



**Universidade Estadual de Londrina**

---

**GUSTAVO RAFAEL MAZZARON BARCELOS**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE,  
GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES  
DO EXTRATO DE *Anacardium occidentale* L. *IN VITRO***

---

**Londrina  
2007**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

GUSTAVO RAFAEL MAZZARON BARCELOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE,  
GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES  
DO EXTRATO DE *Anacardium occidentale* L. *IN VITRO***

---

**Londrina  
2007**

**GUSTAVO RAFAEL MAZZARON BARCELOS**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE,  
GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES DO  
EXTRATO DE *Anacardium occidentale* L. *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus**

**Londrina  
2007**

# **GUSTAVO RAFAEL MAZZARON BARCELOS**

## **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E DOS EFEITOS PROTETORES DO EXTRATO DE *Anacardium occidentale* L. *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. **Ilce Mara de Syllos Cólus**  
Departamento de Biologia Geral  
CCB-UEL

Profa. Dra. **Denise Crispim Tavares**  
Universidade de Franca - SP

Profa. Dra. **Berenice Quinzani Jordão**  
Departamento de Biologia Geral  
CCB-UEL

Londrina, 16 de fevereiro de 2007.

APOIO FINANCEIRO  
Universidade Estadual de Londrina  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

**Dedico este trabalho,  
à minha mãe, Shirlei**

*“Podemos resistir a uma invasão de exércitos,  
mas não a uma invasão de idéias” (Victor Hugo)*

## **Agradecimentos**

A Universidade Estadual de Londrina, ao Centro de Ciências Biológicas, ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular;

A minha mãe, pelo apoio e sacrifício, os quais tornaram possível a realização deste trabalho;

A minha orientadora e segunda mãe em Londrina, Ilce, pela orientação, mostrando sempre o caminho correto, por me ensinar a “ordem lógica dos parágrafos”, pela amizade, compreensão nos momentos difíceis e também pela paciência pelos meus inúmeros esquecimentos;

A Karine, pela companhia, compreensão e ajuda nestes 2 anos de mestrado;

Aos meus irmãos Giuliano e Daniela, pelo carinho e apoio;

A profa. Dra. Maria Aparecida M. Maciel, pelo fornecimento do extrato do caju utilizado neste trabalho;

A banca examinadora, pela contribuição na melhoria deste trabalho;

Ao meus amigos de laboratório: Zé, pelo enorme companheirismo em tudo, ajuda com experimentos, artigos e pela amizade demonstrada nestes 2 anos; Ju, pela amizade, paciência, ajuda nos experimentos e na correção do português; Mari, pela amizade, pelos inúmeros conselhos e pragas, pela ajuda no slide da aula do doutorado e pelos jantares; Iara, pela amizade, ajuda no laboratório e companheira de “ataque”; Hellen, pela amizade, pela dança de salão e ajuda no laboratório; Roberta pela explicação do artigo do meu exame de doutorado e pela ajuda no laboratório. Ao Fernando, pela amizade e pelo certificado TRF. Aos novas amigas de laboratório, Priscila, Priscilla e Natália pela ajuda e pelos momentos agradáveis na mutagênese;

Ao Mateus e a Karina, pela grande ajuda nos trabalhos de aberrações cromossômicas e micronúcleo;

A Fernanda, pela grande ajuda no laboratório, amizade e pelos muitos momentos de descontração;

A Luciana, por me ensinar a técnica de sobrevivência celular;

Ao Marco e a Ana Carol, pela amizade, companheirismo, ajuda extra-laboratório e traduções;

A Dona Cida e ao Sr. João, pela ajuda na moradia no final do mestrado e pelos almoços de domingos;

Ao Dário e Melissa, pela ajuda com o material;

A Sueli, pelo cafezinho, bom humor e ajuda nestes dois anos;

A CAPES e a UEL pelo auxílio financeiro;

A todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado.

Muito obrigado!

BARCELOS, GUSTAVO RAFAEL MAZZARON. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e dos efeitos protetores do extrato de *Anacardium occidentale* L. *in vitro***. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

## RESUMO

O uso de espécies vegetais para fins de tratamento e cura de doenças remonta o início da civilização, desde o momento em que o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação destes recursos naturais para seu próprio benefício. Dentre as plantas que continuam a ser uma grande fonte de medicamentos para a humanidade está a espécie *Anacardium occidentale* L., popularmente conhecida como cajueiro, o qual possui indicações terapêuticas variadas, tais como: propriedade cicatrizante, antihipertensivo, combate a distúrbios gástricos, controle do diabetes, combate a asma e bronquites. Contudo, alguns estudos demonstraram atividade mutagênica para o extrato desta planta. Em faces às atividades já descritas para o cajueiro e com o objetivo de contribuir para um melhor esclarecimento de suas atividades biológicas, o presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* os possíveis efeitos citotóxico, genotóxico, mutagênico e protetor do extrato da casca do cajueiro, utilizando o ensaio do cometa e o teste de aberrações cromossômicas em cultura de células V-79. O teste de sobrevivência celular avaliou a citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato da casca do caju (500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000 µg/mL de meio de cultura) e permitiu a escolha de três (500 µg/mL, 1000 µg/mL e 2000 µg/mL de meio de cultura), as quais não apresentaram citotoxicidade, para a realização dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade. Nos testes de aberrações cromossômicas e do cometa, foram utilizados, respectivamente, como agentes indutores de danos a doxorrubicina (DXR) e o metilmetanosulfonato (MMS) e como controle negativo, PBS. Nas avaliações das atividades protetoras utilizando o ensaio do cometa o extrato foi associado ao MMS em pré, pós e tratamento simultâneo e sua ação antimutagênica quando associado à DXR foi avaliada sobre a incidência de aberrações cromossômicas em tratamento simultâneo contínuo e nas fases G1, S e G2 do ciclo celular. Os resultados obtidos no teste de aberrações cromossômicas revelaram que nenhuma das três concentrações utilizadas apresentou efeito mutagênico em todos os protocolos de tratamentos utilizados e que, no teste de antimutagenicidade, o extrato da casca do cajueiro proporcionou efeito antimutagênico em todas as fases do ciclo celular testadas. Na fase G1 as concentrações de 500 e 2000 µg/mL, bem como, a concentração de 1000 µg/mL na fase S também apresentaram efeito protetor. O ensaio do cometa revelou que as duas menores concentrações utilizadas não apresentaram atividade genotóxica e a maior mostrou genotoxicidade baixa. Todas as concentrações apresentaram atividade protetora de danos no DNA causados pelo MMS em tratamento simultâneo e pós-tratamento, o que sugere que tal extrato possua possivelmente uma ação bio-antimutagênica. O fato do extrato do cajueiro não ter apresentado genotoxicidade na maioria das concentrações e protocolos avaliados e ter protegido as células V79 contra danos causados por agentes alquilantes (MMS) e oxidantes (DXR) fornecem maior segurança para a utilização terapêutica do mesmo e estimula a continuidade dos estudos visando contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos em seu efeito protetor e identificação dos compostos bioativos encontrados neste extrato.

