



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE *Anacardium microcarpum* E
SUA TOXICIDADE EM DIFERENTES MODELOS
BIOLÓGICOS *IN VITRO***

TESE DE DOUTORADO

Valter Menezes Barbosa Filho

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE *Anacardium microcarpum* E SUA
TOXICIDADE EM DIFERENTES MODELOS
BIOLÓGICOS *IN VITRO***

Valter Menezes Barbosa Filho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS)
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Dr^a. Thaís Posser

Co-orientadora: Dr^a. Sirleis Rodrigues Lacerda

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Barbosa Filho, Valter Menezes

Avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano de *Anacardium microcarpum* e sua toxicidade em diferentes modelos biológicos *in vitro* / Valter Menezes Barbosa Filho.-2015.

83 f.; 30cm

Orientadora: Thaís Posser

Coorientadora: Sirleis Rodrigues Lacerda

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2015.

1. *Anacardium microcarpum* 2. Antioxidante 3. Atividade antibacteriana 4. Citotoxicidade 5. Estresse oxidativo I. Posser, Thaís II. Lacerda, Sirleis Rodrigues III. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Valter Menezes Barbosa Filho. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: valterbarbosafilho@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE *Anacardium microcarpum* E SUA TOXICIDADE
EM DIFERENTES MODELOS
BIOLÓGICOS *IN VITRO***

elaborada por
Valter Menezes Barbosa Filho

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Thaís Possér, Dr^a (UNIPAMPA)
(Presidente/Orientadora)

Vera Maria Melchiors Morsch, Dr^a. (UFSM)

Maribel Antonello Rubin, Dr^a. (UFSM)

Andreлина Noronha Coelho de Souza, Dr^a (UECE)

José Henrique Leal Cardoso, Dr. (UECE)

Santa Maria, 11 de setembro de 2015.

Este trabalho eu poderia dedicar a várias pessoas que me apoiaram durante todo este percurso. Entretanto, por uma questão de justiça queria dedicar este trabalho aquela pessoa que tem sido meu companheiro constante e que sempre de maneira incondicional esteve/está comigo em todos os meus momentos, de forma especial naqueles mais difíceis em que a lógica e a razão humana não são suficientes para dar significado.

Esta pessoa sempre me ensinou que apesar de todo o drama humano, o amor ao próximo sempre seria a alternativa mais coerente. Por isto, dedico este trabalho a meu pai, Walter de Menezes Barbosa (*in memoriam*), que mesmo não estando mais fisicamente presente, sempre tenho contado com a sua presença a me acompanhar na jornada da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido esta possibilidade;

Aos meus filhos Daniel, David e Raquel pelo exemplo de coragem e determinação;

A minha mãe, esposa, irmãos, tios e nora pela compreensão e incentivo;

Aos amigos Carlos Magno Belém, Bruna Marcelino Januario, Ivanildo Pinho e Valéria Pinho por terem sempre acreditado que este momento seria possível;

A Prof^a. Dr^a Thais Posser, pela dedicação durante a orientação deste estudo;

Ao Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha por ser o idealizador deste curso de doutorado;

A Prof^a. Dr^a. Sirleis Rodrigues Lacerda pela co-orientação;

Aos amigos Emily Pansera Waczuk e Jean Paul Kamdem pelo apoio durante todo este curso;

A todos os professores do DINTER URCA/UFSM pela dedicação a nós, seus alunos;

A todos os amigos dos laboratórios da UFSM e da URCA onde realizei meus trabalhos, pela grande ajuda e ensinamentos que me deram;

Aos colegas doutorandos do DINTER URCA/UFSM pelo companheirismo;

Aos amigos professores da URCA, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Dr. José Galberto Martins da Costa e Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes pelo apoio na superação de vários desafios que surgiram ao longo desta caminhada;

Aos companheiros da jornada da vida que, independente das dificuldades sempre deram testemunho, com a sua conduta, que é possível acreditar na esperança;

A Universidade Regional do Cariri (URCA) e a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo apoio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO DE *Anacardium microcarpum* E SUA TOXICIDADE EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

AUTOR: VALTER MENEZES BARBOSA FILHO
ORIENTADORA: DR^a THAIS POSSER
CO-ORIENTADORA: DR^a SIRLEIS RODRIGUES LACERDA
Santa Maria, 11 de setembro de 2015.

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) e/ou da diminuição do sistema de defesa antioxidante. Esta condição pode predispor o surgimento de vários processos patológicos, como os infecciosos. *Anacardium microcarpum* é uma espécie nativa da região Nordeste do Brasil, sendo usada na medicina popular, como tônico no tratamento de inflamação, reumatismo, tumores e doenças infecciosas. Porém, há falta de estudos na literatura sobre o envolvimento da atividade antioxidante e antibacteriana de *A. microcarpum* em suas propriedades farmacológicas, especialmente em relação ao estresse oxidativo. Sendo assim, a primeira parte deste trabalho avaliou *in vitro*, o potencial antioxidante das frações etanólica, metanólica e acetato de etila das cascas do caule de *A. microcarpum* usando modelos químicos e biológicos, bem como, seus possíveis efeitos tóxicos em leucócitos e eritrócitos humanos. Os resultados demonstraram que todas as frações de *A. microcarpum* (1-400 µg/mL) sequestraram o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e inibiram a peroxidação lipídica induzida pelo Fe²⁺ (10 µM) em homogeizados de cérebro e fígado de ratos. As frações não apresentaram nenhum efeito tóxico na viabilidade celular em leucócitos, e não induziram a hemólise dos eritrócitos humanos. A partir destes resultados, a segunda parte deste trabalho investigou o potencial antibacteriano destas frações diante de linhagens padrão de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e sua atividade moduladora de drogas antibacterianas de uso clínico. Os dados revelaram que houve fraca inibição do crescimento bacteriano na presença das frações com a CIM (concentração inibitória mínima) de 512 µg/mL. Entretanto, as frações apresentaram efeito modulatório relevante em combinação com antibacterianos, sendo os resultados especialmente notórios, para um sinergismo com aminoglicosídeos contra cepas multirresistentes de *E. coli* quando elas foram adicionadas ao meio de crescimento a uma concentração sub-inibitória (CIM/8 = 64 µg/mL). Em conclusão, os resultados apresentados demonstram de forma inédita, a atividade antioxidante de *A. microcarpum*, o que pode pelo menos em parte, ser atribuído ao seu conteúdo polifenólico. É possível sugerir que a interação dos constituintes químicos de *A. microcarpum* com os antibióticos provavelmente está relacionada aos efeitos moduladores observados. Com base nestes estudos, pode-se dizer que o uso de *A. microcarpum* na medicina tradicional apresenta base científica e a espécie é promissora para a descoberta de novas drogas que poderiam auxiliar no tratamento de doenças infecciosas.

Palavras-chave: *Anacardium microcarpum*. Antioxidante. Atividade antibacteriana. Citotoxicidade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Graduate Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria

ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL POTENTIAL EVALUATION OF *Anacardium microcarpum* AND ITS TOXICITY IN DIFFERENT BIOLOGICAL MODELS

AUTHOR: VALTER MENEZES BARBOSA FILHO

SUPERVISOR: DR^a THAIS POSSER

CO-SUPERVISOR: DR^a SIRLEIS RODRIGUES LACERDA

Santa Maria, September 11th, 2015.

Oxidative stress reflects an imbalance between the systemic manifestation of reactive species and a biological system's ability to readily detoxify the reactive intermediates or to repair the resulting damage. This condition may facilitate the onset of various pathological processes, including infections. *Anacardium microcarpum* is a native species from the Northeast Brazil, used in folk medicine as a tonic for the treatment of inflammation, rheumatism, tumor, and infectious diseases. However, there is no information in the literature regarding the involvement of antioxidant and antibacterial activities of *A. microcarpum* in its pharmacological properties, especially in relation to oxidative stress. Therefore, the first part of this study aimed at evaluating *in vitro*, the potential antioxidant of ethanolic, methanolic and ethyl acetate fractions from the stem barks of *A. microcarpum* using chemical and biological models, as well as their possible toxic effects in human leukocytes and erythrocytes. The results demonstrated that all the fractions (1-400 µg/mL) scavenged the 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) radical, and inhibited lipid peroxidation caused by Fe²⁺ (10 µM) in rat brain and liver homogenates. The fractions did not have any toxic effect on leukocytes and did not caused hemolysis of erythrocytes. Based on these results, the second part of this work was to investigate the antibacterial potential of these fractions against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, and their modulatory potential in combination with antibiotic drugs. The data revealed that all the fractions exhibited low antibacterial activity against multidrug resistant strains with minimal inhibitory concentration (MIC) of 512 µg/mL. However, the fractions showed notorious synergism with antibiotic drugs, especially from the class of aminoglycosides against *E. coli*, when they were added to the growth medium at the sub-inhibitory concentration (i.e., MIC/8 = 64 µg/mL). In conclusion, the results demonstrated for the first time the antioxidant activity of *A. microcarpum* which can be at least in part, attributed to its polyphenolic content. The possible interaction of chemical constituent from *A. microcarpum* with antibiotics may be associated with the modulation observed. Taken together, the use of *A. microcarpum* in traditional medicine has a scientific base and could be a promising source for the discovery of new drugs that could assist in the treatment of infectious diseases.

Keywords: *Anacardium microcarpum*. Antioxidant. Antibacterial activity. Cytotoxicity. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Anacardium microcarpum</i> . Chapada do Araripe, Crato-CE, Brasil.....	14
Figura 2 – <i>Anacardium microcarpum</i> (Casca do caule). Chapada do Araripe, Crato-CE, Brasil.....	14
Figura 3 – Etapas do processo de peroxidação lipídica	17

Artigo 1

Table 1 - Phenolics and flavonoids composition of <i>A. microcarpum</i> fractions.....	33
Table 2 - Percent inhibition of DPPH by different concentrations of <i>A. microcarpum</i> fractions	35
Figure 1 - High performance liquid chromatography elution profiles of (a) methanolic, (b) ethanolic and (c) ethyl acetate fractions of <i>A. microcarpum</i> . Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercitrin (peak 9), quercetin (peak 10), kaempferol (peak 11) and kaempferol glycoside (peak 12).....	32
Figure 2 - The inhibitory effect of EtOH fraction (A), AcOEt fraction (B) and MeOH fraction (C) on Fe^{2+} (10 μ M) - induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. Values are the means of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. basal, # $p < 0.05$ vs. Fe^{2+}	32
Figure 3 - The inhibitory effect of <i>A. microcarpum</i> EtOH fraction (A), AcOEt fraction (B) and MeOH fraction (C) on Fe^{2+} (10 μ M) - induced lipid peroxidation in rat liver homogenates. Values are the means of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. basal, # $p < 0.05$ vs. Fe^{2+}	34
Figure 4 - Effect of different fractions from <i>A. microcarpum</i> on human leukocytes in the absence (A, C, and E) or presence (B, D, and F) of H_2O_2 (2 mM) + Azide (1 mM). The results are expressed as percentage of control. Values are the means of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. H_2O_2 (2 mM) + Azide (1 mM) alone.....	35
Figure 5 - Osmotic fragility of erythrocytes treated with EtOH fraction (A), AcOEt fraction (B) and MeOH fraction (C) from <i>A. microcarpum</i> . Treated erythrocytes were added to various concentrations of salt solution (0-0.9%) and incubated for 20 min. Absorbances of the supernatants were measured at 540 nm. Hemolysis in each tube was expressed as percentage of the absorbance in distilled water (control). The bars represent the means of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate \pm SEM	36

Manuscrito 1

Table 1 - Origin of bacterial strains and their resistance to antibiotics.....	55
---	----

Table 2 - Qualitative phyto-constituents analysis of crude ethanolic extract (CEE), ethyl acetate fraction (EAF) and metanolic fraction (MF) from the stem bark of <i>A. microcarpum</i>	56
Figure 1 - MIC of the antibiotics in the absence and presence of CEE (A), EAF (B) and MF (C) at the sub-inhibitory concentrations (64 µg/mL) for <i>E. coli</i> strain 06	58-60
Figure 2 - MIC of the antibiotics in the absence and presence of CEE (A), EAF (B) and MF (C) at subinhibitory concentrations (64 µg/mL) for <i>P. aeruginosa</i> strain 03	61-63
Figure 3 - MIC of the antibiotics in the absence and presence of CEE (A), EAF (B) and MF (C) at subinhibitory concentrations (64 µg/mL) for <i>S. aureus</i> strain 10	64-66

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	– 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EO	– Estresse Oxidativo
ERO	– Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	– Espécies Reativas de Nitrogênio
GSH	– Glutathiona Reduzida
MDA	– Malondialdeído
NPS	– Nitroprussiato de Sódio
RL	– Radical livre
RNA	– Ácido Ribonucleico
SNC	– Sistema Nervoso Central
TBARS	– <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	12
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Anacardium microcarpum</i> e suas propriedades farmacológicas	13
1.2	Estresse oxidativo	15
1.2.1	Antioxidantes.....	18
1.2.2	Fragilidade Osmótica e Viabilidade Celular em Condições Oxidativas.....	20
1.3	Doenças Infecciosas	21
1.3.1	Agentes Antimicrobianos e Mecanismos de Resistência.....	22
1.3.2	Terapias Alternativas das Doenças Infecciosas: Modulação dos Antibióticos.....	24
1.4	Justificativa	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	RESULTADOS	28
3.1	Artigo 1	29
	Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic flagility effects of Caju (<i>Anacardium microcarpum</i>)	29
3.2	Manuscrito 1	39
	Phytocompounds and Modulatory effects of <i>Anacardium microcarpum</i> (caju) on antibiotics drugs used in clinical infections	39
4	DISCUSSÃO	67
5	CONCLUSÕES	71
6	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	74

APRESENTAÇÃO

Os temas abordados nesta tese se encontram dispostos da seguinte forma:

No item **INTRODUÇÃO** consta uma Revisão da Literatura.

Os itens **MATERIAS E MÉTODOS, RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** estão apresentados na forma de um artigo e um manuscrito.

A realização dos experimentos de pesquisa envolvendo animais recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, sob número de protocolo: 076/2012

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO** trazem comentários sobre os resultados em conformidade com a literatura especializada e as **PERSPECTIVAS DO ESTUDO** estão no final da tese.

As **REFERÊNCIAS** estão citadas no artigo e no manuscrito e as referências utilizadas para a introdução e a discussão estão elencadas no final da tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Anacardium microcarpum* e suas propriedades farmacológicas

O gênero *Anacardium* está representado por onze (11) espécies, dentre as quais o *Anacardium occidentale* (caju) é o mais conhecido pelos seus valores nutricionais e econômicos. Este fato se deve à exploração dos pseudofrutos para a produção de doces e sucos, e ainda, a amêndoa e o líquido obtido a partir da casca da castanha do caju são importantes produtos de exportação (SANTOS; MAGALHÃES, 1999). Este gênero está entre os mais pesquisados da família Anacardiaceae, em relação aos constituintes químicos e atividades biológicas dos extratos e derivados. Estes são ricos em flavonoides, lipídeos fenólicos, terpenos, xantonas e esteroides (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006).

A espécie *Anacardium microcarpum*, conhecida popularmente como cajuzeiro é uma planta nativa do Brasil, especialmente da região Nordeste (figura 1). Seus pseudofrutos possuem elevados níveis de vitamina C, açúcares, compostos fenólicos e minerais (cálcio, ferro e fósforo). Esta espécie produz pedúnculos pequenos, mas com excelente sabor e livres de adstringência (AGOSTINI-COSTA et al., 2003, 2004).

Na medicina tradicional, as infusões das cascas do *A. microcarpum* (figura 2) são frequentemente usadas para o tratamento de inflamação, reumatismo, tumor e doenças infecciosas, sendo que tais enfermidades mantêm correlação com o estresse oxidativo. (ALEXANDER, 2008; TEDONG et al., 2010).

VIEIRA; MAYO; ANDRADE (2014) estudaram as características morfológicas do *Anacardium microcarpum*, nos estados do Ceará, Maranhão, Pará, Piauí, e Rio Grande do Norte, no sentido de estabelecer diferenças taxonômicas para as espécies *A. occidentale* e *A. microcarpum*. *A. microcarpum* se caracteriza pelo hábito arbóreo, folhas simples, flores pequenas e perfumadas dispostas em panícula e, sobretudo, pelo fruto e hipocarpo de tamanhos diminutos, que o diferencia do seu parente mais próximo, a espécie *A. occidentale*. Apesar da inexpressividade econômica do *A. microcarpum*, tanto pelo fato de não ser cultivado quanto pelo pequeno tamanho, o cajuí desempenha papel sócio-econômico importante nos seus locais de ocorrência.



Figura 1 – *Anacardium microcarpum*. Chapada do Araripe, Crato-CE, Brasil.

Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.



Figura 2 – *Anacardium microcarpum* (Cascas do caule). Chapada do Araripe, Crato-CE, Brasil.

Fonte: Arquivo pessoal do pesquisador.

O ácido anacárdico é utilizado na indústria química para a produção de cardanol, que é usado para resinas, revestimentos e materiais de fricção, sendo reportado como o principal componente desta espécie. Vários estudos têm se voltado à avaliação de atividades biológicas dos ácidos anacárdicos, com destaque para a ação antitumoral, habilidade em inibir as enzimas tirosinase, prostaglandina sintase e lipooxigenase, atividade antiacne, antibacteriana e antifúngica (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006).

Muitas propriedades farmacológicas têm sido atribuídas às espécies de Anacardiaceae, em especial ao *A. occidentale*. As cascas desta espécie possuem atividade antiinflamatória atribuída à presença de taninos condensados (MOTA; THOMAS; BARBOSA FILHO, 1985). Adicionalmente, são referidos efeitos antígenotóxico e antimutagênico de extratos metanólicos à mesma (BARCELOS et al., 2007a, 2007b). Metabólitos secundários presentes em espécies da família Anacardiaceae apresentam também, comprovada capacidade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Helicobacter pylori* (MUROI; KUBO, 1996; KUBO et al., 2006; GREEN et al., 2007;), efeito gastroprotetor (MORAIS et al., 2010), anti-viral (GONÇALVES et al., 2005), anti-diabetogênico (KAMTCHOUING et al., 1998), sendo que alguns estudos sugerem atividade promissora na terapêutica antitumoral (SUNG et al., 2008). A literatura relaciona os efeitos antioxidantes de espécies do gênero *Anacardium* as suas elevadas concentrações de compostos fenólicos, particularmente presentes nas cascas e na castanha das plantas (KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006; KUBO et al., 2006).

Estudo pioneiro avaliando o efeito do extrato etanólico obtido das cascas do caule do *A. microcarpum* em modelo de indução de Parkinsonismo por Paraquat em *Drosophila melanogaster* demonstrou baixa toxicidade e seu potencial neuroprotetor atribuído pelo menos em parte, à ação antioxidante desta espécie (MÜLLER et al., 2013). É importante mencionar que plantas com potencial antioxidante têm sido vislumbradas pela possibilidade de modificar o *status* oxidativo envolvido na patogenia de várias doenças (NEERGHEEN et al., 2010; GILES et al., 2012).

1.2 Estresse oxidativo

Radicais livres (RL) são átomos, grupo de átomos ou íons contendo um ou mais elétrons não emparelhados em sua estrutura. Nos seres vivos, sua formação ocorre naturalmente, em processos fisiológicos importantes à manutenção da homeostase, como nas reações imunológicas e inflamatórias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A produção de RL pode ser desencadeada dentro das células por absorção de energia radiante, pelo metabolismo enzimático de substâncias químicas exógenas, bem como, por metais de transição como o ferro, o qual doa ou aceita elétrons durante reações intracelulares e catalisam a formação de radicais, como ocorre na reação de Fenton (HALLIWELL, 2006).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) são compostos radicalares e não radicalares que quando têm sua produção em excesso podem acarretar um desequilíbrio ao sistema de defesa antioxidante, determinando uma condição conhecida por estresse oxidativo (EO). Os efeitos destas espécies são abrangentes. Porém, três reações são particularmente relevantes na lesão celular: lesões do DNA, modificações oxidativas das proteínas e a peroxidação lipídica (PL) das membranas celulares sendo, neste caso, os ácidos graxos poliinsaturados importantes alvos, podendo a sua oxidação levar a formação de produtos citotóxicos (SILVA et al., 2005; VALKO et al., 2006).

