



Universidade Federal do Pampa

Campus São Gabriel

Bacharelado em Biotecnologia

ILLANA KEMMERICH MARTINS

**NEUROPROTEÇÃO PROVIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES
DE *Anacardium microcarpum*–Duke CONTRA O DANO INDUZIDO PELO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FATIAS CORTICAIS DE *Gallus gallus***

São Gabriel

2014

ILLANA KEMMERICH MARTINS

**NEUROPROTEÇÃO PROVIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES
DE *Anacardium microcarpum*–Duke CONTRA O DANO INDUZIDO PELO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FATIAS CORTICAIS DE *Gallus gallus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no *campus* de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Professora Dra. Thaís Posser

Co-orientadora: Professora Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé

São Gabriel

2014

ILLANA KEMMERICH MARTINS

**NEUROPROTEÇÃO PROVIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES
DE *Anacardium microcarpum*–Duke CONTRA O DANO INDUZIDO PELO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FATIAS CORTICAIS DE *Gallus gallus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no
campus de São Gabriel da Universidade Federal do
Pampa, como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 28 de março de 2014.

Banca Examinadora:

Dra. Thaís Posser
Orientadora
UNIPAMPA

Dr. Jeferson Luis Franco
UNIPAMPA

Msc. Ana Paula Zemolin
UNIPAMPA

Dedico este trabalho à minha família, que mesmo longe sempre se fez presente. Mãe e Pai, obrigada por sempre acreditarem na minha capacidade. Essa caminhada não seria a mesma sem vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo fim de mais esta etapa, por sempre iluminar e guiar meu caminho.

À minha família pelo apoio, incentivo, amor, carinho, mesmo estando longe.

À minha orientadora Professora Thaís Posser, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela confiança na minha capacidade.

À minha co-orientadora, Professora Lúcia Vinadé, pela amizade, pela ajuda na confecção deste trabalho, pelos ensinamentos em fatias cerebrais.

As minhas colegas e amigas Evelise Carvalho e Rafaela Nasi, pelos momentos de amizade, de conversas, de estudos. Essa caminhada não seria a mesma sem a alegria de vocês!

As minhas amigas e colegas de laboratório Ana Paula Lucho, Ana Paula Zemolin, Ana Paula Perin, Marinês Heberle pela amizade, ensinamentos, companhia ao longo desse estudo.

À FAPERGS pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Todo homem, por natureza, deseja saber. (Aristóteles)

RESUMO

Estudos relacionados à investigação de propriedades biológicas de espécies vegetais têm contribuído para o combate de diversas patologias, através da obtenção de princípios ativos que apresentam propriedades farmacológicas e biotecnológicas. O estresse oxidativo causado pela aumentada produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, entre estes o H_2O_2 está envolvido em diversas doenças neurodegenerativas que tem impulsionado a busca por terapias antioxidantes. Plantas superiores apresentam altas concentrações de compostos com potencial antioxidante em sua composição, podendo apresentar metabólitos com importante potencial do ponto de vista biotecnológico. O objetivo do estudo foi avaliar a neuroproteção dos extratos Hidroalcoólico (EHAM), Metanólico (EMAM) e Acetato de Etila (EAAM) contra o dano oxidativo causado pelo H_2O_2 em fatias corticais de pintainhos, como os mecanismos envolvidos no insulto deste e a possível participação das MAPK nos mecanismos de ação. Para este estudo, utilizou-se microfatias corticais obtidas de pintainho (*Gallus gallus*) com idade entre 5 – 15 dias. As fatias de 3 mm de diâmetro foram incubadas por 1h em tampão HEPES-salina oxigenado na presença de H_2O_2 e/ou frações do extrato nas concentrações de 1-1000 $\mu\text{g/mL}$ de *A. microcarpum*. Após os tratamentos, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico MTT. A fração metanólica do extrato foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, onde foi realizado ensaio de peroxidação lipídica (TBARS), tióis totais (GSH, PSH) e análise de *Western Blot*. Os resultados mostraram que a co-incubação de H_2O_2 na presença de EMAM e EHAM protegeu totalmente contra a queda na viabilidade causada pelo H_2O_2 nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ de extrato respectivamente. O tratamento não causou alteração nas concentrações de tióis proteicos e não proteicos. O EMAM reverteu a peroxidação lipídica induzida por H_2O_2 a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Neste estudo também foi avaliada a participação de MAPK, ERK1/2 e morte celular apoptótica. A fosforilação da ERK foi estimulada quando as fatias foram incubadas com H_2O_2 , este efeito não foi alterado pelo extrato. Para sabermos o mecanismo que está atuando na fosforilação da ERK, se faz necessário outros ensaios. Mais estudos serão conduzidos para aprofundar os

mecanismos de neurotoxicidade e proteção bem como identificação de constituinte presente nesta espécie.

Palavras - chave: *A. microcarpum*, neuroproteção, MAPK, fatias corticais.

ABSTRACT

Studies focused on biological properties of different species of plants have shown some properties that help on treatment of several diseases, by obtaining active ingredients that have pharmacological and biotechnological properties. Oxidative stress is characterized by an increased production of reactive oxygen and nitrogen species, among them H_2O_2 which are involved in several neurodegenerative diseases. This fact has motivated the search for antioxidants therapies. Superior plants show high concentrations of many compounds with antioxidants potential in your composition. They also possess metabolites with a significant biotechnological potential. The goal of this study was to evaluate a possible neuroprotection provide by *A. microcarpum* hidroalcoholic extract (EHAM), *A. microcarpum* methanolic extract (EMAM) and *A. microcarpum* ethil acetate extract (EAAM) against oxidative stress induced by H_2O_2 in brain slices of little chicks (*Gallus gallus*), as well as the biochemical mechanisms involved in this effect. For this purpose, we used cortical micro slices obtained from little chicks (*Gallus gallus*) aging 5 – 15 days. The slices were incubated for 1 hour in oxygenated buffer HEPES-saline with or without H_2O_2 and different *A. microcarpum* fractions concentration (1-1000 $\mu\text{g/mL}$). After treatments, cellular viability was evaluated by the colorimetric method of MTT. Methanolic fraction showed better neuroprotective effect with relation to other two extracts and was used for further assays: lipid peroxidation (TBARS), total thiols (protein and non protein thiols) and ERK phosphorylation by Western Blot. Our results showed that EMAM and EHAM protected against cellular damage caused by H_2O_2 on 10 $\mu\text{g/mL}$ and 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The treatments didn't cause any alteration on proteics and non proteics thiols. EMAM reversed to control levels the lipidic peroxidation induced by H_2O_2 from 100 $\mu\text{g/mL}$. MAPK involvement in this effect was also evaluated. ERK phosphorylation was stimulated when the slices were incubated with H_2O_2 , and this effect wasn't altered by the extract. Further experiments are necessary to understand the mechanism by which extracts provide neuroprotection.