**Palavras-chave:** cajueiro, citotoxicidade, aberrações cromossômicas, ensaio do cometa, antimutagenicidade.

BARCELOS, GUSTAVO RAFAEL MAZZARON. **Evaluation of citotoxicity, genotoxicity and of the protective effects of the extract of *Anacardium occidentale* L. *in vitro***. 2007. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

### ABSTRACT

The use of vegetable species in order to treat and cure diseases leads us back to the beginning of our civilization, to the moment in which man started a long journey of handling, adaptation and modification of these natural resources for his own benefit. Among the plants that continue to be a great source of medicine to the humanity is the *Anacardium occidentale* L., popularly known as cashew tree, which has several therapeutical indications, such as: scarred property, antihypertensive, gastric disturbance combat, diabetes control, asthma and bronchitis combat. However, some studies showed mutagenic activity for this plant's extract. In the face of activities already described for the cashew and having as an aim to contribute for a better clarifying of its biological activities, the present work has as a goal to evaluate *in vitro* the possible citotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and protective effects of the cashew's stem bark, using the comet assay and the cromossomic aberration test in cell V-79. The cell survival test evaluated the citotoxicity of different cashew's stem bark extract concentrations (500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 and 6000 µg/mL of culture agent) and allowed the choice of three (500 µg/mL, 1000 µg/mL and 2000 µg/mL of culture agent), which did not present citotoxicity for the fulfillment of the genotoxicity and mutagenicity tests. In the cromossomic aberration and comet assays the doxorubicine (DXR) and methyl metanosulfonate (MMS) were respectively used as damage inductor agents and, as negative control, PBS. In the protection activities using the comet assay, the extract was associated to the MMS in pre, post and simultaneous treatment and its antimutagenic action, when associated to DXR, was evaluated over the cromossomic aberrations incidence in simultaneous continuous treatments and in the phases G1, S and G2 of the cell cycle. The results obtained in the cromossomic aberration test revealed that none of the three concentrations that were used has showed mutagenic effect in all the treatment protocols used and that in the antimutagenicity test, the cashew's stem bark provided antimutagenic effect in all phases of the cell cycles tested. In the G1 phase, the 500 and 2000 µg/mL concentrations as well as the 1000 µg/mL concentration in the S phase also presented protective effect. The comet assay revealed that the two minor concentrations used did not present genotoxic activity and that the major one showed low genotoxicity. All concentrations presented damage protection activity in the DNA caused by the MMS in simultaneous treatment and post-treatment, which suggests that such extract possibly has a bio-antimutagenic action. The fact that the cashew's stem bark extract did not show genotoxicidade in the most of concentrations and protocols assessed and it has protected the V79 cells against damages caused by alkylant (MMS) and oxidant (DXR) agents gives us more security in its therapeutical usage and stimulates the continuity of the studies aiming to contribute to the understanding of the mechanism involved in its protective effect and identification of the bioactive compounds found in this extract.

**Keywords:** cashew, citotoxicity, chromossomic aberration, comet assay, antimutagenicity.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.1 MUTAGÊNESE E ANTIMUTAGÊNESE.....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>1.2 <i>Anacardium occidentale</i> L. ....</b>                          | <b>15</b> |
| <b>1.3 SISTEMA DE CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO <i>IN VITRO</i>.....</b> | <b>18</b> |
| <b>1.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....</b>                                  | <b>20</b> |
| <b>1.4.1 TESTE DO COMETA .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>1.4.2 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....</b>                                | <b>23</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2. OBJETIVO .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>3. ARTIGO 1 .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4. ARTIGO 2 .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>  | <b>71</b> |

# INTRODUÇÃO

## 1.1 MUTAGÊNESE E ANTIMUTAGÊNESE

A informação genética de todos os organismos vivos está estocada em grandes macromoléculas, os ácidos nucléicos chamadas de DNA, especificada pela seqüência de bases nitrogenadas (SNUSTAD & SIMMONS, 2001). Esta informação genética tem de ser transmitida fielmente de célula a célula durante os diversos estágios de desenvolvimento do indivíduo (BROWN, 1999).

Apesar do “repasso” de informação através da replicação do material genético ser feito de forma precisa, ele está sujeito a erros, ou seja, eventualmente ocorrem mutações, produzindo variabilidade genética, que fornece a matéria prima para a evolução (SNUSTAD & SIMMONS, 2001; BURNS & BOTTINO, 1991).

