S. B.; MURATA, R. M.; YATSUD, R.; DOS SANTOS, M. H.; T.J. NAGEM, T. J.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*, **Phytochemistry**, v.15, p.886–891,2008.

ANTONIO, A. G.; MORAES, R. S.; PERRONE,D.; MAIA, L.C.; SANTOS,K. R. N.; NATÁLIA L.P.; ÍÓRIO N. L. N.; FARAH, A. Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*, **Food Chemistry**, v.118, p. 782–788, 2010.

BABPOUR,S.E.; ANGAJI,A; ANGAJI,M.S.Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. **Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(3)**, pp. 132-137, Março, 2009.

BARBIERI,V. DE S.D. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária.** 2005, 124f. Dissertação (Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor Ciências Biológicas,Universidade Federal do Paraná,Curitiba,2005.

BARBOSA,B.D. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St Hill, (Anacardiaceae).** 2008, 82f. Dissertação (Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais,2008.

BARCELOS,M.R.G.;SHIMABUKURO,F.;MORI,P.M.;MACIEL,M.A.M.;CÓLUS,DE S.M.I. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**,v.114, p.268–273, 2007.

BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M., *Neem Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) toxicity in *Artemia sp*:comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde** v.26, n. 2, p.157-160, 2008.

BEVILACQUA,M.I. **Avaliação *in vitro* da radiação LED associada ao azul de toluidina na redução bacteriana e na formação do biofilme dentário pelo *Streptococcus mutans***. 2006,72f. Dissertação (Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale da Paraíba, São José dos Campos,2006.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 808-810, 1985.

BRITO,S.E; DE ARAÚJO,P.C.M; LIN,LONG-ZE; HARNLY,J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD – ESI/MS. **Food chemistry**, v.105, p.1112-1118,2007.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73,p. 878, 2004.

CAMPBELL,M.K.**Bioquímica**.3.ed.Porto Alegre: Artmed Editora,2000. 752p.

CASTILLO A.; LI'EBANA J.; L'OPEZ E.; BACA P.; LI'EBANA J. M.; LI'EBANA M. J.; CASTILLO F. Interference of antibiotics in the growth curves of oral streptococci, **International Journal of Antimicrobial Agents** v.27, p. 263–266, 2006.

CHUNG, J. Y.; CHOO, J. H.; LEE, M.H.; HWANG, J. K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytochemistry**, v.13, p. 261–266, 2006.

ESPINOSA-CRISTÓBAL,L.F.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN G. A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R. E.; LOYOLA-RODRÍGUEZ, J. P.; PATIÑO-MARÍN, N.; REYES-MACÍAS, FACUNDO RUIZ, J. F. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Materials Letters**, v. 63, p. 2603–2606, 2009

FIGUEIREDO, L. N.; N. L.; AGUIAR, S. R. M. M.; FALÉ, P. L.; ASCENSÃO, L.; SERRALHEIRO, M. L. M.; LINO, A. R. L. The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 664–668, 2010.

FILHO, C. V.; Y. A. R. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21(1), p. 99-105, 1998.

FONTANA, M.; YOUNG, D. A.; WOLFF, M. S.; PITTS, N. B.; LONGBOTTOM, C. Defining Dental Caries for 2010 and Beyond. **Dent Clin N Am**, v. 54, p. 423–440, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters** v. 160, p. 171–177, 2006.

GIULIANO, M.; STELLAVATO, A.; CAMMAROTA, M.; LAMBERTI, M.; MIRAGLIA, N.; SANNOLO, N.; DE ROSA, M. Effects of low concentrations of benzene on human lung cells *in vitro*. **Toxicology Letters** v. 188, p. 130–136, 2009.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F.; FACUNDO RUIZ, F.; PENA, D. C. C.; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, F.; MARTÍNEZ, A. E.; GUILLÉN, A. J. P.; TAPIA-PÉREZ, H.; CASTAÑÓN, G. M. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, p. 237–240, 2008.

INMETRO. Programa de análises de produtos: relatório sobre análises em chás. Disponível em: <[http://www.imetro.gov.br/consumidor/produtos/cha\\_final.pdf](http://www.imetro.gov.br/consumidor/produtos/cha_final.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2010.