Key-words: *A. microcarpum*, neuroprotection, MAPK, brain slices.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Plantas Medicinais	11
1.2 Gênero Anacardium	12
1.4 Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) e Doenças Neurodegenerativas	13
1.6 MAPKs	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	16
4. METODOLOGIA	16
4.1 Animais	16
4.2 Obtenção dos Extratos	17
4.3 Preparação e tratamento das fatias corticais	17
4.4 Viabilidade celular das fatias corticais	18
4.5 Peroxidação lipídica	18
4.7 Western Blot	19
4.7.1 Separação de proteínas das fatias corticais	19
4.7.2 Eletrotransferência e Imunodeteção	20
4.8 Quantificação de Proteínas	21
4.9 Análise Estatística	21
5. RESULTADOS	21
5.1 Avaliação da Neurotoxicidade e Neuroproteção de <i>A. microcarpum</i>	21
5.1.2 Tratamento com Extrato Hidroalcoólico de <i>A. microcarpum</i> (EHAM)	22
5.1.3 Tratamento com Extrato Metanólico de <i>A. microcarpum</i> (EMAM)	23
5.1.4 Tratamento com Extrato Acetato de Etila de <i>A. microcarpum</i> (EAAM)	24
5.2 Peroxidação Lipídica	25
5.3 Tióis Protéicos e não Protéicos	26
5.4 Modulação de MAPKs através do tratamento com H ₂ O ₂ e EMAM	27
6. DISCUSSÃO	29
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

O Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo abrigando aproximadamente 22% da biodiversidade vegetal do planeta, em grande parte concentrada na Floresta Amazônica e no que resta da Mata Atlântica, somando mais de 55.000 espécies. O uso de plantas no tratamento das doenças apresenta influências da cultura indígena, africana e européia e, essas influências, constituem a base da medicina popular que proporciona valiosas informações quanto às propriedades e indicações das plantas medicinais brasileiras (SIMÕES *et al.*, 2003).

A região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema, com predominância de Caatinga, uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas. Esta região é considerada uma das mais ricas fontes de material com potencial farmacológico existentes, devido à diversidade das espécies e aos conhecimentos oriundos da medicina tradicional integrante das culturas indígena, negra e européia (BRANDÃO *et al.*, 2004).

Atualmente, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. As plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população, em parte associado alto custo de medicamentos e o difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica. Mas apesar das ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes oriundos do metabolismo vegetal podem ser tóxicos ao organismo.

Com base nessas informações, as plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Esses produtos apresentam uma diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (PINTO *et al.*, 2002). Apesar do grande número de pesquisas

nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SIMÕES *et al.*, 2003).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 44% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna. (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

1.2 Gênero *Anacardium*

O Cajuzeiro é uma espécie da família Anacardiaceae nativa do Brasil, dispersa na Amazônia, no Nordeste, Goiás, Mato Grosso e Guianas e que habita na mata alta de terra firme ou de várzea, sendo raramente cultivada. No trabalho de MITCHEL e MORI (1987), esta espécie foi agrupada, pela taxonomia numérica, como variabilidade da espécie cultivada, *Anacardium occidentale* L. A casca do caule de *A. microcarpum* é utilizada na medicina popular brasileira como um tônico para o tratamento de inflamação, reumatismo, doenças tumorais e infecciosas, em que os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas em sua etiologia (BARBOSA FILHO *et al.*, 2014).

O consumo de frutas em geral tem aumentado principalmente em decorrência do seu valor nutritivo. Estes alimentos contêm diferentes fitoquímicos, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes que podem estar relacionadas com o retardo do envelhecimento e a prevenção de certas doenças (LIMA *et al.*, 2002). Os frutos do gênero *Anacardium* são ricos em vitamina C e o suco de cajuí apresenta teores consideráveis de açúcares, fenólicos e minerais, destacando-se entre eles cálcio, ferro e fósforo (RUFINO *et al.*, 2007).

Recentemente foram descritos alguns compostos da planta *A. microcarpum*, como ácido gálico, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido elágico, catequina, epicatequina, quercetina, isoquercitrina, quecitrina, rutina, dentre outros (BARBOSA FILHO *et al.*, 2014).

Dentre os compostos descritos para esta espécie, nos últimos anos foi descoberta uma série de atividades biológicas para os ácidos anacárdicos; além de

atividade antitumoral, destaca-se a habilidade em inibir as enzimas tirosinase (KUBO *et al.*, 1994), prostaglandina sintase e lipooxigenase (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001). Estes ácidos também são conhecidos por suas atividades antiacne (KUBO *et al.*, 1994), antibacteriana (KUBO *et al.*, 1993), moluscocida (SULLIVAN *et al.*, 1982) e antifúngica (PRITHIVIRAJ *et al.*, 1997).

1.4 Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) e Doenças Neurodegenerativas

As espécies reativas a oxigênio (EROs) são formadas e degradadas pelo metabolismo natural da célula mantendo os níveis fisiológicos necessários para a sobrevivência da mesma, atuando em sistemas de sinalização celular e nos sistemas redox. Porém uma geração excessiva de EROs implicando no aumento de radicais livres, pode ocasionar em um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, caracterizando o estresse oxidativo (VALENCIA *et al.*, 2004).

Dentre as EROs, estão incluídas: radical superóxido ($O^{\circ-}$), radical hidroxila (OH°) e o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEITE *et al.*, 2003). O H_2O_2 não é um radical livre, mas é um metabólito de oxigênio extremamente deletério, pois participa como intermediário na reação que produz o radical OH° . É produzido pelo metabolismo normal da célula e através da degradação catalítica de neurotransmissores, como a dopamina. Possui vida longa e se mostra capaz de atravessar membranas biológicas, assim, causando danos celulares. Quando produzido, só poderá ser removido através de um dos três sistemas antioxidantes: catalase, glutatona peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres e é chamado de estresse oxidativo, podendo causar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos e outras substâncias oxidáveis (LEITE & SARNI, 2003). Por sua vez, este desequilíbrio está associado a muitos fenômenos fisiológicos, patológicos e a processos adversos como inflamação, envelhecimento, carcinogênese entre outros (DEAN *et al.*, 1997). O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, tem sido associado a

uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo como diversas doenças neurodegenerativas entre estas, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (ALEXI *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2000).

Os antioxidantes podem ser tanto enzimáticos, como catalase, glutathione peroxidase, peroxirredutases e não enzimáticos, tais como α -tocoferóis, β -caroteno, ascorbato e os compostos fenólicos são definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis (HALIWELL, 2001; SOUSA *et al.*, 2007).

Sabendo que as plantas têm um grande potencial antioxidante, a obtenção de princípios ativos que apresentem propriedades farmacológicas e biotecnológicas se torna necessário para desenvolver novas terapias que auxiliem no tratamento de doenças causadas pelo excesso de radicais livres, como as doenças neurodegenerativas. Doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela perda de células neuronais específicas, deteriorando progressivamente e irreversivelmente o SNC e podem ter efeitos devastadores sobre o funcionamento mental e físico. O surgimento dos sintomas dessas doenças costuma ser tardio, como na Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (LI, *et al.*, 2013).

Ainda são desconhecidos os fatores envolvidos no processo das doenças neurodegenerativas, mas sabe-se que dentre estes fatores incluem-se a produção de EROs e estresse oxidativo (MCCUBREY, *et al.*, 2006).

1.6 MAPKs

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são compostas por proteínas serina-treonina cinases, que medeiam a sinalização intracelular e estão associadas na diferenciação celular, proliferação, sobrevivência, transformação e morte celular (MCCUBREY *et al.*, 2006). A resposta celular a estímulos depende de redes integradas de sinalização celular, que funcionam de uma maneira coordenada.

O controle dessa rede de sinalização se dá através de proteínas quinases e fosfatases (WONG e SCOTT, 2004).