Mutações são modificações súbitas e hereditárias no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética pré-existente (ZAHA, 1996). Danos ao DNA podem ser decorrentes de processos celulares normais ou da exposição do organismo a agentes químicos, físicos ou biológicos. As manifestações das mutações dependem do tipo celular atingido, ou seja, se é de natureza somática ou germinativa. Quando o dano ocorre em células somáticas, pode gerar neoplasias, morte celular, má formação e disfunção tecidual e abortos. Já em células germinativas, os danos no material genético são transmissíveis, causando desordens genéticas, baixa fertilidade e síndromes fetais (RABELLO-GAY, 1991).

Agentes mutagênicos são definidos como causadores de danos no DNA resultando em mutações de ponto, deleções e inserções, recombinações, rearranjos, bem como outros tipos

de alterações cromossômicas (SUGIMURA, 2000). Dentre os inúmeros agentes mutagênicos conhecidos, destacam-se os físicos, como a radiação ionizante; os endógenos, como os radicais livres e os biológicos, como as infecções virais e bacterianas. Os agentes mutagênicos podem estar presentes nos alimentos, medicamentos ou no ambiente em que o homem pode se expor ocupacional ou acidentalmente, como por exemplo, as radiações ionizantes e não ionizantes.

Os danos no material genético causados por esses agentes mutagênicos tendem a ser reparados por enzimas de reparo, mas caso a célula se divida antes que o reparo ocorra, este dano pode levar ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA, que é dependente da quantidade e tipo do agente mutagênico. Para o surgimento de um tumor, esta alteração deve ocorrer em determinadas regiões de genes que estimulam (proto-oncogenes) e/ou inibam (genes supressores tumorais) a proliferação celular, levando, assim, ao ganho ou perda de função destes genes. Essas alterações, invariavelmente, fazem com que a célula afetada tenha maior chance de adquirir novas alterações. Logo, os danos fixados no DNA além de serem irreversíveis, são também cumulativos, e após um determinado número de alterações nesses genes, que varia entre 5 a 7, a célula torna-se uma célula neoplásica (PINTO & FELZENSZWALB, 2003). Portanto, entre a exposição a agentes mutagênicos e o início da carcinogênese, existe uma tênue linha; logo, ao ultrapassar esta linha, estes agentes mutagênicos passam a ser carcinogênicos, sendo relevantes os mais variados estudos sobre o processo de mutagênese e carcinogênese (SUGIMURA, 2000).

Paralelamente, vários pesquisadores têm relatado os mecanismos de antimutagênese e anticarcinogênese. Segundo Kada *et al.* (1982), os agentes antimutagênicos pertencem a duas classes: desmutagênicos e bio-antimutagênicos. Agentes desmutagênicos são compostos capazes de inativar química, física ou enzimaticamente um agente mutagênico. As inativações química e física ocorrem por ligação direta com o agente mutagênico, impedindo sua ativação

por seqüestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impossibilitando que os mesmos estabeleçam contato com o material genético. A inativação enzimática de um mutágeno pode ocorrer por dois mecanismos: a inativação de enzimas de fase I da biotransformação, como as enzimas da família P450 ou a indução de enzimas de fase II, como a glutathione S-transferase. Já os compostos bio-antimutagênicos, podem atuar como moduladores do reparo e replicação do DNA, agindo em nível celular ao aumentar a fidelidade na replicação do material genético, estimular o reparo livre de erro em danos no material genético ou inibir os sistemas de reparo sujeitos a erro (KADA *et al.*, 1982; KURODA *et al.*, 1992).

Outros autores classificam os mecanismos de antimutagênese e anticarcinogênese como extracelulares e celulares. Entre os processos extracelulares, pode-se citar os físicos, como a remoção mecânica dos agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos e os químicos, tais como a modificação da microbiota intestinal, complexação, diluição e desativação de mutágenos e carcinógenos endógenos e exógenos (DE FLORA, 1998; GENTILE *et al.*, 2001; KNASMÜLLER *et al.*, 2002). Os processos celulares compreendem a inibição de mutação e iniciação do câncer, dos quais se pode citar: modificação do transporte transmembrana; modulação do metabolismo; atividade antioxidante; controle da replicação celular; modulação dos mecanismos de reparo do DNA; controle da expressão gênica e neutralização dos produtos oncogênicos. Existem também mecanismos de anticarcinogênese que envolvem a inibição da promoção e progressão tumoral, bem como bloqueio de metástases. Estes mecanismos envolvem, basicamente, a ação de antioxidantes, bloqueio da angiogênese e atividades hormonais (DE FLORA, 1998; HEO *et al.*, 2001).

## 1.2 *Anacardium occidentale* L.

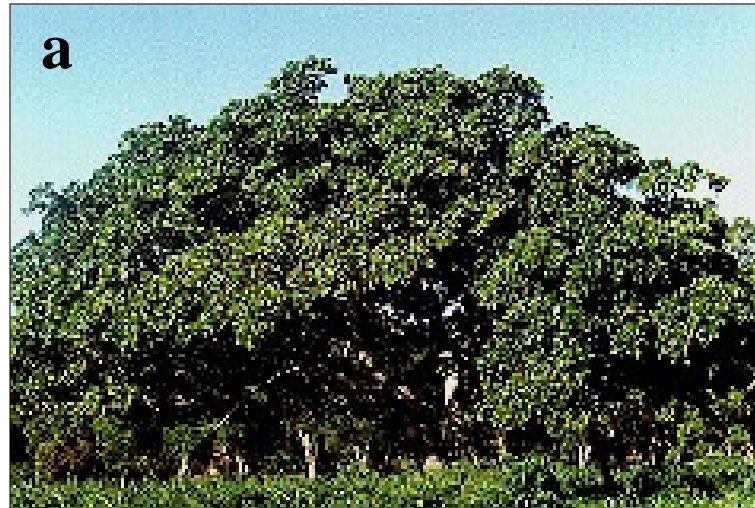
O uso de espécies vegetais para fins de tratamento e cura de doenças e sintomas remontam ao início da civilização, desde o momento em que o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação destes recursos para seu próprio benefício. Atualmente, a natureza continua a ser uma grande fonte de medicamentos para a humanidade. Nos últimos 20 anos, o interesse pelas plantas medicinais tem aumentado o volume de investigações científicas sobre seus efeitos biológicos em seres humanos e animais (VEIGA JR. *et al.*, 2005).

