

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

KATIANE RAQUEL MÜLLER

**AÇÃO NEUROPROTETORA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DO CAJUIZEIRO *Anacardium microcarpum***

Ducke NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

São Gabriel

2014

KATIANE RAQUEL MÜLLER

**AÇÃO NEUROPROTETORA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DO CAJUIZEIRO *Anacardium microcarpum***

Ducke NO MODELO DE *Drosophila melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Thaís Posser

São Gabriel

2014

KATIANE RAQUEL MÜLLER

**AÇÃO NEUROPROTETORA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DO CAJUZEIRO *Anacardium microcarpum*
Ducke NO MODELO DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 21 de março de 2014:

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Thaís Posser
Orientadora
(UNIPAMPA)

Dr. Gabriel da Luz Wallau
(UNIPAMPA)

Prof.^a Dr.^a Margéli Pereira de Albuquerque
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a toda minha família que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Não tenho palavras pra descrever o quanto sou grata a vocês!

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial a Prof^a. Dr^a. Thaís Posser, por ser minha orientadora, pela disponibilidade e prontidão, ensinamentos e paciência.

Ao pessoal do Laboratório de Estresse Oxidativo e Sinalização Celular pelo apoio e pela amizade!

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Obrigada pelo apoio!

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim....

Sem vocês nada disso seria possível!!!

“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

A planta *Anacardium microcarpum* Ducke conhecida popularmente como cajuzeiro, é encontrada em populações naturais de vários ecossistemas do Nordeste do país, principalmente nas áreas de Cerrado. Estudos etnofarmacológicos encontraram atividade adstringente, antidiabética, anti-inflamatória, antirreumática e antiulcerogênica para o gênero *Anacardium*. Entretanto, há falta de estudos focados no potencial neuroprotetor e antioxidante desta espécie. Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação neuroprotetora e o potencial antioxidante *in vivo* e *in vitro* do extrato hidroalcoólico e de duas diferentes frações: metanol e acetato de *Anacardium microcarpum*. Todos os testes foram realizados com moscas adultas de ambos os sexos de 0-4 dias. Para os testes de toxicidade 25 moscas foram tratadas com meio padrão contendo 0, 1 e 10mg/ml de extrato ou frações, durante cinco dias. Para os testes de neuroproteção, seis grupos de 25 moscas foram tratadas durante 72 horas: com solução de 1% de sacarose (controle) ou Paraquat (PQ 5mM) na presença ou ausência de extrato ou frações (1 e 10 mg/ml). No final dos tratamentos foi analisado o número de moscas mortas, as alterações comportamentais, a produção de hidroperóxidos e a atividade de enzimas antioxidantes. Foi avaliado também o efeitos antioxidantes *in vitro* e a quantificação de compostos fenólicos. Os ensaios de toxicidade demonstraram que o tratamento com extrato e as frações não afetaram a sobrevivência e não apresentaram efeito citotóxico. Por outro lado, o PQ 5mM induziu um aumento de 85 % na mortalidade e déficit locomotor. Este efeito foi totalmente revertido pelo co-tratamento com extrato o hidroalcoólico e a fração metanol. O PQ também induziu o dano oxidativo, sendo revertido ao nível do controle quando co-tratados com extrato hidroalcoólico e a fração metanol. A fração de acetato 10mg/ml aumentou à atividade da GST, SOD e CAT. A fração de metanol 10mg/ml estimulou a atividade de CAT. Enzimas como a CAT e SOD são essenciais para o sistema de defesa intracelular, promovendo a proteção celular contra moléculas reativas potencialmente induzidas. GST é uma enzima de fase II do metabolismo de desintoxicação atuando na excreção de xenobióticos. *In vitro*, a % de scavenging do radicais ABTS foi semelhante entre os extratos. A fração acetato apresentou maior potencial redutor de Fe^{3+} e quase três vezes mais níveis de compostos fenólicos. Em conclusão, este estudo demonstrou que o extrato hidroalcoólico e a fração metanol foram antioxidantes mais eficazes *in vivo*, embora a fração acetato tenha apresentado níveis mais elevados de compostos fenólicos e potencial antioxidante *in vitro*.

Este estudo reflete a presença de compostos neuroprotetores, destacando os efeitos biológicos do cajuzeiro como um potencial agente terapêutico em doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: antioxidante, doenças neurodegenerativas, estresse oxidativo e compostos fenólicos.

ABSTRACT

The plant *Anacardium microcarpum* Ducke popularly known as cajuizeiro is found in natural populations of various ecosystems of the Northeast of the country, mainly in the Cerrado. Become Ethnopharmacological studies found astringent activity, antidiabetic, anti-inflammatory, antirheumatic and antiulcerogenic for the genus *Anacardium*. However, there is lack of studies focusing on the neuroprotective and antioxidant potential of this species. This study aims to evaluate the neuroprotective effect and antioxidant potential *in vivo* and *in vitro* of the hydroalcoholic extract and two different fractions: methanol and acetate of the *Anacardium microcarpum*. All tests were performed with adult flies (both sexes and 0-4 days). For the toxicity test 25 flies were treated with standard medium containing 0, 1 and 10mg/ml extract and fractions for 5 days. For the tests of neuroprotection, six groups of 25 flies were treated for 72 hours with a solution of 1% sucrose (control) or Paraquat (PQ 5mM) in the presence or absence of extract and fractions (1 to 10 mg / ml). At the end of the treatments was analyzed the number of dead flies, behavioral changes, production of hydroperoxides and antioxidant enzymes. It was also evaluated the antioxidant effects *in vitro* and quantification of phenolic compounds. Toxicity tests have shown that treatment with extract and fractions did not affect the survival and showed no cytotoxic effect. On the other hand, PQ 5mM induced a increase of the 85% in mortality and locomotor deficit. This effect was completely reversed by co-treatment with the hydroalcoholic extract and methanol fraction. The PQ also induced oxidative damage, being reversed to the control level when co-treated with hydroalcoholic extract and methanol fraction. The fraction of acetate 10mg/ml increased the activity of GST, SOD and CAT. The fraction of methanol 10mg/ml stimulated CAT activity. Enzymes such as CAT and SOD are essential for intracellular defense system and promote cellular protection against potentially induced reactive molecules. GST is an enzyme of phase II detoxification metabolism acting in the excretion of xenobiotics. *In vitro*, the % scavenging of ABTS radical was similar between extracts. The acetate fraction showed higher reducing potential of Fe^{3+} and nearly three times the levels of phenolic compounds. In conclusion, this study demonstrated that the hydroalcoholic extract and methanol fraction were more effective antioxidants *in vivo*, although the acetate fraction has shown higher levels of phenolic compounds and antioxidant potential *in vitro*. This study reflects the presence of

neuroprotective compounds, especially the biological effects of cajuzeiro as a potential therapeutic agent for neurodegenerative diseases.

Keywords: antioxidant, neurodegenerative diseases, oxidative stress and phenolic compounds.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Estresse Oxidativo	3
2.2.Antioxidantes	5
2.3.Metabolitos Secundários de Plantas	6
2.4. <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke	8
2.5. <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen (1830)	9
2.5.1. Parkinsonismo induzido por Paraquat.....	10
4.OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo Geral	13
4.2. Objetivo Específico	13
5. MATERIAS E MÉTODOS	15
5.1. Reagentes.....	15
5.2.Obtenção dos Extratos	15
5.3.Cultura Estoque de <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen (1830).....	16
5.4.Toxicidade do Extrato	16
5.4.1. Potencial Citotóxico pelo Método de MTT	17
5.4.2.Potencial Citotóxico pelo Método Resazurina	17
5.5.Efeito Neuroprotetor	18
5.5.1. Avaliação da Sobrevivência	18
5.5.2. Geotaxia Negativa.....	19
5.6. Atividade Antioxidante <i>in vivo</i> (DCFH-DA)	19
5.7. Quantificação de Proteína.....	20
5.8. Enzimas Antioxidantes.....	20
5.9. Análise das Propriedades Antioxidantes <i>in vitro</i>	20
5.9.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos	20
5.9.2. Quantificação de Flavonóides.....	21
5.9.3. Atividade Antioxidante pelo Método ABTS.....	22
5.10. Análise Estatística.....	23
6.RESULTADOS	24

6.1. Avaliação da Toxicidade do Extrato Hidroalcoólico e das Frações, Metanol e Acetato, de <i>Anacardium microcarpum</i> sobre a Sobrevivência e Viabilidade Celular.	24
6.2. Avaliação do Potencial Neuroprotetor do Extrato Hidroalcoólico e das Frações, Metanol e Acetato, de <i>Anacardium microcarpum</i> contra a Neurotoxicidade Induzida pelo Herbicida Paraquat.	25
6.3. Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	27
6.4. Enzimas antioxidantes.....	28
6.5. Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	29
7. DISCUSSÃO	31
8. CONCLUSÃO.....	35
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1.INTRODUÇÃO

Os seres vivos interagem com o meio ambiente e tentam manter um ambiente interno que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. Devido aos processos metabólicos o oxigênio retirado da atmosfera é vital para organismos aeróbios, porém ocorre à formação de radicais livres no meio intracelular que ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, podendo comprometer processos biológicos importantes (CERQUEIRA et al,2007). Em condições normais o organismo elimina estas moléculas indesejáveis através de defesas antioxidantes (MONTEIRO, 2007).

O estresse oxidativo (EO) corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação (VICENTINO; MENESES, 2007).O dano oxidativo tem influência decisiva sobre o envelhecimento humano, ocasionando danos em biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, que vão se acumulando ao longo dos anos produzindo danos celulares e teciduais, levando ao envelhecimento do organismo (PANIZ, 2007). O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com um grande número de doenças crônicas, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (MORAIS et al, 2009).

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum que afeta mais de 1% da população acima de 60 anos de idade. Clinicamente, é caracterizada por defeitos do aparelho locomotor, como a rigidez muscular, instabilidade postural, e tremor. A principal neuropatologia que dá origem a estas alterações motoras é a perda progressiva e seletiva dos neurônios dopaminérgico (DA) da substância negra, o que causa uma diminuição do conteúdo de dopamina no cérebro. Sabe-se que provavelmente a doença é causada por uma combinação de fatores de risco, como o processo de envelhecimento, propensão genética e exposições ambientais a inseticidas e herbicidas. Vários modelos para o estudo da DP têm sido desenvolvidos à base de toxinas. Dentre estes os mais utilizados para o estudo da DP, se destacam os modelos da 6-OHDA, MPTP, rotenona, paraquat, LPS e reserpina (CAPITELLI, 2007).

Os antioxidantes destacam-se por prevenir a formação e a ação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que se associam ao dano oxidativo (BROINIZI et al, 2008). O consumo de frutas e outros vegetais, principais fontes de antioxidantes, estão associadas com

a diminuição do risco de doenças. Além de vitaminas, várias outras substâncias com atividade antioxidante podem ser encontradas nos vegetais comumente consumidos na dieta (GIADA, 2006). Muitos vegetais *in natura* ou processados podem ser fontes de antioxidantes, assim, procura-se estudar frutas, tubérculos, cascas, sementes, óleos, entre outros componentes das plantas, para verificar o seu potencial antioxidante (OLIVEIRA et al, 2009). Nos últimos anos, têm-se investigado os efeitos dos antioxidantes em relação às enfermidades, principalmente nos países desenvolvidos do ocidente (MORAIS et al, 2009), utilizando sistemas integrando bioensaios *in vitro* e *in vivo* para verificar potenciais atividades de extratos de plantas medicinais usados na medicina tradicional (CARBONARI, 2005). Para uma avaliação correta desta atividade sistemas *in vivo* devem ser desenvolvidos desde que representem condições químicas, físicas e ambientais similares ao sistema em análise (ALVES,2010).