A família das MAPKs inclui proteínas cinases regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e proteínas cinases ativadas pelo estresse (SAPKs), JNK1/2 e p38^{MAPK} (CHANG; KARIN, 2001; CHEN, *et al.*, 2001). A sinalização da proteína cinase regulada por sinal extracelular - ERK1/2, durante a injúria oxidativa neuronal está envolvida em diversas condições neuropatológicas, como isquemia, trauma cerebral e doenças neurodegenerativas (CHU, *et al.*, 2007). A ativação da ERK1/2 ocorre através de diversas condições do estresse oxidativo *in vitro* e o bloqueio da ativação exerce efeitos protetores em linhagens celulares e neurônios submetidos ao insulto oxidativo (PARK, *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o estresse oxidativo está envolvido nos mecanismos de diversas doenças neurodegenerativas, se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias antioxidantes para tais patologias. Sabe-se que *A. microcarpum* tem altas concentrações de antioxidantes, como descrito por BARBOSA FILHO, *et al.*, 2014. Portanto estudos que avaliem efeitos antioxidantes e neuroprotetores desta planta bem como sua toxicidade, são importantes para validar o uso popular desta planta e seu potencial biotecnológico na produção de novos fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial neurotóxico e neuroprotetor das diferentes frações de *A. microcarpum* em fatias corticais submetidas a estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ e possíveis mecanismos bioquímicos que medeiam seu efeito protetor.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a neurotoxicidade das frações liofilizadas do extrato de *A. microcarpum* pela análise da viabilidade de fatias corticais de pintainhos *Gallus gallus*;
- Avaliar a possível neuroproteção das frações liofilizadas do extrato de *A. microcarpum* pela análise da viabilidade de fatias corticais de pintainhos *Gallus gallus* submetidos ao dano oxidativo agudo por H₂O₂ bem como selecionar a fração mais efetiva para estudos subsequentes;
- Avaliar se houve indução da peroxidação lipídica pelo tratamento com H₂O₂ possível proteção por co-tratamento com *A. microcarpum*;
- Avaliar o estado redox das fatias corticais após serem submetidas a tratamento com H₂O₂ e/ou *A. microcarpum* através da concentração de tióis.
- Avaliar a modulação de MAPK ERK1/2 pelo tratamento com H₂O₂ e/ou *A. microcarpum*;

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

No presente estudo foram utilizados pintainhos da espécie *Gallus gallus* com idade entre 5 - 15 dias, mantidos no Biotério da Universidade Federal do Pampa, a uma temperatura entre 22 ° C e 25 ° C e comida *ad libitum*. Todos os ensaios foram

realizados com a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais – CEUA/UNIPAMPA, sob o protocolo nº 011/2012.

4.2 Obtenção dos Extratos

As cascas do caule de *A. microcarpum* foram coletadas de Barrero Grande, Crato-Ceará (7 ° 22 'S, 39 ° 28' W; 892 m do nível do mar), Brasil, em novembro de 2011. O material vegetal foi identificado pela Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva do Herbário Caririense Dárdano de Andrade - Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA) e uma exsicata foi depositada nesta mesma universidade sob número 6702.

Para a obtenção das frações do extrato de *A. microcarpum*, as cascas frescas foram maceradas com 99,9% de etanol e água (1:1, v / v) e deixadas descansar durante três dias. Após, a suspensão foi filtrada, o solvente evaporado sob pressão reduzida e liofilizadas para se obter 490 g de extrato hidroalcoólico (fração EHAM). Cento e cinquenta gramas (150 g) deste foram utilizadas para extração com acetato de etila (EAAM) e metanol (EMAM) para se obter 12,5 g e 105,23 g respectivamente. Todas as frações foram armazenadas no congelador e diluídas em água antes dos experimentos.

4.3 Preparação e tratamento das fatias corticais

Para a preparação de fatias corticais, os animais foram mortos por decapitação, em seguida os cérebros foram retirados a 4 ° C e os córtices dissecados e fatiados na espessura de 400 µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain (CORDOVA et al, 2004). As fatias foram sempre mantidas em *cutting solution* (110 mM sacarose, 60 mM de NaCl, KCl 3 mM, 0,5 mM CaCl₂, MgSO₄ 7 mM, glicose 5 mM, 25 mM HEPES pH 7,4). O diâmetro das fatias foi padronizado utilizando *punch* de 3 mm.

As fatias corticais foram pré-incubadas individualmente em placa de Elisa durante 30 min em tampão HEPES-salina (124mM NaCl , 4mM KCl, 1.2mM MgSO₄ , 12mM glicose , 1mM CaCl₂ e 25 mM de HEPES pH 7,4) previamente oxigenado durante 30 min (200 µL / fatia).

Após o pré-tratamento, o tampão foi substituído por tampão fresco com ou sem H₂O₂ (2 mM – a partir de curva de concentração) na ausência ou presença de solução das frações Hidroalcoólica, Metanólica e Acetato de *A. microcarpum* (0,1 – 1 mg) e incubadas por 1 hora à 37 ° C.

4.4 Viabilidade celular das fatias corticais

O ensaio de viabilidade celular foi realizado logo após os tratamentos das fatias corticais, incubados por 30 minutos a 37 ° C com MTT (0,05% em HEPES-salina) (CORDOVA et al., 2004). O MTT, 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio é convertido em formazan púrpura após a clivagem do anel tetrazólico por desidrogenases mitocondriais. O formazan foi dissolvido por meio da adição de 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), resultando numa cor púrpura do composto cuja densidade óptica foi medida em leitor de placas ($\lambda = 540$ nm) (Liu et al., 1997).

4.5 Peroxidação lipídica

Os produtos finais da peroxidação lipídica foram determinados nas amostras de tecidos pelo método de OHKAWA et al, (1979) com o ácido tiobarbitúrico como substância reativa (TBARS), sem muitas modificações. Para peroxidação lipídica *in vitro* as fatias foram incubadas a 37 ° C durante 60 minutos com diferentes concentrações do extrato de *A. microcarpum* (0,1 - 1000 mg) na presença ou ausência de H₂O₂ (2 mM). A seguir, quatro fatias por grupo de tratamento foram homogeneizadas em tampão 20mM HEPES (pH 8,0) e incubou-se com 0,45 M ácido acético / HCl buffer pH 3,4, ácido tiobarbitúrico a 0,8 % (TBA), 8,1 % de SDS, e em

seguida a 95 ° C durante 60 minutos para promover a reação de coloração, medido a 532 nm.

4.6 Tióis Protéicos e não protéicos

Neste ensaio, os níveis de glutathiona (GSH) foram dosados como protéicos e não protéicos (ELLMAN, 1959). Após os tratamentos, as fatias corticais foram transferidas para *ependorfs* contendo 200 µL de PCA 0,5 M para cada grupo tratado e homogeneizado com *beads* no equipamento Power Liser durante 30 segundos a 2.000 vibrações. Ao término da homogeneização, foram retiradas as *beads* de cada *ependorf* e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos a uma temperatura de 4 ° C. Após a centrifugação, em uma placa de ELISA foi adicionado 50 µL de amostra do sobrenadante de cada um dos grupos tratados, juntamente com 290 µL de TRIS/HCl (0,5 M, pH 8,0) e 10 µL de DTNB 5mM. Após 15 minutos, a leitura foi realizada em leitor de placas ($\lambda = 412\text{nm}$). Para a determinação de tióis protéicos (PSH), o *pellet* foi homogeneizado em 200 µL de TRIS/ HCl (0,5 M, pH 8,0). Após, foi retirado 10 µL de amostra de cada grupo, adicionadas a 215 µL de TRIS/HCl (0,5 M, pH 8,0) e 10µL de DTNB (5mM). Passados 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, a leitura foi realizada em leitor de placas ($\lambda = 412\text{nm}$).