Dentre estas plantas, está a espécie *Anacardium occidentale* L., pertencente à família Anacardiaceae e popularmente conhecida como cajueiro. Caracteriza-se por ser uma árvore frondosa, facilmente encontrada em todo o país, sendo mais abundante na região nordeste (Figura 1). De indicações e utilizações terapêuticas variadas, o cajueiro é uma espécie vegetal também utilizada em reflorestamentos, para fins ornamentais e para sombreamento, além de servir como componente para fungicidas, inseticidas, vernizes, pinturas, adesivos e até plásticos de lonas para freios (CORREA, 1978).

Existem vários relatos na literatura demonstrando o uso de folhas, cascas, caule e frutos desta espécie na medicina popular. A casca do tronco é adstringente, rica em tanino, o que justificaria sua indicação popular como cicatrizante. Também é indicada no combate à hipertensão, no tratamento de distúrbios gástricos, como anti-inflamatório (MOTA *et al.*, 1985) e bactericida (AKINPELU, 2000).

A infusão das cascas do cajueiro apresenta propriedades analgésicas, afrodisíacas, sendo também indicada para cólicas intestinais, úlceras gástricas, asma e bronquites. A castanha do fruto produz uma resina com propriedades anti-sépticas, vermífugas e vesicantes (CORREA, 1978) e foi observada uma forte capacidade antioxidante contra a

hepatocarcinogenicidade induzida pela aflatoxina B1 em ratos Wistar (PREMALATHA & SACHDANDAUM, 1999).



**Figura 1:** *Anacardium occidentale* L.

**a.** Cajueiro, **b.** pseudofruto do caju

Fonte: <http://www.arbolesornamentales.com/Anacardiumoccidentale.htm>

Estudos pré-clínicos realizados com metabólitos isolados da casca da árvore desta espécie, demonstraram ação antibactericida e antipirética para o ácido anacárdico (EICHBAUM, 1988) e a atividade anti-inflamatória foi correlacionada com extrato metanólico, com frações hidro-alcoólicas obtidas de extrato etanólico e com taninos isolados destas frações (MOTA *et al.*, 1985). A atividade contra leishmania foi verificada por França *et al.* (1993). No entanto, quando testado em altas concentrações, extratos de *A. humile* e óleos derivados de *A. occidentale* apresentaram-se citotóxicos no teste de *Salmonella typhimurium* (SANTOS, F.V., comunicação pessoal; GEORGE & KUTTAN, 1997).

Cavalcante *et al.* (2003) estudaram o suco de caju e verificaram, além de seu benefício nutricional, potenciais bactericida e antimutagênica. Foram analisados tanto sucos naturais como processados (cajuína) e estes foram caracterizados como sendo misturas complexas contendo altas concentrações de vitamina C, diversos carotenóides e metais. Os testes realizados indicaram que o *A. occidentale* possui atividade mutagênica, antimutagênica e comutagênica e que estas propriedades podem estar relacionadas com os constituintes químicos do suco. Polasa e Rukmini (1987) também realizaram testes mutagênicos com alguns óleos vegetais e observaram que o derivado do cajueiro apresentou-se mutagênico, com ou sem ativação da fração S-9.

Em face das atividades relacionadas ao cajueiro, muitos estudos relacionados ao *A. occidentale* estão sendo realizados a fim de investigar seus efeitos benéficos nas mais diversas áreas da ciência.

### 1.3 SISTEMA DE CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*

Sistemas testes de curta duração são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos ambientais (KURODA *et al.*, 1992). Entre esses sistemas, destaca-se a cultura de células de mamíferos *in vitro*, como a cultura de linfócitos de sangue periférico humano, as linhagens celulares provenientes de hamster Chinês, como por exemplo, as células CHO (células de ovário) e células V79 (fibroblastos de pulmão) (TAKAHASHI, 2003). Células que se aderem e se dividem em superfície sólida são mais indicadas para experimentos de antimutagênese *in vitro*, pois facilitam a manipulação durante a realização de estudos em condições de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento em relação ao agente mutagênico (KURODA *et al.*, 1992) e de experimentos com tratamentos nas diferentes fases do ciclo celular (PRESTON, 1981).

Entre as vantagens desse sistema-teste, destacam-se a facilidade na padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional) devido à uniformidade metabólica e comportamental do material; possibilidade dos tratamentos das células serem realizados em várias fases do ciclo celular; rapidez; economia; boa reprodutibilidade; organização dos cromossomos e de seu DNA igual às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991).

As linhagens de células de hamster, como a V79 e CHO, como outras linhagens celulares, apresentam algumas vantagens e desvantagens. Dentre as desvantagens, podemos citar que estas linhagens celulares apresentam cariótipo variável, freqüentemente formam populações celulares não-sincrônicas, apresentam considerável heterogeneidade nos tempos de ciclo celular, além de serem células transformadas. Contudo, tais desvantagens não superam as vantagens tais como facilidade de crescimento em cultivo, fácil manutenção,

pequeno período de estabilização (15 a 30 h), pequeno número cromossômico, cromossomos relativamente grandes e ciclo celular curto (10 a 14 horas) (PRESTON, 1997).