A centenas de milhares de anos as plantas são utilizadas com finalidade terapêutica. Muitas das propriedades terapêuticas atribuídas às plantas não foram comprovadas. Atualmente, muitas pessoas ainda dependem do uso de plantas medicinais. Um quarto de todas as prescrições médicas são formulações à base de substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados de plantas (FAKIN, 2006). O uso das plantas baseado no conhecimento tradicional não é o suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros, sendo necessária a avaliação do risco e benefícios do seu uso por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. A falta de conhecimento por parte da população sobre possíveis efeitos secundários e tóxicos de diversas plantas pode levar a graves consequências (CARVALHO, 2011).

Dentre os frutos nativos dos cerrados brasileiros, destaca-se o cajuzeiro (*Anacardium microcarpum Ducke*), encontrado em vários ecossistemas do Nordeste do país e também, no caso do Piauí, nos tabuleiros costeiros. Estudos etnofarmacológicos associados ao gênero *Anacardium* encontraram atividade adstringente, antidiabético, antidiarréico, anti-hemorragico, anti-inflamatório, antirreumático, antitérmico, antiulcerogênico, diurético e vermífugo, utilizando cascas do caule, casca da castanha, ramos, pedúnculos, raiz, folhas, frutos, semente e óleo (GONÇALVES et al, 2005). Entretanto, na literatura ainda são poucos os trabalhos sobre o cajuzeiro, o que reforça a necessidade de gerar informações sobre a espécie (RUFINO et al,2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estresse Oxidativo

Uma molécula transforma-se em um radical livre, ganhando ou perdendo um elétron em uma reação química (MIORELLI, 2006). Radicais livres são moléculas que apresentam elétron desemparelhado, quando o elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO (espécies reativas de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio) (BARREIROS et al.,2006). Espécies reativas são produzidas por fatores endógenos (respiração aeróbica, algumas funções imunes mediadas pelas células) e exógenos (dieta, medicamentos, fumo, fumaça de exaustão de automóveis, atividade física exaustiva) que são prejudiciais à saúde dos mesmos (GIADA, 2006). A reação de redução do oxigênio à água fornece a energia que o organismo necessita e permite a complexidade dos organismos superiores. De todo o oxigênio utilizado na respiração celular para a produção de energia cerca de 2 a 5% se transforma em ERO (MIORELLI, 2006).

No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos em diversos processos celulares como: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS et al, 2006). A presença desses compostos no organismo humano acarreta o desenvolvimento de patologias como as neoplasias, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, artrite e diabetes. (AZEVEDO et al, 2011).

ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos e distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as principais EROs podemos citar o radical hidroxila que é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. O radical superóxido que ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos e macrófagos causando lesões em membranas biológicas secundárias;

a peroxila que, é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas, sendo associada a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas. O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, mas é capaz de atravessar camadas lipídicas sendo altamente tóxico para as células e gerar o radical hidroxila (BARREIROS et al , 2006 ; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Dentre os radicais livres envolvidos em atividades benéficas podemos citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que foram identificados como moléculas sinalizadoras, reguladoras de atividade de fatores de transcrição e determinantes de expressão gênica, além de servirem como segundos mensageiros na transdução de sinal para citocinas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores (MIORELLI, 2006).

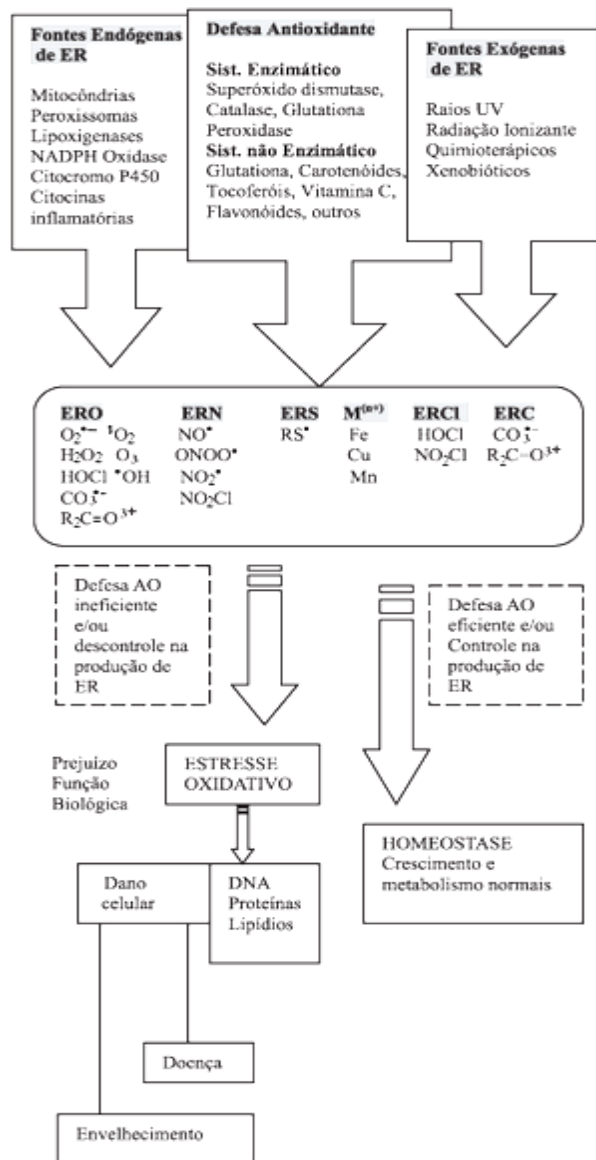
Os antioxidantes tem função de estabilizar ou desativar radicais livres antes que estes ataquem alvos biológicos nas células (AZEVEDO et al, 2011). Para proteger o organismo o sistemas de defesas antioxidantes podem atuar de três maneiras: prevenindo a formação de ERO, interceptando as espécies reativas, ou seja, neutralizando as ERO geradas e ainda podem atuar na reparação dos danos ocasionados por ERO (MIORELLI, 2006).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma essencial para que o organismo tenha um bom funcionamento. Quando este equilíbrio não acontece e ele tende para uma maior quantidade de radicais livres dizemos que o organismo está em estresse oxidativo (EO). Em resumo (Figura 1) o EO pode ter origem endógena, como o que ocorre em um processo de inflamação ou ate mesmo em situações de exercício físico extremo, mas pode também ter causas exógenas como a presença de xenobióticos no organismo (FERREIRA e MATSUBARA 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

O envelhecimento é um processo complexo que se manifesta no organismo em diversos níveis: molecular, celular, genético afetando órgãos e sistema. Os mecanismos pelo qual ele ocorre ainda são pouco compreendidos, mas há indícios de que as ERO participem como um dos principais determinantes do envelhecimento. O envelhecimento é caracterizado por uma queda progressivo nas funções biológicas e com o tempo reduz a resistência ao estresse e aumenta a susceptibilidade a muitas doenças. Um exemplo disso é a incidência de doença de Parkinson em 1 a 2% da população acima dos 65 anos de idade e de 4% na população acima dos 85 anos de idade. O estresse oxidativo desencadeia a cascata que conduz à degeneração das células dopaminérgicas na doença de Parkinson. Entretanto, o estresse oxidativo está intimamente ligado a outros componentes do processo degenerativo, como a

disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, toxicidade do óxido nítrico e inflamação (SOARES, 2013).

Figura 1- Fontes de Espécies Reativas e Respostas Celulares Derivadas de uma Defesa Antioxidante Suficiente ou Insuficiente.



Fonte: Vasconcelos et al.,2007.

2.2. Antioxidantes

Antioxidante é um conjunto heterogêneo de substâncias formado por vitaminas, minerais, compostos vegetais e ainda por enzimas que atuam na defesa contra os radicais livres. As células possuem um sistema endógeno de defesa dentre as quais se destacam as enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). A Catalase é uma hemoproteína encontrada no citoplasma que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 , sendo encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). É um dos catalisadores mais ativos produzidos decompondo o peróxido de hidrogênio a uma taxa extremamente rápida (BAPTISTA, 2009). A SOD corresponde a uma família de enzimas, que catalisam a destruição do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O radical livre superóxido é convertido em peróxido que pode ser destruído por reações mediadas pelas catalase ou pela glutathione peroxidase. A glutathione S-transferase (GST) está diretamente associada com desintoxicação ou proteção celular, sendo encontrada na maioria dos tecidos, como fígado, intestino, rins, cérebro e pulmões (ABREU, 2009).

Devido eficiência parcial do sistema antioxidante endógeno, é necessário o consumo de antioxidantes exógenos para combater o excesso de radicais livres (AZEVEDO et al, 2011). Os antioxidantes exógenos são fotoquímicos oriundos de metabolitos secundários, encontrados geralmente em frutas, hortaliças e vegetais. Estes, atuam evitando que se inicie ou se propague as reações de oxidação em cadeia, as quais levam, ao dano celular (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos tem recebido atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (AZEVEDO et al, 2011).

2.3. Metabolitos Secundários de Plantas

As plantas produzem uma série de componentes orgânicos que são divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários exercem funções essenciais para a planta como, fotossíntese, respiração e de armazenamento de energia. Em contrapartida os metabólitos secundários não exercem ação direta nas funções vitais, entretanto produzem substâncias que possuem papel na proteção contra patógenos, defesa contra herbívoros, atração de organismos benéficos, proteção contra estresses abióticos, entre outros

(BERGAMASCHI, 2010). Existem três grupos de metabólitos secundários: alcalóides, compostos fenólicos e terpenos (BEZERRA, 2008).

Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente nas angiospermas. Esses metabólitos são conhecidos pela presença de substâncias que possuem intenso efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos e alucinógenos. Outras importantes funções foram atribuídas a esses compostos como: antineoplásicos, antidepressivo, utilização no tratamento do Mal de Alzheimer e depressor cardíaco. Atualmente, muitas pesquisas estão sendo realizadas para o isolamento de novos alcalóides com propriedades terapêuticas (SOARES, 2013).

Os terpenos são a classe estruturalmente mais variada de produtos vegetais naturais, costumam ser substâncias voláteis sendo, portanto, denominados óleos essenciais ou essências. Os terpenos mais conhecidos são os carotenos e as xantofilas, por serem compostos antioxidantes e neutralizadores de radicais livres (VIZZOTTO et al, 2010). Além disso, já são amplamente utilizados pelo homem como inseticidas e em produtos aromáticos (BEZERRA, 2008).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um grupo fenol e um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Devido a sua característica química desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e na quelatação de metais pesados, atuando assim como antioxidante no processo oxidativo (BERGAMASCHI, 2010). Dentre eles a classe dos flavonóides é a mais conhecida por exibir propriedades farmacológicas como antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica.

Os flavonóides, exercem efeitos benéficos em diversas doenças incluindo câncer, distúrbios neurodegenerativos e doenças cardiovasculares. Estudos indicam que a atividade biológica dos flavonóides é resultante da capacidade de redução, doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular. A atividade antioxidante parece estar diretamente relacionada com o número de grupamento hidroxila. Por serem intensamente metabolizados *in vivo*, há uma significativa alteração no seu potencial redox, sugerindo que os flavonóides também podem atuar na cascata de sinalização de diversas proteínas quinases, o que pode estar relacionado com os efeitos benéficos destes compostos (SOARES, 2013).

2.4. *Anacardium microcarpum* Ducke

Anacardiaceae é uma família formada por 76 gêneros e 600 espécies. Os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lanea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Dentre eles, os gêneros *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacam-se pela composição química de suas espécies e pelas atividades biológicas de seus extratos e metabólitos (CORREIA et al, 2006).