4.7 Western Blot

4.7.1 Separação de proteínas das fatias corticais

O ensaio foi realizado de acordo com POSSER, 2009. Após os tratamentos, as fatias corticais foram transferidas para *ependofs* e solubilizadas em 100 µL de SDS 4% *Stop Solution* (4% de SDS, 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA, pH 6,8), paralisando qualquer reação que estivesse ocorrendo no momento e a seguir

incubadas por 5 minutos a 90 ° C para completar a solubilização. Após foi retirado de 3 µL de amostra para a dosagem de proteína (PETERSON, 1977) e com o restante foi adicionado 8µL de β-mercaptoetanol (8%) e 25 µL de glicerol (40%).

Para o preparo dos géis foram utilizados sistemas de eletroforese em mini-gel. Após o preparo dos géis de separação 10% (10 mL acrilamida 30%, 7,6 mL TRIS 1,5 M pH 8,8, 0,3mL SDS 10%, 4,5 mL glicerol 50%, 7,6 mL H₂O milli-Q, 110 µL APS 10%, 20µL TEMED) e gel de entrada 4% (2,7 mL acrilamida 30%, 5 mL TRIS 500 mM pH 6,8, 0,2 mL SDS 10%, 12 mL H₂O milli-Q, 10 µL TEMED, 0,2 mL APS 10%) foram preenchidas as placas e a polimerização ocorreu *overnight*.

Para os ensaios de *Western blotting*, a quantificação de proteína foi realizada pelo método de Peterson (1977). Para a separação das proteínas de cada amostra, foi realizado um cálculo de acordo a quantificação de proteínas por Peterson para saber o volume da amostra a ser pipetado do gel. Após o preenchimento dos poços com as amostras, a eletroforese correu durante aproximadamente 2 horas, a uma corrente de 25 mA por placa e uma voltagem de 150 V.

4.7.2 Eletrotransferência e Imunodetecção

Após a eletroforese, foi retirado os resíduos dos géis de entrada e os géis de separação transferidos para uma membrana de nitrocelulose embebida em tampão de transferência (50 mM de Ácido Bórico, 4 mM de EDTA; pH 8,9) a uma corrente de 400 mA e voltagem de 30 V durante 3 horas. Após a eletotransferência, as membranas foram coradas com Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% ácido acético) por 5 minutos, após foi retirado o excesso do corante com TBS-T (Tween 0,05 %, TBS 10% e 900 mL de H₂O destilada) e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado 5% (Molico). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T 3 vezes por 5 minutos cada e posteriormente incubadas *overnight* em câmara fria com anticorpos primários ERK1/2 e PARP1/2. Após as incubações, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com TBS-T e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário *anti-rabbit*. Para a imunodetecção, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T e as

bandas correspondentes as proteínas foram reveladas com kit ECL (quimioluminescência) (CORDOVA *et al*, 2004).

4.8 Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas nas microfatias foi realizada de acordo com o protocolo de Bradford (1976) usando albumina bovina como padrão.

4.9 Análise Estatística

Todas as determinações foram efetuadas em triplicata, o tratamento estatístico dos dados se deu pela análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey, através do *software* Prisma 5.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. O valor de $p < 0,05$ foi considerado, estatisticamente, significativo.

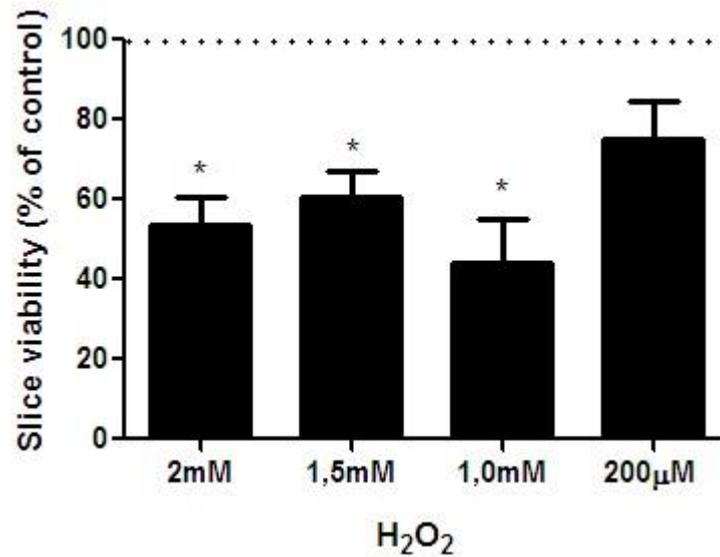
5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da Neurotoxicidade e Neuroproteção de *A. microcarpum*

O modelo de fatias cerebrais foi escolhido devido à grande interação entre as células, e ser considerado um modelo para o estudo de reações bioquímicas que ocorrem no Sistema Nervoso Central (SNC) (CORDOVA *et al.*, 2004).

Anteriormente a realização dos experimentos com o extrato, foi realizada uma curva de concentração do H₂O₂, nas concentrações de 2 mM, 1,5 mM, 1 mM e 200 μ M, na qual foi escolhida a concentração de 2 mM diminuir em 50% a viabilidade das fatias corticais em relação ao controle (Figura 1).

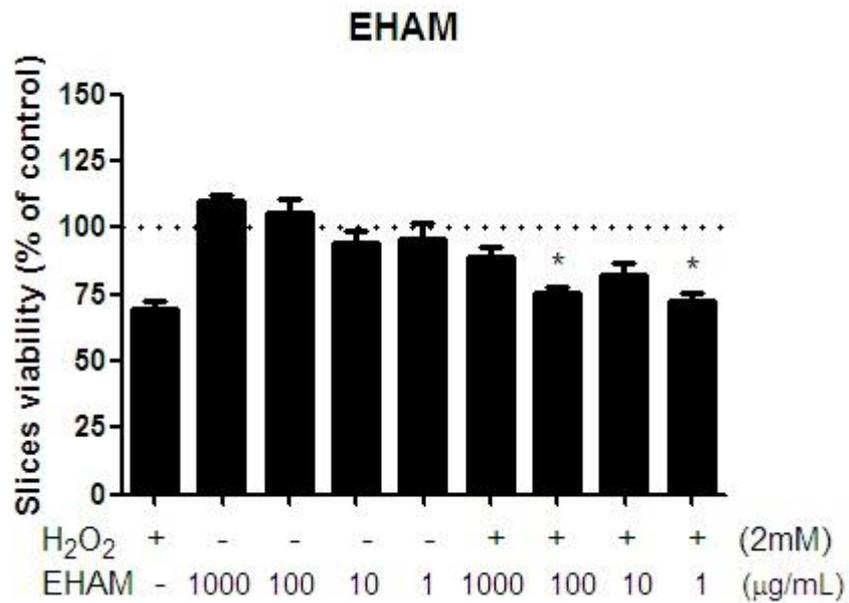
FIGURA 1 – A figura mostra a viabilidade celular das fatias corticais, quando submetidas ao H_2O_2 . O controle está representado pela linha pontilhada.