A maioria das linhagens celulares utilizadas em ensaios *in vitro* não têm capacidade de metabolização de drogas, havendo a necessidade, portanto, da adição de sistemas de metabolização, como o S9 (fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254 (GALLOWAY *et al.*, 1994; PRESTON, 1997). No entanto, o sistema *in vitro* tem se mostrado eficiente na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos, apesar dos experimentos com animais vivos reproduzirem com maior semelhança as condições humanas (KURODA *et al.*, 1992).

Nem sempre o resultado positivo *in vitro* é garantia de positividade *in vivo*, mas serve de alerta. O sistema *in vitro* é de grande importância por fornecer dados fundamentais sobre a ação da substância testada, como clastogênica, aneugênica, ação direta ou indireta sobre o DNA e nível de toxicidade (TAKAHASHI, 2003).

## **1.4 ENSAIOS *IN VITRO***

Ensaio de curta duração com células de mamíferos têm sido amplamente utilizados tanto nos estudos de mutagenicidade como nos de antimutagenicidade.

A avaliação dos danos causados por diferentes xenobióticos é feita principalmente através das técnicas do micronúcleo (JOHNSTON *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 1997), cometa (OLIVE *et al.*, 1992. FRIEAUFF *et al.*, 2001), aberrações cromossômicas (SASAKI *et al.*, 1994; MATSUOKA *et al.*, 1997; ALVES *et al.*, 2000) e trocas entre cromátides irmãs (CORTÉS *et al.*, 1994). Tais testes são essencialmente comparativos. Assim, é sempre necessária a presença simultânea de controles negativo e positivo para os experimentos (GONTIJO & TICE, 2003).

Segundo Gebhart (1992), as metodologias citogenéticas clássicas para avaliar *in vitro* a mutagenicidade de agentes químicos e físicos também podem ser utilizadas para a avaliação e identificação de agentes antimutagênicos.

### **1.4.1 TESTE DO COMETA**

O teste do cometa é proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele é utilizado para detectar lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente célula e tecido-específico, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos

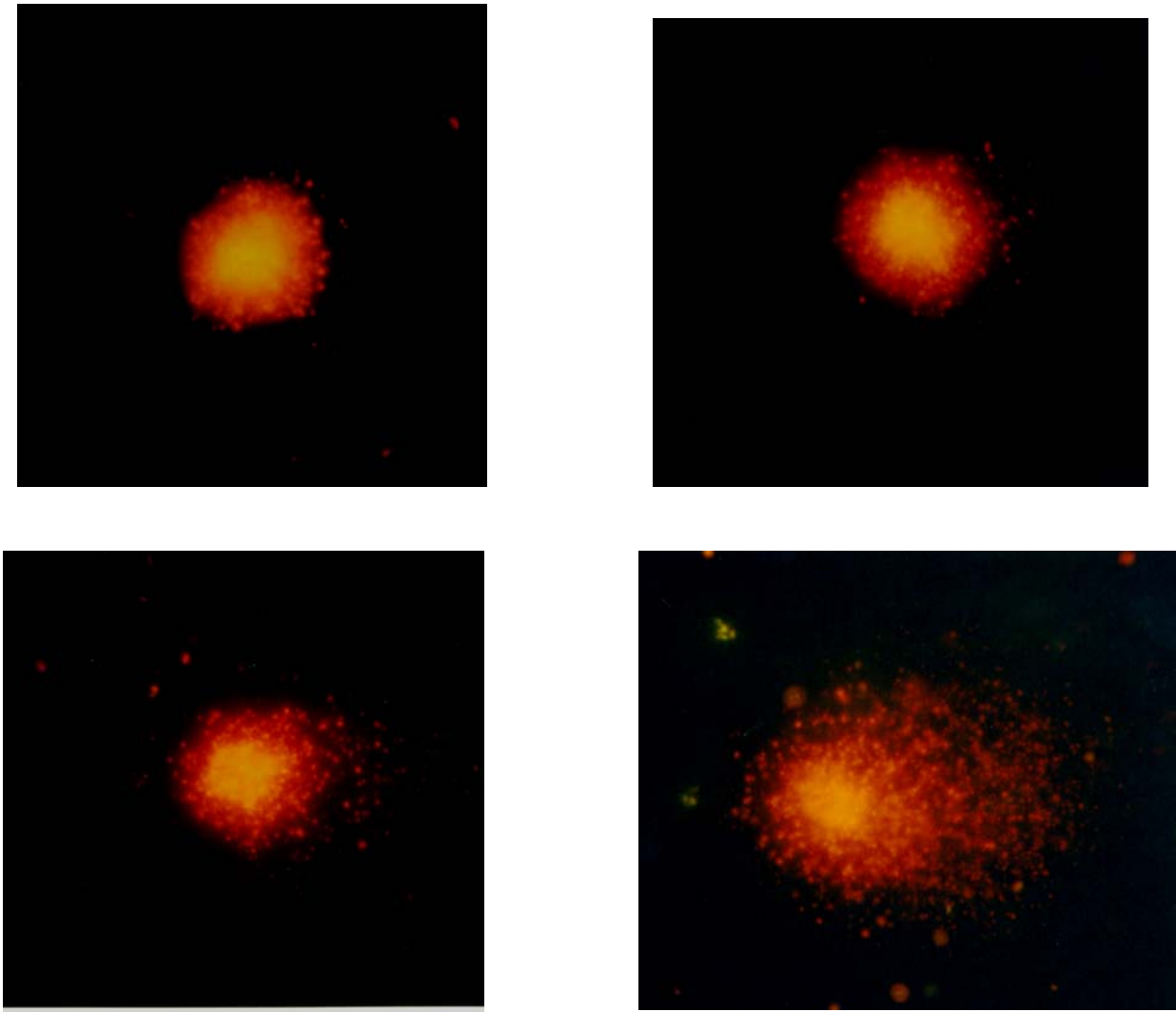
e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada sub-população celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (GONTIJO & TICE, 2003).