No estudo destas espécies foram encontrados grandes quantidades de lipídios fenólicos e derivados (CORREIA et al, 2006). Além dos lipídios fenólicos destacam-se outros constituintes químicos encontrados em diversas partes do cajuzeiro como os flavonóides apigenina, kanferol, quercetina, miricetina, agatisflavona, robustoflavona e amentoflavona nas folhas, nas flores já foram isolados galato de etila e na casca da castanha o sitosterol. Outros compostos como ácido gálico, taninos, campesterol, estigmasterol e sitosterol foram encontrados nas cascas do caule (CHAVES et al, 2010). Nos últimos anos foi descoberta uma série de atividades biológicas para os ácidos anacárdicos, entre elas destacam-se atividade antitumoral, habilidade em inibir as enzimas tirosinase, prostaglandina sintase e lipooxigenase, atividade antiacne, antibacteriana e antifúngica (CORREIA et al, 2006).

Encontrado nos cerrados brasileiros, encontra-se o cajuzeiro (Figura 2) (*Anacardium microcarpum*). A planta destaca-se pelo comércio da amêndoa e do pedúnculo, *in natura* ou processados, gerando renda para muitas famílias que vivem diretamente nas regiões de ocorrência da planta (RUFINO¹ et al, 2007).

Figura 2- Cajuí, fruto do cajuzeiro (*Anacardium microcarpum*).



Fonte: Rufino¹ et al, 2007.

O cajuzeiro é uma árvore frondosa que alcança de 25 a 30m de altura, contendo um tronco de casca espessa com 50 a 90cm de diâmetro (RUFINO¹ et al.,2007). O fruto verdadeiro, a castanha, é um aquênio que, em média, não ultrapassa 3g, daí o nome cajuí. Possui um pedúnculo cuja coloração pode variar de amarelo-clara a vermelho-intensa, predominando a amarela (BARROS, 2002; RUFINO, 2004). A castanha é utilizada na forma tradicional e quebrada uma a uma para a obtenção da amêndoa. O pedúnculo, da mesma forma que o do cajueiro cultivado, é utilizado para a fabricação de doces, suco, cajuína e bebidas alcoólicas (RUFINO, 2004). Depois da castanha, um dos principais produtos do cajueiro é o LCC (líquido da casca da castanha de caju). O LCC é viscoso, de coloração castanho escuro, localizado no mesocarpo da castanha sendo liberado no processamento para obtenção da amêndoa, constitui uma fonte natural de compostos fenólicos, sendo constituído por ácidos anacárdicos, cardóis, cardanóis e 2-metilcardóis (CHAVES et al, 2010).

O suco de cajuí é rico em vitamina C, apresentando teores consideráveis de açúcares, fenólicos e minerais, destacando-se entre eles cálcio, ferro e fósforo. Possui baixo teor de proteínas, sendo rico também em aminoácidos, contendo 14 tipos diferentes, onde se destacam com maior abundância a alanina, a valina e a leucina, seguidos da serina, ácido glutâmico, proteína e triptofano. Dessa forma, a presença de vitaminas, sais minerais, carboidratos e ácidos orgânicos no suco de cajuí, o torna importante alimento do ponto de vista médico e dietético (RUFINO¹ et al, 2007).

2.5. *Drosophila melanogaster* Meigen (1830)

D. melanogaster popularmente conhecido como mosca-da-fruta, apresenta tamanho entre 1 a 2mm, coloração acinzentada/amarelada, possui olhos vermelhos e o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. O desenvolvimento deste inseto, inclui a fertilização e a formação do zigoto, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e fase adulta. A *Drosophila* atinge a maturidade sexual após 12 horas atingindo, assim, o estado adulto. A duração média do ciclo de vida da *Drosophila* depende das condições ambientais, mas geralmente o tempo médio de vida das fêmeas é de 26 dias e o dos machos 33 dias (ROQUE, 2010).

Embora as moscas da fruta pareçam ser diferentes dos seres humanos possuem os processos celulares, bem como muitos genes e vias de sinalização compartilhadas entre os seres humanos. Além disso, as moscas são capazes de executar comportamentos motores

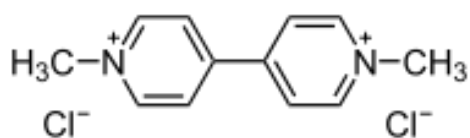
complexos, como caminhadas, escaladas e vôo tornando-se um modelo interessante para estudos de comportamentos, doenças neurodegenerativas e toxicidade de compostos (MUÑOZ-SORIANO e PARICIO, 2011).

A *Drosophila melanogaster* é utilizada como modelo biológico na pesquisa em genética, devido ao seu tamanho reduzido, fácil dimorfismo sexual, ciclo de vida curto, elevada fecundidade, fácil cultivo em laboratório, com poucas exigências nutricionais e baixo custo. Estes organismos também têm sido muito utilizados para testar a toxicidade de praguicidas, como bioindicador de letalidade e na avaliação do efeito tóxico-genético. *Drosophilas* também têm sido utilizados como modelos experimentais no estudo a respeito da fisiopatologia da doença de Parkinson, expondo estes organismos ao herbicida Paraquat (PQ) induzindo o parkinsonismo que é evidenciado pelos déficits motores observados nas moscas. Danos locomotores em *D. melanogaster* afetam a sua geotaxia negatixa, que é o comportamento de locomoção realizado pelas moscas, onde a tendência é de se locomoverem contra a gravidade. Sendo assim, moscas afetadas por certas substâncias podem ter sua geotaxia afetada e a perda de capacidade de vôo contra a gravidade (ROCHA et.al. 2012).

2.5.1. Parkinsonismo induzido por Paraquat

O Paraquat (PQ) ou 1,1'-dimetil-4-4'-bipiridina-dicloreto (Figura 3) é um herbicida utilizado no controle da erva daninha, encontrado com os seguintes nomes comerciais: Gramaxone®, Gramocil®, Agroquat®, Gramuron®, Paraquat®, Paraquol®, e também em misturas com outros princípios ativos, como Secamato®. É um sólido incolor e cristalino cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{14}N_2$, com peso molecular de 186, 25 kDa. Na forma de sal dicloreto é representado pela fórmula $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$, com peso molecular de 257,25 kDa (SANTOS et al, 2012).

Figura 3- Fórmula estrutural do herbicida Paraquat



Fonte: Santos et al, 2012.

Os mecanismos bioquímicos envolvidos na toxicidade do PQ não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, sabe-se que ele atua no encéfalo de animais causando um aumento na formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, entre eles o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), que são instáveis e reagem rapidamente com ácidos graxos, provocando lesão nas membranas, proteínas e DNA (SCHMITT et al, 2006). Sabe-se que o PQ pode também atuar direta ou indiretamente na função mitocondrial e conseqüentemente causar a neurodegeneração em neurônios em modelos animais e em alguns casos, nos seres humanos (BERRY et al., 2010).

O PQ consegue penetrar a barreira hematoencefálica e acumular-se em diferentes regiões no cérebro, essa exposição ao herbicida leva a uma redução das células do sistema nigroestriatal dopaminérgico, o que juntamente com a perda normal destas através do envelhecimento, pode levar ao aparecimento precoce da doença de Parkinson (DP) (PONZONI e GARCIA-CAIRASCO, 1995). A análise post-mortem de cérebros com DP revelou a constante degeneração das células dopaminérgicas e o aparecimento de sintomas parkinsonianos. Devido à indução de dano oxidativo o PQ tem sido usado em modelos experimentais de DP por induzir o parkinsonismo (RAMOS, 2012). O Parkinsonismo é uma síndrome complexa que resulta em déficits motores, rigidez, tremores e alterações posturais, juntamente com outros déficits neurológicos, que se manifestam como a doença progride. Estes são geralmente considerados como manifestações de toxicidade quando neurônios dopaminérgicos são afetados (BERRY et al., 2010).

Estudos recentes demonstram que os produtos naturais e os polifenóis isolados possuem atividade antioxidante sendo capazes de bloquear o estresse oxidativo induzido por substâncias em *Drosophila* (JIMENEZ-DEL RIO et al, 2010; ORTEGA-ARELLANO et al., 2011).

3.JUSTIFICATIVA

Estima-se que de todas as espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas foram submetidas a algum estudo científico para avaliar as suas propriedades. Estima-se que 70% das plantas existentes no planeta ocorrem em apenas 11 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e República Democrática do Congo (NOGUEIRA et al., 2010). A flora brasileira possui uma grande diversidade sendo uma das mais ricas fontes de novas substâncias bioativas. Levando em consideração a riqueza da flora brasileira um exemplo de espécie vegetal pouco estudada é a *Anacardium microcarpum* Ducke geralmente encontrada no nordeste do país. O gênero *Anacardium* já é conhecido por possuir propriedade terapêuticas, aumentando assim o interesse no estudo de outras espécies pertencentes a esse gênero como a planta *A. microcarpum* que ainda carece de estudos, buscando assim um possível agente terapêutico natural para diversas doenças principalmente neurodegenerativas.

4.OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade e ação neuroprotetora *in vivo* através do modelo experimental da *Drosophila melanogaster* induzindo parkinsonismo através do inseticida Paraquat e o potencial antioxidante *in vivo* e *in vitro* do extrato hidroalcoólico liofilizado das cascas de *Anacardium microcarpum* e de duas diferente frações: metanol e acetato.

4.2. Objetivo Específico

- Avaliar o efeito tóxico *in vivo* do extrato hidroalcoólico liofilizado das cascas de *Anacardium microcarpum* e das frações metanol e acetato em *Drosophilas melanogaster*.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico liofilizado das cascas de *Anacardium microcarpum* e das frações metanol e acetato em *Drosophilas melanogaster*.
- Avaliar a toxicidade e efeito neuroprotetor *in vivo* do extrato hidroalcoólico liofilizado das cascas de *Anacardium microcarpum* e das frações metanol e acetato em *Drosophilas melanogaster* expostas ao herbicida Paraquat.
- Determinar o efeito antioxidante *in vivo* do extrato hidroalcoólico liofilizado das cascas de *Anacardium microcarpum* e das frações metanol e acetato em *D. melanogaster* expostas ao herbicida Paraquat.
- Avaliar o efeito antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico e das frações metanol e acetato de *Anacardium microcarpum*.
- Quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcoólico e das frações metanol e acetato de *Anacardium microcarpum*.
- Quantificar os flavonóides presentes no extrato hidroalcoólico e das frações metanol e acetato de *Anacardium microcarpum*.

- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes (Catalase, Glutathione-S-Transferase, Acetilcolinesterase e Superóxido Dismutase) após a ingestão do extrato hidroalcoólico liofilizado das cascas de *Anacardium microcarpum* e das frações metanol e acetato em *Drosophila melanogaster*, expostas ao herbicida Paraquat.

5. MATERIAS E MÉTODOS

5.1. Reagentes

Tampão fosfato de sódio- KPI, (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico), tampão de HEPES, dimetilsulfóxido-DMSO, quercetina, 5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico), iodeto de acetiltiocolina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, 20,70-diclorofluoresceína-diacetato (DCHF-DA), bissulfato de sódio, de cobre (II), sulfato de tetra-hidrato de tartarato de sódio e potássio, ácido tânico, de Folin-Ciocalteu, 2,2'-azino-bis (sal de diamônio de ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, acetato de sódio, 2,4,6-Tris (2-piridil)-5-triazina (TPTZ), metilviologênio dicloreto hidrato (paraquat), amiloglucosidase de *Aspergillus niger* e imunoglobulina anti-coelho (anticorpo ligado com fosfatase alcalina, A-3687) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). (Kit) foi adquirida da Labtest (Belo Horizonte, MG, BRA), ferrocianeto de potássio tri-hidratado, acetato de zinco di-hidratado, ferro (II) sulfato de amônio, ácido gálico, hexa-cloreto de alumínio, persulfato de potássio e ferro (III), foram adquiridos da Vetec química Fina LTDA (Rio de Janeiro, RJ, BRA). Anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182) e anti-p38-total, anti-fosfo ERK1/2 (Thr202/Tyr204) e anti-total de-ERK1/2 e anticorpos de b-actina foram adquiridos a partir de tecnologia de sinalização celular. SDS, acrilamida, cloreto de bis-acrilamida, nitrocelulose Hybond, ditiotreitól (DTT) foram obtidos de GE Healthcare Divisão de Vida. Todos os outros reagentes foram produtos comerciais do mais alto grau de pureza disponível.