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual as ERO/ERN reagem com os lipídeos das membranas celulares ocasionando acentuadas alterações na organização estrutural e funcional, com perda de fluidez e da seletividade iônica e subsequente liberação do conteúdo das organelas. Este processo pode ser dividido em três etapas reacionais de caráter progressivo: iniciação, propagação e terminação (Figura 3), envolvendo a formação de hidroperóxidos lipídicos, os quais decompõem as duplas ligações dos ácidos graxos desencadeando o dano às membranas (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; PETRESCU et al., 2001).

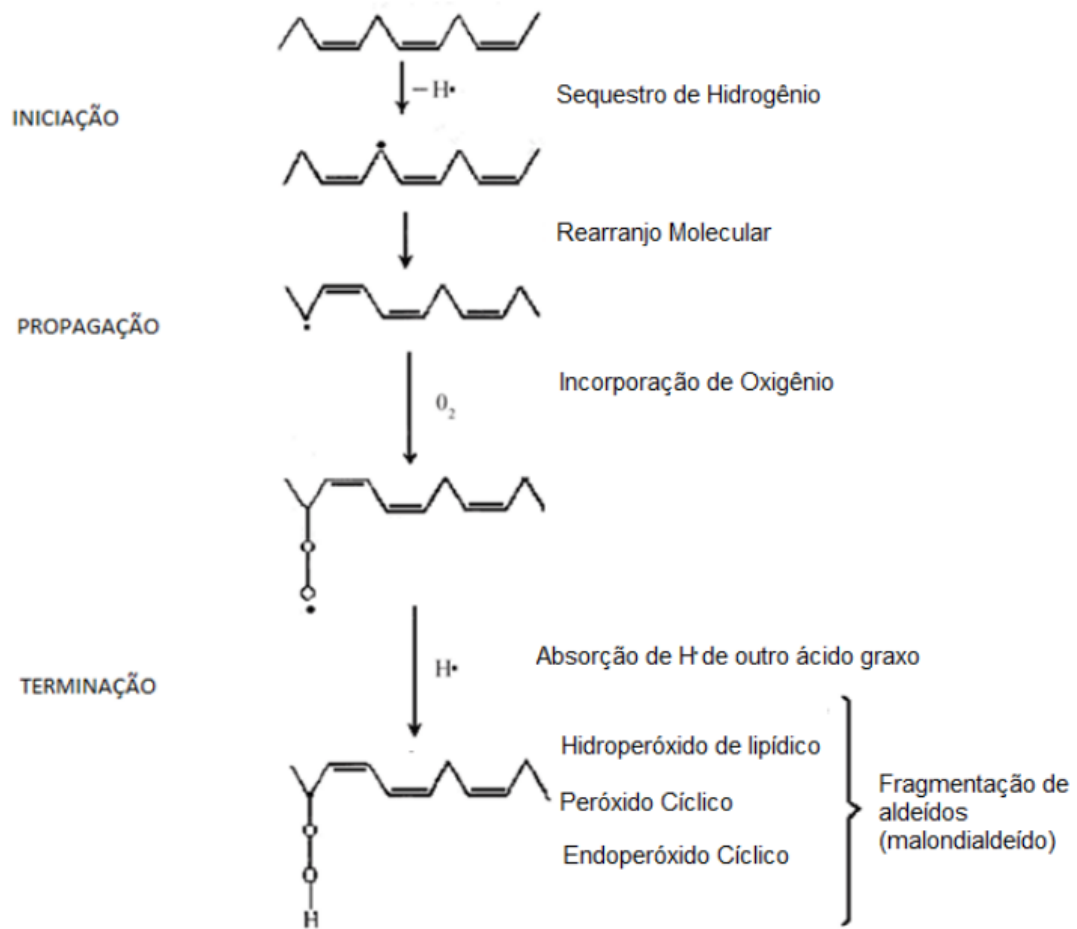


Figura 3 – Etapas do processo de peroxidação lipídica

Fonte: (Adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Diversos modelos de indução da peroxidação lipídica têm sido realizados para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais ou sintéticos *in vitro*. Nestes, substâncias podem ser testadas diante de agentes pró-oxidantes que possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio. A utilização do ferro como indutor de dano oxidativo representa um modelo bastante usado (PEREIRA et al., 2008; PUNTEL; NOGUEIRA; ROCHA, 2005). O ferro é um elemento essencial à manutenção dos processos metabólicos celulares, participando de mecanismos oxidativos e do transporte de oxigênio tecidual. Entretanto, sua capacidade de sofrer oxidação e redução cíclicas, mesmo sendo aspecto importante para suas funções biológicas, favorece a formação de espécies reativas. O excesso deste íon no compartimento intracelular pode conduzir à disfunção mitocondrial e distúrbios na homeostase do cálcio, desencadeando dano ao citoesqueleto e morte celular (SUDATI et al., 2009; WAGNER et al., 2006).

As lesões decorrentes do estresse oxidativo podem ocorrer em qualquer órgão. Nesta perspectiva, o cérebro se torna mais exposto devido à elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, níveis baixos de enzimas antioxidantes, níveis elevados de metais de transição (LOHR; KUCZENSKI; NICULESCU, 2003) e grande consumo de oxigênio (HALLIWELL, 2006). Também as células hepáticas possuem alta taxa metabólica (200kcal/kg/tecido/dia), a qual está diretamente associada a um elevado fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Parte destes elétrons é desviada, produzindo ERO adicionais (SILVA et al., 2010).

Dados da literatura apontam que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças, como em processos inflamatórios e infecciosos. A resposta inflamatória é essencial ao sistema de defesa do organismo. Porém, quando exacerbada, tem o potencial de causar danos aos tecidos e aumentar a suscetibilidade a doenças oportunistas (KUMANOTO, 2011).

1.2.1 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que exercem proteção direta ou indireta contra os efeitos tóxicos provocados por espécies reativas, podendo atuar como barreira física e prevenir a formação de radicais livres ou ainda, em sítios biológicos de atuação destes, como por exemplo, a membrana celular. Um agente antioxidante tem a capacidade de doar elétrons e evitar a oxidação de outros compostos, como as biomoléculas (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Os danos potenciais decorrentes do estresse oxidativo são minimizados pelo sistema de defesa enzimático e não-enzimático. O primeiro está representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, enquanto que vitaminas, compostos polifenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e de baixo peso molecular (bilirrubina, melatonina, estrógenos), são exemplos de antioxidantes não-enzimáticos (BONNEFOY; DRAI; KOSTKA, 2002; EDENHARDER; GRUNHAGE, 2003).

A capacidade antioxidante de produtos naturais pode ser avaliada através de métodos diretos ou indiretos. No primeiro caso, determina-se a ação de uma substância contendo antioxidantes sobre a degradação oxidativa de um sistema biológico (plasma sanguíneo, lipídeos de membrana, DNA, proteínas, etc.), ao passo em que os métodos indiretos avaliam a

capacidade de um agente antioxidante em sequestrar radicais livres, sem no entanto, este evento estar associado com a real degradação oxidativa (ROGINSKY; LISSI, 2005). Um método direto bastante descrito na literatura para a avaliação da atividade antioxidante no sistema biológico é a determinação da formação de malondialdeído (MDA), como produto de degradação oxidativa, pela técnica de TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances* (MIGUEL, 2010).

Plantas e seus derivados têm sido usados para o tratamento de várias doenças. Estima-se que até 80% da população de países em desenvolvimento se utiliza da medicina tradicional para o tratamento de seus agravos à saúde, ressaltando assim, a relevância desta prática, para comunidades economicamente menos favorecidas (BONFANTI et al., 2013).

Estudos têm sugerido que constituintes fitoquímicos possuem atividades farmacológicas com efeito benéfico no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BOLIGON et al., 2009; PEREIRA et al., 2008). Os compostos fenólicos são amplamente estudados, possuindo em sua estrutura química, um ou mais anéis aromáticos, carregando grupos hidroxilas, o que confere aos mesmos, a habilidade de sequestrar radicais livres pela formação de radicais fenoxil (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

O crescente interesse na pesquisa de bioatividades de compostos fenólicos, a exemplo de flavonoides, deve-se à sua capacidade de detoxificar radicais livres bem como, de quelar metais de transição como o ferro, e bloquear a formação de espécies reativas de oxigênio (DUGAS et al., 2000; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Por exemplo, a quercetina é um flavonoide que apresenta comprovada ação citoprotetora em modelos *in vitro* de morte por apoptose, sendo considerada um excelente antioxidante pela presença de grupamentos hidroxilas no anel B e da dupla ligação no anel C (WAGNER et al., 2006). Outros estudos mostram que a presença deste flavonoide em concentrações relativamente altas em extratos de plantas protege contra a diminuição da viabilidade celular, a depleção de glutatona e o aumento das ERO decorrentes da exposição a metais pesados (HOLLMAN; KATAN, 1997; FRANCO et al., 2009).

Vários estudos têm estimulado a investigação em torno dos constituintes químicos presentes em espécies vegetais com potencial antioxidante dada a capacidade destes de restaurar e/ou estimular o sistema de defesa endógeno, diminuindo em consequência disto, o dano oxidativo provocado pelo excesso de ERO ou ERN ou pela deficiência nos sistemas antioxidantes, e ainda, prevenir ou amenizar a evolução de determinadas doenças (KAMDEM et al., 2013; MAHDY et al., 2012).

1.2.2 Fragilidade Osmótica e Viabilidade Celular em Condições Oxidativas

Os eritrócitos são particularmente suscetíveis à ação de agentes oxidantes pelo elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas e alta concentração celular de oxigênio e hemoglobina (Hb), sendo potentes favorecedores de processos oxidativos (SICINSKA et al., 2006; SATO; SATO; SUZUKI, 1999). Assim, estas células podem ser utilizadas como modelo simples e importante de investigação de efeito tóxico de substâncias em situações associadas ao estresse oxidativo (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006).

Dada a vulnerabilidade das membranas das hemácias ao ataque de espécies reativas de oxigênio, admite-se o fato de que estas podem ter sua conformação estrutural e consequente, capacidade funcional afetada, com perda da integridade e hemólise (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Vale salientar que a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas contribuem significativamente, para a hemólise decorrente da formação de poros, subsequente perda de potássio e lise celular (DUMASWALA et al., 1999; BUREAU et al., 2005). O método de fragilidade osmótica é usado para avaliar a sensibilidade dos eritrócitos em meio com solução salina hipotônica, refletindo a capacidade das hemácias em reter uma determinada quantidade de água antes da lise. Em condições de normalidade, a membrana dos eritrócitos possui a capacidade de aumentar seu volume em até 70% como resultado de sua configuração bicôncava. Uma vez que este limiar é ultrapassado, decorre a lise da membrana (OTEIZA, 1994).

A investigação em torno da citotoxicidade de extratos de plantas é importante para a padronização de suas aplicabilidades fitofarmacêuticas (CHOODHARY; SEKHON, 2011; ARUN; SRAVYA; ROJA, 2012; ANANTHA, 2013). A atividade hemolítica avaliada a partir do teste de fragilidade osmótica é um bom indicador de citotoxicidade, sendo significativa no *screening* de plantas, gerando informação preliminar sobre as interações entre os constituintes químicos dos extratos e as estruturas celulares. Estas interações podem causar alterações nos lipídeos de membranas, levando a mudanças na rigidez da membrana (OTEIZA, 1994).

Outro método usado para avaliação da citotoxicidade de extratos de plantas é a viabilidade celular em leucócitos. Para tal, um sistema formado por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e azida sódica é utilizado com a finalidade de causar dano celular através do bloqueio da ação da catalase, que por sua vez, possui elevada atividade em leucócitos humanos como sistema de defesa antioxidante diante da lipoperoxidação induzida por H₂O₂. A viabilidade ou

não das células pode ser estimada pelo ensaio de exclusão pelo corante azul de Tripán, o qual penetra em células cujas membranas tenham sido lesionadas, sendo que as células consideradas não viáveis apresentam a coloração azul (HYNES et al., 2003; MINERVINI; FORNELLI; FLYNN, 2004).

1.3 Doenças Infecciosas

As doenças infecciosas têm sido responsáveis pelo aumento nas taxas de morbidade e mortalidade mundiais. Estima-se que cerca de 26% da mortalidade em todo o mundo se deva às causas infecciosas (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011), estando associadas à elevação da ocorrência de resistência microbiana relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos e à terapêutica inadequada, o que tem contribuído para o aumento de casos graves de infecções e diminuição das alternativas de tratamento efetivo (CORREIA et al., 2007).

Observa-se que a pesquisa por produtos naturais e derivados com capacidade antioxidante e antimicrobiana tem sido alvo de interesse de pesquisadores com vistas a oferecer novas modalidades de tratamento que possam melhorar a eficácia, com menos efeitos colaterais e menor toxicidade (COLOMBO et al., 2006).

Vale ressaltar que extratos de plantas têm sido investigados não somente pelo potencial antimicrobiano direto, mas em combinação a fármacos usados na prática clínica, pela baixa possibilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência. Muitas pesquisas já apontam para a possibilidade de modulação, em especial, para a ação sinérgica de compostos naturais quando associados a antibióticos, por exemplo, como agentes capazes de modificar a ação destas drogas. A perspectiva seria de ampliar o espectro antimicrobiano a partir do sinergismo de produtos que formariam um complexo capaz de destruir o agente microbiano (COUTINHO et al., 2009; CUNHA et al., 2011; MATIAS et al., 2010).

Estudos já comprovaram a eficácia do sinergismo de extratos de diversas plantas associadas a antibióticos contra bactérias sensíveis, a exemplo de *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias resistentes provenientes de isolados clínicos como *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* (NASCIMENTO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

Reconhece-se a importância de determinados patógenos na ocorrência de infecções de relevância clínica, a exemplo de *P. aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, responsável por

doenças de natureza oportunista, especialmente do trato respiratório e de maior incidência em pacientes internados em terapia intensiva, em uso de antibióticos, que apresentam comorbidades graves e ainda, em imunodeprimidos, sendo amplamente conhecida sua capacidade de desenvolver resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos (RIOU et al., 2010). De forma similar, bactérias do gênero *Staphylococcus* podem provocar infecções de natureza variada, sendo importantes agentes etiológicos de doenças oportunistas em humanos. *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, está comumente relacionado a infecções da pele e tecidos moles sem grandes complicações, mas também pode ser responsável por casos mais graves como pneumonia, meningite e sepse. Infecções provocadas por este patógeno apresentam taxas elevadas de morbidade e mortalidade (VERHOEFF et al., 1999).

Também merece destaque, as infecções provocadas por *Escherichia coli*, um bacilo Gram-negativo, frequentemente responsável por doenças, como infecções do sistema urinário, septicemia e meningite no período neonatal, estando ainda associada à doença diarreica principalmente, em crianças menores de cinco anos de idade, pela produção de enterotoxinas (BINGEN et al., 1998). Neste cenário, acredita-se que a pesquisa com extratos de plantas pode ser promissora no sentido de ampliar o espectro terapêutico, sobretudo, diante da problemática das infecções causadas por bactérias multirresistentes.

1.3.1 Agentes Antimicrobianos e Mecanismos de Resistência

Compreende-se por antimicrobianos, substâncias capazes de inibir o crescimento e/ou destruir microrganismos, podendo ser produzidos por bactérias ou fungos, ou ser ainda, total ou parcialmente sintéticos, tendo como principal objetivo o tratamento ou a prevenção de infecções, com redução ou eliminação dos organismos patogênicos (BROOKS et al., 2012).

Além de apresentar toxicidade seletiva, caracterizada pelo fato de que a droga deve causar prejuízos ao patógeno e não ao hospedeiro, os antimicrobianos podem atuar por uma ou várias vias, apresentando diferentes mecanismos de ação, tais como, a inibição da síntese da parede celular e da síntese proteica. No primeiro caso, encontram-se os betalactâmicos, inibidores seletivos da síntese da parede celular bacteriana. No segundo, tem-se como exemplo os aminoglicosídeos, que em um primeiro momento se ligam a uma proteína receptora específica localizada na subunidade 30S do ribossomo microbiano, em seguida

bloqueiam a atividade normal do ‘complexo de iniciação’ para a formação de peptídeos. Em sequência, a mensagem do mRNA é lida equivocadamente, ocorrendo uma inserção incorreta de um aminoácido no peptídeo com conseqüente formação de uma proteína não funcional. Na etapa seguinte, a ligação do aminoglicosídeo resulta em quebra do polissomos e sua separação em monossomos incapazes de sintetizar proteínas. Estas atividades ocorrendo simultaneamente podem desencadear como efeito global, a morte da bactéria (BROOKS et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; SAVIC et al., 2008).

Outro mecanismo de ação dos antimicrobianos é a inibição da síntese dos ácidos nucleicos, como no caso das quinolonas, que bloqueiam a síntese do DNA microbiano ao inibirem a enzima DNA girase (BROOKS et al., 2012; DRLICA et al., 2008).

É válido mencionar que apesar dos avanços ocorridos na terapêutica microbiana, a resistência bacteriana tem aumentado exponencialmente, constituindo um grande problema de saúde pública (ROSSI; ANDREAZII, 2005). De acordo com SARAIVA (2012), a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem reconhecido nas plantas e seus derivados, uma ferramenta promissora para o tratamento de infecções, dada à sua ação de modificar o efeito de drogas.

De maneira geral, os mecanismos pelos quais as bactérias adquirem resistência aos antibióticos são: (i) alterações moleculares que interferem na ligação do antibiótico ao sítio de atuação, como ocorre com antibióticos betalactâmicos e quinolonas; (ii) inativação enzimática do antibiótico, a exemplo de aminoglicosídeos e betalactamases que inativam penicilinas e cefalosporinas, e ainda, (iii) modificações na barreira de permeabilidade bacteriana, impedindo que o antibiótico alcance o alvo. Em um quarto mecanismo, as bactérias podem ainda (iv) desenvolver um alvo estrutural alterado para o fármaco, uma via metabólica alterada que omite a reação inibida pelo fármaco ou elaborar uma enzima alterada que ainda tem a capacidade de desempenhar sua função metabólica, mas é bem menos afetada pelo fármaco (BROOKS et al., 2012; GEORGOPAPADAKOU; LIU, 1980; NEVES et al., 2007; SILVEIRA et al., 2006; SOUSA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

Pode-se mencionar a resistência de *P. aeruginosa* a uma série de antibióticos clinicamente usados, por mecanismos como a inativação de aminoglicosídeos por ação enzimática, a diminuição de permeabilidade de sua membrana externa e também modificações no alvo de quinolonas (LEHMAN; THOMAS, 2007). A terapêutica antimicrobiana para cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* envolve o uso de antibióticos carbapenêmicos como o imipenem, geralmente reservado para infecções mais graves, como as hospitalares resistentes às demais classes de fármacos (RUPP; FEY, 2003).

O imipenem possui efetiva atividade contra vários bastonetes Gram-negativos, Gram-positivos e anaeróbicos, sendo resistente a betalactamases. No entanto, este antimicrobiano é inativado pelas di-hidropetidases no rim, razão pela qual é administrado em associação à cilastatina, um inibidor da peptidase. Para infecções provocadas por *P. aeruginosa*, é importante a administração concomitante deste fármaco com um aminoglicosídeo, dada a rapidez com que a resistência microbiana se estabelece. Neste aspecto, vale salientar, que a gentamicina, um antibiótico pertencente à classe dos aminoglicosídeos, tem sido empregada para o tratamento de infecções graves desencadeadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (BROOKS et al., 2012).