ISLAM, B.; KHAN, S. N.; NAEEM, A.; SHARMA, V.; KHAN, A. U. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. **Journal of Applied Microbiology** ISSN, p. 1364-5072, 2008.

ISSA, Y.; WATSS, C. D.; BRUNTON, P. A.; WATERS, M. C.; DUXBURY, A. J. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts *in vitro*. **Dental Materials**, v. 20, p. 12–20, 2004.

JESUS,S.F.P.R.;COSTA,M.R.M.;BASTOS,V.I.;COUTO,L.B.G.;VIEIRA,DO S.P.M.;DE SOUZA,A.I. Ação antibacteriana e antiaderente de pithecellobium Cochliocarpum (gomez) macbr sobre microrganismos orais. **Odontol. Clín.-Cient., Recife,v. 9 (4),p. 331-335, out./dez., 2010.**

JUNIOR,L.F.J; VIEIRA,B.L.; LEITE,DE F.V.J.M.; LIMA,C.K. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. **Saúde em Revista, Piracicaba, v.7(16): 11-17, 2005.**

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

KONAN,A.N.;LICOPAN,N.;DÍAZ,C.E.I.;JACYSYN,DEF.J;TIBA,T.M.M.;MENDES,A.P.G .J.; BACCHI,M.E.; SPIRA,B. Citotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and Toxicologic Pathology ,2010.**

KOKOSKA, L.; POLESNY, Z.; RADA,V.; NEPOVIM, A.; VANEK, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity, **Journal of Ethnopharmacology, v. 82. p. 51- 53. 2002.**

KOUTSAFTIS,A.;AOYAMA.I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the Total Environment,v. 387,p.166–174,2007.**

KUETE, V.; NGAMENI, B.; FOTSO SIMO C. C.; KENGAP TANKEU, R.; TCHALEU NGADJUI, B.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; KUIATE, J. R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology, v.120, p. 17–24, 2008.**

LEAL,M.A.K.L.;CANUTO,M.K.;COSTA,DAS.C.K;NOBREJUNIOR,V.H.;VASCONCELS, M.S.; SILVEIRA,R.E.; FERREIRA,P.V.M.; FONTELE,B.J.; ANDRADE,M.J.; VIANA,DE B.S.G. Effects of Amburoside A and Isokaempferide, Polyphenols from *Amburana cearensis*, on Rodent Inflammatory Processes and Myeloperoxidase Activity in Human Neutrophils. **Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,v.104, p.198–205,2008.**

LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; ARAÚJO,M. J. A. M.; DUTRA, R. P.; NASCIMENTO, F. R. F.; VALÉRIO MONTEIRO-NETO, V.; RIBEIRO, M. N. S.; GONCALVES, A. G.; GUERRA, R. N. M. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journal of Ethnopharmacology , v.125, p. 1–9, 2009.**

LIMA,F.R.M.;LUNA,DES.J.;DOS SANTOS,A.F.DE ANDRADE, C. C. M.; SANT'ANA, G. E. A.; GENET,J-P.; MARQUEZ, NEUVILLE,L.; MOREAU,N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**,v. **105**,p.137–147,2006.

LIMA,V.L.A.G.;MÉLO,DE A.E.;LIMA,DA S.E.D. Nota prévia: teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n.2, p.187-190, jul./dez., 2004.

LOPES,P.N.; KATO,J.M; ANDRADE,DE A.H.E.; MAIA,S.J.G; YOSHIDA,M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Viola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**. v. **46** (4), p. 689-693, 1997.

LORENZO,J.L. **Microbiologia para estudantes de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu,2004. 274p.

LUCISANO YM, MANTOVANI B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J Immunol**. 1984; **132**(4):2015-20

MARTINS, E.R.; SANTOS, R.H.S. Plantas medicinais: uma alternativa terapeutica de baixo custo. **Viçosa: UFV, Imprensa Universitária,1995. 26p.**

MBOSSO,E. J. T.; NGOUELA, S.; NGUEDIA, J. C. A.; BENG, V. P.; ROHMER, M.; TSAMO, E. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 476–481, 2010.