5.2. Obtenção dos Extratos

As cascas do caule de *Anacardium microcarpum* Ducke foram coletadas em Barreiro Grande, Crato-Ceará (7° 22 'S, 39° 28' W; 892m do nível do mar), no Brasil, em novembro de 2011. O material vegetal foi identificado pela Dr^a. Maria Arlene Pessoa da Silva do herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA). As cascas do caule foram lavadas em água corrente e em seguida foram trituradas e

colocadas em frascos de vidro contendo o solvente e esta solução hidroalcoólica de extração (99,9% de etanol em água destilada) na proporção de 1:1, de modo que o material ficou totalmente imerso na solução de extração, por um período de três dias. Depois de 72h, o material recebeu duas filtrações em fibras de algodão e, em seguida foi submetido ao processo de secagem do solvente etanólico por evaporador rotativo e o restante da água pelo processo de banho de água durante dois dias. Depois de completada a secagem foi obtido 490g de extrato bruto ou extrato hidroalcoólico. Destes, em 150g foi adicionado acetato de etila e metanol obtendo-se 12,5g de fração acetato e 105,23g de fração metanol. O extrato e as frações foram liofilizados e colocados em frascos e mantidos sob refrigeração constante ($18^{\circ}\text{C} \pm 2$) para a sua utilização.

5.3.Cultura Estoque de *Drosophila melanogaster* Meigen (1830)

Drosophila melanogaster (linhagem Harwich) foram obtidas a partir da espécie nacional Stock Center, Bowling Green, OH, EUA. As moscas foram mantidas em frascos de 2,5cmX6,5cm contendo 10ml de meio padrão para *D. melanogaster* em BOD com temperatura e umidade constantes ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 60% de umidade relativa). Todos os experimentos foram realizados com moscas adultas entre 0-4 dias de idade de ambos os sexos.

5.4.Toxicidade do Extrato

Os testes de toxicidade tem como objetivo avaliar o potencial de uma substância ou material em produzir efeitos letais ou tóxicos em sistemas biológicos a nível celular. A liberação de substâncias tóxicas pelo material pode lesar as células ou reduzir a taxa de crescimento celular (CHORILLI et al.,2009).

Para a avaliação da toxicidade 25 moscas foram tratadas em meio de cultura padrão com o extrato hidroalcoólico ou com uma das frações acetato e metanol nas concentrações de 1mg/ml e 10g/ml durante 5 dias. No controle havia somente meio de cultura padrão. O

número de moscas mortas foi anotado diariamente, sendo cada experimento realizado em triplicata.

5.4.1. Potencial Citotóxico pelo Método de MTT

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazana. O MTT (coloração amarela) é reduzido a formazana (precipitado de coloração violeta) pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que está ativa em células que possuem o metabolismo da cadeia respiratória intacto. Assim, a formazana é quantificado espectrofotometricamente e possui correlação direta com o número de células viáveis. Este produto gerado dentro da célula é extraído através da adição de um solvente (VALADARES et al, 2007; TEIXEIRA, 2012).

Para este teste foram selecionadas seis moscas de cada tratamento e anestesiadas, separando a cabeça do resto do corpo. Em uma placa de Elisa foram individualmente dispostas uma mosca por poço (cabeça e tronco separados) e adicionados 200µl de solução de MTT em cada poço. A placa foi levada para incubação a 37°C por 30 minutos. Após o tempo de incubação cada mosca foi removida e transferida para outra placa de Elisa com 200µl do solvente DMSO e novamente incubada a 37°C por 30 minutos. Terminada a incubação foram removidas e descartadas as moscas. Sendo feita a leitura na leitora de placas multimodo Enspire® (Perkin Elmer, EUA) a 540nm e depois 630nm.

5.4.2. Potencial Citotóxico pelo Método Resazurina

Na forma oxidada, a resazurina é um composto de cor azul e não apresenta fluorescência, porém ao ser reduzido é convertida em resorufina, um composto cor-de-rosa e altamente fluorescente. A resazurina, ao ser incorporada pelas células, atua como um aceitador intermediário de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, sendo reduzido intracelularmente por enzimas mitocondriais, como a desidrogenase. A determinação da

redução do composto permite assim avaliar a variação na atividade metabólica das células (MARTINS, 2008; CUNHA, 2013).

Foram selecionadas 20 moscas por tratamento, homogeneizadas com tampão TRIS (20mM pH 7,0) e centrifugadas a 1000g por 5 minutos (4°C) sendo coletado o sobrenadante. Na placa de Elisa foram adicionados 180µl de tampão, 10µl de amostra e 10µl de resazurina. A placa foi mantida em temperatura ambiente protegida da luz por 24 horas sendo posteriormente feita a leitura da absorbância na leitora de placas multimodo Enspire® (Perkin Elmer, EUA).

5.5.Efeito Neuroprotetor

A fim de testar o efeito antioxidante e neuroprotetor do extrato, foram feitos dezoito grupos de tratamento: seis para o extrato hidroalcoólico, seis para a fração acetato e seis para a fração metanol. Os seis grupos foram divididos em: um grupo controle alimentadas apenas com sacarose 1%, um grupo alimentado com solução de Paraquat 5mM, dois grupos de tratamento apenas com o extrato da planta: um contendo 1mg/ml de solução de extrato de planta e outro com 10mg/ml de extrato e também foram feitos dois grupos contendo solução de Paraquat 5mM combinado com o extrato de planta: um contendo Paraquat 5mM e 1mg/ml de cada fração do extrato de planta e outro contendo solução de Paraquat 5mM e 10mg/ml do extrato de planta. Os tratamentos foram realizados em tubos de plástico com um papel filtro na base, para cada grupo foram colocadas 25 moscas entre 0- 4 dias e alimentadas diariamente com 180µl de solução, conforme o grupo. Os tratamentos tiveram duração de 72 horas, sendo avaliado posteriormente a sobrevivência, geotaxia negativa e o estresse oxidativo pelo método de DCFH-DA.

5.5.1. Avaliação da Sobrevivência

Foram anotadas diariamente durante os três dias de tratamento a mortalidade das moscas expostas as diferentes concentrações do extrato de planta em cada uma das frações, avaliando o seu potencial tóxico quando comparado à mortalidade do controle.

5.5.2. Geotaxia Negativa

A capacidade locomotora foi determinada pelo ensaio de geotaxia negativa tal como descrito por Coulomn e Birman (2004), com algumas modificações. Para os ensaios, cinco moscas por tratamento foram anestesiadas e colocadas em tubos transparentes de 15cm (comprimento de 15 cm, diâmetro de 1,5 cm e contendo uma marcação em 8cm.). Depois de 30 minutos de recuperação, as moscas foram batidas suavemente para a parte inferior da coluna. Após 10 segundos foi contado o número de moscas que atingiram os 8 centímetros de coluna. Os ensaios foram repetidos três vezes em intervalos de 1 min. Com os resultados obtidos foi feita uma média do número de moscas no topo e outra das moscas na base.

5.6. Atividade Antioxidante *in vivo* (DCFH-DA)

O ensaio baseia-se na redução do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína DCFH-DA no interior das células, produzindo um substrato oxidável DCFH. O DCFH-DA atravessa a membrana da célula, onde enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar o 2',7'-diclorofluoresceína DCFH. Na presença de espécies reativas de oxigênio o DCFH é oxidado formando a 2',7'-diclorofluoresceína DCF, que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530nm. Através da fluorescência pode-se quantificar as espécies reativas produzidas pelas células (LUNARDI, 2004).

A oxidação de (DCFDA) foi feita seguindo Pérez-Severiano et al. (2004). A emissão de fluorescência de DCF resultante foi monitorizada em intervalos regulares de 20 em 20 minutos até completar 1 hora, a um comprimento de onda de excitação de 485nm e um comprimento de onda de emissão de 530nm num leitor de placas multimodo Enspire® (Perkin Elmer, EUA). A quantidade de DCF formado foi calculada com base numa curva de calibração construída utilizando um padrão comercial de DCF. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes.

5.7. Quantificação de Proteína

O teor total de proteína da amostra foi estimada como descrito por Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão . A absorbância foi medida a 595nm com o auxílio de um leitor de placa multimodo Enspire® (Perkin Elmer , EUA). O teor de proteínas totais presentes na amostra de extrato é expressa em mg/g .

5.8. Enzimas Antioxidantes

20 moscas por amostra foram homogeneizadas em tampão HEPES (20mM pH 7,0) e centrifugadas a 1000g por 5 minutos (4°C). O sobrenadante foi isolado, uma alíquota foi separada para determinação da quantidade total de proteína na amostra e o restante para determinação da acetilcolinesterase com base em protocolos previamente descritos (FRANCO et al., 2009; OHKAWA et al., 1979). O sobrenadante foi centrifugado novamente a 20.000g a 4°C por 30 minutos, do sobrenadante resultante uma nova alíquota foi separada para determinação da quantidade total de proteína da amostra e o restante foi utilizado para a medição da catalase (CAT) (AEBI, 1984), glutathiona-S-transferase (GST) (HABIG e JAKOBY, 1981) e superóxido dismutase (SOD) (KOSTYUK e POTAPOVICH, 1989).

5.9. Análise das Propriedades Antioxidantes *in vitro*

Todos os ensaios espectrofotométrico da análise das propriedades antioxidantes foram realizados em placas de 96 poços usando o leitor de placa multimodo Enspire leitor® (Perkin Elmer , EUA), nas concentrações de 1µg/ml, 10µg/ml, 40µg/ml e 400µg/ml para cada fração do extrato.

5.9.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos

O reagente Folin- Ciocalteu é uma solução formada por íons de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Na presença dos fenolatos ocorre a formação de complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$. A reação baseia-se na desprotonação dos compostos fenólicos em meio básico, geram os ânions fenolatos. Ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e muda de coloração amarela para azul (OLIVEIRA et al, 2009).

Os compostos fenólicos de amostras do extrato foram detectadas pelo método de Folin - Ciocalteu (SINGLETON et al, 1999) com pequenas modificações. Na placa de Elisa em cada poço foram adicionados 175µl de água destilada, 4µl de amostra, 35µl de reagente de Folin- Ciocalteu 1N e após 3 min., 70µl de solução de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura. A reação foi mantida no escuro durante 2h e posteriormente a absorbância foi lida a 760nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão (50-500µg/mL). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAES).

5.9.2. Quantificação de Flavonóides

O método espectrofotométrico utilizado para a determinação do conteúdo de flavonóides utiliza o cloreto de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, podendo assim determinar a quantidade de flavonóides, sem que haja interferência das outras substâncias fenólicas. Nestas condições o complexo Flavonóide-Alumínio, absorve comprimentos de ondas maiores do que o flavonóides sem a presença do complexante (SOARES, 2006).