1.3.2 Terapias Alternativas das Doenças Infeciosas: Modulação dos Antibióticos

Várias vantagens têm sido apontadas na utilização de derivados de plantas como antimicrobianos, podendo ser citadas a menor incidência de efeitos colaterais, menor custo, maior nível de tolerância e aceitação pelos usuários (PAREKH; CHANDA, 2007), tendo sido este potencial terapêutico amplamente pesquisado (BARRETO et al., 2014; COUTINHO et al., 2010).

A avaliação sobre o efeito antimicrobiano de extratos de plantas pode ser realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placa. Entende-se por CIM, a menor concentração de uma substância na qual não ocorre crescimento microbiano (JAVADEPOUR et al., 1998). A literatura considera atividade antimicrobiana clinicamente relevante, quando os valores de CIM são inferiores a 256 µg/mL (HOUGHTON et al., 2007).

Ressalta-se que extratos de plantas podem inibir o crescimento microbiano por diversas formas, habilidade que pode estar associada à natureza hidrofóbica de seus componentes, os quais podem interagir com a bicamada lipídica da membrana celular e alterar a cadeia respiratória e a produção de energia, ou aumentar a permeabilidade celular aos antibióticos levando à interrupção da atividade celular, sendo a interferência no sistema enzimático um outro mecanismo de ação. Estes mecanismos podem ocorrer através da combinação de extratos de plantas em concentrações denominadas de sub-inibitórias (COUTINHO et al., 2008; 2009; NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999).

No que concerne à pesquisa com extratos de diversas plantas, a literatura relata efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (KUETE et al., 2010). Particularmente para cepas Gram-negativas, as quais possuem uma estrutura da parede celular mais complexa, a modulação sinérgica com produtos naturais se torna ainda mais importante como forma de destruição microbiana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Assim, não somente a investigação sobre a ação antimicrobiana direta de plantas, mas a avaliação do potencial destas em modular a ação de antibióticos tem sido ressaltada. Vale referir que compostos como fenóis têm sido apontados como responsáveis por esta atividade, uma vez que possuem a capacidade de interagir com os constituintes químicos presentes nas membranas (NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999; MENDES et al., 2011).

A partir do exposto, torna-se relevante a pesquisa de novos agentes antimicrobianos, os quais possam constituir em alternativas terapêuticas especialmente, em face da resistência microbiana às drogas geralmente utilizadas, acreditando-se que a busca por antimicrobianos derivados de espécies vegetais representa uma modalidade viável e inovadora.

1.4 Justificativa

Vários estudos correlacionam o estresse oxidativo a diversas patologias humanas. A capacidade que as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio possuem de causar danos a biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA é bem enfatizada na literatura e tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas que visem explorar esta relação para a descoberta de novas substâncias com potencial antioxidante. Vale referir que o *status* oxidativo celular pode tornar o organismo mais vulnerável ao surgimento de doenças, inclusive em decorrência de um processo inflamatório exacerbado e conseqüente, liberação de espécies reativas.

É importante enfatizar que o tratamento com agentes antimicrobianos pode sofrer alterações e ter sua resposta diminuída em situações oxidativas. Some-se a este fato, os diversos mecanismos de resistência microbiana, tornando-se um desafio a utilização de fármacos mais efetivos, por apresentar melhor resposta, com menos efeitos colaterais e boa aceitação entre os usuários. Assim, produtos derivados de plantas despertam o interesse de pesquisadores na perspectiva de novas terapêuticas a partir da indicação de uso etnofarmacológico. Deste modo, o potencial antioxidante de extratos vegetais tem sido alvo

de pesquisas, considerando a capacidade que agentes antioxidantes detêm de modificar o estado de doença e diminuir e/ou evitar o dano provocado pelo estresse oxidativo.

Considerando que o *Anacardium microcarpum* tem sido utilizado na medicina popular para tratamento de doenças de caráter inflamatório e infeccioso, dentre outras, torna-se relevante a realização de estudos em torno de seus possíveis efeitos antioxidante e antimicrobiano, bem como de possível toxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* as atividades antioxidante, citotóxica e o efeito antibacteriano e modulador de drogas antibacterianas, do extrato etanólico e das frações acetato de etila e metanólica, das cascas do *Anacardium microcarpum*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização fitoquímica dos constituintes químicos presentes no extrato e diferentes frações do *A. microcarpum*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico e das frações, acetato de etila e metanólica do *A. microcarpum* pelo ensaio do radical 1,1-difenil, 2-picrilidrazila (DPPH);
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações, acetato de etila e metanólica do *A. microcarpum* sobre a peroxidação lipídica induzida por ferro em homogeneizado de cérebro e fígado de ratos;
- Avaliar as possíveis alterações do extrato etanólico e das frações do *A. microcarpum* na viabilidade celular em leucócitos humanos (citotoxicidade);
- Determinar a influência do extrato etanólico e das frações do *A. microcarpum* na fragilidade osmótica em eritrócitos humanos;
- Avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de drogas antibacterianas de uso clínico, do extrato etanólico e das frações do *A. microcarpum* em diferentes linhagens bacterianas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*).

3 RESULTADOS

Os resultados que compõem esta tese estão apresentados na forma de um artigo e um manuscrito, sendo que os itens: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências se encontram estruturados de acordo com as normas das respectivas revistas nas quais os mesmos estão publicados ou submetidos.

3.1 Artigo 1

Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*)

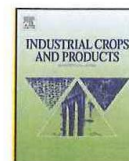
Valter Menezes Barbosa Filho, Emily Pansera Waczuk, Jean Paul Kamdem, Amos Olalekan Abolaji, Sirleis Rodrigues Lacerda, José Galberto Martins da Costa, Irwin Rose Alencar de Menezes, Aline Augusti Boligon, Margareth Linde Athayde, João Batista Teixeira da Rocha, Thais Posser.

Periódico: Industrial Crops and Products, 2014, p. 280-288.



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*)



Valter Menezes Barbosa Filho^a, Emily Pansera Waczuk^b, Jean Paul Kamdem^{b,e,*}, Amos Olalekan Abolaji^{b,f}, Sirleis Rodrigues Lacerda^a, José Galberto Martins da Costa^c, Irwin Rose Alencar de Menezes^d, Aline Augusti Boligon^g, Margareth Linde Athayde^g, João Batista Teixeira da Rocha^b, Thaís Posser^{h,**}

^a Universidade Regional do Cariri-URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 63.100-000, Pimenta, Crato-Ceará, Brazil

^b Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais, CEP 63.105.000, Crato-Ceará, Brazil

^d Departamento de Química Biológica, Chemistry Biology Department, Medicinal Chemistry and Pharmacology Laboratory, Universidade Regional do Cariri – URCA, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

^f Drug Metabolism and Molecular Toxicology Unit, Department of Biochemistry, College of Medicine, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

^g Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^h Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS CEP 97300-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2013

Received in revised form 21 January 2014

Accepted 16 February 2014

Keywords:

Anacardium microcarpum

Caju

Oxidative stress

HPLC–DAD

Antioxidant

TBARS

ABSTRACT

Anacardium microcarpum is consumed as infusion in the Brazilian folk medicine for the treatment of various diseases in which free radicals assaults have been implicated in their etiology. However, there is no scientific report on this traditional claim. Thus, we investigated for the first time, its antioxidant activity as well as its potential toxic effects on human leukocytes and erythrocytes *in vitro*. In addition, qualitative and quantitative analyses of the classes of phytochemicals in the various fractions from *A. microcarpum* were carried out by HPLC–DAD. The results demonstrated that IC₅₀ (for DPPH radical scavenging) varied from 27.88 ± 1.60 (AcOEt fraction) to 32.86 ± 3.05 µg/mL (EtOH fraction), and all the fractions strongly inhibited Fe²⁺ (10 µM)-induced lipid peroxidation in rat brain and liver homogenates. All the fractions were not cytotoxic to leukocytes and were able to prevent against 2 mM H₂O₂-induced cytotoxicity. Moreover, the fractions did not have any effect on human erythrocytes osmotic fragility, suggesting that *A. microcarpum* infusion can be consumed safely. Preliminary phytochemical analysis exhibited the presence of phenolics and flavonoids compounds as major phytochemical groups. Taking together, our results indicate that the popular use of *A. microcarpum* for preventive or therapeutic agents in pathologies where cell oxidative stress is implicated has a scientific basis.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The growing interest in plant-derived extracts, instead of pure compounds have generated considerable interest of researchers in finding information on the biological activities and toxicity of

various plants traditionally used in folk medicine to treat diseases (Lantto et al., 2009; Oke and Aslim, 2010; Kuere et al., 2011; Awah et al., 2012; Kamdem et al., 2013). This is due to the fact that their health-promoting effects might involve several active compounds in the extracted material, and that they are generally regarded as safe (Dastmalchi et al., 2007; Lantto et al., 2009).

The genus *Anacardium* is represented by eleven (11) species in which *Anacardium occidentale* is widely known due to its nutritional and economic values. *A. microcarpum* (family: Anacardiaceae) known as Caju, is one of the plant species of this genus. The plant is native from Brazil, especially in the Northeastern region. Its fruits contain high level of vitamin C, sugars, phenolic compounds and minerals (calcium, iron and phosphorous). Anacardic acid which is

* Corresponding author at: Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Tel.: +55 5596343886.

** Corresponding author.

E-mail addresses: kamdemjeanpaul2005@yahoo.fr, jpkamdem@gmail.com (J.P. Kamdem), thaisposser@hotmail.com (T. Posser).

used in the chemical industry for the production of cardanol (used for resins, coatings and frictional materials), has been reported to be the main component of both *A. occidentale* and *A. microcarpum* (Agostini-Costa et al., 2004; Alexander, 2008; Tedong et al., 2010). The infusions of *A. microcarpum* barks is used in Brazilian folk medicine as a tonic for the treatment of inflammation, rheumatism, tumor and infectious diseases, in which free radicals and/or reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) assaults have been implicated in their etiology.

Substantial evidences from the literature indicate that free radicals and/or ROS/RNS may cause cell and tissue damage by interacting with cell membranes and organelles. For instance, by-products of lipid peroxidation have been shown to cause profound alterations in the structural organization and functions of the cell membrane such as loss of membrane fluidity, loss of essential fatty acid, increased permeability to ions, leading to the release of cell and organelle contents (Van Ginkel and Sevanian, 1994; Gutteridge, 1995; Petrescu et al., 2001). Therefore, the potential of plant extracts or natural antioxidants that may help the organism to modify the oxidative status in disease conditions is of utmost importance.

In spite of the beneficial effects of plant extracts, exposure to phytotherapeutic agents however, can represent a serious public health problem (Secco, 1990; De Moraes et al., 2006) since several of them can be toxic to cells (ex. leukocytes and erythrocytes) (Bent and Ko, 2004; Shi et al., 2008). They can exert their toxicity by promoting excessive fluidity or denaturation of the membranes (Penha-Silva et al., 2007; De Freitas et al., 2008). Some authors have attempted to screen the potential toxic and beneficial effects of plants extracts (Yen et al., 2001; Ajaiyeoba et al., 2006; Oke and Aslim, 2010; Kuete et al., 2011; Awah et al., 2012; Kamdem et al., 2013) using several cell types. As part of our interest in the efficacy and safety of *A. microcarpum*, we evaluated its antioxidant activity and potential toxicity in human leukocytes and erythrocytes.

Based on the aforementioned information and considering that there is no scientific basis in the literature on the use of *A. microcarpum* in the management of free radicals related diseases as well as its potential toxic effect to human, the present study was designed to investigate for the first time: (i) the antioxidant activity of different fractions from *A. microcarpum* barks using two *in vitro* biochemical assays; (ii) the cytotoxicity of fractions from *A. microcarpum* in human leukocytes using the Trypan blue assay; (iii) the influence of different fractions from *A. microcarpum* on the osmotic fragility of human erythrocytes. In addition, the chemical characterization of the fractions was performed using high performance liquid chromatography coupled to diode-array detector (HPLC–DAD).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemicals used including solvents were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, caffeic acid, ellagic acid and chlorogenic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol, catechin and epicatechin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid, malonaldehydebis-(dimethyl acetal) (MDA), thiobarbituric acid (TBA), sodium azide and hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Plant collection and extractions

The stem barks of *A. microcarpum* were collected from Barrero Grande, Crato-Ceará (7°22' S; 39°28' W; 892 m sea level), Brazil, in

November 2011. The plant material was identified by Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva of the herbarium Caririense Dárdano de Andrade – Lima (HCDAL) of the Regional University of Cariri (URCA) and a voucher specimen was deposited (number 6702).

The fresh barks of *A. microcarpum* were macerated with 99.9% of ethanol and water (1:1, v/v) for 3 days. The suspension was filtered, solvent evaporated under reduced pressure and lyophilized to obtain 490 g of ethanolic extract (EtOH fraction). One hundred and fifty grams (150 g) of this was partitioned with ethyl acetate and methanol to obtain 12.5 g of ethyl acetate fraction (AcOEt fraction) and 105.23 g of methanolic fraction (MeOH fraction). All the fractions were stored in the freezer and re-suspended in water prior to experiments.

2.3. Identification and quantification of phenolic and flavonoid compounds by HPLC–DAD

Reversed phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm) packed with 5 μm diameter particles; the mobile phase was made up of water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B for 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively, following the method described by Boligon et al. (2013) with slight modifications. *A. microcarpum* (MeOH fraction, EtOH fraction and AcOEt fraction) were analyzed at a concentration of 15 mg/mL. The presence of twelve compounds namely, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, catechin, epicatechin, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin, kaempferol, and kaempferol glycoside were investigated. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectra with those of the commercial standards. The flow rate was 0.7 ml/min, injection volume of 50 μL and the wavelengths were 257 nm for gallic acid, 280 nm catechin and epicatechin, 327 nm for caffeic, ellagic and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol, kaempferol glycoside and rutin. The samples and mobile phase were filtered through 0.45 μm membrane filter (millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030–0.400 mg/mL for quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, epicatechin, catechin and kaempferol; and 0.050–0.350 mg/mL for gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200–500 nm). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicates. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviations of the responses and the slopes using three independent analytical curves, as defined by Sabir et al. (2013). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.4. DPPH radical scavenging assay

Scavenging activity on DPPH free radicals by the fractions was assessed according to the method described by Kamdem et al. (2013). Twenty microliters of the fractions (1–400 μg/mL) was mixed with 100 μL of 0.3 mM DPPH in ethanol. The mixture was allowed to stand at room temperature for 30 min in the dark. Blank solutions were prepared with each test sample (20 μL) and 100 μL of water. The negative control was 100 μL of 0.3 mM DPPH with 20 μL of water, while ascorbic acid (1–50 μg/mL) was used as positive control. The absorbance was measured at 518 nm against each blank using ELISA microplate reader (SpectraMax, USA) and the

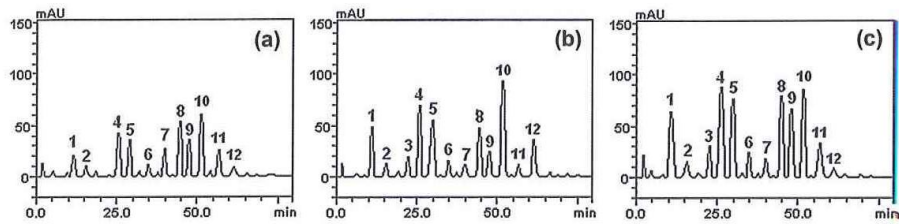


Fig. 1. High performance liquid chromatography elution profiles of (a) methanolic, (b) ethanolic and (c) ethyl acetate fractions of *A. microcarpum*. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercitrin (peak 9), quercetin (peak 10), kaempferol (peak 11) and kaempferol glycoside (peak 12).

Inhibition of free radical, DPPH, in percent was calculated using the formula:

$$\% \text{inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

The IC_{50} value, defined as the concentration of the sample providing 50% reduction in initial DPPH concentration, was calculated from the graph plotting inhibition percentage against sample concentration.

2.5. Lipid peroxidation assay in the brain and liver

Rats were decapitated; whole brain and liver were dissected, placed on ice and weighed. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris–HCl, pH 7.4 (1:10, w/v for liver and 1:5, w/v for brain). The homogenates were centrifuged for 10 min at $3600 \times g$ to yield a pellet which was discarded, and a low-speed supernatant (S1) was used for the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. Aliquots of the brain or liver homogenates (20 μL), and 10 μM of FeSO_4 were incubated for 1 h at 37°C in the presence or absence of the fractions (1–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), to induce lipid peroxidation. Thereafter, 40 μL of sodium dodecyl sulfate (8.1%), 100 μL of acetic acid/HCl (pH 3.4) and 100 μL of 0.6% thiobarbituric acid (TBA) were subsequently added to the reaction mixture and incubated at 100°C for 1 h. After cooling, samples were centrifuged for 2 min at 6000 rpm and the absorbance of supernatant was measured at 532 nm using an ELISA plate reader (SpectraMax, USA). Standard curve of malondialdehyde (MDA) was used to quantify TBARS production in brain and liver homogenates (Ohkawa et al., 1979).

2.6. Collection of human blood samples

2.6.1. Preparation of human leukocytes

Heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from the hospital of Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (age 25 ± 10). This work was carried out in accordance with the Guidelines of the Ethical Committee of UFSM and approved by the institutional review board of UFSM (0089.0.243.000-07).

Differential erythrocyte sedimentation with dextran was used to separate leukocytes of the blood as previously described (Kamdem et al., 2013). Two milliliters of dextran 5% was added to 8 mL of blood sample, mixed and allowed to stand at room temperature for 45 min. Subsequently, the supernatant was centrifuged (2000 rpm, 10 min) and the pellet was washed with a solution of erythrocyte lysis (NH_4Cl , 150 mM; NaHCO_3 , 10 mM and disodium EDTA, 1 mM, pH 7.4), homogenized and left for 5 min. Then, the tube was centrifuged (2000 rpm, 2 min) and the pellet was washed again with lysis solution. The pellet was suspended in 2 mL Hank's buffer solution saline (HBSS) containing in mM: 5.4 KCl, 0.3 Na_2HPO_4 ,

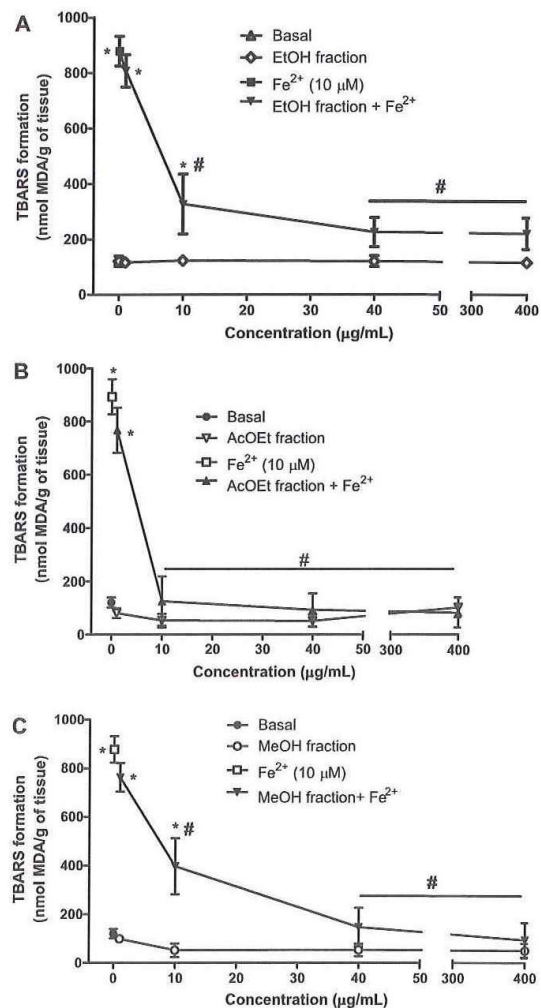


Fig. 2. The inhibitory effect of EtOH fraction (A), AcOEt fraction (B) and MeOH fraction (C) on Fe^{2+} (10 μM)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. Values are the means of $n=3$ independent experiments performed in duplicate \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. basal, # $p < 0.05$ vs. Fe^{2+} .