O teste do cometa também conhecido como SCG (*single cell gel assay*) e MGE (*microgel electrophoresis*) foi introduzido primeiramente por Östling e Johanson em 1984 como uma técnica micro-eletroforética para visualização direta de danos no DNA em células individuais (FAIRBAIN *et al.*, 1995).

O princípio básico do teste do cometa é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN *et al.*, 2003).

As células podem, portanto, serem classificadas visualmente de acordo com a categoria de migração da cauda em quatro classes (0, 1, 2 e 3), sendo que a classe 0 representa nenhum ou mínimo dano e a classe 3 representa máximo dano. É classificado em classe 0 quando não há migração de fragmentos de material genético (cauda); em classe 1 quando o tamanho da cauda do cometa não excede o diâmetro da cabeça; em classe 2 quando o tamanho da cauda é entre 1 a 2 vezes o tamanho da cabeça e em classe 3 quando o tamanho da cauda é maior que 2 vezes o tamanho da cabeça (COLLINS *et al.* 1997) (Figura 2).

Durante a última década, o teste tem sido muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas (FAIRBAIN *et al.*, 1995). A versão alcalina (pH>13) pode ser usada para detectar danos no DNA (MERK & SPEIT, 1999) do tipo quebra de fita simples e dupla, as quais apresentam um importante papel na formação de aberrações cromossômicas e também sítios apurínicos e apirimidínicos (chamados de sítios álcali lábeis), os quais são provavelmente convertidos em quebras em altos pHs. Contudo, essas lesões primárias são passíveis de reparo e podem não resultar em alterações genéticas (COLLINS *et al.*, 1997).



**Figura 2:** Classes de cometa: **a.** classe 0, **b.** classe 1, **c.** classe 2, **d.** classe 3.

Várias pesquisas utilizam tal técnica em seus estudos. Em aplicações clínicas, por exemplo, o método foi utilizado para analisar as células de pacientes com câncer, antes e após a quimioterapia para verificar os danos no DNA; no monitoramento humano, a técnica é usada para detectar as lesões no DNA de pessoas expostas a algum tipo de radiação, por exemplo (ANDERSON & PLEWA, 1998). Ou seja, a versatilidade de aplicações do teste do cometa indica sua utilidade em uma ampla área da biologia, medicina, toxicologia, entre outros (FAIRBAIN *et al.*, 1995).

O teste do cometa deve ser realizado em condições mínimas de toxicidade celular, visto que o processo citotóxico leva, inevitavelmente, à formação de quebras no DNA. Então,

durante os experimentos, é necessária a condução de teste de citotoxicidade independente, com alíquotas da mesma amostra (GONTIJO & TICE, 2003) ou de sobrevivência celular.

Enfim, o ensaio do cometa possui vantagens como simplicidade, rapidez e relativo baixo custo, além de diferir de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. Além disso, o fato do ensaio possibilitar o acesso às quebras do DNA de uma única célula, poucos milhares de células (de 1 a 10.000 células) são suficientes para sua realização (GONTIJO & TICE, 2003).

#### **1.4.2 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS**

As aberrações cromossômicas (AC) são mudanças no número ou na estrutura normal do cromossomo que podem ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição a agentes genotóxicos físicos, químicos ou biológicos (RUSSEL, 2002).

Existem três níveis de mutações, as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais como as deleções, duplicações, inversões e translocações e as aberrações cromossômicas em número, como as aneuploidias e euploidias, que contribuem para o grande número de abortos, morte pré-natal e nascimento de pessoas com anormalidades estruturais, fisiológicas e mentais (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002).

As primeiras alterações cromossômicas foram analisadas na década de 30 por Sax e colaboradores utilizando grãos de pólen de *Tradescantia*. O uso da hipotonização por Hsu em 1952, permitiu uma detalhada análise dos cromossomos humanos (TUCKER & PRESTON, 1996).

Em estudos epidemiológicos, foi demonstrado que pessoas com elevadas frequências de AC em linfócitos periféricos possuem um elevado risco de desenvolvimento de câncer (BONASSI *et al.*, 1995; HAGMAR *et al.*, 1998). Desta forma, o teste de AC tem sido utilizado tanto para avaliação de suscetibilidade individual como para o diagnóstico de alguns tipos de neoplasias (SKJELBRED *et al.*, 2006).

O processo pelo qual as AC são formadas é muito complexo e não está totalmente elucidado. Entretanto, Bender *et al.* (1973) propuseram um modelo para o mecanismo de formação de AC por agentes mutagênicos, onde a maioria dos aspectos propostos ainda é válida: (1) o cromossomo antes da replicação é monomérico e contém uma dupla hélice de DNA; (2) AC é consequência de lesões no DNA; (3) lesões primárias no DNA são causadas por agentes físico/químicos que quebram sua fita ou por danos nas suas bases nitrogenadas, que são convertidas em quebras de fita de DNA; (4) as quebras nas fitas do DNA são transformadas em diferentes tipos de AC seja por mecanismos ineficientes de reparo ou replicação do DNA.

As aberrações cromossômicas podem ser classificadas em numéricas ou estruturais. As aberrações numéricas originam-se pela ação de agentes aneugênicos, os quais interferem nas fibras do fuso, gerando uma segregação errada dos cromossomos durante a anáfase e originando perda ou ganho de cromossomos inteiros. As aberrações cromossômicas estruturais são alterações na estrutura cromossômica, visíveis microscopicamente, que envolvem quebras do cromossomo, seguidas por rearranjo anormal do cromossomo quebrado. A quebra pode ser completa em uma única cromátide ou em ambas, resultando na perda ou deleção de parte do material genético, translocação ou outro rearranjo. Os agentes capazes de gerar aberrações estruturais são chamados de clastogênicos (SWIERENGA *et al.*, 1991).