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994). Em cada poço da placa de Elisa para quantificação dos flavonoides na amostra 150µl alumínio (AlCl_3) foram misturada com o mesmo volume de uma solução de cada amostra. A amostra branco consistiu de 150µl de amostra com 150µl de água destilada, sem AlCl_3 e depois de 10 min. a absorbância foi lida a 41nm. A quercetina foi utilizado como padrão (5-100µg/ml). Os resultados foram expressos em mg de quercetina (QE) por 100g de amostra.

5.9.3. Atividade Antioxidante pelo Método ABTS

Uma das metodologias mais utilizadas para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical ABTS- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (RUFINO² et. al, 2007). A adição de persulfato de potássio resulta na formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada, à medida que o antioxidantes é misturado ocorre à redução do ABTS^{•+} em ABTS, resultando na coloração azul-clara. O ABTS possui excelente estabilidade, boa solubilidade e uma das principais vantagens é a sua simplicidade, o que permite que seja aplicado em análises rotineiras de laboratórios (TIVERON, 2010).

A atividade antioxidante do extrato na reação com ABTS foi determinada de acordo com o método de Baltrušaitytė et al. (2007) com algumas modificações. O radical ABTS foi gerado por oxidação de soluções preparadas com 1ml de 2,2-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) 7mM e 17,5µl de solução estoque de sal de diamônio com persulfato de potássio (K₂S₂O₈) 140mM. A mistura foi deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 horas antes da utilização. Para a avaliação da capacidade antioxidante, a solução ABTS foi diluída em água destilada. Em cada poço da placa de Elisa 200µl de solução ABTS foram misturados com 2µl de amostra e 48µl de água destilada numa microplaca e a diminuição na absorbância foi medida após 10 min. A atividade de eliminação de radicais (RSA) foi calculada pela fórmula $\% \text{ RSA} = [(AB - AA)/AB] \times 100$, onde RSA = ABTS • + eliminadora; AB = absorção da amostra de controlo (apenas ABTS•+); AA = absorção de uma amostra de extrato ou fração testada.

5.9.4. Capacidade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

O método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) está baseado na capacidade de fenóis em reduzir o Fe³⁺ em Fe²⁺, sendo uma alternativa para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas (RUFINO et al, 2006). A reação ocorre com a formação do complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-pirimidil)-s-

triazina) com o Fe (III). Na presença de um antioxidante o ferro é reduzido dando origem ao $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ de cor azul escura, emitindo absorvância em 593nm (TIVERON, 2010).

A capacidade de redução de amostras de extrato foi realizada pelo método original de Benzie e Strain (1996) , com algumas modificações. Na placa de Elisa foram adicionados 9 μ l de amostra, 270 μ l de reagente FRAP preparada na hora e 27 μ l de água destilada. O reagente FRAP foi preparado por mistura de 2,5 ml de tampão de acetato 0,3M e pH 3,6 , com 250 μ l de uma solução de (2-piridil)- s- triazina (TPTZ) e 250 μ l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,4,6 - Tris 10mM. A mistura foi agitada e incubada durante 30 minutos em banho-maria a 37° e as leituras de absorvância foram feitas a 595nm. Amônio de ferro (II) hexa-hidrato de sulfato foi usada para calcular a curva padrão (500-5000 μ M). A capacidade redutora do extrato foi expressa em μ M de Fe (II).

5.10. Análise Estatística

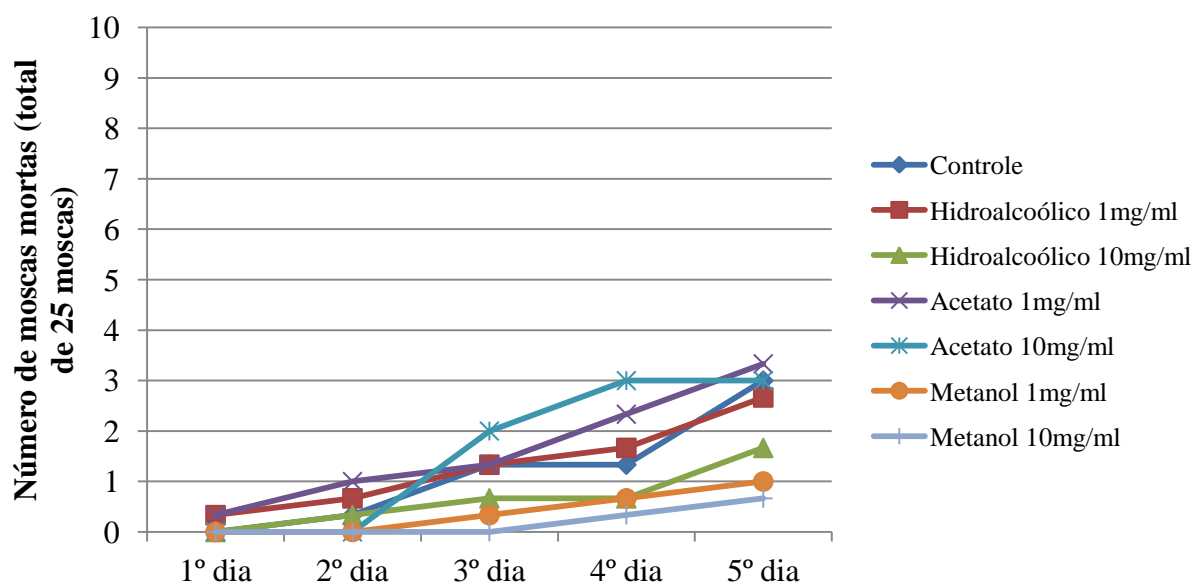
A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas a $p < 0,05$.

6.RESULTADOS

6.1. Avaliação da Toxicidade do Extrato Hidroalcoólico e das Frações, Metanol e Acetato, de *Anacardium microcarpum* sobre a Sobrevivência e Viabilidade Celular.

A Figura 4 mostra o número de moscas mortas ao final do quinto dia de tratamento com o extrato hidroalcoólico e as frações acetato e metanol, demonstrando que a planta não afetou a sobrevivência das moscas em até cinco dias de tratamento em nenhuma das concentrações testadas, indicando que não houve toxicidade. A fração de metanol nas duas concentrações testadas foi a que menos causou mortalidade, porém estatisticamente não foi encontrada diferença significativa.

Figura 4- Avaliação da Sobrevivência das moscas tratadas com o Extrato Hidroalcoólico e as Frações Acetato e Metanol de *A.microcarpum* (n=3).



A avaliação da viabilidade celular pelo teste de MTT (Figura 5) e pelo método de resazurina (Figura 6) não apontaram atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico e das frações metanol e acetato. Entretanto, os resultados obtidos pelos dois métodos foram diferentes. Pelo ensaio de MTT houve um aumento significativo na viabilidade celular na fração metanol 10mg/ml. Pelo método de resazurina em todas as frações e no extrato hidroalcoólico pode-se observar um aumento na viabilidade celular em relação ao controle.

Figura 5- Atividade Citotóxica do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol de *A.microcarpum* realizados pelo método de MTT. ***p<0.05 (n=5)

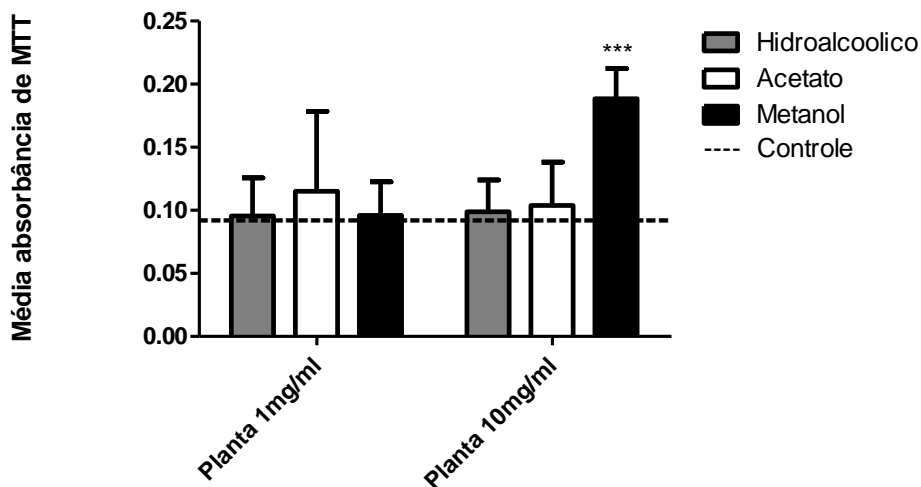
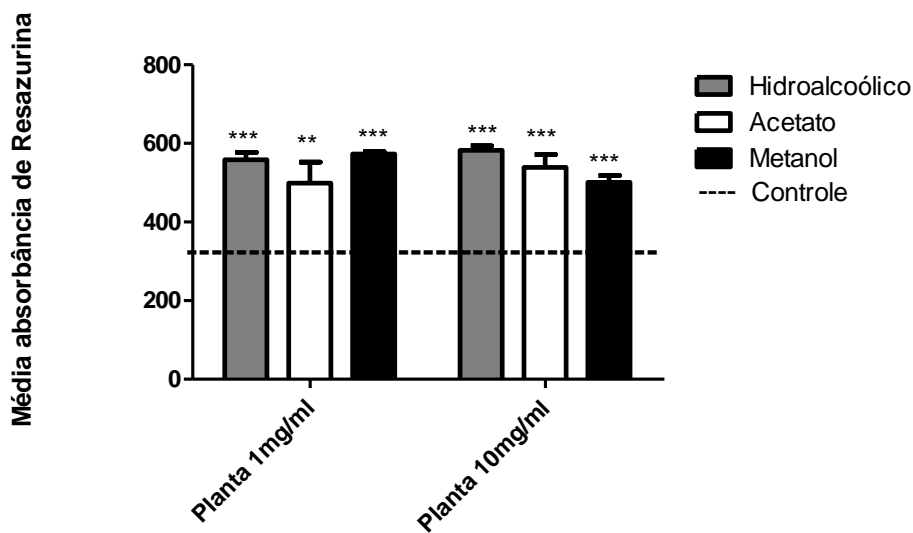


Figura 6- Atividade Citotóxica do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol de *A.microcarpum* realizados pelo método de Resazurina. *** p<0.05, ** p<0,0042 (n=4)



6.2. Avaliação do Potencial Neuroprotetor do Extrato Hidroalcoólico e das Frações, Metanol e Acetato, de *Anacardium microcarpum* contra a Neurotoxicidade Induzida pelo Herbicida Paraquat.

Na figura 7 são mostrados os dados da mortalidade das moscas submetidas ao tratamento com extrato hidroalcoólico e das frações metanol e acetato na presença ou

ausência de Paraquat 5mM (PQ). PQ causou cerca de 85% das mortes nas moscas, sendo tal efeito revertido parcialmente revertido pelo co-tratamento com o extrato hidroalcoólico e pelo co-tratamento com a fração metanol ambos na concentração de 1mg/ml. O co-tratamento com a fração de metanol 10mg/ml reduziu em 92% e o co-tratamento com o extrato hidroalcoólico 10mg/ml reduziu 90% a mortalidade causada pelo PQ, apresentando reversão total contra o dano induzido pelo herbicida. O co-tratamento com a fração de acetato na concentração de 1mg/ml reduziu em 29% a mortalidade, não sendo tão eficiente no co-tratamento na concentração de 10m/ml. Na figura 8 podemos observar o efeito causado pelo herbicida na atividade locomotora, onde o Paraquat 5mM causou déficit locomotor na geotaxia das moscas, fazendo com que a maioria delas permanecesse na base, sendo revertido pelo co-tratamento dos extratos com maior eficiência na maior concentração do extrato hidroalcoólico 10mg/ml e na fração metanol 10mg/ml.