Table 1
Phenolics and flavonoids composition of *A. microcarpum* fractions.

Compounds	MeOH fraction (mg/g)	EtOH fraction (mg/g)	AcOEt fraction (mg/g)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
a. Gallic acid	7.13 \pm 0.01	14.53 \pm 0.02	21.32 \pm 0.04	0.026	0.085
b. Chlorogenic acid	–	5.83 \pm 0.03	10.57 \pm 0.03	0.009	0.030
c. Caffeic acid	13.57 \pm 0.05	19.36 \pm 0.02	27.19 \pm 0.03	0.031	0.102
d. Ellagic acid	13.19 \pm 0.01	15.12 \pm 0.01	25.61 \pm 0.05	0.018	0.059
e. Catechin	3.05 \pm 0.04	3.79 \pm 0.01	6.24 \pm 0.02	0.015	0.049
f. Epicatechin	3.11 \pm 0.01	4.53 \pm 0.01	9.35 \pm 0.01	0.013	0.041
g. Rutin	9.86 \pm 0.03	3.81 \pm 0.03	7.03 \pm 0.01	0.045	0.148
h. Isoquercitrin	15.79 \pm 0.03	14.25 \pm 0.01	25.98 \pm 0.02	0.027	0.089
i. Quercitrin	13.20 \pm 0.02	7.49 \pm 0.02	20.64 \pm 0.02	0.032	0.105
j. Quercetin	18.16 \pm 0.01	28.03 \pm 0.04	27.02 \pm 0.01	0.019	0.062
k. Kaempferol	9.93 \pm 0.02	3.54 \pm 0.01	11.25 \pm 0.02	0.008	0.027
l. Kaempferol glycoside ^a	3.15 \pm 0.04	9.06 \pm 0.03	3.47 \pm 0.01	–	–

^a Quantified as kaempferol. Results are expressed as mean \pm S.E. of three determinations. LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification. The phytochemicals a–d represent phenolics compounds while, e–l are flavonoids compounds.

0.4 KH_2PO_4 , 4.2 NaHCO_3 , 1.3 CaCl_2 , 0.5 MgCl_2 , 0.6 MgSO_4 , 137 NaCl and 10 D-glucose, 10 Tris-HCl, pH 7.4; and adjusted to 2×10^6 leukocytes/mL with HBSS buffer.

2.6.2. Preparation of human erythrocytes

Ten milliliters of blood was collected into heparinized tubes from healthy volunteers. The erythrocytes were separated by centrifuging the blood sample at 2000 rpm for 5 min at room temperature. The plasma was discarded and the cell pellet was washed three times with phosphate buffered saline (6.1 mM and pH 7.4, containing 150 mM NaCl).

2.7. Cytotoxicity assay in human leukocytes

The toxic effect of fractions from *A. microcarpum* bark extract toward leukocytes was determined by the method described by Mischell and Shiingi (1980). Briefly, 2.5 μL of different concentrations of fractions (1–400 $\mu\text{g/mL}$) was added to cell suspension (497.5 μL) and incubated in the presence or absence of hydrogen peroxide (2 mM) + azide (1 mM), for 3 h at 37 $^\circ\text{C}$ in a water bath. Hydrogen peroxide (2 mM) + azide (1 mM) was used as positive control, while distilled water was used as negative control. After the incubation, a volume of 50 μL of cells suspension was mixed with 50 μL of 0.4% Trypan blue solution and left for 5 min. The cell viability was determined microscopically (400 \times magnification) using a hemocytometer and was calculated as the number of living cells (*i.e.*, those not stained with Trypan blue) divided by the total number of cells multiplied by 100.

2.8. Osmotic fragility measurement of human erythrocytes

The osmotic fragility of red blood cells was determined by using a modified method of Godal and Heisto (1981). Five hundred microliters of erythrocyte, 100 μL of each fraction (1–400 $\mu\text{g/mL}$) prepared in 1% PBS, pH 7.4, and 900 μL of phosphate buffer saline (6.1 mM and pH 7.4, containing 150 mM NaCl), pH 7.4 were pre-incubated for 3 h at 37 $^\circ\text{C}$. After incubation, the sample was mixed, centrifuged (2500 rpm for 10 min) and the supernatant was discarded. The erythrocytes were washed twice with phosphate buffered saline (6.1 mM and pH 7.4, containing 150 mM NaCl), pH 7.4, centrifuged at 2500 rpm for 2 min and the supernatant discarded. Two duplicate sets of assay tubes containing 1.5 mL of 0–0.9% (w/v) NaCl solution in distilled water were incubated with 7.5 μL of treated or untreated erythrocytes for 20 min. Then, the sample was homogenized and centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The lysis of erythrocytes was followed by measuring the absorbance of hemoglobin content in the supernatants at 540 nm using microplate reader (SpectraMax, USA). A value of 100% lysis was assigned to the supernatant of the tube with erythrocytes and

distilled water. The percentage of hemolysis or osmotic fragility in each assay tube was calculated using the equation:

$$\text{Osmotic fragility (\%)} = \frac{A}{A_1} \times 100$$

where A represents the absorbance of treated erythrocytes and A_1 , the absorbance of untreated erythrocytes (control).

2.9. Statistical analysis

The results are shown as means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was measured by one-way (DPPH, TBARS, Cytotoxicity) or two-way (osmotic fragility) analysis of variance (ANOVA), followed by Benferroni post-test when appropriated. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. HPLC characterization of fractions from *A. microcarpum* and content of antioxidant compounds

The HPLC profile of methanolic (MeOH), ethanolic (EtOH), and ethyl acetate (AcOEt) fractions of the barks of *A. microcarpum* is depicted in Fig. 1A–C. Chlorogenic acid (retention time- $t_R = 21.86$ min, peak 3) appeared to be absent in MeOH fraction (Fig. 1A) and present in EtOH and AcOEt fractions (Fig. 1B and C). However, the chromatograms of all the fractions revealed the presence of gallic acid ($t_R = 12.35$ min, peak 1), catechin ($t_R = 15.97$ min, peak 2), caffeic acid ($t_R = 25.03$ min, peak 4), ellagic acid ($t_R = 29.78$ min, peak 5), epicatechin ($t_R = 35.11$ min, peak 6), rutin ($t_R = 40.51$ min, peak 7), isoquercitrin ($t_R = 44.27$ min, peak 8), quercitrin ($t_R = 42.93$ min, peak 9), quercetin ($t_R = 52.16$ min, peak 10), kaempferol ($t_R = 56.27$ min, peak 11) and kaempferol glycoside ($t_R = 61.94$ min, peak 12). They were identified by comparisons with the retention times and UV spectra of the standards analyzed under similar analytical conditions.

The contents of these compounds in each fraction indicate that quercetin (18.16 \pm 0.01 mg/g) and isoquercetin (15.79 \pm 0.03 mg/g) were the major components present in MeOH fraction, while catechin (3.05 \pm 0.04 mg/g) and epicatechin (3.11 \pm 0.01 mg/g) were the less abundant. Caffeic acid and quercetin were the major components in EtOH and AcOEt fractions with respectively (19.36 \pm 0.02 mg/g) and (28.03 \pm 0.04 mg/g) for EtOH fraction and (27.19 \pm 0.03 mg/g) and (27.02 \pm 0.01 mg/g) for AcOEt fraction. Kaempferol (3.54 \pm 0.01 mg/g) and catechin (3.79 \pm 0.01 mg/g) appeared to be the minor component in EtOH fraction, while kaempferol glycoside (3.47 \pm 0.01 mg/g) and catechin

(6.24 ± 0.02 mg/g) were the minor components in AcOEt fraction (Table 1).

3.2. Scavenging effect of *A. microcarpum* fractions on DPPH radicals

The radical scavenging abilities of the fractions and ascorbic acid at different concentrations were tested against the scavenging of DPPH radicals (Table 2). All the fractions showed significant concentration-dependent DPPH radical scavenging capacity. Among them, AcOEt fraction was most efficient, with the lowest IC₅₀ value (27.88 ± 1.6 µg/mL), which was three times higher than that of ascorbic acid used as reference. The inhibitory potency was in the following order: AcOEt > MeOH fraction ≈ EtOH (Table 2).

3.3. TBARS assay

3.3.1. Effect of *A. microcarpum* fractions on Fe²⁺-induced lipid peroxidation in the rat brain

Fig. 2A–C shows the inhibition of lipid peroxidation (LPO) assessed by the amount of MDA produced. All the fractions did not have any effect on basal lipid peroxidation when compared with the basal or control ($p > 0.05$). Fe²⁺ (10 µM) caused significant increase in lipid peroxidation ($p < 0.001$, Fig. 2A–C) in rat brain homogenates, which was significantly reduced ($p < 0.05$) by the treatment with EtOH fraction (Fig. 2A), AcOEt fraction (Fig. 2B) and MeOH fraction (Fig. 2C). Additionally, AcOEt fraction was most efficient in inhibiting Fe²⁺-induced LPO. The maximum reduction was attained at 40 µg/mL for EtOH fraction (Fig. 2A) and 10 µg/mL for AcOEt fraction (Fig. 2B).

3.3.2. Effect of *A. microcarpum* fractions on Fe²⁺-induced lipid peroxidation in the rat liver

As expected, Fe²⁺ (10 µM) caused significant ($p < 0.05$) LPO in rat liver homogenates which was evidenced by the TBARS formation in comparison with the basal (Fig. 3A–C). However, treatment with EtOH fraction (10–400 µg/mL) (Fig. 3A), AcOEt fraction (1–400 µg/mL) (Fig. 3B) and MeOH fraction (1–400 µg/mL) (Fig. 3C) were effective in protecting against LPO induced by Fe²⁺. It should be stressed that AcOEt fraction (Fig. 3B) and MeOH fraction (Fig. 3C) showed higher antioxidant activity by reducing LPO at the lowest tested concentration (1 µg/mL). Under basal condition, none of the fractions significantly changed the TBARS formation when compared with the basal (Fig. 3A–C).

3.4. Cytotoxicity effect of *A. microcarpum* fractions on human leukocytes

The toxicity of fractions from *A. microcarpum* was investigated on human leukocytes. The results shown in Fig. 4 indicate that EtOH fraction (Fig. 4A), AcOEt fraction (Fig. 4C) and MeOH fraction (Fig. 4E) exhibited no toxic effect on leukocytes at the concentrations tested (1–400 µg/mL) when compared to the control ($p > 0.05$). The cell viability using trypan blue staining was generally greater than 90% at all the concentrations tested, confirming the absence of cytotoxicity. Cytotoxicity was induced with H₂O₂ (2 mM) and Azide (1 mM), and the protective effect of the plant extract was investigated. As expected, exposure of leukocytes to H₂O₂ (2 mM) and Azide (1 mM) for 3 h caused significant toxicity to cells, as shown by decrease in cell viability (approximately 40%) when compared to the control ($p < 0.05$, Fig. 4B, D and F). However, this effect was significantly attenuated by co-treatment with EtOH fraction (10–400 µg/mL) (Fig. 4B), AcOEt fraction (40–400 µg/mL) (Fig. 4D) and MeOH fraction (400 µg/mL) (Fig. 4F) when compared with H₂O₂ (2 mM) + Azide (1 mM) alone ($p < 0.05$).

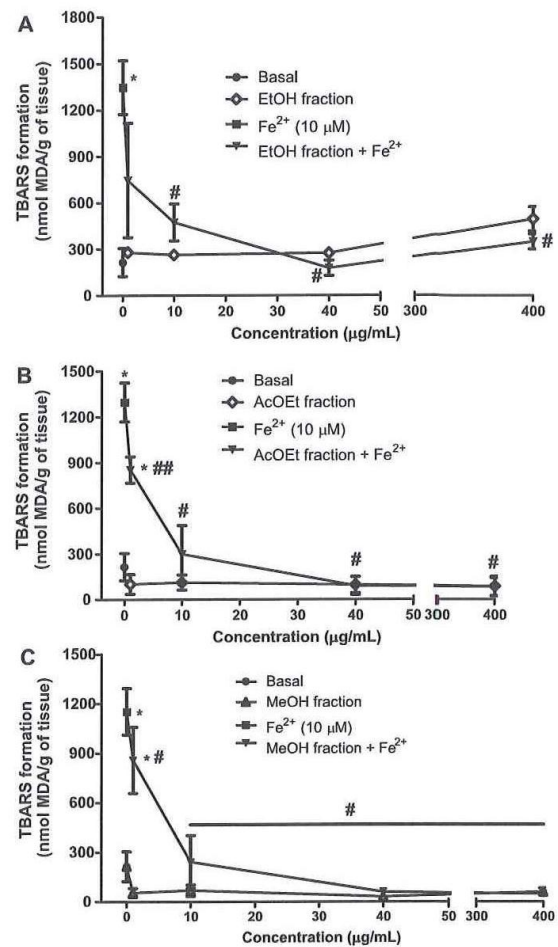


Fig. 3. The inhibitory effect of *A. microcarpum* EtOH fraction (A), AcOEt fraction (B) and MeOH fraction (C) on Fe²⁺ (10 µM)-induced lipid peroxidation in rat liver homogenates. Values are the means of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate ± SEM. * $p < 0.05$ vs. basal, # $p < 0.05$ vs. Fe²⁺.

3.5. Osmotic fragility

Fig. 5 shows the osmotic hemolysis of human erythrocytes from both control (untreated) and treated erythrocytes with different concentrations of fractions from *A. microcarpum* (1–400 µg/mL) at different salt concentrations (0–0.9%). The results indicated that no significant differences were observed between the treated erythrocytes osmotic fragility with EtOH fraction (Fig. 5A), AcOEt fraction (Fig. 5B), MeOH fraction (Fig. 5C) and their control groups ($p > 0.05$).

4. Discussion

Scientific and safety data to support the ethnopharmacological claims on the use of *A. microcarpum* in the Brazilian folk medicine are inexistent. In this context, the present study aimed to investigate the efficacy and safety of this plant, on the basis of its antioxidant activity and toxicity using human leukocytes and erythrocytes models.

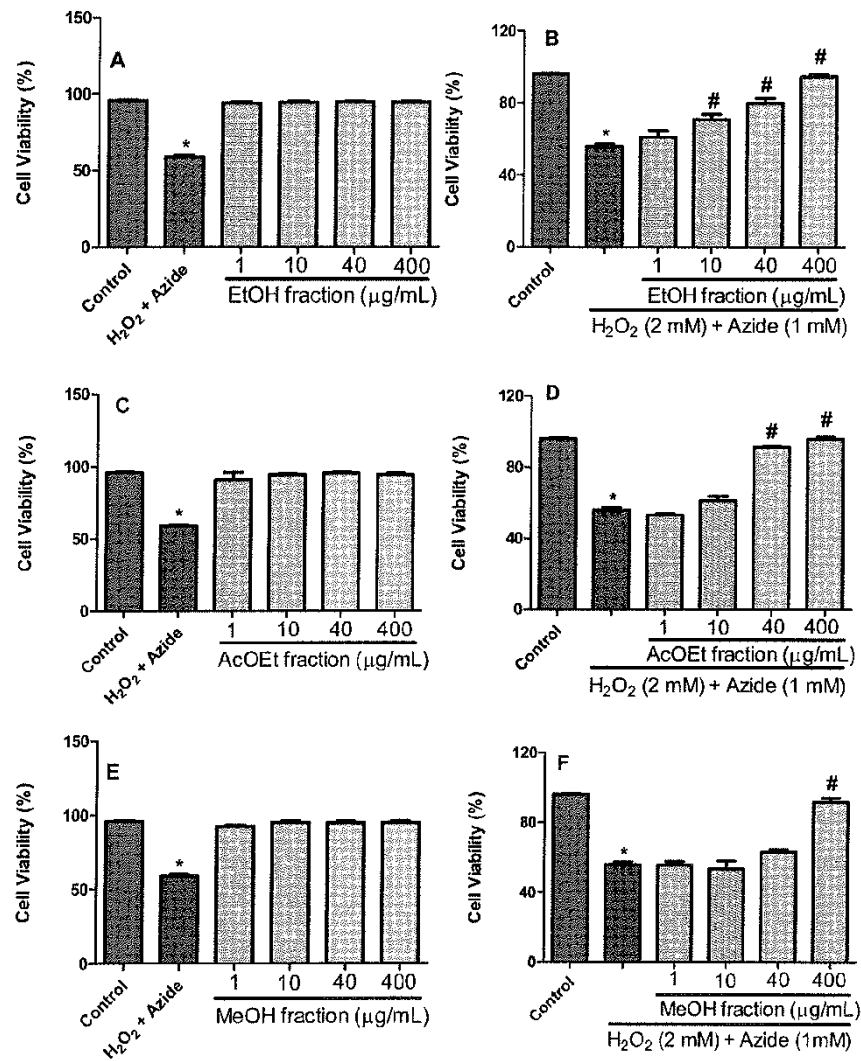


Fig. 4. Effect of different fractions from *A. microcarpum* on human leukocytes in the absence (A, C, and E) or presence (B, D, and F) of H₂O₂ (2 mM) + Azide (1 mM). The results are expressed as percentage of control. Values are the means of n=3 independent experiments performed in duplicate ± SEM. * p < 0.05 vs. control, # p < 0.05 vs. H₂O₂ (2 mM) + Azide (1 mM) alone.

Table 2
Percent inhibition of DPPH by different concentrations of *A. microcarpum* fractions.

Concentration (µg/mL)	Reference (ascorbic acid)	EtOH fraction	AcOEt fraction	MeOH fraction
1	8.07 ± 3.67	5.76 ± 0.23	7.41 ± 1.32	5.17 ± 1.06
10	59.78 ± 6.95	17.29 ± 2.4	28.89 ± 4.59	23.9 ± 3.80
30	78.98 ± 6.73	–	–	–
40	–	60.86 ± 8.27	71.73 ± 1.91	60.91 ± 2.63
50	90.32 ± 5.65	–	–	–
400	–	80.66 ± 1.52	82.42 ± 0.16	81.30 ± 0.91
IC ₅₀ (µg/mL)	8.36 ± 6.63 ^a	32.86 ± 3.05 ^c	27.88 ± 1.60 ^b	32.83 ± 4.30 ^c

Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). Means with different letters are significantly different from each other.