MELO, M.F.A.; SANTOS,V.J.E.;DE SOUZA,C.F.L.; CARVALHO,T.DE A.A.; PEREIRA,V.M.DO S.; HIGINO,S.J. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*.**Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16(2),p.202-205,2006.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L.; **Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina***. Disponível em: <[http://www.puc-rio.br/pibic/relatório\\_resumo2007/relatórios/qui/qui\\_mariana\\_gava\\_milani.pdf](http://www.puc-rio.br/pibic/relatório_resumo2007/relatórios/qui/qui_mariana_gava_milani.pdf)>. Acesso em: 10 fev.2011.

MORAES-DE-SOUZA, A.R. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil.** 2007,60f. Dissertação (Ciência- Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,Piracicaba,2007.

MOURA, L. C.; **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubinosa* e *Pfaffia glomerata* Em microrganismos da cavidade bucal.** P. 17-18, 2006.71 f. Dissertação (mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca, 2006.

NADER, T. T. **Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus*.** 2010.68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” ,Jaboticabal- SP, 2010.

NASCIMENTO,B.I.; INECCO,R.; MATOS,H.S.; BORGES,S.S.N.; MARCO,A.C. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim-santo (*ANDROPOGUM SP*). **Caatinga (Mossoró,Brasil), v.19, n.2, p.123-127, abril/junho,2006**

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.;ALBUQUERQUE,U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.2, p. 143-148, 2008.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERAL, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, p. 191-196, 2010.**

OBICI,S.; OTOBONE,J.F.;SELA,DA S,R.V.;ISHIDA,K.;DA SILVA,C.J.;NAKAMURA, C.V.;CORTEZ,G.A,D.;AUDI,A.E. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology,v. 115,p.131–139,2008.**

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17(3), p. 466-476, 2007.**

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

PACHÚ, C. O. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos. p. 102f.** Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia. Campina Grande, 2007.

PEREIRA, R. M. **Determinação de constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais por espectrometria de absorção atômica com chama.** Dissertação (Mestrado). p. 104 f. Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química, Belo Horizonte, 2010.

PIMENTEL,M.F.;DELIMA,P.D.;MARTINS,R.L.;BEATRIZ,A.;SANTAELLA,T.S.;LOTUF,C.V.L.Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol **PANAMJAS Pan –American Journal of Aquatic sciences.** v. 4, n. 3, p. 363 – 368, 2009.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacológicos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae).** P. 143 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

**REGULAMENTO TÉCNICO PARA FIXAÇÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE CHÁS- PLANTAS DESTINADAS A PREPARAÇÕES DE INFUSÕES E DECOCCÕES.** Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portaria/519\\_98](http://www.anvisa.gov.br/legis/portaria/519_98). Acesso em: 12 mar.2011.

RODRIGUES, N. L. V. B. **Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe ii a – não inertes e classe ii b – inertes.** p.41. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SÁNCHEZ-FORTÚN.S.; BARAHONA,M.V. Toxicity and characterization of cholinesterase-inhibition induced by diisopropyl fluorophosphates in *Artemia salina* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,v. 72,p. 775–780,2009.

SANTOS,P.R. **Aproveitamento de resíduos e microscopia de força atômica em materiais biológicos.**2007.309f.Tese (Doutorado em Física)- Centro de Ciências e Tecnologia Departamento de Física,Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,2007.

SEIZI,OGA. Fundamentos da toxicologia.2.ed. São Paulo: Atheneu Editora,2003.474 p.

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Santa Maria-RS, 2009.**

SILVA, J. G. S.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. H.; SIQUEIRA-JUNIOR<sup>1</sup>, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17(4), p. 572-577, 2007.**

SILVA,R.S.Caracterização da lectina de alga marinha vermelha *Amansia multifida* J.V.Lamouroux por espectrometria de massa. 2010,59f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm., 90(2), p. 124-128, 2009.**

SGARIGLIA,A.M.;SOBERÓN,R.J.;SAMPIETRO,A.D.;QUIROGA,N.E.;VATTUONE,M.A. Isolation of antibacterial components from infusion of *Caesalpinia paraguariensis* bark. A bio-guided phytochemical study. **Food Chemistry,2010.**

SHULTZ,R.A. **Introdução ao estudo da botânica sistemática.**3.ed.v.2.Rio de Janeiro: Editora Globo,1963, 427p.