Figura 7- Efeito Neuroprotetor do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol de *A.microcarpum* sob a sobrevivência das moscas. *** $p<0.05$ ** $p<0,004$ # $p< 0.05$ em relação ao PQ. (n=3)

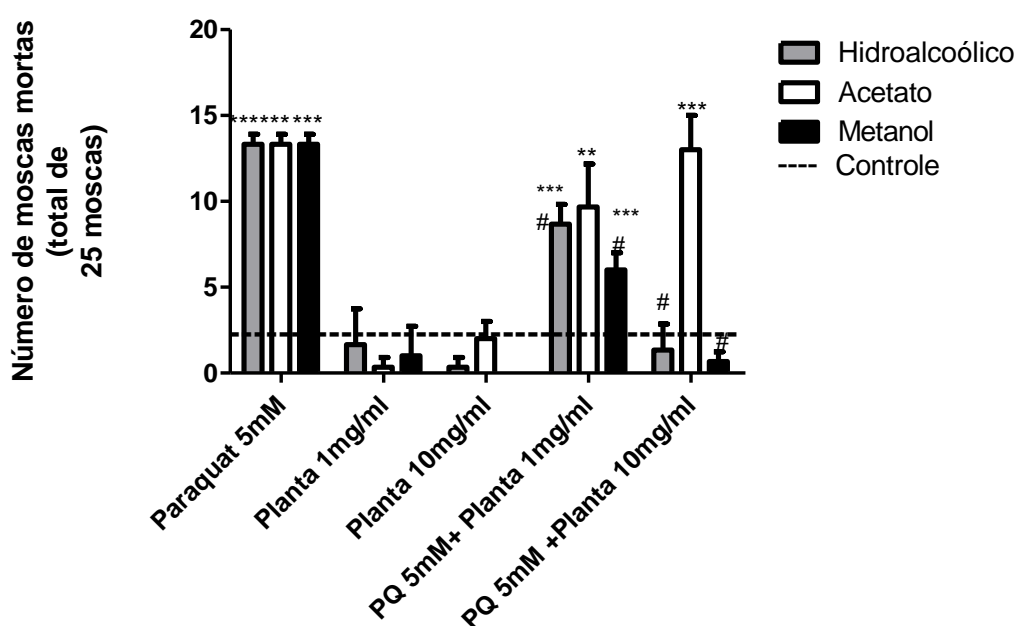
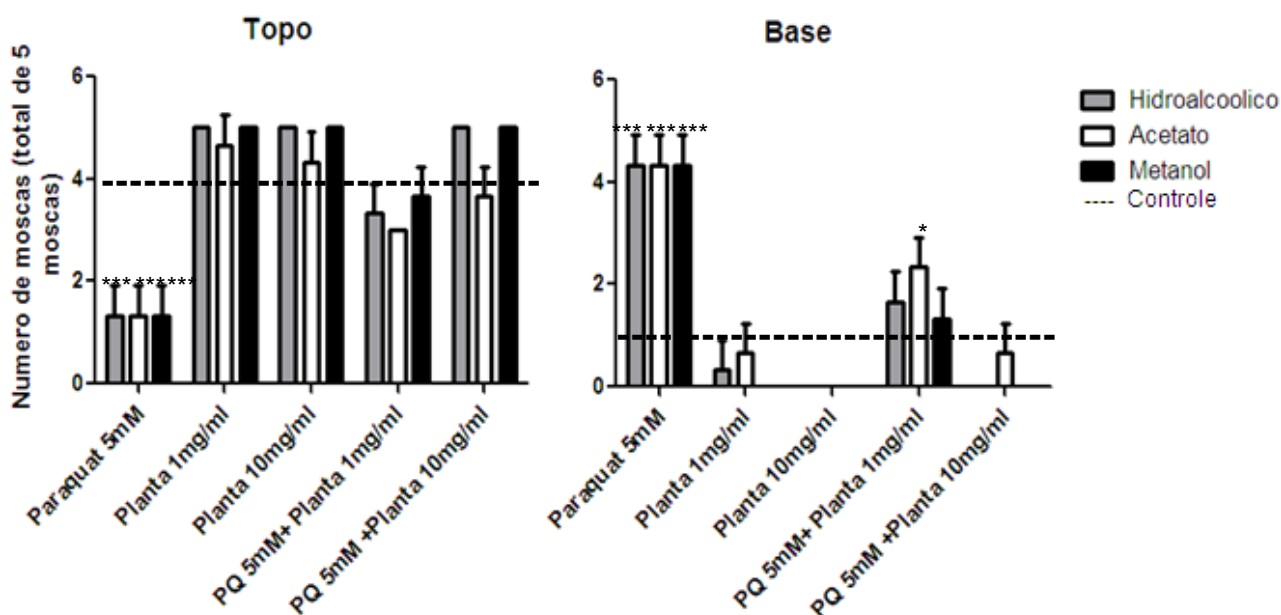


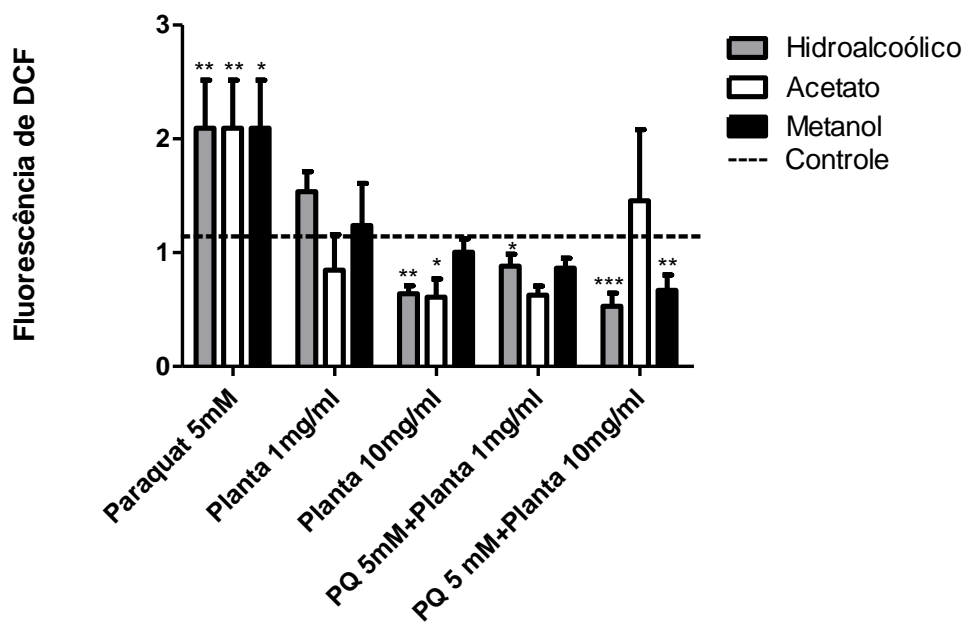
Figura 8- Efeito Neuroprotetor do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol de *A.microcarpum* sob a atividade locomotora das moscas. *** $p<0.05$ * $p<0,03$ (n=3)



6.3. Atividade Antioxidante *in vivo*

A figura 9 mostra os dados obtidos pelo teste de DCFH-DA, onde o Paraquat 5mM induziu a formação de ROS como o esperado. O co-tratamento com o extrato e as frações demonstraram efeito antioxidante frente formação de espécies reativas induzida pelo Paraquat já na concentração de 1mg/ml na fração acetato, porém o efeito foi maior na concentração de 10mg/ml do extrato hidroalcoólico e da fração metanol. Houve uma redução de 75% na geração de ERO no grupo co-tratado com o extrato hidroalcoólico na concentração 10mg/ml e uma redução de 70% no grupo co-tratado com a fração metanol na concentração 10mg/ml. O tratamento apenas com a planta *A. microcarpum* também reduziu a quantidade de espécies reativas em relação ao controle, demonstrando o efeito antioxidante da planta.

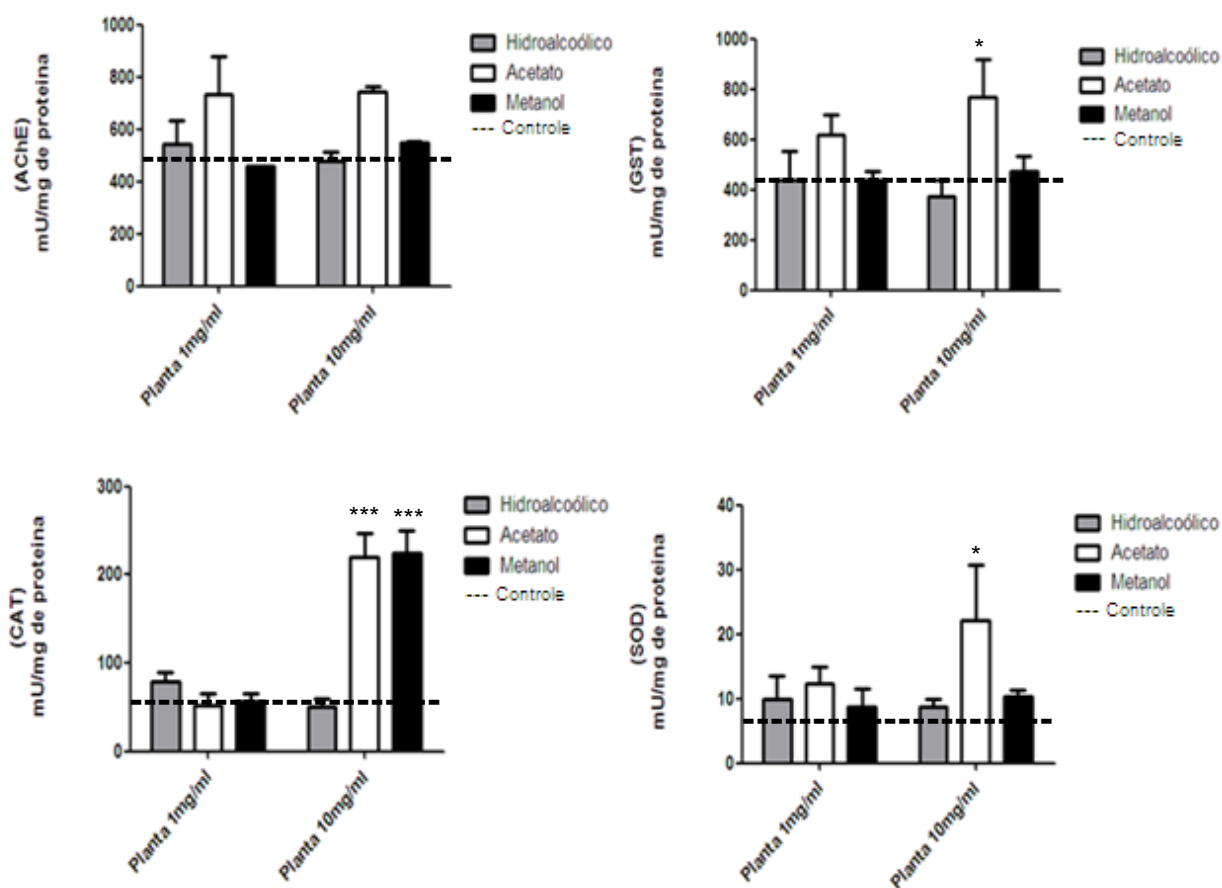
Figura 9- Efeito Antioxidante *in vivo* do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol de *A. microcarpum* sob a geração de espécies reativas. *** $p < 0.05$ * $p < 0,027$ ** $p < 0,0042$ (n=4)



6.4. Enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE), Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST) e Superóxido Dismutase (SOD) são mostradas na figura 10. Houve um aumento significativo na atividade enzimática da GST, SOD e CAT na fração acetato 10mg/ml e um aumento na CAT na fração metanol 10mg/ml.