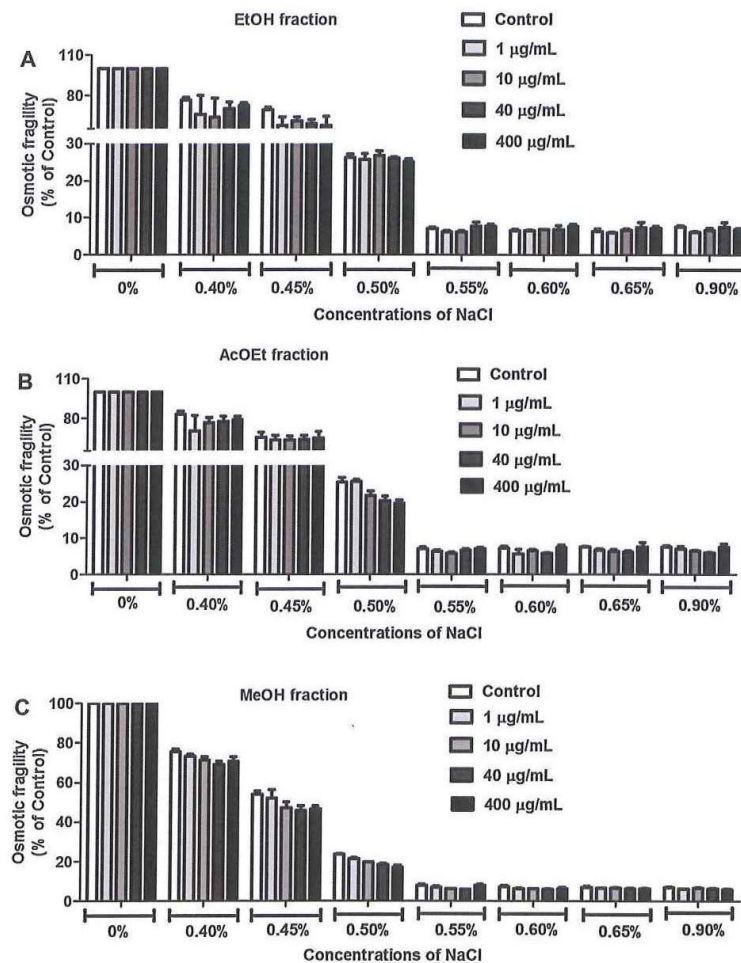


Fig. 5. Osmotic fragility of erythrocytes treated with EtOH fraction (A), AcOEt fraction (B) and MeOH fraction (C) from *A. microcarpum*. Treated erythrocytes were added to various concentrations of salt solution (0–0.9%) and incubated for 20 min. Absorbances of the supernatants were measured at 540 nm. Hemolysis in each tube was expressed as percentage of the absorbance in distilled water (control). The bars represent the means of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate \pm SEM.

Antioxidants from natural and synthetic origins are being extensively studied because of their potential prophylactic as well as therapeutic capacity (Neerghen et al., 2010; Giles et al., 2012; Zadra et al., 2012; Nagendrappa et al., 2013; Kołodziejczyk et al., 2013). The radical-quenching abilities of the fractions from *A. microcarpum* were tested by the DPPH method. Our results showed significant concentration-dependent DPPH radical scavenging capacity (Table 2), indicating the ability of these fractions to transfer either electrons or hydrogen atoms to DPPH radical (Naik et al., 2003), thereby changing the purple color to the yellow-colored diphenylpicrylhydrazine (non radical). This interaction depends on the structural conformation of the bioactive compounds present in these fractions (Table 1), among which the hydroxyl groups of phenolics and flavonoids are highly favorable (El-Sayed, 2009). Although AcOEt fraction exhibited strongest DPPH radical scavenging ability ($IC_{50} = 27.88 \pm 1.60 \mu\text{g/mL}$) in comparison with other fractions, it was less effective than that of ascorbic acid ($IC_{50} = 8.36 \pm 6.63 \mu\text{g/mL}$) used as standard antioxidant. Nevertheless, it is comparable with butylate hydroxytoluene

(BHT) ($IC_{50} = 23.1 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) used as standard antioxidant in related studies using the same assay system (Oke and Aslim, 2010).

In biological system, lipid peroxidation generates a number of degradation products such as malondialdehyde (MDA), which is widely used as a marker of oxidative stress (Yoshikawa et al., 1997; Michel et al., 2008). In this study, MDA was used as an index of the levels of LPO. The observed significant increases in the TBARS formation induced by Fe^{2+} in the brain and liver homogenates imply possible damage to these tissues. Interestingly, all the fractions have demonstrated antioxidant activity against Fe^{2+} -induced LPO in rat brain and liver homogenates. LPO is a complex process involving the interaction of oxygen-derived free radicals with polyunsaturated fatty acids, occurring through free radical chain reaction (Reed, 2011; Nowak, 2013). The ability of these fractions to inhibit LPO may be due to their high polyphenolic content as observed in this study. Polyphenols are potent antioxidants, capable of chelating transition metals ions, which may induce Fenton-type oxidation reactions in their free states (Rice-Evans et al., 1996; Moran et al., 1997; Karaman et al., 2010). Consequently,

a plausible mechanism by which these fractions conferred protective action against Fe²⁺-induced LPO was through direct interaction with Fe²⁺ or its oxidized form. They may also assist in scavenging free radicals, thereby, preventing free radical chain reactions.

Toxicological assays of plant extracts are part of the procedures that contribute to standardization of phytopharmaceuticals (Machado et al., 2005; Choodhary and Sekhon, 2011; Arun et al., 2012; Anantha, 2013). In the current study, the fractions of *A. microcarpum* were evaluated on human leukocytes and erythrocytes in order to examine their cytotoxicity effects. The results showed that none of the fractions was cytotoxic to human leukocytes at the concentrations tested. This observation strongly suggests that *A. microcarpum* infusions will possibly not result in any cytotoxic effect on the users. In addition, we observed potential ability of these fractions to counteract the cytotoxicity induced by H₂O₂/sodium azide system. The reason for using this system is based on the fact that high activity of catalase in leukocytes has been reported to protect against H₂O₂-mediated LPO (Chow, 1988). Our objective was to inhibit catalase activity and to detect the potential protective effect of these fractions on the damage caused by H₂O₂. H₂O₂/sodium azide system caused significant decrease in cell viability, which was significantly attenuated by EtOH, AcOEt and MeOH fractions. The protective effect offered by these fractions might be linked to their ability to counteract H₂O₂ cytotoxicity, thus confirming the antioxidant activity observed in DPPH and TBARS results.

Osmotic fragility has been found to be altered in various pathological conditions including anemia and cancer (Kolanjiappan et al., 2002; Chen et al., 2007). Hemolytic activity or osmotic fragility is a good indicator of the effect of various *in vitro* insults levied on it by various compounds or plant extracts for the screening of cytotoxicity since it provides primary information on the interaction between molecules and biological entities at cellular level. In this study, we have also used human erythrocytes to further investigate the toxic effect of *A. microcarpum*. The osmotic fragility showed that treatment of human erythrocytes with the fractions did not cause any significant alteration in osmotic fragility when compared with the control. According to Oteiza (1994), the interaction of chemicals with erythrocytes membrane component could stimulate changes in lipid distribution, leading to rigidity changes of the membrane. Consequently, the absence of effect on osmotic fragility observed here, may suggest that there was no interaction of phytochemicals from this plant with cell membrane. This hypothesis is in agreement with our results showing that all the fractions did not have any toxic effect to human leukocytes.

5. Conclusion

The results presented herein provide evidences that different fractions from *A. microcarpum* possess significant antioxidant activities by inhibiting the DPPH radical, and lipid peroxidation in rat brain and liver homogenates, which can be attributed to a greater extent to their phenolic and flavonoid contents. Among the fractions, AcOEt fraction exhibited a strongest antioxidant activity. All the fractions were deemed non-toxic to human leukocytes and did not have any effect on human erythrocytes osmotic fragility, at the concentrations tested. In addition, all the fractions protected leukocytes from H₂O₂ + Azide-induced cytotoxicity, contributing to the integrity and functionality of these cells. Consequently, the use of this plant in Brazilian folk medicine in the management of diseases associated with oxidative stress has a scientific basis. However, *in vivo* toxicological evaluations are recommended on this plant for further information in the subject area.

Acknowledgements

VMBF would like to thanks specially CAPES for financial support. VMBF is a beneficiary of the CAPES postgraduate (Doctoral) fellowship. This work was also supported by CNPq, FAPERGS, FAPERGS-PRONEX-CNPq.

References

- Alexander, H.T., 2008. A nutty chemical. *Chem. Eng. News* 86, 26–27.
- Agostini-Costa, T.S., Jales, K.A., Garruti, D.S., Padilha, V.A., de Lima, J.B., Aguiar, M.J., de Paiva, J.R., 2004. Anacardic acid content in cashew apples from *Anacardium microcarpum* and eight clones of *Anacardium occidentale* from Northeastern Brazil. *Cienc. Rural* 34, 1075–1080.
- Ajaiyeoba, E.O., Abiodun, O.O., Falade, M.O., Ogbode, N.O., Ashidi, J.S., Happi, C.T., Akinboye, D.O., 2006. *In vitro* cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine* 13, 295–298.
- Anantha, N.D., 2013. Approaches to pre-formulation R and D for phytopharmaceuticals emanating from herb based traditional Ayurvedic processes. *J. Ayurveda Integr. Med.* 4, 4–8.
- Arun, R., Sravya, R.B., Roja, C., 2012. A review on standardization of herbal formulation. *Int. J. Phytother.* 2, 74–88.
- Awah, F.M., Uzoegwu, P.N., Ifeonu, P., Oyugi, J.O., Rutherford, J., Yao, X., Fehrmann, F., Fowke, K.R., Eze, M.O., 2012. Free radical scavenging, phenolic contents and cytotoxicity of selected medicinal plants. *Food Chem.* 131, 1279–1286.
- Bent, S., Ko, R., 2004. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *Am. J. Med.* 116, 478–485.
- Boligon, A.A., Schwanz, T.G., Piana, M., Bandeira, R.V., Fröhlich, J.K., de Brum, T.F., Zadra, M., Athayde, M.L., 2013. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. leaves. *Nat. Prod. Res.* 27, 68–71.
- Chen, H., Khan, A.A., Liu, F., Gilligan, D.M., Peters, L.L., Messick, J., Haschek-Hock, W.M., Li, X., Ostafin, A.E., Chishti, A.H., 2007. Combined deletion of mouse dematin-headpiece and beta-adducin exerts a novel effect on the spectrin-actin junctions leading to erythrocyte fragility and hemolytic anemia. *J. Biol. Chem.* 282, 4124–4135.
- Chow, C.K., 1988. Interrelationships of cellular antioxidant defense systems. In: Chow, C.K. (Ed.), *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*. CRC Press, Boca Raton, pp. 217–237.
- Choodhary, N., Sekhon, B.S., 2011. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. *J. Pharm. Educ. Res.* 2, 55–70.
- Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Kosar, M., Hiltunen, R., 2007. Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a water soluble moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Food Sci. Technol.* 40, 239–248.
- De Freitas, M.V., Netto, R.C.M., da Costa Huss, J.C., de Souza, T.M.T., Costa, J.O., Firmino, C.B., Penha-Silva, N., 2008. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol. In Vitro* 22, 219–224.
- De Moraes, M.O., Bezerra, F.A.F., Costa-Lutuf, L.V., Pessoa, C., de Moraes, M.E.A., 2006. Safety and efficacy of phytomedicines. *Adv. Phytomed.* 2, 213–224.
- El-Sayed, S.A., 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114, 1271–1277.
- Giles, N.M., Kumari, S., Stamm, R.A., Patel, S., Giles, G.I., 2012. A hydrogen peroxide electrode assay to measure thiol peroxidase activity for organoselenium and organotellurium drugs. *Anal. Biochem.* 429, 103–107.
- Godal, H.C., Heisto, H., 1981. High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian blood donors. *Scand. J. Haematol.* 27, 30–34.
- Gutteridge, J.M.C., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819–1828.
- Kamdem, J.P., Adekunle, A., Boligon, A.A., Klimaczewski, C.V., Elekofehinti, O.O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuck, E.P., Meinerz, D.F., Athayde, M.L., 2013. Antioxidant, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: its potential role in neuroprotection. *Ind. Crop. Prod.* 52, 26–34.
- Karaman, S., Tütem, E., Sözgen Baskan, K., Apak, R., 2010. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chem.* 120, 1201–1209.
- Kolanjiappan, K., Manoharan, S., Kayalvizhi, M., 2002. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin. Chim. Acta* 326, 143–149.
- Kolodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., Baron, A., 2013. Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Ind. Crop. Prod.* 51, 279–288.
- Kuete, V., Krusche, B., Youns, M., Voukeng, I., Fankam, A.G., Tankeo, S., Lacmata, S., Efferth, T., 2011. Cytotoxicity of some Cameroonian species and selected medicinal plants extracts. *J. Ethnopharmacol.* 134, 803–812.
- Lantto, T.A., Colucci, M., Zavadová, V., Hiltunen, R., Raasmaja, A., 2009. Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chem.* 117, 405–411.
- Machado, T.B., Leal, I.C.R., Kuster, R.M., Amaral, A.C.F., Kokis, V., de Silva, M.G., dos Santos, K.R., 2005. Brazilian phytopharmaceuticals-evaluation against hospital bacteria. *Phytother. Res.* 19, 519–525.

- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J., Thérond, P., 2008. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects. *Ann. Biol. Clin.* 66, 605–620.
- Mischell, B.B., Shiingi, S.M., 1980. *Selected Methods in Cellular Immunology*. WH Freeman Company, New York.
- Moran, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., Abian, J., Becana, M., 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean and other legume tissue: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 861–870.
- Nagendrappa, P.B., Naik, M.P., Payyappallimana, U., 2013. Ethnobotanical survey of malaria prophylactic remedies in Odisha, India. *J. Ethnopharmacol.* 146, 768–772.
- Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., Satav, J.G., Banavalikar, M.M., Sohoni, D.P., Biyani, M.K., Mohan, H., 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry* 63, 97–104.
- Neergheen, V.S., Bahorun, T., Taylor, E.W., Jen, L., Aruoma, O.I., 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* 278, 229–241.
- Nowak, J.Z., 2013. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol. Rep.* 65, 288–304.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oke, F., Aslim, B., 2010. Biological potentials and cytotoxicity of various extract from endemic *Origanum minutiflorum* O Schwarz & P. H. Davis. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1728–1733.
- Oteiza, P.I., 1994. A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 374–379.
- Penha-Silva, N., Firmino, C.B., de Freitas Reis, F.G., da Costa Huss, J.C., de Souza, T.M.T., de Freitas, M.V., Netto, R.C.M., 2007. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech. Ageing Dev.* 128, 444–449.
- Petrescu, A.D., Gallegos, A.M., Okamura, Y., Strauss III, J.F., Schroeder, F., 2001. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. *J. Biol. Chem.* 276, 36970–36982.
- Reed, T.T., 2011. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1302–1319.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Hamid, A., Khan, M.Q., Athayde, M.L., Santos, D.B., Boligon, A.A., Rocha, J.B.T., 2013. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chem.* 131, 741–747.
- Secco, R.S., 1990. Produtos naturais: alternativa segura? *Cienc. Cult.* 42, 807–810.
- Shi, Y.Z., Ruan, J.Y., Ma, L.F., Han, W.Y., Wang, F., 2008. Accumulation and distribution of arsenic and cadmium by tea plants. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9, 265–270.
- Tedong, L., Madiraju, P., Martineau, L.C., Vallerand, D., Arnason, J.T., Desire, D.D., Lavoie, L., Kamtchouing, P., Haddad, P.S., 2010. Hydro-ethanolic extract of cashew tree (*Anacardium occidentale*) nut and its principal compound, anacardic acid, stimulate glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1753–1762.
- Van Ginkel, G., Sevanian, A., 1994. Lipid peroxidation induced membrane structural alterations. *Methods Enzymol.* 233, 273–288.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H., 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1045–1053.
- Yoshikawa, T., Naito, Y., Kondo, M., 1997. Food and diseases. In: Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., Inoue, M. (Eds.), *Free Radicals and Diseases*. Plenum Press, New York, pp. 11–19.
- Zadra, M., Piana, M., Brum, T.F., Boligon, A.A., Freitas, R.B., Machado, M.M., Stefanello, S.T., Soares, F.A., Athayde, M.L., 2012. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules* 17, 12560–12574.

3.2 Manuscrito 1

Phytocompounds and Modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajuí) on antibiotics drugs used in clinical infections

Valter M. Barbosa-Filho^{1,2}, Emily P. Waczuk², Nadghia F. Leite³, Irwin R.A. Menezes¹, José G.M. da Costa¹, Sírléis R. Lacerda¹, Isaac A. Adedara², Henrique D.M. Coutinho^{4*}, Thais Posser⁵, Jean P. Kamdem^{2,6*}

¹Universidade Regional do Cariri-URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 63.100-000, Pimenta, Crato-Ceará, Brazil; ²Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil; ³Universidade Regional do Cariri-URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS, Departamento de Química Biológica, Crato-Ceará, Brazil; ⁴Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri, Bairro Pimenta, 63105-100 Crato, CE, Brazil; ⁵Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS CEP 97300-000, Brazil; ⁶Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

Correspondence should be addressed to:

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho. Universidade Regional do Cariri – URCA. Av. Cel. Antonio Luiz, 1161. Crato – CE. Brasil. CEP:63105-000. E-mails: hdmcoutinho@gmail.com; Dr. Jean Paul Kandem. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS. Porto Alegre – RS. Brasil. CEP: 90035-003. E-mail: kamdemjeanpaul2005@yahoo.fr

phone. (+55) 88 31021212; Fax (+55) 88 31021291

Running title: *Anacardium microcarpum* modulates antibiotics drugs

Abstract

Background: The challenge of antibiotic resistance and the emergence of new infections have generated considerable interest in the exploration of natural products from plant origin, as a combination therapy. In this context, the crude ethanolic extract (CEE), ethyl acetate fraction (EAF) and methanolic fraction (MF) from *Anacardium microcarpum*, were tested alone or in combination with antibiotics (amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and imipenem) against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

Methods: Antibiotic-resistance modifying activity was performed using the micro-dilution method by determining the minimal inhibitory concentration (MIC). In addition, phytochemical prospecting analyses of tested samples were carried out.

Results: Our results indicated that all the extracts showed low antibacterial activity against multidrug resistant strains (MIC = 512 µg/mL). However, addition of CEE, EAF and MF to the growth medium at the sub-inhibitory concentration (MIC/8 = 64 µg/mL) significantly modulated amikacin- and gentamicin-resistant *E. coli* 06. CEE and EAF also demonstrated a significant ($p < 0.001$) synergism with imipenem against *S. aureus*. In contrast, MF antagonized the antibacterial effect of ciprofloxacin and gentamicin against *P. aeruginosa* 03 and *S. aureus* 10 respectively. Qualitative phytochemical analysis of the extracts revealed the presence of secondary metabolites including phenols, flavonoids, xanthones, chalcones and tannin pyrogallates.

Conclusions: Taken together, our results suggest that *A. microcarpum* is a natural source with resistance-modifying antibacterial activity that needs to be further investigated to overcome the present resistant infection problem.

Keywords: Multidrug resistant, *Anacardium microcarpum*, Antibacterial activity, Caju

Introduction

Infectious diseases caused by microorganisms including bacterial species remain a major therapeutic problem in the hospitals, leading to significant morbidity and mortality¹⁻³. This is mainly due to the emergence of new infections (eg. Mycoses and bacterial illnesses), and the widespread of antibiotics resistance⁴.

Among several pathogenic species, the most significant ones are: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *E. coli* belongs to the normal flora of humans and plays an important role in the human intestinal tract. However, some strains can cause chronic diarrhea, food poisoning⁵ or illness outside the intestinal tract. *P. aeruginosa*, which is occasionally associated with opportunistic human diseases⁶, can cause a wide range of acute and chronic infections including infections of the urinary tract, skin and respiratory tract as well as cystic fibrosis⁷. *P. aeruginosa* was reported by the Centers for Disease Control and Prevention as the second most common pathogen in healthcare associated-infections behind *E. coli*⁸. *S. aureus* is one of the five most common causes of nosocomial postsurgical wound infections^{9,10}. It is also an opportunistic pathogen in humans¹¹.

Normally, the principal mechanism by which antibacterial agents act is by interference with cell wall synthesis, inhibition of protein synthesis, interference with nucleic acid synthesis, inhibition of a metabolic pathway as well as the disruption of bacterial membrane structure¹². However, these actions of the antibacterial agents have failed due to multidrug resistance, which is related to the simple/plastic genomes and DNA exchanges with others bacterial strains¹³. This situation represents a serious public health problem and affects largely the economy, necessitating the urgent development of new antimicrobial agents.

Less than two decades ago, natural products from plants origin have generated considerable interest in the search of new antibacterial agents and/or new compounds

able to potentiate the antibacterial activity of old antibiotics¹⁴⁻²⁰. Additionally, substantial evidence from the literature have shown the potential of crude extracts in controlling multidrug resistance in *in vitro* studies²¹⁻²³, and the efficacy of plant antimicrobials derived compounds in food applications²⁴⁻²⁶.