5.1.2 Tratamento com Extrato Hidroalcoólico de *A. microcarpum* (EHAM)

A incubação das fatias corticais com o H_2O_2 reduziu em aproximadamente 35% a viabilidade celular, enquanto que a incubação somente com o EHAM não afetou a viabilidade das fatias corticais. Quando as fatias foram co-incubadas com EHAM e H_2O_2 , o EHAM na concentração de 1000 µg/mL reverteu totalmente o dano causado pelo H_2O_2 (Figura 2).

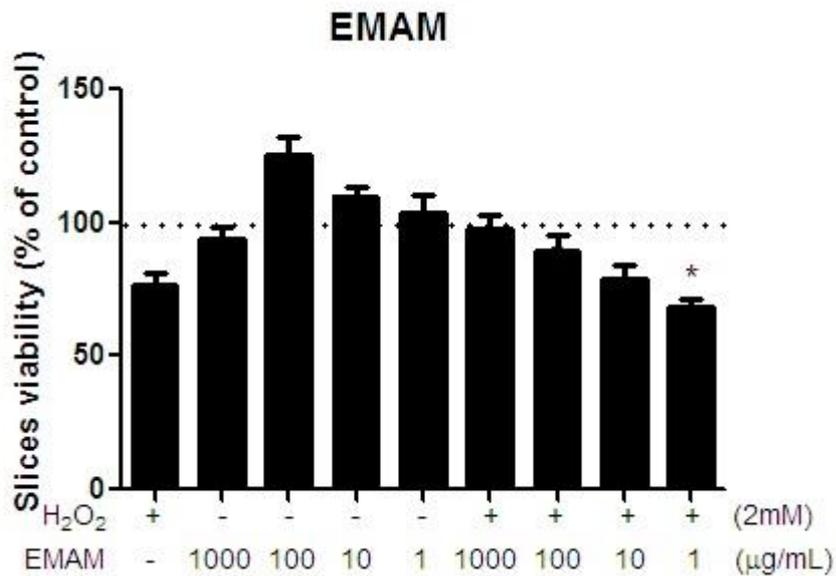
FIGURA 2 – Incubação com EHAM, onde o H_2O_2 reduziu aproximadamente 35% a viabilidade celular das fatias corticais, e a concentração de 1000 µg/mL reverteu totalmente o dano oxidativo causado pelo H_2O_2 . * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. O controle está representado pela linha pontilhada.



5.1.3 Tratamento com Extrato Metanólico de *A. microcarpum* (EMAM)

As fatias quando expostas somente ao H₂O₂, reduziram significativamente (aproximadamente 25%) a viabilidade celular. Com resultados semelhantes ao EHAM, o EMAM também mostrou neuroproteção e reverteu o dano causado pelo H₂O₂ na concentração de 10 µg/mL quando co-incubadas (Figura 3).

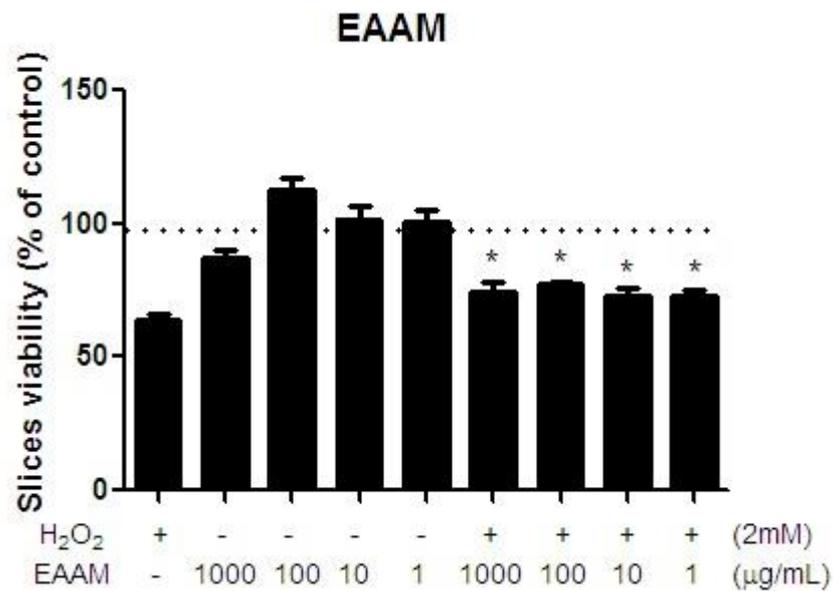
FIGURA 3 - Incubação com EMAM, onde o H₂O₂ reduziu aproximadamente 25% a viabilidade celular das fatias corticais, e a concentração de 1000 µg/mL reverteu totalmente o dano oxidativo causado pelo H₂O₂. O controle está representado pela linha pontilhada.



5.1.4 Tratamento com Extrato Acetato de Etila de *A. microcarpum* (EAAM)

A incubação somente com o H₂O₂ reduziu significativamente (aproximadamente 30%) a viabilidade das fatias corticais, enquanto que a incubação somente com o EAAM não comprometeu a viabilidade das fatias, mantendo em nível de controle ou mais. Porém quando co-incubadas com EAAM e H₂O₂, não foram detectadas neuroproteção (Figura 4).

FIGURA 4 - Incubação com EAAM, onde o H₂O₂ reduziu aproximadamente 30% a viabilidade celular das fatias corticais, e nenhuma das concentrações mostraram neuroproteção e neurotoxicidade contra o H₂O₂. O controle está representado pela linha pontilhada.

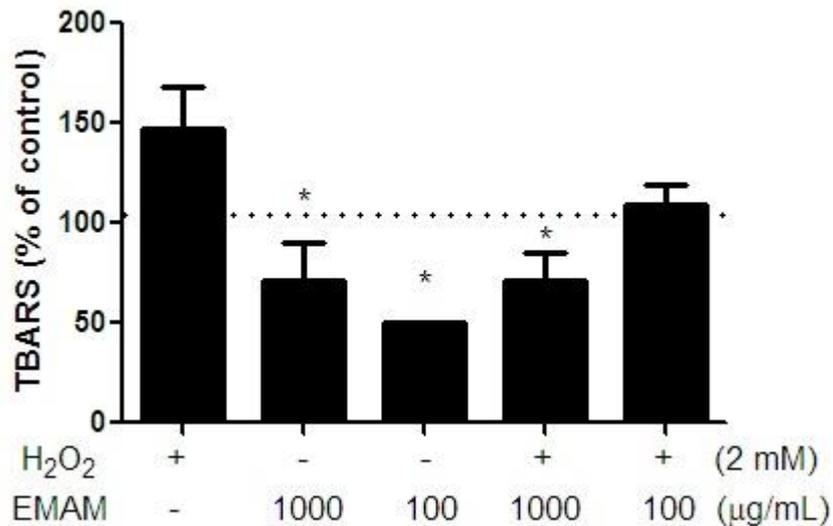


Após os ensaios realizados com as três frações de *A. microcarpum*, os dados foram comparados através de análise de variância (ANOVA) para determinar com qual fração seria dada a continuidade nos experimentos. Foi escolhida a fração Metanólica (EMAM) devido o alto índice de neuroproteção a partir da concentração de 10 μg/mL.