Os agentes químicos ou físicos que causam danos cromossômicos podem ser divididos em duas classes distintas: S-independentes e S-dependentes. Os agentes S-independentes são

aqueles que causam dano no material genético sem que haja a necessidade da replicação do DNA, por exemplo, Raios-x e alguns quimioterápicos radiomiméticos como a bleomicina. Já os agentes S-dependentes são compostos que inserem, geralmente, aductos, radicais metil ou etil ou geram um sítio apurínico no material genético, e, neste caso, o dano cromossômico só será visualizado após a replicação do DNA (PALITTI, 1998).

O teste de AC em cultura de células de mamíferos é um dos métodos mais sensíveis para a detecção de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos presentes no ambiente, sendo complementar ao teste de Ames em *Salmonella typhimurium*. Ademais, além da utilização de linfócitos de sangue periférico para a realização do teste, linhagens provenientes de hamster Chinês (células V-79 - fibroblastos de pulmão e CHO – ovário, por exemplo) são indicadas para a realização do ensaio de AC (TAKAHASHI, 2003).

## REFERÊNCIAS

- ALVES, I.; OLIVEIRA, N.G.; LAIRES, A.; RODRIGUES, A.S.; RUEFF, J.. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. **Mutagenesis**, v. 15, p. 229- 234, 2000.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286-287, 2000.
- ANDERSON, D.; PLEWA M.J. The international Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67-73, 1998.
- Arboles ornamentales <http://www.arbolesornamentales.com/Anacardiumoccidentale.htm>, 21/08/05.
- BENDER, M.A.; GRIGGS, H.G.; WALKER, P.L. Mechanisms of chromosomal aberration production: I. Aberration induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light. **Mutation Research**, v. 20, p. 403-416, 1973.
- BONASSI, S.; ABBONDANDOLO, A.; CAMURRI, L.; DAL PRA, L.; DE FERRARI, M.; DEGRASSI, F.; FORNI, A.; LAMBERTI, L.; LANDO, C.; OADOVANI, P. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future câncer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. **Cancer Genetic and Cytogenetic**, v. 79, p. 133-135, 1995.
- BROWN, T. A. **Genética um Enfoque Molecular**, 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- CAVALCANTE, A.A.M.; RÜBENSAM, G.; PICADA J.N.; GOMES DA SILVA, E.; FONSECA MOREIRA J.C.; HENRIQUES J.A. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 360-369, 2003.
- COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, p. 183-193, 1997.
- CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Ministério da Agricultura, IBDF: Rio de Janeiro, p. 55, 1978.
- CORTÉS, F.; DAZA, P.; PIÑERO, J.; ESCALZA, P.. Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. **Mutation Research**, v. 24, p. 203-207, 1994.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.

EICHBAUM, F.W. Biological properties of anacardic acid (O-pentadecadienyl-salicylic acid) and related compounds. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 19, p. 119-133, 1988.

FAIRBAN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FRANÇA, F.; CUBA, C.A.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.; ALMEIDA, M.; DAS VIRGENS, M. L.; MARSDEN, P.D. An evaluation of the effect of a bark extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) on infection by *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 151-155, 1993.

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W.. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, p. 133-137, 2001.

GALLOWAY, S.M.; AARDEMA, M.J.; IISHIDATE, M. J.R.; IVETT, J.L.; KIRKLAND, D.J.; MORITA, T.; MOSESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group in vitro tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 312, p. 241-261, 1994.

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 211-220, 1992.

GENTILE, J.M.; GENTILE, G.; LOHMAN, P.H.; FERGUSON, L.R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: mechanistic studies. **Mutation Research**, v. 480, p. 1-7. 2001.

GEORGE, J.; KUTTAN, R. Mutagenic, carcinogenic and cocarcinogenic activity of cashewnut shell liquid. **Cancer letters**, v. 112, p. 11-16, 1997.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STROMBERG, U.; MIKOCZY, Z.; LANDO, C.; HANSTEEN, I.L.; MONTAGUD, A.H.; KNUDSEN, L.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C.; TINNERBERG, H.; BROGGER, A.; FORNI, A.; HOGSTEDT, B.; LAMBERT, B.; MITELMAN, F.; NORDESTON, I.; SALOMAA, S.; SKERFVING, S. Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. **Mutation Research**, v. 405, p. 171-178, 1998.

HARTMANN, A.; AGUREL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R.. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HEO, M. Y.; SOHN, S. J.; AU, W. W. Anti-genotoxicity of galangin as cancer chemopreventive agent candidate. **Mutation Research**, v. 488, p. 135-150, 2001.

KADA T.; INOUE T.; NAMIKI N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski, E.J. (Ed.), **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**, Praeger, New York, p. 137-151, 1982.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KNASMÜLLER S.; STEINKELLNER H.B.J.; MAJER E.C.; NOBIS G.; SCHARF G.; KASSIE F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1051-1062, 2002.

KURODA, Y.; JAIN, K.A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Animutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

JOHNSTON, P. J.; MACPHAIL, S. H.; STAMATO, T. D.; KIRCHGESSNER, C. U. ; OLIVE, P. L.. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. **Radiation Research**, v. 149, p. 455-462, 1998.

MATSUOKA, A.; OZAKI, M.; TAKESHITA, K.; SAKAMOTO, H.; GLATT, H. R.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.. Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. **Mutagenesis**, v. 12, p. 365-372, 1997.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 33, p. 167-172, 1999.

MILLER, B.; ALBERTI, S.; LOCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E.. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research**, v. 192; p. 45-59, 1997.

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

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R.E.; BANÁTH, P.. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 198, p. 259-267, 1992.