The Brazilian plant, *Anacardium microcarpum*, popularly known as “Cajui” belongs to the Anacardiaceae family. It is found in the Northeastern region. Its fruits are rich in vitamin C, proteins, lipids, carbohydrates and phenolic compounds. The infusions of *A. microcarpum* barks are used in the traditional Brazilian medicine as a tonic for the treatment of a variety of diseases including infectious diseases, inflammation, rheumatism and tumor. Recently, we have reported for the first time that the popular use of *A. microcarpum* in the prevention and/or treatment of the above listed diseases (which are associated with oxidative stress) has a scientific basis due to its antioxidative activity²⁷. But, no study has been carried out to investigate its potential use as antibacterial agent. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the antibacterial activity of crude ethanolic extract and fractions (ethyl acetate and methanolic) from *A. microcarpum* barks against different bacterial strains, and their potential to modulate antibiotics drugs used in clinical infections. Furthermore, the phytochemical prospecting of *A. microcarpum* was investigated for the presence or absence of secondary metabolites.

Materials and Methods

Plant material and extraction

The stem barks of *A. microcarpum* were collected from Barrero Grande, Crato-Ceará (7°22'S; 39°28'W; 892 m sea level), Brazil, in November 2011. The plant material was identified by Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva of the herbarium Caririense Dárdano de Andrade - Lima (HCDAL) of the Regional University of Cariri (URCA) and a voucher specimen was deposited (number 6702). The resh

barks of *A. microcarpum* were macerated with 99.9% of ethanol and water (1:1, v/v) for 3 days. The suspension was filtered, solvent evaporated under reduced pressure and lyophilized to obtain 490 g of crude ethanolic extract (CEE). One hundred and fifty grams (150 g) of this was partitioned with ethyl acetate and methanol to obtain 12.5 g of ethyl acetate fraction (EAF) and 105.23 g of methanolic fraction (MF). Prior to use, CEE, EAF and MF were prepared by dissolving 10 mg of each in 1 mL of DMSO (10%), thus starting with an initial concentration of 10 mg/mL. The resulting solutions were then diluted to 1024 $\mu\text{g/mL}$ in sterile water and used in the experiments.

Preliminary phytochemical analysis

The CEE, EAF and MF were screened according to the method described by Matos et al.²⁸ with slight modifications, for detecting the presence of different classes of secondary metabolites such as: Phenols, flavones, flavonoids, chalcones, xanthenes, alkaloides, flavonones, aurones and tannin pyrogallates.

Drugs and microorganisms

The antibiotics used were amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and imipenem. They were purchased from Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, USA. The stock solutions of the antibiotics (5 mg/mL) were prepared in sterile water and then diluted to 2500 $\mu\text{g/mL}$, which was used for the experiments. Resazurin sodium (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) was used as an indicator of the growth of bacteria.

The gram negative bacteria used in this study were *Escherichia coli* (25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (9027). The gram positive bacterium that was used in this study was *Staphylococcus aureus* (25923). They were used for the determination of minimal inhibitory concentration. However, for the modulation of the antibiotic activity *Pseudomonas aeruginosa* 03, *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 10 were used. Their origin and resistance profile to antibiotics is showed in Table 1. All the

strains were obtained from the Laboratory of Clinical Microbiology of the Federal University of Paraíba (Brazil) and maintained on nutrient agar slants at 4°C.

Growth media and culture conditions

The heart infusion agar (HIA) (Difco Laboratory, Ltda) and the Caldo brain heart infusion (BHI, 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.) were used for bacteria media culture. The culture media were prepared according to the guidelines of the suppliers. The cultures of bacteria were maintained at 4°C in HIA. Briefly, the microbial suspension were prepared by making a sterile saline suspension of isolated colonies selected from BHI (for bacteria) and the agar plates were grown for 24 h at 37°C. The suspension was adjusted to match the tube of 0.5 McFarland turbidity standard, which corresponds to 10^5 CFU (colony-forming units)/mL²⁹. Resazurin sodium (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) at concentration of 0.01% was added to the culture media as a growth indicator, after incubation at 37°C.

Determination of antibacterial activity

A preliminary evaluation of the antibacterial activity of the CEE, EAF and MF from the bark of *A. microcarpum* was determined by the micro-dilution method³⁰, by determining the smallest amount of plant extract required to inhibit the visible growth of the tested pathogens. This was carried by two-fold dilutions. Briefly, 100 µL of culture medium containing different bacterial strains (10^5 CFU/ml) were distributed in 96-well plates and then subjected to serial dilution using 100 µL of each extract, with final concentrations varying from 512 to 8 µg/mL. The negative control contained bacterial suspension and the solvent (DMSO, 10%), while the positive control was made of the culture medium plus different bacterial strains. Antibacterial activity was detected by adding 20 µL of 0.01% resazurin staining aqueous solution in each well at the end of the incubation period. The bacterial growth was observed by the irreversible oxidation of resazurin to resofurin, characterized by a change from blue color to the pink color. The minimum

inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined as the lowest concentration in which they were able to inhibit bacterial growth²⁹. All experiments were performed in triplicate and the procedure was repeated at least three times.

Modulation of the antibiotic activity

In order to evaluate the potential modulatory effect of CEE, EAF and MF on the tested antibiotics, the extracts were tested at the sub-inhibitory concentration (i.e., MIC/8) as described by Coutinho et al.³¹ using different bacterial strains. For this set of experiment, we used *Pseudomonas aeruginosa* 03, *Escherichia coli* 06 and *Staphylococcus aureus* 10. These bacteria are known to be resistant to a wide range of antibiotics (Table 1). Briefly, 100 μ L of a solution mixture containing BHI (10%), the bacterial inoculums with or without different extracts (64 μ g/mL) was placed in each well plate. Then, 100 μ L of the antibiotic drugs at the concentration of 1250 μ g/mL was added in the first well, which was serially diluted to obtain concentrations ranging from 1250 \rightarrow 1.22 μ g/mL.

Statistical Analysis of Microbiological Results.

The results of the tests were done in triplicate and expressed as geometric mean. Statistical analysis was applied to two-way ANOVA followed by Bonferroni posttests using GraphPad Prism 5.0 software.

Results

Phytochemical analysis of crude ethanolic extract and fractions from the bark of A. microcarpum

The phytochemical prospecting of the CEE, and fractions (EAF and MF) revealed the presence of a variety of classes of secondary metabolites (Table 2). On all products were detected the presence of phenols, flavones, flavonoids, chalcones, xanthones, alkaloids, flavanones, auronones and tannin pyrogallates (Table 2). It should be noted that the chemical composition of the CEE, EAF and MF used in the present study

was previously determined by Barbosa-Filho et al.²⁷ using high performance liquid chromatography coupled to diode-array detector (HPLC–DAD).

Antibacterial activity of CEE, EAE and MF from A. microcarpum bark extract

All the extracts showed growth inhibition of *E. coli* (25922), *P. aeruginosa* (9027) and *S. aureus* (25923) only at the highest concentration tested (512 µg/mL), suggesting that they presented a MIC value of 512 µg/mL (data not shown). Taking into account that the extracts presented a weak inhibitory activity since their MIC value was more than 500 µg/mL, we tested their possible potential to modulate the action of antibiotics at the sub-inhibitory concentration (MIC/8 = 64 µg/mL).

Modulation of antibiotic activity by CEE, EAE and MF from A. microcarpum bark extract

The ability of CEE, EAF and MF to modulate the effects of antibiotics amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and imipenem against *E. coli* 06 is presented in Figure 1. The results indicate that the addition of CEE, EAF and MF to the growth medium at the sub-inhibitory concentration caused a significant reduction of the MIC when compared to amikacin and gentamicin alone ($p < 0.001$) (Figure 1A-C). However, the addition of CEE, EAF and MF to the growth medium in the presence of ciprofloxacin and imipenem did not have any effect (Figure 1A-C). The synergistic action of the CEE, EAF and MF with amikacin caused respectively 30%, 40% and 40% reduction in the MIC when compared to amikacin alone (Figure 1A-C), while, the combination of gentamicin with MF resulted in the highest reduction of the MIC (from 364.58 to 156.25 µg/mL), with 57.14% reduction in comparison to gentamicin alone (Figure 1C).

In contrast to what observed in *E. coli*, CEE only modulated the action of amikacin against *P. aeruginosa*, with a percent reduction of 25% in the MIC (from 208.33 to 156.25 µg/mL) when compared to amikacin alone ($p < 0.001$, Figure 2A). Similarly, the synergistic action of gentamicin with EAF caused a significant reduction in the MIC, when compared to gentamicin alone ($p < 0.001$) (Figure. 2B). Surprisingly, the addition

of EAF to the growth medium showed significant antagonistic modulating activity to the antibiotic amikacin (Figure 2B). CEE was not able to modulate the antibiotics gentamicin, ciprofloxacin and imipenem (Figure 2A). No modulatory activity of the antibiotics ciprofloxacin and imipenem was observed against *P. aeruginosa* when EAF was added to the growth medium (Figure 2B). Similarly, MF did not have any effect on amikacin, gentamicin and imipenem, but significantly decreased the MIC of ciprofloxacin (Figure 2C).

Against multi-drug resistant bacteria *S. aureus*, CEE demonstrated synergism when associated to the antibiotic amikacin and Imipenem (Figure 3A), showing a reduction of MIC of 60.94% and 90.46% respectively. Similarly, EAF (Figure 3B) and MF (Figure 3C) when combined with gentamicin significantly modulated the effect of the antibiotic. However, CEE exhibited significant antagonistic modulatory activity of gentamicin in comparison to gentamicin alone (Figure 3A, $p < 0.001$). The combination of EAF with imipenem caused a dramatic decrease in the MIC of the antibiotic (Figure 3b, $p < 0.001$). Ciprofloxacin when combined with CEE (Figure 3A), EAF (Figure 3B) or MF (Figure 3C) did not promote any reduction of the MIC. Similarly, MF did not show any synergism with amikacin and imipenem (Figure 3C).

Discussion

The challenge of antibiotic resistance has recently generated considerable interest in the exploration of natural products from plant origin, as a combination therapy in order to modulate the action of the antibiotics^{19,20,31}. In this context, the aim of this study was to evaluate the potential modulatory action of four antibiotics (amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and imipenem) by crude ethanolic extract and fractions (ethyl acetate and methanolic) from *A. microcarpum*, against different bacterial strains (*Escherichia coli* 06; *Pseudomonas aeruginosa* 03 and *Staphylococcus aureus* 10). The results presented herein indicated that *A. microcarpum* exhibited significant synergistic action

with the tested antibiotics, especially from the class of aminoglycosides (amikacin and gentamicin), against the tested bacterial strains.

Numerous studies have reported the antibacterial activity of plant extracts by measuring their capacity to inhibit bacteria growth. In the current study, we investigated the antibacterial activity of CEE, EAF and MF using the micro-dilution method. The results indicated that all the extract showed weak antibacterial activity against the bacterial strains tested, since their MIC value was greater than 500 µg/mL. According to Dall'Agnol et al.³² and Tanaka et al.³³, plant extracts with $500 \leq \text{MIC} \leq 1000$ µg/mL present a weak inhibitory activity.

Aminoglycosides are class of bactericidal antibiotics characterized by the presence of a six-carbon aminocyclitol ring, covalently bonded to multiple amino sugar groups. They can act by impairing bacterial protein synthesis through irreversible binding to the 30S subunit of the bacterial ribosome³⁴. The resistance of bacteria (Gram-positive and negative) to aminoglycosides mainly includes enzyme inactivation and the presence of efflux proteins that are able to pump the antibiotic to the extracellular space. The effects of aminoglycosides, amikacin and gentamicin used in this study, were significantly modulated by CEE, EAF and MF from *A. microcarpum* against *E. coli*. Interestingly, CEE and EAF also demonstrated a significant synergism with imipenem against *S. aureus*. In the same line, MF modulated the action of ciprofloxacin-resistant *P. aeruginosa* and gentamicin-resistant *S. aureus*. The inhibition of bacterial growth by plant extracts and chemicals occurs through diverse mechanisms which may be related to the hydrophobic nature of the compound(s). Although we did not investigate the mechanism by which these extracts modulate aminoglycoside activity, we hypothesize that it might be attributed to the chemical constituent of these extracts. It is possible that compounds from *A. microcarpum* are interacting with lipid bilayer of the cell membrane or with proteins presents on the bacterial outer plasma membrane³⁵, thereby, facilitating the permeability to antibiotics, leading to the interruption of vital

cellular activity³⁶. Phytochemical prospection of *A. microcarpum* revealed the presence of a variety of secondary metabolites including phenols, flavonoids, tannins, and alkaloids, which are known to be responsible for antimicrobial activity from most plants. Of particular interest, recent studies have shown that compounds such as polyphenols can interact with signal transduction pathways and cell receptors leading to interruption of the microbial growth and induce cell death³⁷.

Natural compounds from plant origin can cause alteration in the effect of antibiotics either by increasing or antagonizing the antibiotic activity³¹. In the present study, CEE antagonized the activity of gentamicin against *S. aureus*, while EAF antagonized the activity of amikacin-resistant *P. aeruginosa* by significantly increasing the MIC of the antibiotics. Our results corroborated with those of Veras et al.³⁸ who observed a significant increase in the MIC value when combined natural products and aminoglycosides. This antagonism can be partly due to mutual interaction/chelation of the antibiotic with the chemical component of the plant extracts^{39,40}.

In conclusion, this study reported for the first time the potential of crude ethanolic extract (CEE), and fractions (ethyl acetate and methanolic) from *A. microcarpum* to enhance in a synergic way, different antibiotics resistance against different bacterial strains (*Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 03 and *Staphylococcus aureus* 10) *in vitro*. Noteworthy was the fact that, all the extracts exhibited significant synergistic action with aminoglycosides (amikacin and gentamicin) against *E. coli* 06. The finding of the present investigation represents an important step for the search and development of new antibacterial agents, which could be useful to overcome the present resistant infection problem.

References

1. Rapp RP. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy* 2004; 24 :4-28.

2. Tenover FC. Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria. *Amer J Med* 2006; 119:S3-S10.
3. Gullo A. Invasive Invasive fungal infections: the challenge continues. *Drugs* 2009; 69: 65-73.
4. World Health Organization Traditional Medicine. Growing needs and potential. WHO Policy Perspective on Medicine, no. 2; 2002.
5. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect* 2010; 12: 89-98.
6. Martin SJ, Yost RJ. Infectious diseases in the critically ill patients. *J Pharm Pract* 2011; 24: 35-43.
7. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect* 2011; 13: 1133-1145.
8. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 996-1011.
9. Bibi Y, Nisa S, Chaudhary F, Zia M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11: 52.
10. Lima AF, Costa LB, Silva JL, Maia MB, Ximenes EC. Interventions for wound healing among diabetic patients infected with *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Sao Paulo Med J* 2011; 129: 165-170.

11. Colonna C, Dorati R, Conti B, Caliceti P, Genta I. Sub-unit vaccine against *S. aureus*-mediated infections: set-up of nano-sized polymeric adjuvant. *Int J Pharm* 2013; 452: 390-401.
12. Tripathi KD. Antimicrobial drugs. Essentials of medicinal pharmacology. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2008. p. 668-669.
13. Sahu MC, Dubey D, Rath S, Debata NK, Padhy RN. Multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* as known from surveillance of nosocomial and community infections in an Indian teaching hospital. *J Public Health* 2012; 20: 413-423.
14. Kumar K, Chopra S. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1465-1470
15. Tran TD, Do TH, Tran NC, Ngo TD, Huynh TN, Tran CD et al. Synthesis and anti methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity of substituted chalcones alone and in combination with non-beta-lactam antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 4555-4560.
16. Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A. *Chemotherapy* 2011; 57: 305-309.
17. Sánchez-Medina A, García-Sosa K, May-Pat F, Peña-Rodríguez LM. Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan traditional medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine* 2001; 8: 144-151.
18. Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 2007; 14: 508-516.

19. De almeida TS, Rocha JBT, Rodrigues FFG, Campos AR, da Costa JGM. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. *Ind Crop Prod* 2013; 44: 630-633.
20. Barreto HM, Silva Filho EC, Lima EO, Coutinho HDM, Morais-Braga MFB, Tavares CCA et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Ind Crop Prod* 2014; 59: 290-294.
21. Dubey D, Sahu MC, Rath S, Debata NK, Padhy RN. Antibacterial activity of medicinal plants used by aborigines of Kalahandi, Orissa, India against multidrug resistant bacteria. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: S846–854.
22. Dubey D, Padhy RN. Surveillance of multidrug resistance of two Gram-positive pathogenic bacteria in a teaching hospital and *in vitro* efficacy of 30 ethnomedicinal plants used by an aborigine of India. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 2: 273–281.
23. Arokiyaraj S, Sripriya N, Bhagya R, Radhika B, Prameela L, Udayaprakash NK. Phytochemical screening, antibacterial and free radical scavenging effects of *Artemisia nilagirica*, *Mimosa pudica* and *Clerodendrum siphonanthus*-an *in-vitro* study. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: S601–S604.
24. Tajkarimi M, Ibrahim S, Cliver D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 2010; 21: 1199-1218.
25. Gyawali R, Ibrahim SA. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 95: 29-45.
26. Gyawali R, Adkins A, Minor RC, Ibrahim SA. Behavior and changes in cell morphology of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid medium and skim milk in the presence of caffeine. *CyTA-J Food* 2013; 12: 235-241.

27. Barbosa Filho VM, Waczuk EP, Kamdem JP, Lacerda SR, Martin da Costa JC, Alencar de Meneses IR et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). *Ind Crops Prod* 2014; 55: 280-288.
28. Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Edições UFC, Fortaleza; 1997.
29. NCCLS – national committee for clinical laboratory standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6. ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n.2, 2005.
30. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 1996; 39: 3107-3113.
31. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008; 54: 328-330.
32. Dall’Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Sarmento L, Lamb L, et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine* 2003; 10: 511-516.
33. Tanaka JCA, da Silva CC, Filho BPD, Nakamura CV, de Carvalho JE, Foglio MA. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Quim Nova* 2005; 28: 834-837.
34. Chen LF, Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Med Clin North Am* 2011; 95: 819-842.
35. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 1996; 50: 27-34.

36. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994; 76: 626-631.
37. Rodrigues FFG, Costa JGM, Coutinho HDM. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehneri*. *Phytomedicine* 2009; 16: 1052-1055.
38. Veras HNH, Santos IJM, Santos ACB, Fernandes CN, Matias EFF, Leite GO, et al. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin *in vitro*. *Curr Top Nutraceutical Res* 2011; 9: 25-30.
39. Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MLP. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. *Aliment Nutr* 2004; 15: 285-292.
40. Granowitz EV, Brown RB. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. *Crit Care Clin* 2008; 24: 421-442.