5.2 Peroxidação Lipídica

No estudo, observou-se um aumento de 50% nos níveis de TBARS quando as fatias foram tratadas com H₂O₂ (Figura 5) em relação ao controle. Após análise estatística foi observado também, que a concentração de 100 μg/mL quando co-incubada com H₂O₂ reduziu em aproximadamente 25% a peroxidação lipídica quando em relação ao controle.

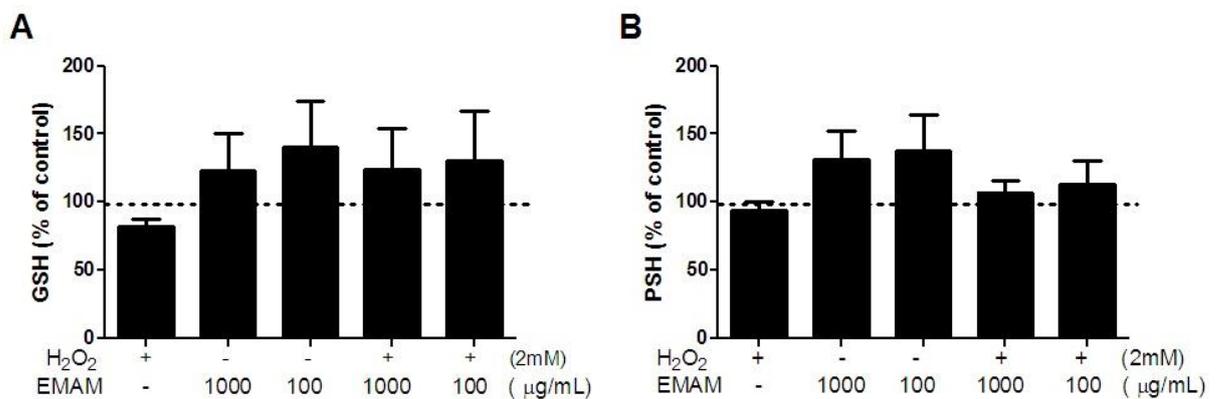
FIGURA 5 – Níveis de peroxidação lipídica em resposta a exposição ao H_2O_2 e o efeito protetor do EMAM na concentração de 1 mg/mL. Quando as fatias são co-incubadas com EMAM e H_2O_2 , há uma redução de aproximadamente 75% nos níveis de peroxidação lipídica em relação a incubação somente com H_2O_2 . O controle está representado pela linha pontilhada.



5.3 Tióis Protéicos e não Protéicos

Ensaio foram realizados para detectar glutathiona intracelular (GSH) e tióis protéicos (PSH), onde foi observada uma diminuição de aproximadamente 20% nos níveis de glutathiona intracelular, quando as fatias foram tratadas somente com H_2O_2 e quando co-incubadas com EMAM e H_2O_2 não causaram diminuição nestes níveis (Figura 6A). No ensaio PSH, foi observado uma pequena diminuição de tióis protéicos quando as fatias foram tratadas com H_2O_2 e um aumento não significativo quando co-incubadas com EMAM e H_2O_2 (Figura 6B).

FIGURA 6 – Níveis totais de Glutathiona (GSH) e tióis protéicos (PSH). (A) Observa-se uma redução de aproximadamente 20% nos níveis de glutathiona intracelular quando as fatias foram tratadas com H_2O_2 e quando co-incubadas com EMAM e H_2O_2 , nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ houve um aumento nesses níveis. (B) Não houve diminuição significativa nos níveis de tióis protéicos quando as fatias foram tratadas com H_2O_2 , tampouco houve aumento nesses níveis quando co-incubadas com EMAM e H_2O_2 . O controle está representado pela linha pontilhada.



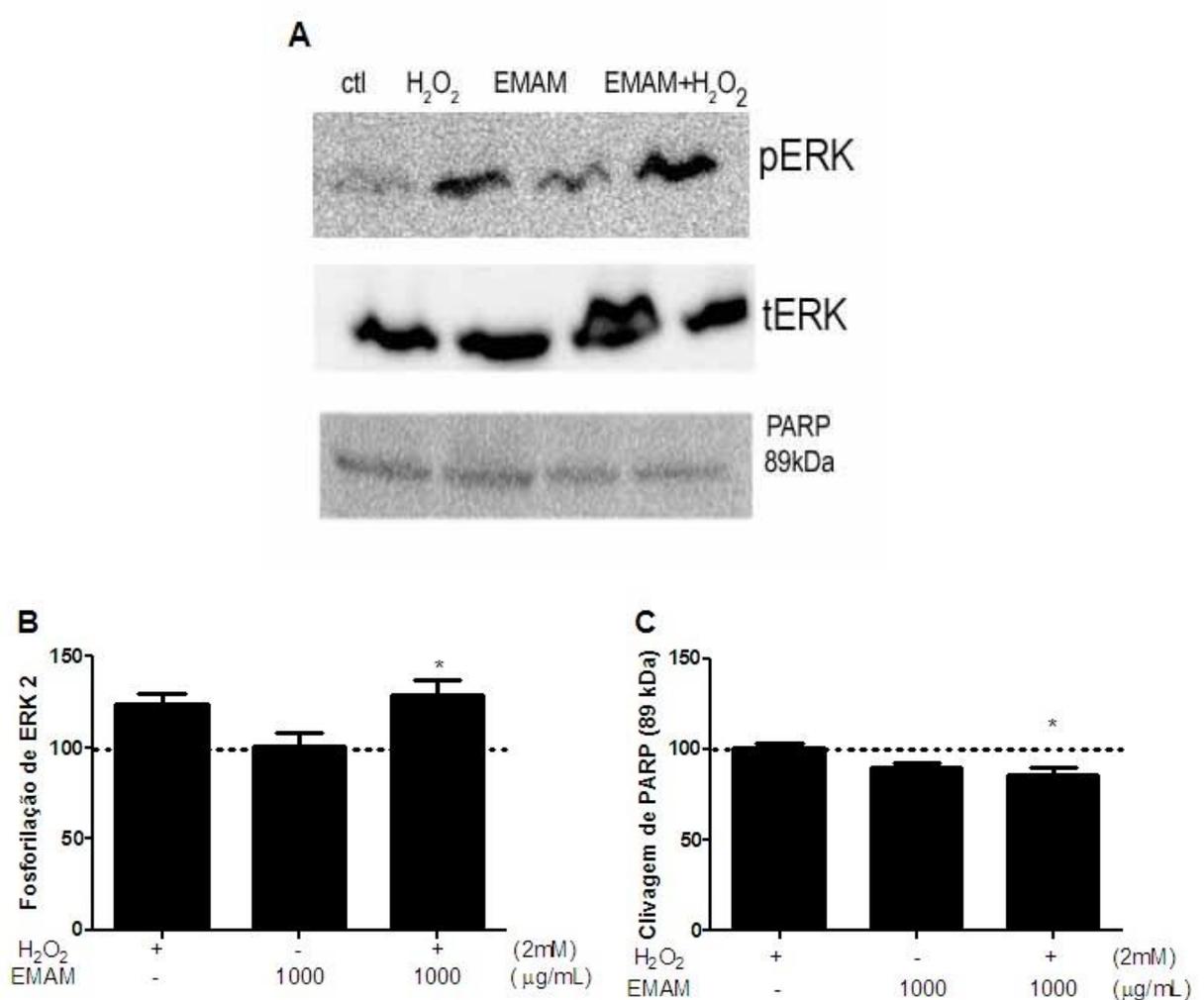
5.4 Modulação de MAPKs através do tratamento com H_2O_2 e EMAM

Baseado na análise das membranas do ensaio de Western Blotting submetidas a dois anticorpos diferentes, ERK1/2 e PARP, constatou-se que a fosforilação da ERK (Figura 7A) foi induzida pelo H_2O_2 e não houve bloqueio na co-incubação com EMAM e H_2O_2 (Figura 7B). Com base desse resultado, fica comprovada que a fosforilação da ERK pode estar envolvida no processo de morte celular das fatias corticais. Para caracterizar se a morte das fatias corticais estava ocorrendo por necrose ou apoptose devido ao insulto pelo H_2O_2 , foi realizada a marcação da proteína PARP-1.