Figura 10- Efeito do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol de *A.microcarpum* sob a atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE), Catalase (CAT) Glutaciona-S-Transferase (GST) e Superóxido Dismutase (SOD). *** $p < 0.05$ * $p < 0,025$ (n=3)



6.5. Atividade Antioxidante *in vitro*

A Tabela 1 demonstra as propriedades antioxidantes *in vitro* dos extratos de *Anacardium microcarpum*. A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} e pelo método de redução do ferro (FRAP) variam de acordo com os compostos testados. Os valores de % de scavenging obtidos pelo ABTS, foram maiores no extrato acetato apresentando uma média de $68,71 \pm 0,4$, seguido do extrato metanol com uma média de $68,01 \pm 0,4$ e do extrato hidroalcoólico com uma média de $66,95 \pm 0,9$, entretanto não houve grande variação entre eles. Pelo método de FRAP as médias foram de $4,8 \pm 0$ no extrato acetato, $3,24 \pm 0,04$ no extrato hidroalcoólico e de $2,9 \pm 0,04$ no extrato metanol, os valores são expressos em $\mu\text{M Fe [II]}/\text{mg}$ de extrato.

O teor de compostos fenólicos totais (mg de GAE/g de extrato) foi maior no extrato acetato apresentando uma média de $351 \pm 7,4$, seguido do extrato metanol com uma média de

133,7±2,3 e do extrato hidroalcoólico com uma média de 113±1,4 (Tabela 1). O teor de flavonoides (mg de QE/g de extrato) não foi detectado pelo método utilizado. Este resultado sugere que há distinções na composição química dos extratos de acordo com a fração utilizada.

Tabela 1- Concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS ·+ e FRAP do Extrato Hidroalcoólico e das Frações Acetato e Metanol. (n=3)

	Compostos fenólicos (mg de GAE/100g de extrato)	ABTS·+ (% scavenging)	FRAP (µM Fe [II]/100g de extrato.
Extrato Hidroalcoólico	113±1,4	66,95±0,9	3,24±0,04
Fração Acetato	351±7,4	68,71±0,4	4,8±0
Fração Metanol	133,7±2,3	68,01±0,4	2,9±0,04

7.DISCUSSÃO

Em nossos estudos o extrato hidroalcoólico e as frações acetato e metanol, não foram tóxicos para *D. melanogaster* e também não apresentaram citotoxicidade para as células, aparentando até mesmo aumentar a viabilidade celular. Os ensaios de citotoxicidade determinam a resposta biológica de células através da avaliação de dano celular através da medição do crescimento celular, morte das células e de aspectos específicos do metabolismo celular. Portanto, a avaliação citotóxica permite determinar a segurança de substâncias a serem utilizadas na terapêutica. (CEFALI, 2009).. Nos dois métodos utilizados, o extrato e as frações demonstraram ser seguros para utilização, porém o método de resazurina demonstrou ser mais minucioso na detecção da fluorescência. Estudos comparando os dois métodos de análise, concluíram que a resazurina é mais sensível como indicador redox e requer menos redução quando comparado com o MTT. A resazurina não é tóxica para as células e não é necessária a morte celular para se obter resultados como acontece no método com MTT, mesmo após um longo período de incubação (CAVALEIRO, 2008). Este fator pode explicar as diferenças encontradas nos resultados dos dois métodos, portando o método de resazurina mostrou-se melhor como indicador de citotoxicidade.

Os testes de neuroproteção utilizando o Paraquat, é uma ferramenta promissora para estudar os mecanismos de morte celular neuronal *in vivo*, além de induzir a neurotoxicidade no sistema nigro-estriatal produzindo potentes mudanças comportamentais e locomotoras (CORASANITI et al, 1998), demonstraram que o extrato e as frações protegeram contra o dano neurológico e contra os déficits locomotores causados pelo herbicida. O mecanismo responsável pelos efeitos neurotóxicos *in vivo* do Paraquat estão associados à produção de radicais livres que desempenham um papel crucial na neurotoxicidade induzida pelo herbicida (CORASANITI et al, 1998), portando sugere-se que o *Anacardium microcarpum* funciona como um possível antioxidante na prevenção do dano neurológico e locomotores.

Os níveis de estresse oxidativo podem ser estudados através da utilização de compostos indutores da formação de ROS, como o Paraquat, e posteriormente quantificados pelo corante fluorescente (DCFH-DA) que é diacetilado por esterases a DCFH. O DCFH, por sua vez na presença de ROS, é oxidado a DCF emitindo a fluorescência (ANDRADE, 2011). Estudos realizados com células de carcinoma, concluíram que o tratamento com PQ aumentou a intensidade do DCFH-DA, indicando elevada produção de ROS (KIM et al., 2011). A atividade antioxidante da espécie *Anacardium microcapum* também pode ser

comprovada *in vivo*. No nosso estudo o PQ realmente atuou indutor de estresse oxidativo, como demonstrado pelo teste de DCFH-DA, sendo que o extrato de cajuzeiro e as frações atuaram frente aos danos oxidativos induzidos por esse agente oxidante. Sugere-se que os compostos presentes no extrato poderiam estar inibindo as espécies reativas de oxigênio, reforçando algumas defesas antioxidantes celulares evitando os danos locomotores e neurotóxicos causados pelo Paraquat.

Pelo fato do extrato e das frações terem propiciado um significativo efeito antioxidante, foi avaliado também seu efeito sobre a atividade das enzimas SOD, CAT, GSH e AChE. Enzimas como CAT e SOD são essenciais para o sistema de defesa intracelular, por atuarem na remoção do superóxido e o H₂O₂. Uma diminuição dessas enzimas leva ao acúmulo de espécies reativas e ao dano celular. Para se proteger do estresse oxidativo o organismo desenvolveu um sistema antioxidante dependente de glutathiona (GSH), que age diretamente nas moléculas reativas evitando danos no sistema biológico e o comprometimento da viabilidade celular (OLIVEIRA E SILVA, 2012). Em nosso estudo as enzimas tiveram sua atividade enzimática aumentada pela ação do extrato, aumentando assim a proteção antioxidante das células. Estudos realizados com camundongos que tiveram a sua dieta suplementada com ácido anacárdico também demonstram aumento nos níveis enzimáticos das enzimas GST e CAT (CARVALHO, 2011).

Foi encontrado para a espécie *Anacardium microcapum* atividade antioxidante *in vitro* tanto pelo método de ABTS, quanto pelo método de redução de ferro. Trabalhos realizados com extratos hidroacetônico e hidrometanólico provenientes de resíduos de caju (bagaço do pedúnculo) de *Anacardium occidentale L.* também demonstraram forte capacidade de sequestro do ABTS⁺ (ANDRADE, 2013). Estudos utilizando a mesma metodologia de FRAP foram encontrados valores semelhantes para a espécie *Anacardium occidentale*: 3.3 ± 0.1 para a variedade vermelha, 4.6 ± 0.3 para a variedade amarela (ALI e CROZIER, 2007), $1,811 \pm 0,089$ para o extrato aquoso liofilizado (FAZALI et al., 2011). Assim, o estudo sugere que o extrato e as frações foram capazes de doar elétrons para o radical ABTS e também para a redução do ferro, sugerindo que eles podem ser capazes de doar elétrons aos radicais livres em sistemas biológicos reais.

A maioria dos antioxidantes isolados de plantas superiores são compostos fenólicos e flavonoides. Assim, o conteúdo de compostos fenólicos e de flavonoides pode contribuir diretamente para a atividade antioxidante dos extratos (SOARES, 2013). Segundo Rufino et al. (2010) o teor de polifenóis pode ser classificado em três categorias: baixo (< 1 mg EAG/g), médio (1 – 5 mg EAG/g) e alto (> 5 mg EAG/g) para amostras baseadas em material vegetal

fresco (MF) e baixo (< 10 mg EAG/g), médio ($10 - 50$ mg EAG/g) e alto (> 50 mg EAG/g), baseadas em material vegetal seco (MS). Seguindo esta classificação dada em mg EAG/g, o extrato hidroalcoólico e as frações metanol e acetato de *Anacardium microcarpum* apresentam altos teores de compostos fenólicos. Quanto à quantidade de compostos fenólicos, estudos realizados com *Anacardium occidentale* encontraram valores semelhantes $201,61 \pm 19,15$ para o extrato aquoso $165,07 \pm 4,10$ para o extrato hidroalcoólico (VIEIRA et al., 2010).

Em nossos estudos encontraram-se diferenças na composição de acordo com o solvente utilizado em cada fração. Comparando com outros estudos em espécies vegetais que utilizaram diferentes frações, o conteúdo fenólico também variou de acordo com o solvente. Bertoldi (2006) realizou estudos com *Schinus terebinthifolius raddi* extraídos com diferentes solventes, concluindo que haviam diferenças entre eles, encontrando maiores quantidades de fenóis nos extratos extraídos com água e acetona do que em etanol e metanol. Vizzotto e Pereira (2011) testou os solventes água ultrapura, metanol, etanol, acetona e hexano para extração de Blackberry (*Rubus* sp.) concluindo que a acetona foi o solvente mais eficiente em extração, seguido de metanol e etanol. Pode-se observar uma relação entre o solvente utilizado na composição do extrato e das frações com a quantidade de fenóis, conseqüentemente influenciando também na atividade antioxidante *in vitro*. Sugerindo que há uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante.

Diferente dos resultados obtidos *in vitro* onde a fração acetato apresentava maior potencial antioxidante, os resultados *in vivo* sugerem que a fração metanol e o extrato hidroalcoólico possuem maiores efeitos antioxidantes. Resultados semelhantes foram encontrados por Cinta e Mancini-Filho (2001) quando comparado o efeito antioxidante *in vivo* e *in vitro* de especiarias. Os testes *in vitro* comprovam a presença de substâncias antioxidantes, porém muitos desses métodos não demonstram correlação com a habilidade dos compostos em inibir o estresse oxidativo *in vivo*. Isto se deve ao fato de que a atividade antioxidante depende também da interação com outros componentes e condições ambientais (ALVES,2010). Embora os estudos *in vitro* revelem a efetividade de compostos como antioxidantes e indiquem os mecanismo responsáveis por essa ação, estudo *in vivo* revelam a efetividade do sistema biológico.

O Brasil é conhecido pela sua diversidade com grande potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos derivados da flora nativa. O cajuí (*Anacardium microcarpum*- Duke) apresenta uma série de propriedades biológicas e constituintes, como os compostos fenólicos, capazes de atuar no sistema biológico como antioxidantes. Além de antioxidante, o *A. microcarpum* mostrou ter atividade neuroprotetora sendo útil no tratamento

de doenças neurodegenerativas como a Doenças de Parkinson. Desta forma, nosso estudo contribui para o melhor conhecimento biológico de potenciais substâncias terapêuticas encontradas abundantemente na flora brasileira.

8.CONCLUSÃO

- Este estudo demonstra de forma inédita a baixa toxicidade *in vivo* do extrato e das fração acetato e metanol do cajuizeiro, além de não apresentar efeito citotóxico para as células nas duas metodologias utilizadas.
- A espécie *Anacardium microcarpum* mostrou seu potencial neuroprotetor em um clássico modelo de parkinsonismo em *D. melanogaster* mostrando proteger contra o dano oxidativo e locomotor causado pelo herbicida.
- A atividade antioxidante *in vitro* foi demonstrada através do método redução de ferro e pelo método de radical ABTS, mostrando também que há diferenças no potencial antioxidante de acordo com o solvente da fração e do extrato.
- A quantidade dos compostos fenólicos variou de acordo com a composição do solvente da fração e de acordo com o extrato, tendo relação direta com o potencial antioxidante.
- A atividade antioxidante *in vitro* foi demonstrada, variando de acordo com de acordo com o solvente da fração e do extrato. Entretanto, foram encontrados resultados divergentes do que os encontrados *in vivo*, sugerindo que além da composição da planta, outros fatores biológicos estão envolvidos na atividade antioxidante.
- As enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST e AchE tiveram um aumento na sua atividade enzimática com a suplementação do extrato e das frações aumentando a proteção antioxidante do organismo.
- A ação antioxidante *in vivo* e *in vitro* da planta ressalta o potencial biológico do cajuizeiro como um potencial agente terapêutico em modelos de doenças neurodegenerativas, aliado a sua baixa toxicidade.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Renata Viana. **Efeito promnésico e antioxidante do café no sistema nervoso central de ratos**. Belo Horizonte, 2009.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105, 121–126, 1984.