Acknowledgement

VMBF would like to thank specially CAPES for financial support. VMBF is a beneficiary of the CAPES postgraduate (Doctoral) fellowship. Dr. Kamdem especially thanks The World Academy of Sciences for the developing countries (TWAS), TWAS-CNPq and the Alexander von Humboldt Foundation for the 2013 AGNES grant for Junior Researchers. This work was also supported by CAPES, FAPERGS, FAPERGS-PRONEX-CNPq.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Table 1 Origin of bacterial strains and their resistance to antibiotics

Bacteria	Origin	Resistance profile
		Aztreonam, Amoxicillin, Ampicillin,
		Amicilin, Amoxicillin, Cefadroxil,
		cefaclor, Cephalothin,
<i>Escherichia coli</i> 06	Surgical wound	Ceftazidime, Ciprofloxacin,
		Chloramphenicol, Imipenem,
		Kanamycin, Sulphamethrim,
		Tetracycline, Tobramycin
		Cefatazidime, Imipenem,
<i>Pseudomonas</i>	Urine culture	Ciprofloxacin, piperacilin-
<i>aeruginosa</i> 03		tazobactam, Levofloxacin,
		Meropenem, Amicilin
		Oxacillin, Gentamicin, Tobramycin,
<i>Staphylococcus</i>	Surgical wound	Amicilin, Kanamycin, Neomycin,
<i>aureus</i> 10		Paromomycin, Butirosin, Sisomicin,
		Netilmicin

Table 2 Qualitative phyto-constituents analysis of crude ethanolic extract (CEE), ethyl acetate fraction (EAF) and metanolic fraction (MF) from the stem bark of *A. microcarpum*

Secondary metabolites	CEE	EAF	MF
Phenols	+	+	+
Flavones	+	+	+
Flavonoids	+	+	+
Chalcones	+	+	+
Xanthones	+	+	+
Alkaloids	+	+	+
Flavanones	+	+	+
Aurones	+	+	+
Tannin pyrogallates	+	+	+

(+) indicate the presence of the metabolite.

Figure captions

Figure 1 MIC of the antibiotics in the absence and presence of CEE (A), EAF (B) and MF (C) at the sub-inhibitory concentrations (64 µg/mL) for *E. coli* strain 06. ***p < 0.001 indicate significant difference when the CEE, EAF or MF was added to the médium.

Figure 2 MIC of the antibiotics in the absence and presence of CEE (A), EAF (B) and MF (C) at subinhibitory concentrations (64 µg/mL) for *P. aeruginosa* strain 03. ***p < 0.001 indicate significant difference when the CEE, EAF or MF was added to the medium.

Figure 3 MIC of the antibiotics in the absence and presence of CEE (A), EAF (B) and MF (C) at subinhibitory concentrations (64 µg/mL) for *S. aureus* strain 10. ***p < 0.001 indicate significant difference when the CEE, EAF or MF was added to the medium.

Figure 1A

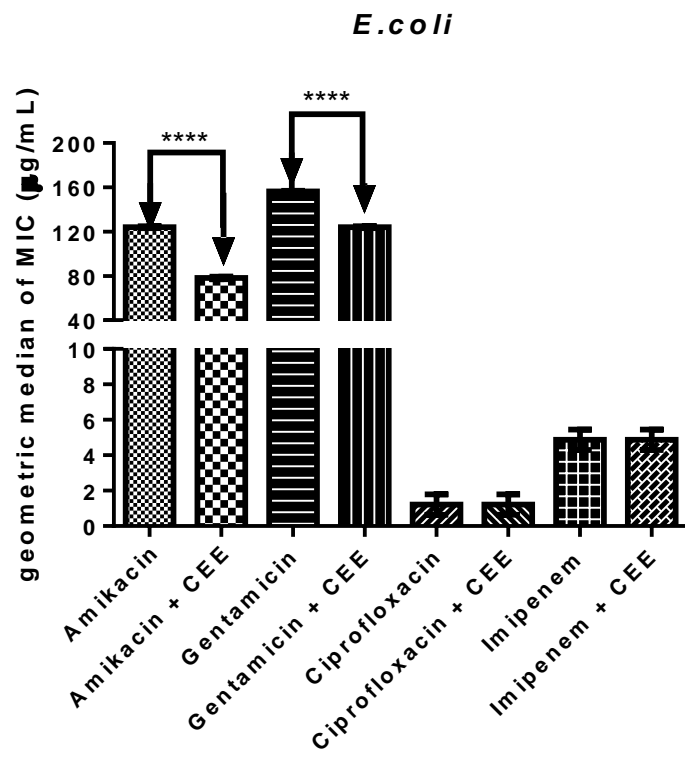


Figure 1B

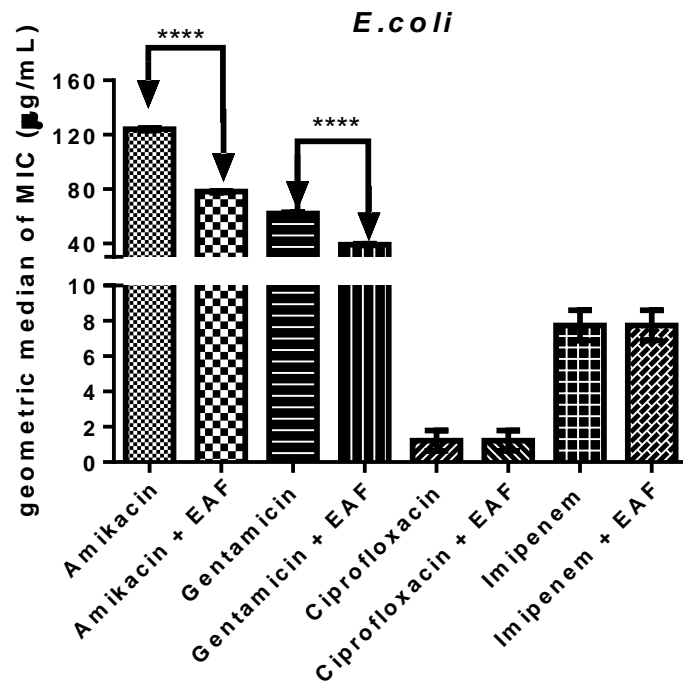


Figure 1C

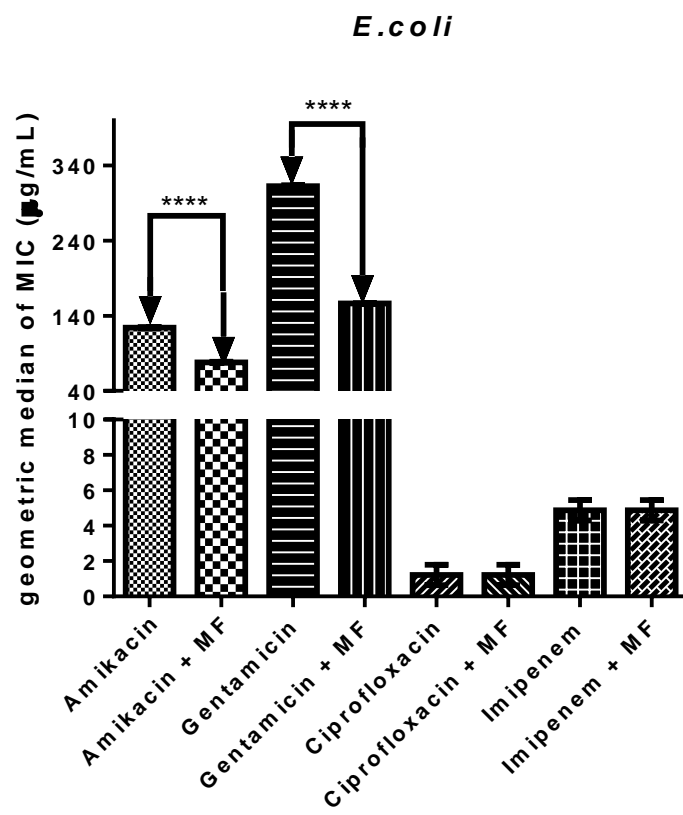


Figure 2A

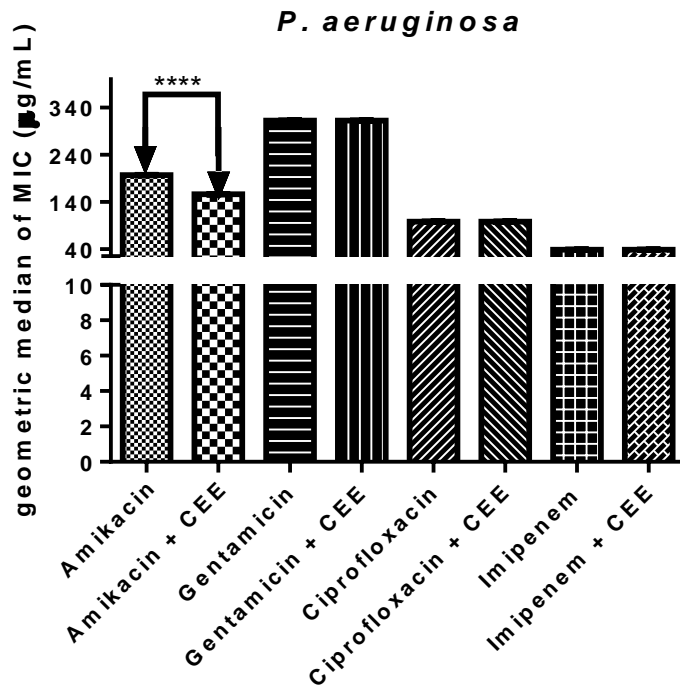


Figure 2B

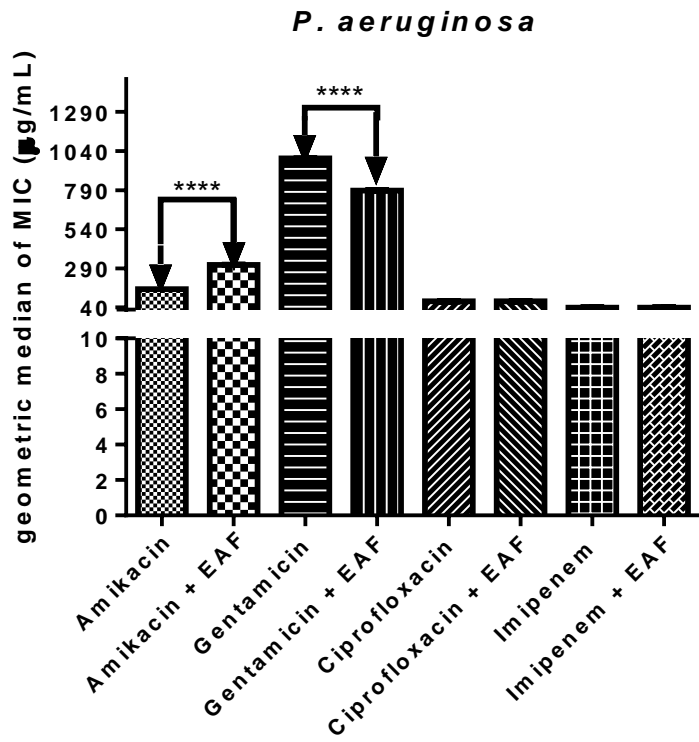


Figure 2C

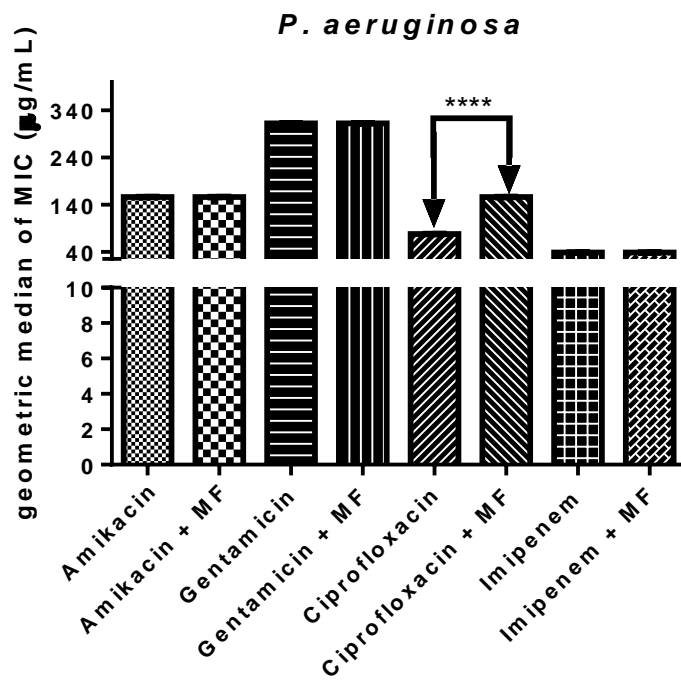


Figure 3A

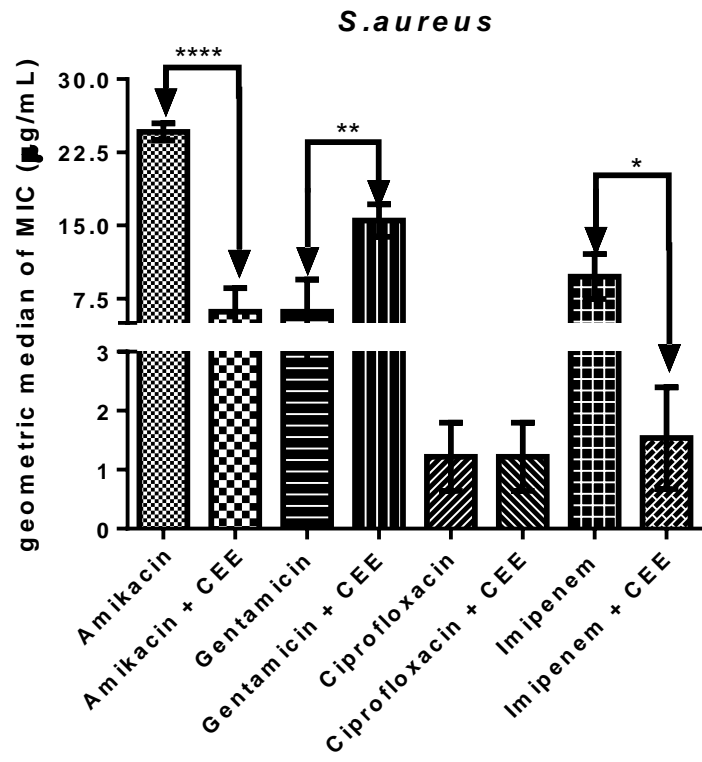


Figure 3B

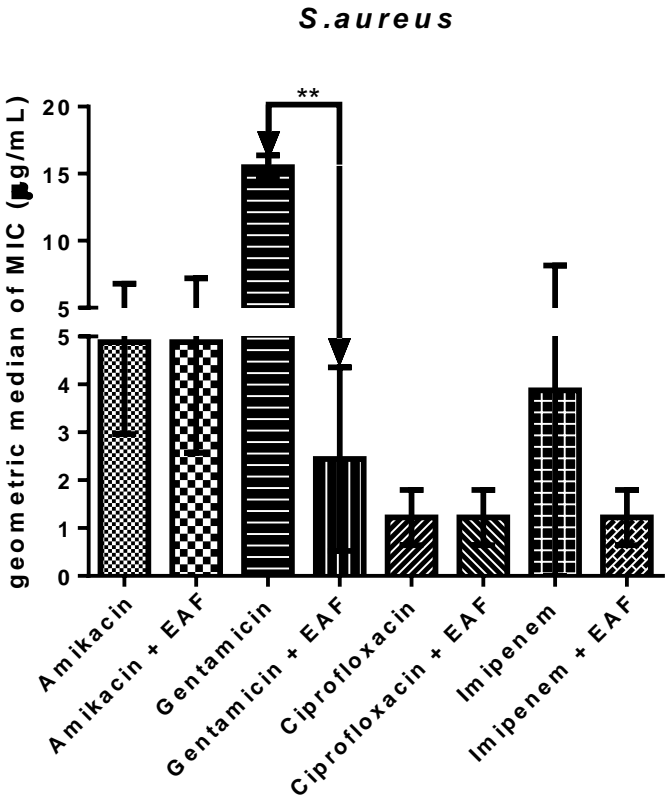
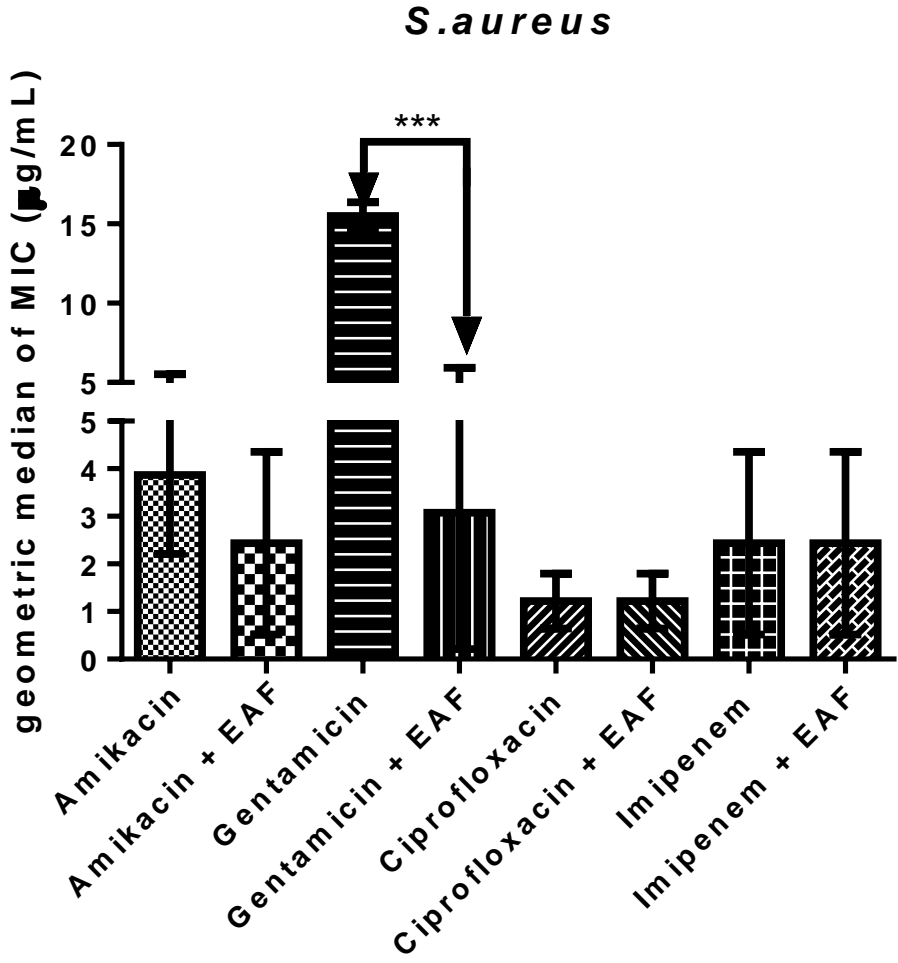


Figure 3C



4 DISCUSSÃO

O considerável aumento no interesse por antioxidantes naturais se deve a possibilidade que estes apresentam de alterar condições clínicas associadas ao estresse oxidativo. Estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de validar o uso científico de plantas para fins medicinais, especialmente, as de utilização etnofarmacológica, com a preocupação em sua eficiência e segurança.

As infusões cascas do caule do *Anacardium microcarpum* são usadas para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, entre outros usos, por comunidades que residem em área rural na Chapada do Araripe, Nordeste brasileiro. Este fato despertou o interesse pela investigação do potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico e das frações metanólica e acetato de etila, obtidas desta espécie, bem como, de possível efeito citotóxico, constituindo um estudo preliminar neste contexto.

É importante mencionar que o perfil cromatográfico das frações do *A. microcarpum* revelou a presença de compostos fenólicos, particularmente, quercetina e ácido cafeico, sendo que a fração acetato de etila foi a que mostrou maior concentração de ácido gálico, quercetina, quercitrina e isoquercitrina.

Os resultados desta pesquisa demonstraram que todas as frações do *A. microcarpum* apresentaram atividade sequestradora diante do radical DPPH, sendo que a fração acetato de etila foi a mais efetiva, com menor valor de IC₅₀ (27,88±1,6 µg/mL). O DPPH é um radical livre estável que tem sido extensivamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas. O efeito de sequestrar este radical ocorre devido à capacidade atribuída à estrutura química de certos compostos em doar átomos de hidrogênio e/ou elétrons, a exemplo de compostos fenólicos, os quais possuem habilidade de se oxidar na presença de agentes oxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; JUNG; HEO; WANG, 2008; SOUSA et al., 2007).