Os resultados mostram que a clivagem da proteína PARP-1 manteve a expressão nas fatias corticais quando incubadas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e quando co-incubadas com EMAM e H_2O_2 (Figura 7A). A Figura 7B, demonstra uma diminuição não significativa da clivagem de PARP-1, podendo afirmar que o EMAM

quando co-incubado com H_2O_2 , não compromete a viabilidade celular das fatias corticais, pois quanto menor a expressão da proteína PARP-1 menor será a morte celular por apoptose. Dessa maneira, considera-se que a morte celular que ocorre nas fatias corticais seja do tipo necrótica, causado pelo insulto do H_2O_2 .

FIGURA 7 – Indução do H_2O_2 na ativação da ERK 1/2 e clivagem de PARP 89 kDa. (A) Fatias corticais tratadas com EMAM e co-incubadas com H_2O_2 e EMAM, mostraram fosforilação da ERK na co-incubação e uma diminuição (não significativa) da clivagem de PARP1. (B) O EMAM na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ não protegeu as fatias corticais da fosforilação da ERK, levando a um aumento da morte celular quando comparado somente com a incubação do EMAM 1000 $\mu\text{g/mL}$. (C) Diminuição não significativa nos níveis de PARP1 quando as fatias foram tratadas somente com EMAM ou quando co-incubadas com EMAM e H_2O_2 . O controle está representado pela linha pontilhada.



6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado a atividade neuroprotetora e neurotóxica das frações hidroalcoólica (EHAM), metanólica (EMAM) e acetato de etila (EAAM) do extrato liofilizado de *A. microcarpum* contra o dano oxidativo induzido pelo H₂O₂ em fatias corticais de pintainhos. Também foram avaliadas as propriedades antioxidantes deste composto e a possível participação das MAPKs no mecanismo de ação.

Com base nos resultados, os extratos de *A. microcarpum* se mostraram neuroprotetores quando co-incubados com H₂O₂, somente a fração acetato de etila não demonstrou proteção nas fatias, talvez por ser a fração menos polar dentre as três estudadas. A fração metanólica escolhida para dar continuidade aos ensaios, na concentração de 1000 µg/mL e 100 µg/mL foi significativamente diferente em relação ao controle ($p > 0,05$), sendo que na co-incubação do EMAM e H₂O₂, os níveis da peroxidação lipídica retornaram aos do controle.

Os resultados obtidos com as três frações do extrato liofilizado de *A. microcarpum*, devem-se ao fato de o Gênero *Anacardium* possuir muitos antioxidantes, como o ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides, compostos fenólicos, não esquecendo o ácido anacárdico que em diversos estudos mostrou uma variedade de atividades, bem como atividade antitumoral, antiacne (KUBO *et al.*, 1994), antibacteriana (KUBO *et al.*, 1993), moluscocida (SULLIVAN *et al.*, 1982) e antifúngica (PRITHIVIRAJ *et al.*, 1997). Por nenhuma das três frações terem demonstrado neurotoxicidade, o extrato de *A. microcarpum*, faz da casca do caule uma fonte promissora de compostos bioativos por conta dos altos teores de ácidos anacárdicos descritos por BARBOSA FILHO *et al.*, 2014.

A membrana que reveste as células e organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, por isso, ela é um dos componentes celulares mais suscetíveis ao ataque pelas EROs em decorrência da peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Em decorrência, há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular. (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Com base nos resultados obtidos, observa-se que nas frações de 1000 µg/mL e 100 µg/mL quando tratadas

separadamente ao peróxido de hidrogênio, foi significativamente inferior quando controlado ao controle. Já na co-incubação do EMAM e H₂O₂, os níveis de peroxidação lipídica retornaram a níveis do controle.

Altas concentrações de GSH estão presentes em todas as células vivas aeróbicas e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Serve para destoxificar compostos via através de reações catalisadas pela glutathione S-transferase ou diretamente, como é o caso com o peróxido de hidrogênio na reação catalisada pela GPx. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo contra a lesão resultante da exposição a agentes como: íons de ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta. Além disso, participa da eliminação de produtos da lipoperoxidação (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Analisando os resultados obtidos, não se pode perceber nenhuma alteração de tióis proteicos e não proteicos quando tratadas somente com o EMAM ou quando co-incubadas com o H₂O₂. Este fato pode estar relacionado à atividade da enzima glutathione redutase, atuando na manutenção dos níveis de GSH reduzida. Esta manutenção acontece através da catalização dependente de NADPH transformando GSSG em GSH, dessa forma, mantendo os níveis intracelulares capazes de proteger a célula contra diversos danos, como estresse oxidativo. A remoção do H₂O₂ do interior da célula, se dá com a participação da glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase, mantendo os níveis de GSH com consumo de NADPH para manter estes níveis (JOHNSON *et al.*, 2012).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são compostas por proteínas serina-treonina cinases, que medeiam a sinalização intracelular e estão associadas na diferenciação celular, proliferação celular, sobrevivência, transformação e morte (MCCUBREY *et al.*, 2006). As vias de sinalização MAPKs estão associadas a uma variedade de doenças humanas, incluindo as doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica (BOGOYEVITCH, *et al.*, 2004).

A ativação da MAPK ERK1/2 e da forma fosforilada é bem conhecida quando se fala em doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer. Em pacientes com Alzheimer, foi demonstrado que há uma alta expressão neuronal de ERK1/2 fosforilada e outras MAPKs, quando associadas com marcadores de estresse oxidativo (ZHU, *et al.*, 2002).

Estudos mostram que dependendo da concentração utilizada de H₂O₂ pode induzir a morte de células cerebrais do tipo apoptótica e/ou necrótica através da ativação da ERK1/2 (COLE e PEREZ-POLO, 2001; RUFFELS *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstram a fosforilação da ERK, porém ela não está envolvida na proteção do contra o H₂O₂. Entretanto não está esclarecido por qual mecanismo ocorreu esta fosforilação, podendo estar associada à ativação da proteção pelas fatias corticais ou associada à morte causada pelo H₂O₂. Estudos subseqüentes esclarecerão por qual mecanismo ocorreu a fosforilação da ERK.