SIQUEIRA,J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. P.; GARCEZ, W. S.; MARIA AMÉLIA DIAMANTINO BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach.**Química Nova, p. 557-559, 1998.**

SUZIMONE DE J. CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Quim. Nova, Vol. 29, No. 6, p.1287-1300, 2006.**

TAJRA, F. S. **Avaliação das potencialidades biotecnológicas da lectina de alga marinha da espécie *Hypnea musciformis* (HML) no diagnóstico e prevenção da cárie dentária.** 2010, 92f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2010.

TAKADA K.; HIRASAWA, M. A novel selective medium for isolation of *Streptococcus mutans*, **Journal of Microbiological Methods** v. 60, p. 189– 193, 2005.

TSAI, T-HSUNG.; TSAI, T-HSIEN.; CHEN, Y-C.; LEE, C-W; TSAI, P-J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food Chemistry** , v.120, p. 859–864, 2008.

TEIXEIRA, H. E. **Avaliação do potencial anticárie de lectinas vegetais.** 2005, 106f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 369–376, 2005.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. *In: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil.* Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 111-112, 2002.

XU, J.; MA, M.; PURCELL, M. W. Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as *in vitro* models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.189, p.100–111, 2003.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, 1ª Edição, São Paulo, 2008.

## 7 ANEXOS

### **ANEXO A – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO A SER PUBLICADO NA REVISTA BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS.**

14 de Janeiro de 2011

Prezados autores,

É com prazer que comunico que o manuscrito intitulado "Compositional analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes and in vitro antifungal activity against *Fusarium* species" foi ACEITO para ser publicado na Revista Brasileira de Biociências.

Sendo o inglês a língua do manuscrito, o texto final do manuscrito deverá ser revisado por especialista na língua. As despesas desta revisão deverão ser pagas pelos autores (diretamente ao revisor, que dá nota fiscal de serviço). Estamos, a bastante tempo, trabalhando com uma editora cujo trabalho de revisão tem sido muito eficiente e completo. Os preços variam, dependendo da qualidade e extensão do texto. Assim, um texto com um bom inglês terá um baixo custo.

Caso os autores discordem deste procedimento, informe-me por e-mail. Neste caso, o manuscrito não poderá ser publicado.

Um orçamento será enviado por e-mail se os autores estiverem de acordo.

Fico aguardando novo contato para tomar as providências.

Desde já, agradeço a escolha da Revista Brasileira de Biociências como veículo para a divulgação dos seus resultados de pesquisa.

Atenciosamente,

Rinaldo Pires dos Santos

Editor-Chefe

Revista Brasileira de Biociências

**ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO  
REVISTA BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS**

**Compositional analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes and *in vitro* antifungal activity against *Fusarium* species**

Ricardo Pires dos Santos <sup>1,2,6</sup>, Roberto Araújo Sá <sup>3</sup>, Márcia Machado Marinho <sup>2</sup>, Jorge Luis Martins <sup>4</sup>, Edson Holanda Teixeira <sup>2,6</sup>, Francisca Chagas de Sousa Alves <sup>2</sup>, Vanessa Sabrine Correia Ramos <sup>1</sup>, Giselle Soares de Sousa <sup>1</sup>, Benildo Sousa Cavada <sup>3,6</sup>, Rinaldo Pires dos Santos <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Engenharia da Computação, Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Faculdade de Medicina de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>4</sup> Laboratório de Química Ambiental (QuiAmb-Lab), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>6</sup> CNPq Researcher

Short title: Analysis of cashew peduncle bagasse ashes and *in vitro* antifungal activity

\*Author for correspondence: E-mail: rpsantos2007@gmail.com