ALI, M. M.; CROZIER, A. **Reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS) analysis of phenolics in selected Malaysian traditional vegetables and their total antioxidant activities**. Life Sciences, 2007.

ALVES, Clayton et al. **Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds**. Química Nova vol.33 no.10, 2010.

ANDRADE, Renata Araújo Milanez de Sena. **Fitoquímicos bioativos e potencial antioxidante do resíduo agroindustrial do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.)**. Recife, 2013.

ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; POURRAT, A.; LEGRET, P. **Standardization of propolis extract and identification of principal constituents**. Journal de pharmacie de Belgique, 1994.

AZEVEDO, Rhuanna Rackel de Sá et al. Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chá. **Revista Semente**, pp. 240-249, 2011.

BALTRUŠAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYT, V. **Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts**. Food Chemistry, 2007.

BAPTISTA, Sérgio Manuel Pratas. **Avaliação da resposta ao stresse oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco transformadas e não transformadas**. Lisboa, 2009.

BARROS, Levi de Moura. **Caju produção: aspectos técnicos**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.

BARREIROS, André et al. **Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense.** Química Nova vol.29 no.1, 2006.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.** Analytical biochemistry, 1996.

BERGAMASCHI, Keityane Boone. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento.** Piracicaba, 2010.

BERRY, C.; VECCHIA, C. La; NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. Cell Death and Differentiation, 2010.

BERTOLDI, Michele Correa. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa *Schinus terebinthifolius raddi*.** Viçosa, 2006.

BEZERRA, Denise Aline Casimiro. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.** Patos, 2008.
Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry, 1976.

BROINIZI, Priscila Regina Bolelli et al. **Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados em ratos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Vol.44, no.4, 2008.

CAPITELLI, Caroline Santos. **Efeito da melatonina em modelo animal de parkinsonismo induzido pelo MPTP.** Curitiba, 2007.

CARBONARI, Karina Azambuja. **Avaliação do potencial antioxidante (*in vitro* e *in vivo*) e antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *marlierea obscura*.** Florianópolis, 2005.

CARVALHO, Luciana Silva de. **Alterações clínicas e histológicas decorrentes de neurointoxicação por plantas medicinais.** Goiânia, 2011.

CARVALHO, Ana Laura Nicoletti. **Efeitos dos ácidos anacardicos no sistema respiratório de camundongos submetidos a instilação intranasal de partículas resultantes da combustão diesel.** São Paulo, 2011.

CAVALEIRO, Eliana Marisa dos Santos. **Cloning and expression of a putative collagenase from *Aeromonas hydrophila*.** Aveiro, 2008.

CEFALI, Letícia Caramori. **Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo.** Araraquara, 2009.

CERQUEIRA, Fernanda Menezes et al . **Dietetic antioxidants: controversies and perspectives.** Química Nova, Vol. 30, no. 2, p. 441-449, 2007.

CHAVES, Mariana H. et al. **Total phenolics, antioxidant activity and chemical constituents from extracts of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae.** Rev. bras. farmacogn. vol.20 no.1, 2010.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; Rossim, C.; SALGADO, H.R.N. **Ensaio biológico para avaliação de segurança de produtos cosméticos.** Rev Ciênc Farm Básica Apl.,2009.

CINTRA, Renata M. G.; MANCINI-FILHO, Jorge. **Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo.** Nutrire, vol.22, 2001.

CORASANITI, Maria Tiziana; STRONGOLI, Maria Concetta; ROTIROTI, Domenicantonio; BAGETTA, Giacinto; NISTICÒ, Giuseppe. **Paraquat: A Useful Tool for the *in vivo* Study of Mechanisms of Neuronal Cell Death.** Pharmacology and Toxicology, 1998

CORREIA, Suzimone de Jesus et al. **Metabolitos Secundários de espécies de Anacardiaceae.** Química Nova, Vol.29, no.6, 2006.

COULOM, Helene; BIRMAN, Serge. **Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*.** J Neurosci. 2004.

CUNHA, Cláudia Maria da. **Ação do Radical Hidroxilo na Resposta Celular do Cancro da Próstata.** Coimbra, 2013.

FAKIM, Ameenah Gurib. **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. Molecular Aspects of Medicine, 2006.

FAZALI, F. et al. **Phytochemical Screening, *In vitro* and *In vivo* Antioxidant Activities of Aqueous Extract of *Anacardium occidentale* Linn. and its Effects on Endogenous Antioxidant Enzymes in Hypercholesterolemic Induced Rabbits**. Research Journal of Biological Sciences, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.43 n.1, 1997.

FRANCO, J. F.; POSSER, T.; DUNKLEY, P. R.; DICKSON, P. W.; MATTOS, J.J.; MARTINS, R.; BAINY, A. C. D.; MARQUES, M.R.; DAFRE, A. L.; FARINA, M. **Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase**. Free Radical Biology and Medicine, 2009.

FROTA JUNIOR, Mario Luiz Conte da. **Ação extra nuclear do ácido retinóico via espécies reativas de oxigênio em células de Sertoli**. Porto Alegre, 2005.

GIADA, Maria de Lourdes Reis; MANCINI FILHO, Jorge. **Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana**. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, 2006.

GONÇALVES, J.L.S et al. ***In vitro* anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea**. Journal of Ethnopharmacology, 2005.

HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. **Assays for differentiation of glutathione S transferases**. Methods Enzymol., 1981.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. **The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat**. Neurochemical research, 2010.

KIM, Hoon et al. **Continuous hypoxia attenuates paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line**. Experimental and Molecular Medicine, 2011.

KOSTYUK, V.A.; POTAPOVICH,A.I. **Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase.** Biochemistry international, 1989.

LUNARDI, Fabiane. **Validação da mensuração da explosão respiratória em granulócitos humanos normais e leucêmicos induzida por zymosan e éster de forbol pela técnica de citometria de fluxo.** Florianópolis, 2004.

MARQUES, Graziella Silvestre et al. **Evaluation of procedure for spectrophotometric quantification of total flavonoids in leaves of *Bauhinia forficata* Link.** Química Nova vol.35 no.3, 2012.

MARTINS, Matheus Eduardo. **Aplicação de bioensaios de toxicidade para avaliação a eficiência do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) na destoxificação do aldicarbe.** São Carlos, 2008.

MIORELLI, Simone Teresinha. **Efeitos biológicos do composto organoselenado Ebselen em células eucarióticas.** Canoas, 2006.

MONTEIRO, Inês Jales Sousa. **Doença de parkinson as suas bases bioquímicas.** Instituto Superior de Ciências da Saúde do Norte, 2007.

MORAIS, Selene de et al. **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 2009.

MUÑOZ-SORIANO, Verónica; PARICIO, Nuria. **Drosophila Models of Parkinson's Disease: Discovering Relevant Pathways and Novel Therapeutic Strategies.** Parkinson's Disease, 2011.

NOGUEIRA, R.C.; CERQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. **Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience.** Expert Opinion Ther, 2010.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** Anal. Biochem., 1979.

OLIVEIRA, Alane Cabral de et al. **Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes.** Química Nova, v. 32, n. 3, 2009.

OLIVEIRA e SILVA, Ana Mara de. **Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos.** São Paulo, 2012.

ORTEGA- RELLANO, H. F.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. **Life span and locomotor activity modification by glucose and polyphenols in *Drosophila melanogaster* chronically exposed to oxidative stress-stimuli: implications in Parkinson's disease.** Neurochemical research, 2011.

PANIZ, Clóvis. **Avaliação do estado micronutricional e de estresse oxidativo em idosos.** Santa Maria, 2007.

PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria das Graças. **Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits.** J. Biotec. Biodivers. v. 3, N.4, 2012.

PÉREZ-SEVERIANO, F.; RODRIGUEZ-PÉREZ, M.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MALDONADO, P.D.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; ORTIZ-PLATA, A.; SANCHEZ-GARCIA, A.; VILLEDA-HERNANDEZ, J.; ALVAN-ARZATE,S.; AGUILERA,P.; SANTAMERIA,A. **S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats.** Neurochem Int, 2004.

PONZONI, Silvia; GARCIA-CAIRASCO, Noberto. **Neurobiology of parkinsonism: II. experimental models.** Arq. Neuro-Psiquiatr. vol.53 no.3b, 1995

RAMOS, L.F.P. **Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vivo* de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxi dopamina.** Pará, 2012.

ROCHA, Sousa et al. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de genética. **Scire Salutis**, v.3, n.1, 2012.

ROQUE, Paulo. **Mosca da fruta, Drosófila.** Desicosmo- Departamento de Investigação, Concepção e Desenvolvimento, 2010.

RUFINO¹, Maria do Socorro Moura et al. **Suporte tecnológico para a exploração racional do cajuzeiro.** Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

RUFINO², Maria do Socorro Moura et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+.** Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

RUFINO, Maria do Socorro Moura et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.

RUFINO, Maria do Socorro Moura. **Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium spp.*) oriundos da vegetação litorânea do Piauí**. Piauí, 2004.

RUFINO, Maria do Socorro Moura et al. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil**. Food Chemistry, 2010.

SANTOS, Ana et al. **Aspetos gerais da intoxicação por paraquat em animais domésticos**. Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária, 2012.

SCHMITT, Gabriela Cristina et al. **Aspectos gerais e diagnóstico clínico laboratorial da intoxicação por paraquat**. J Bras Patol Med Lab, v. 42, n. 4, p. 235-243, 2006.

SILVEIRA, Leonardo R. **Critical and methodological analyses on the determination of reactive species in skeletal muscle cells during contractions**. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. vol.48 no.6, 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent**. Methods in Enzymology, 1999.

SOARES, Jefferson de Jesus. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. Uruguaiana, 2013.

SOARES, Thaise Sibelli. **Estudos Fitoquímicos e Biológicos de *Melaleuca alternifolia***. Florianópolis, 2006.

ROCHA, Luana Diniz Linhares e Souza et al. ***Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de genética**. Scire Salutis, v.3, n.1, 2013.

TEIXEIRA, Jessica Pedroso. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura**. São Paulo, 2012.

TIVERON, Ana Paula. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Piracicaba, 2010.

VALADARES, Marize Campos; CASTRO, Núbia Cristiana de; CUNHA, Luiz Carlos da. ***Synadenium umbellatum*: cytotoxicity and DNA damage to bone marrow cells from mice.** Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.43 no.4, 2007

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, Vol. 30, No. 5, 2007.

VICENTINO, Amanda; MENEZES, Fábio de Sousa. **Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.17, no.3, 2007.

VIEIRA, Luanne Morais et al. **Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais.** Rev. Bras. Frutic., 2011.

VIZZOTTO, Márcia; PEREIRA, Marina Couto. **Blackberry (*Rubus* sp.): extraction process optimization and determination of phenolic compounds antioxidants.** Rev. Bras. Frutic. vol.33 no.3, 2011.

VIZZOTTO, Márcia et al. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância.** Embrapa clima temperado, 2010.