PARP é uma polimerase tipo 1 (DNA-binding) de 107 kDa, associada na reparação e replicação do DNA, modulação da estrutura da cromatina e marcador de apoptose. A clivagem de PARP é induzida pela Actinomicina, gerando fragmentos de 89 kDa que migrando para o citoplasma celular indica morte celular apoptótica. (MANIKANDAN, 2010; PRASAD, 2010). Foi observado em nosso estudo que a marcação de PARP no tratamento com EMAM e quando co-incubadas com H₂O₂, não diminui a clivagem de PARP, portanto a morte das fatias corticais não está ocorrendo de forma apoptótica, mas sim necrótica em decorrência do H₂O₂.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, vimos que as frações EHAM e EMAM do extrato de *A. microcarpum* se mostraram neuroprotetoras no que diz respeito a estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ em fatias corticais de pintainhos, não apresentando neurotoxicidade para com as mesmas. Desta forma conclui-se que os compostos responsáveis pela proteção dos extratos encontram-se nas frações hidroalcoólica e metanólica, mas não no acetato de etila e apresentam efeitos antioxidantes. Além disto, esta espécie é uma fonte em potencial de substâncias com propriedades terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXI T.; BORLONGAN C. V.; FAULL, R. L.; WILLIAMS C. E.; CLARK R. G.; GLUCKMAN, P. D. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. **Prog Neurobiol.** 2000. V. 60, 409–70.

BARBOSA FILHO, V. M.; WACZUK, E. P.; KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; LACERDA, S. R.; COSTA, J. G. M. DA.; MENEZES, I. R. A. DE.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T. DA.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products.** 2014. V. 55, 280–288.

BOGOYEVITCH, M. A.; BOEHM, I.; OAKLEY, A.; A. KETTERMAN, J.; R. BARR, K. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. **Biochim. Biophys.** 2004. Acta 1697. 89–101.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.** 1976. V. 72, 248–254.

BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova.** 2007. V. 30, 351-355.

BRANDÃO, M. das G. L.; DINIZ, B. C. & MONTE_MÓR, R. L. de M. Uso de espécies nativas na medicina popular em áreas da Amazônia. Plantas medicinais: um saber ameaçado. **Revista Ciência Hoje.** 2004. V. 35 (206), 64 – 66.

CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. The Role of Environmental Exposures in Neurodegeneration and Neurodegenerative Diseases. *Toxicological Sciences.* 2011. V. 124(2), 225–250.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature**, 2001. V. 410, 37–40.

CHEN, Z.; GIBSON, T. B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M. H. MAP kinases. **Chem. Rev.** 2001. V. 101, 2449–2476.

CHEN L.; LIU, L.; LUO, Y.; HUANG, S. MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis. **Journal of Neurochemistry**. 2008. V. 105, 251–61.

COLE, K. K.; PEREZ-POLO, JR. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H₂O₂ injury. **J. Neurochem**. 2002. V. 82, 19–29.

CORDOVA, F. M.; RODRIGUES, A. L.; GIACOMELLI, M. B.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; DUNKLEY, P. R.; LEAL, R. B. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res**. 2004, V. 998, p.65–72.

CUNHA, R. M. S. da. Filogenia molecular em *Anacardium* (Anacardiaceae): utilização do gene da subunidade pequena do RNA ribossômico (SSU rRNA).. 78 p. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza**. 2002.

DEAN, R. T.; SHANLIN F.; STOCKER R.; DAVIES M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Journal Biochemical**. 1997. V. 324 (1), p.1-18.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** . 2002. V. 82: 47-95.

ELLMAN G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**. 1959. V. 82, 70-77.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1997. V. 43 n.1.

HALLIWELL B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life sciences*. **Nature Publishing Group**, 2001. p. 1-7.

HOSTETTAMANN, K.; QUEIROZ, E.F. & VIEIRA, P.C. A importância das plantas medicinais. In: **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFScar, 2003. 152p.: il. Cap.1, p. 9-42, cap. 2, p. 43-58.

JOHNSON, W. M.; WILSON-DELFOSSÉ, A. L.; MIEYAL, J. J. Dysregulation of Glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2012. V.4, p. 1399-1440.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **J. Agric. Food Chem.** 1993. 41, 1016.

KUBO, I.; KINST-HORI, I.; YOKOKAWA, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. **J. Nat. Prod.** 1994. V. 57, p. 545.

KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Naturally occurring antiacne agents, **J. Nat. Prod.** 1994. V. 57, p. 9.

LEITE, H.P. & SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. 2003. V. 18(2): 60-65.

LI, J.; WULIJI O, LI, W.; JIANG, Z. G.; GHANBARI, H. A. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. 2013. V. 14, 24438 – 24475.

LIMA, L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e caratenóides totais em pitanga. **Scientia Agrícola**. 2002. V. 59, n.3, p. 447-450.

LIU, Y., PETERSON, D.A., KIMURA, H., SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.** 1997. V. 69, 581–593.

MANIKANDAN, P.; MURUGAN, R. S.; Priyadarsini, R. V.; VINOTHINI, G.; NAGINI, S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Science*. 2010. V. 86, p. 936 – 941.

MCCUBREY, J. A.; LAHAIR, M. M.; FRANKLIN, R. A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. **Antioxidant Redox Signal.** 2006. 1775–1789.

MITCHELL, J. D.; MORI, S. A. **The cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae)**. *Mem. NY Bot. Gard.* 1987. 42: 1-76.

NORDBERG, J. e ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, 2001. v. 31, n.11, p 1287-1312.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 1979. 95, 351–358.

PARAMASHIVAPPA, R.; KUMAR, P. P.; VITHAYATHIL, P. J.; RAO, A. S. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **J. Agric. Food Chem.** 2001. 49, 2548.

PARK, B. G.; YOO, C. I.; KIM, H. T.; KWON, C. H.; KIM, Y. K. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. **Toxicology.** 2005. 215, 115–125.

PRASAD S.; RAVINDRAN, J., SUNG, B., PANDEY, M.K.; AGGARWAL, B. B. Garcinol potentiates TRAIL – induced apoptosis through modulation of death receptors and antiapoptotic proteins. *Molecular Cancer Therapy*. 2010. 9: 856 – 863.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. **Anal Biochem.** 1977. 83,346-356.

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova.** 2002. 25(Supl. 1): 45-61.

POSSER, T. Efeitos biológicos e moleculares de compostos orgânicos sintéticos de Selênio sobre o Sistema Nervoso Central e Neurotoxicidade do Manganês. **Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Neurociências.** 2009. UFSC.

PRITHIVIRAJ, B.; MANICKAM, M.; SINGH, U. P.; RAY, A. B. Antifungal activity of anacardic acid, a naturally occurring derivative of salicylic acid. **Canadian Journal of Botanic.** 1997. 75, 207.

RUFFELS, J.; GRIFFIN, M.; DICKENSON, J. M. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. **Eur J. Pharmacol** 2004. 483:163–73.

RUFINO, M. S. M; CORREA, M. P. F.; ALVES, R. E.; BARROS, L. M.; LEITE, L. A. S. Suporte tecnológico para a exploração racional do cajuzeiro. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. M.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFGRS/UFSC. 2003. p.291-320.

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

SULLIVAN, J. T.; RICHARDS, C. S.; LLOYD, H. A.; KRISHNA, G. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. **Planta Med.** 1982. *44*, 175.

VALENCIA, A.; MORAN, J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med.* 2004. *36*:1112–25.

VALKO, M.; LEIBFRITZ D.; MONCOL, J., CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. **39**, 44-84.

WONG, W.; SCOTT, J. D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. **Nat. Rev., Mol. Cell Biol.** 2004. *5*, 959–970.

ZHANG, Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.** 2000. *7*:240–50.

ZHU, X.; LEE, H. G.; RAINA, A. K.; PERRY, G.; SMITH, M. A. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. **Neurosignals.** 2002. *11*:270–281.