A partir destes resultados, buscou-se avaliar o possível efeito protetor do *A. microcarpum*, em um modelo *in vitro* bastante utilizado de indução de dano oxidativo aos lipídeos de membrana através da medida da formação de malondialdeído (MDA), obtido como produto de degradação da peroxidação lipídica (PL), pelo método de TBARS (JANERO, 1990). Para tanto, o íon ferro foi utilizado como agente indutor de dano, causando um significativo ($p < 0.05$) aumento na PL em cérebro e fígado de ratos comparado ao basal.

Este efeito foi significativamente reduzido com o tratamento usando diferentes frações do *A. microcarpum*. A fração acetato de etila demonstrou maior potencial antioxidante, inibindo de forma mais eficiente a PL induzida pelo Fe^{2+} .

A PL constitui um processo complexo resultante da interação de espécies reativas com os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares levando à formação de radicais livres, e subsequentes alterações estruturais e funcionais (NOWAK, 2013; REED, 2011). É válido referir que o ferro, dada à sua capacidade de doar elétrons ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), está envolvido na formação do radical hidroxila, altamente citotóxico (FARINA et al., 2013).

Compostos fenólicos são reconhecidamente potentes antioxidantes naturais devido a sua capacidade de quelar metais de transição, os quais induzem reações oxidativas, como ocorre na reação de Fenton (KARAMAN et al., 2010; MORAN et al., 1997; SCHAFFER et al., 2013). Logo, um possível mecanismo de ação para o efeito protetor das frações se deva à interação direta com o íon ferro ou com suas formas oxidadas.

Pesquisas realizadas com a espécie *A. occidentale* apontam para significativa atividade antioxidante através de seu potencial de sequestrar o radical DPPH, o óxido nítrico e o ânion superóxido (O_2^-). De maneira geral, esta atividade foi atribuída a elevadas concentrações de compostos fenólicos, como a rutina e a quercetina, nas frações avaliadas (RAZALI et al., 2008).

Considerando o comprovado potencial antioxidante do *A. microcarpum* neste estudo, na proteção contra o dano oxidativo causado pela PL, buscou-se investigar também, o possível efeito tóxico de suas frações, através de dois modelos muito utilizados para esta finalidade, sendo eles: a fragilidade osmótica em eritrócitos e a viabilidade celular em leucócitos, com o objetivo de verificar seu efeito tóxico. Os resultados demonstram que as frações do *A. microcarpum* não apresentaram efeitos tóxicos em leucócitos. A citotoxicidade induzida pelo sistema H_2O_2 + Azida foi significativamente atenuada com o co-tratamento com as frações. Os resultados da investigação do efeito do *A. microcarpum*, em diferentes concentrações sobre a hemólise não indicaram diferenças significativas no tratamento com as frações.

Compreendendo-se que o estresse oxidativo mantém correlação com diversas situações de doença em humanos, e partindo-se de informações preliminares sobre o uso etnofarmacológico da espécie *A. microcarpum*, e de dados na literatura que reafirmam o uso popular de espécies do gênero *Anacardium* para tratamento de doenças infecciosas (SOUZA et al., 2013), investigou-se a atividade antibacteriana *in vitro* de suas frações contra cepas de

E. coli, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, determinando-se a CIM pelo método de microdiluição em placa e ainda, a ação modulatória quando associado a fármacos utilizados clinicamente, contra cepas bacterianas multirresistentes.

Os resultados demonstraram atividade antibacteriana de baixo espectro para todas as frações do *A. microcarpum*, uma vez que os valores de CIM foram superiores a 500 µg/mL. Pesquisas apontam que extratos de plantas com CIM \geq 500 µg/mL possuem baixa atividade inibitória (DALL'AGNOL et al., 2003; TANAKA et al., 2005). Estudos realizados com outras espécies de *Anacardium* também revelaram um espectro de atividade limitado contra bactérias (KUBO; NIHEI; TSUJIMOTO, 2003).

Observa-se que a ocorrência de mecanismos de resistência microbiana tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais (ARANGO; SÁNCHEZ; GALVIS, 2004). Sabe-se, que compostos fenólicos presentes em extratos de plantas possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade celular aos antibióticos, demonstrando um efeito de sinergismo (BURT, 2004). Neste aspecto, estudos têm demonstrado esta atividade pela associação de produtos naturais em concentrações sub-inibitórias com fármacos antimicrobianos (COUTINHO et al., 2008; 2009).

Assim, a atividade modulatória das frações do *A. microcarpum* foi testada, utilizando-se de concentrações sub-inibitórias, os valores de CIM/8 (64 µg/mL), em associação aos antibióticos: gentamicina, amicacina, ciprofloxacino e imipenem/cilastatina sódica contra linhagens multirresistentes de *E. coli* (25922), *P. aeruginosa* (9027) e *S. aureus* (25923). A modulação das frações contra *E. coli* causou redução significativa nos valores de CIM quando estas foram adicionadas ao meio de cultura na presença de gentamicina e amicacina. Comparado aos resultados observados para *E. coli*, somente a fração etanólica apresentou redução do valor de CIM em associação à amicacina contra *P. aeruginosa*. No entanto, a fração acetato de etila quando modulada com gentamicina reduziu de forma significativa o valor de CIM para esta mesma bactéria, e ainda, a fração metanólica causou redução no valor de CIM associada a ciprofloxacino.

A atividade modulatória das frações contra cepas resistentes de *S. aureus* revelou efeito sinérgico significativo da fração etanólica com amicacina e imipenem. De forma similar, a fração acetato de etila também apresentou sinergismo para a modulação com gentamicina e imipenem, sendo que a fração metanólica reduziu significativamente o valor de CIM somente quando modulada com gentamicina. Vale ressaltar ainda, que a fração etanólica exibiu atividade modulatória antagônica significativa quando associada à gentamicina.

De maneira interessante, os resultados da modulação dos antibióticos com diferentes frações do *A. microcarpum*, apontam atividade de sinergismo especialmente, com aminoglicosídeos. É importante mencionar que a prospecção fitoquímica qualitativa do *A. microcarpum* revelou a presença de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides, os quais têm sido associados a atividade antimicrobiana em outros trabalhos (LAI; ROY, 2004; SOHN et al., 2004). No entanto, estudos relatam que extratos de plantas também podem exercer atividade antagônica com antibióticos (COUTINHO et al., 2008; TINTINO et al., 2013), sendo este efeito atribuído a possíveis interações entre os constituintes químicos presentes nos extratos, atuando na remoção/quelação do antibiótico (BEHLING et al., 2004; GRANOWITZ; BROWN, 2008).

Alguns mecanismos têm sido propostos para a ação sinérgica de compostos fenólicos, como a capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares que se ligam à parede celular bacteriana (TSUCHIYA et al., 1996). A habilidade que extratos de plantas possuem para alterar a permeabilidade da membrana celular e facilitar a penetração do antibiótico constitui um mecanismo peculiar para potencializar a ação de aminoglicosídeos, os quais têm efeito bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano, necessitando, portanto, penetrarem no interior da célula para agir (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Os efeitos observados de extratos de plantas na inibição do crescimento microbiano ocorrem por mecanismos diversos, podendo estar relacionado à natureza hidrofóbica de seus componentes. Estes podem interagir com a bicamada lipídica celular e alterar a cadeia respiratória e a produção de energia (NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999).

Pelo exposto, este estudo desponta sobre a constituição fitoquímica e avaliação de atividades antioxidante, citotóxica, antibacteriana e modulatória de antibióticos do *A. microcarpum*, revelando o seu potencial promissor para utilização na terapêutica de condições que afetam à saúde e que mantêm correlação com o estresse oxidativo e ainda, doenças infecciosas. Entretanto, admite-se a necessidade de ampliar os estudos sobre as atividades farmacológicas desta espécie e da realização de testes *in vivo*, que possam elucidar mecanismos de ação e contribuir ainda mais para a segurança de seus usuários.

5 CONCLUSÕES

A avaliação cromatográfica dos constituintes fitoquímicos do *A. microcarpum* revelou a presença de ácido cafeico e quercetina como os principais compostos presentes nas frações etanólica e acetato de etila, sendo que a quercetina e a isoquercetina são os constituintes majoritários da fração metanólica.

Os estudos *in vitro* realizados demonstraram que esta espécie apresenta capacidade de sequestrar o radical DPPH, sendo que a fração acetato de etila apresentou menor valor de IC₅₀ (27.88 ± 1.6 µg/mL), e ainda, significativo potencial antioxidante na proteção contra a peroxidação lipídica induzida pelo Fe²⁺ em tecido cerebral e hepático de ratos, pela técnica de TBARS.

A partir destes resultados, é possível inferir que os constituintes químicos presentes nas frações do *A. microcarpum* possuem a habilidade de interagir com a membrana celular e oferecer proteção contra a oxidação de lipídeos na presença de agente oxidante. Vários estudos têm correlacionado este efeito antioxidante à presença de polifenóis. Neste aspecto, o *A. microcarpum* desponta como espécie promissora para uso em doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Some-se a isto, o fato de que as frações não demonstraram efeito significativo na fragilidade osmótica em eritrócitos humanos, o que é particularmente relevante, visto que a avaliação da citotoxicidade de extratos de plantas faz parte da abordagem preliminar sobre a utilização farmacológica destes. Não obstante, o co-tratamento com as frações foi capaz de diminuir a toxicidade em leucócitos humanos induzida pelo sistema H₂O₂ + Azida de sódio.

Observou-se que todas as frações apresentaram baixa atividade inibitória sobre o crescimento bacteriano de linhagens padrão de *E. coli* (25922), *P. aeruginosa* (9027) e *S. aureus* (25923), com valores de Concentração Inibitória Mínima - CIM superiores a 500 µg/mL.

No entanto, os dados obtidos a partir da modulação com drogas antibacterianas de diferentes classes e mecanismos de ação farmacológica são promissores na perspectiva de terapêutica antibacteriana adjuvante, especialmente em face da problemática exponencial da resistência microbiana, sendo que os resultados revelaram que as diferentes frações do *A. microcarpum* (etanólica, metanólica e de acetato de etila) provenientes das cascas do seu caule, apresentaram diferentes atividades modulatórias contra cepas bacterianas multirresistentes de *Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 03 e *Staphylococcus*

auresu 10, quando em associação aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), ciprofloxacino e imipeném. Ressalta-se que todas as frações demonstraram efeito sinérgico com os aminoglicosídeos quando testados contra *Escherichia coli* 06.

Pelo exposto, e considerando o caráter preliminar dos resultados deste estudo, é possível concluir que a espécie *A. microcarpum* possui atividade antioxidante associada a não observação de citotoxicidade, o que traz uma perspectiva ampliada de uso farmacológico para doenças cuja patogênese mantém correlação com o estresse oxidativo, como a inflamação e infecção. E ainda, que os dados obtidos a partir da modulação antibacteriana surgem como alternativa para auxiliar o tratamento de doenças infecciosas determinadas por bactérias multirresistentes a ação de antibióticos.

6 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos em nosso trabalho abrem perspectivas para a realização de estudos futuros entre estes:

- Tratamentos de roedores *in vivo* para avaliação de toxicidade e uso seguro da planta;
- Investigação do potencial neuroprotetor de extrato e frações do *A. microcarpum* frente a modelos de toxicidade em roedores e culturas celulares;
- Avaliação do potencial genotóxico do *A. microcarpum* através de testes como cometa e micronúcleo.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Determinação de ácido anacárdico em pedúnculos de caju. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n. 2, p. 77-81, 2003.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Anacardic acid content in cashew apples from *Anacardium microcarpum* and eight clones of *Anacardium occidentale* from Northeastern Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1075-1080, 2004.
- ALEXANDER, H. T. A nutty chemical. **Chemical & Engineering News**, v. 86, p. 26-27, 2008.
- ANANTHA, N. D. Approaches to pre-formulation R and D for phytopharmaceuticals emanating from herb based traditional Ayurvedic processes. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 4, p. 4-8, 2013.
- ARANGO, A. C. M.; SÁNCHEZ, J. G. B.; GALVIS, L. A. B. Productos naturales con actividad antimicótica. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 17, p. 325-331, 2004.
- ARUN, R.; SRAVYA, R. B.; ROJA, C. A review on standardization of herbal formulation. **International Journal of Phytotherapy**, v. 2, p. 74-88, 2012.
- BARCELOS, G. R. M. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1468-1475, 2007b.
- BARCELOS, G. R. M. et al. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 268-273, 2007a.
- BARRETO, H. M. et al. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity *in vitro* by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, 2014.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.
- BINGEN, E. et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **Journal of Infectious Disease**, v. 177, p. 642-650, 1998.
- BOLIGON, A. A. et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6592-6598, 2009.

BONFANTI, G. et al. *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* show similar antioxidant properties but induce different enzymatic activities in the brain of rats. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9179-9194, 2013.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Med**, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.

BROOKS, G. F. et al. Quimioterapia antimicrobiana. In: **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Artmed, cap, 28, p. 339-372, 2012.

BUREAU, A. et al. Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 341-344, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. cap. 20, p. 519-535, 2007.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CHOODHARY, N.; SEKHON, B. S. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 2, p. 55-70, 2011.

CHOW, C. K. Interrelationships of cellular antioxidant defense systems. In: CHOW, C. K. (Ed.), **Cellular Antioxidant Defense Mechanisms**. CRC Press, Boca Raton, p. 217-237, 1988.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

CORREIA, D. et al. Perfil de utilização de antimicrobianos de reserva terapêutica em um hospital privado do Brasil. **Revista de la O.F.I.L. Lisboa**, v. 17, n. 2, p. 23-29, 2007.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement to the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro interference of *Hyptis martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside-resistant *Escherichia coli*. **Indian Journal Medical Residency**, v. 129, p. 566-568, 2009.

COUTINHO, H. D. M. et al. Potentiation of antibiotic activity by *eugenia uniflora* and *eugenia jambolanum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 1024-1026, 2010.

CUNHA, F. A. B. et al. Phytochemical screening, antibacterial activity and in vitro interactions between *Cotus cf. arabicus* L. with UV-A and aminoglycosides. **Natural Product Research**, v. 26, n. 4, p. 380-386, 2011.

DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.

DRLICA, K. et al. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385-392, 2008.

DUGAS, Jr. A. J. et al. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 327-331, 2000.

DUMASWALA, U. J. et al. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 1041-1049, 1999.

EDENHARDER, R.; GRUNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tertbutyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research**, v. 540, p. 1-18, 2003.

FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 575-594, 2013.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 440-457, 2009.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; LIU, F. Y. Penicillin-binding proteins in bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, p. 148-157, 1980.

GILES, N. M. et al. A hydrogen peroxide electrode assay to measure thiol peroxidase activity for organoselenium and organotellurium drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 429, p. 104-107, 2012.

GONÇALVES, J. L. S. et al. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 403-407, 2005.

GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, p. 421-442, 2008

GREEN, I. R. et al. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6236-6241, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical Biology and Medicine**. New York: Clarendon Press, 1989.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical Biology and Medicine**. Oxford UK: Oxford University Press. 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HYNES, J. et al. Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 8, n. 3, p. 264-272, 2003.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biological and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JAVADEPOUR, M. M. et al. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

JUNG, M. J.; HEO, S.; WANG, M-H. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 482-487, 2008.

KAMTCHOUING, P. et al. Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 2, p. 95-99, 1998.

KANDEM, J. P. et al. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 26-34, 2013.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41-60, 2009.

KARAMAN, S. et al. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1201-1209, 2010.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 381-387, 2006.

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

KUBO, I.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7624-7628, 2003.

KUETE, V. et al. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 536-542, 2010.

KUMANOTO, C. A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 386-391, 2011.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, 244-282, 2007.

LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1451-1460. 2004.

LEHMAN, D. C.; THOMAS, J. G. Biofilms: Architects of disease. **Textbook on diagnostic microbiology**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier. p. 884-895, 2007.

LEXIS; L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A-treated rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 98, p. 68-73, 2006.

LOHR, J. B.; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A. B. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs**, v. 17, n. 1, p. 47-62, 2003.

MAHDY, K. et al. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. **European Review for Medical Pharmacological Sciences**, v. 3, p. 31-42, 2012.

MATIAS, E. F. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenácea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010

MENDES, L. P. M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 291-312, 2010.

MINERVINI; F.; FORNELLI; F. FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 21-21, 2004

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

MORAN, J. F. et al. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean and other legume tissue: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 861-870, 1997.

MOTA, M. L.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 289-300, 1985.

MÜLLER, K. R. et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do extrato de *Anacardium microcarpum* no modelo de Parkinsonismo induzido por Paraquat em *Drosophila melanogaster*. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 150-153, 2013

MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 387-394, 1996.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NEERGHEEN, V. S. et al. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, p. 229-241, 2010.

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus spp.* **Arquivo Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 207-213, 2007.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P. W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 233-239, 1999.

NOWAK, J. Z. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on agerelated macular degeneration. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 288-304, 2013.

OLIVEIRA, D. R. et al. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 1265-1270, 2011.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, p. 444-452, 2006.

OTEIZA, P. I. A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 308, p. 374-379, 1994.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 53-58, 2007.

PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 973-983, 2008.

PETRESCU, A. D. et al. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36970-36982, 2001.

PUNTEL, R. L., NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. T. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in the quinolinic acid, but not in the malonate pro-oxidative activity in vitro. **Neurochemistry Research**, v. 30, p. 417-424, 2005.

RAZALI, N. et al. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). **Food Chemistry**, v. 111, p. 38-44, 2008.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIOU, M. et al. In vivo development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the lower respiratory tract of intensive care unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonal therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 513-522, 2010.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. Atheneu: São Paulo, 2005.

RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353-65, 2003.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Utilisation of cashew nut shell liquid from *Anacardium occidentale* as starting material for organic synthesis: A novel route to lasiodiplodin from cardols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 1, p. 13-20, 1999.

SARAIVA, R. M. C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. Dissertação de mestrado. 2012. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia. Belém, 2012.

SATO, Y.; SATO, K.; SUZUKI, Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: II. Comparisson of calculated rate constants form hemolysis with experimental constant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 366, p. 61-69, 1999.

SAVIC, M. et al. Critical residues for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 17, p. 5855-5861, 2008.

SCHAFFER, L. F. et al. *Harpagophytum procumbens* prevents oxidative stress and loss of cell viability *in vitro*. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 2256-2267, 2013.

SICINSKA, P. et al. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR *in vitro*, **Toxicon**, v. 47, p. 387-397, 2006.

SILVA, C. G. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmaceutical Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.

SILVA, L. A. et al. Comparação do treinamento físico de quatro e oito semanas sobre atividade da cadeia transportadora de elétrons e marcadores de estresse oxidativo em fígado de camundongos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 2, p. 126-129, 2010.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SOHN, H. Y. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**, v. 11, p. 666-672, 2004.

SOUSA JÚNIOR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, p. 152-174, 2004.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, C. M. P. et al. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande- Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.

SUDATI, J. H. et al. In vitro antioxidant activity of *Valeriana officinalis* against different neurotoxic agents. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 1372-1379, 2009.

SUNG, B. et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappa B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappa B alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. **Blood**, v. 111, p. 4880-4891, 2008.

TANAKA, J. C. A. et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TEDONG, L. et al. Hydro-ethanolic extract of cashew tree (*Anacardium occidentale*) nut and its principal compound, anacardiac acid, stimulate glucose uptake in C2C12 muscle cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 1753-1762, 2010.

TINTINO, S. R. et al. Atividade extracts in modulating ethanol and hexane root of *Costus cf. arabicus* of antimicrobial drugs. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 157-162, 2013.

TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27-34, 1996.

VALKO, M. et al. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VERHOEFF, J. et al. A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, p. 461-466, 1999.

VIEIRA, M.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium micrucarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 315-327, 2014.

WAGNER, C. et al. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. **Brain Research**, v. 1107, p. 192-198, 2006.

YOUDIM, K. A. et al. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 592-604, 2004.