PALITTI, F. Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 404, p. 133-137, 1998.

PINTO, L. R. F.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

POLASA K.; RUBKMINI, B. Mutagenicity tests of cashewnut shell liquid, rice-bran oil and other vegetable oils using the *Salmonella typhimurium*/microsome system. **Food And Chemical Toxicology**, v. 25, p. 763-766, 1987.

PREMALATHA, B.; SACHDANANDAM, P. *Semecarpus Anacardium* L. nut extract administration induces the in vivo antioxidant defence system in aflatoxin B1 mediated hepatocellular carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 131-139, 1999.

PRESTON, R.J.; AU, W.; BENDER, M.A.; BREWEN, J.G.; CARRANO, A.V.; HEDDLE, J.A.; MCFEE, A.F.; WOLF, S.; WASSOM, J.S. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of de U. S. EPA's Gene-Tox Program, **Mutation Research**, v. 87, p. 143-188, 1981.

PRESTON, R. J. Short/medium term carcinogenicity tests and genetic and related effects. **IARC Meeting**, France, 1997.

RABELLO-GAY, M.N. Teste do Micronúcleo em medula óssea. In: **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese. Métodos e critérios de avaliação**. Ed. Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. L. R.; Monteleone-Neto, R. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP, 1991.

RUSSEL, P.J., 2002. Chromosomal mutations, in: B. Cummings (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595-621, 2002.

SASAKI, Y.F.; SAKAGUCHI, M.; YAMAGISHI, T.; YAMADA, H.; SHIRASU, Y.. Bio-anticlastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil-docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 320, p. 9-22, 1994

SKJELBRED, C. F.; SVENDEN; M. HAUGAN, V.; EEK, A. D.; CLAUSEN, K. O.; SVENDSEN, M. V.; HANSTEEN, I. Influence of DNA repair gene polymorphisms of *hOGG1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC2* and the folate metabolism gene *MTHFR* on chromosomal aberration frequencies. **Mutation Research**, 602, 151-162, 2006.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 387-395, 2000.

SWIERENGA, S. H. H.; HEDDLE, J. A.; SIGAL, E. A.; GILMAN, J. P.; BRILLINGER, R. L.; DOUGLAS, G. R.; NESTMANN, E. R. Recommended protocols based in a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, I. V. Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 246, p. 301-322, 1991.

TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidias. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.

VEIGA JR.; V.F., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.

## 2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo verificar os possíveis efeitos citotóxico, genotóxico, mutagênico, bem como os possíveis efeitos protetores do extrato metanólico da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), utilizando como parâmetros o teste de sobrevivência celular, o ensaio do cometa e o teste de aberrações cromossômicas em células de mamífero *in vitro*.

### 3. ARTIGO 1

#### **Genotoxicity and antigenotoxicity of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V-79 cells**

Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos<sup>a</sup>, Fernanda Shimabukuro<sup>a</sup>, Maria Aparecida Medeiros Maciel<sup>b</sup>, Ilce Mara de Syllos Cólus<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Running title: Antigenotoxicity of cashew

\*Corresponding author:

+55.43.3371-4527

e-mail: [colus@sercomtel.com.br](mailto:colus@sercomtel.com.br)

Artigo a ser submetido ao periódico Toxicology In Vitro

## Abstract

The use of plants for treatments of diseases has been occurring more and more by people, although there are only a few studies that prove these effects. Among these plants is the *Anacardium occidentale*, popularly known as cashew. The present study evaluated, *in vitro*, the possible genotoxic and protective activities of the methanolic extract of the stem bark of the cashew (*Anacardium occidentale*) using methyl methanesulfonate (MMS) as the positive control, to compare the possible mechanisms of induction of DNA damages in the Comet assay. The antigenotoxicity protocols used were pre, simultaneous and posttreatment in relation to MMS. In the assessment of genotoxicity and antigenotoxicity, besides the MMS, PBS was used as the negative control and three concentrations of the extract of *A. occidentale* (500 µg/mL, 1000 µg/mL and 2000 µg/mL) were used in Chinese hamster lung fibroblasts – V79 cells. The Comet assay revealed that the two lower concentrations tested did not present genotoxic activity and the higher one presented genotoxicity. All of the concentrations showed a protective activity in the simultaneous and post treatment in relation to MMS. Future studies are necessary to identify the substances that compose the extract and to better understand the antigenotoxic mechanism detected in this study.

## 1. Introduction

One of the major influences on cancer risk appears to be diet (Ferguson, 1999). In the last decades, many compounds of the diet like vegetables, fruits and substances derived from plants are being studied to identify the constituents that could have beneficial effects to health (Paolini and Nestle, 2003; Knasmüller et al., 2002; Ferguson, 1999; DeMarini, 1998).

The specie *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, it popularly known as cashew and it is characterized as a leafy tree, easily found in Brazil, especially in the northeast region (Correa, 1978). *A. occidentale* L. is indicate to therapeutic uses, like to combat to hypertension, antidiareic and antiinflammatory activities (Mota et al., 1985). Pre-clinical studies with isolated metabolites demonstrated bactericidal and antipyretic effects of the anacardic acid, a compound present in high concentrations in the cashew (Eichbaum, 1988). The activity against leishmania was verified by França et al. (1993) in extracts obtained of the plant.

The cashew tree is used in the production of armatures for airplanes, floor tiles laminates resins, besides serving as a component to varnishes, adhesives, paints and even to plastic brake linings (Morton, 1961). Regarding its nutritional values, the pseudofruit contributes to human nutrition by supplying vitamin C, averaging 269 mg/100 g of juice, five times higher than that of orange juice (Maciel et al., 1986). It is also a rich source of precursors of vitamins A (Cecchi and Rodriguez-Amaya, 1981).

Members of the family Anacardiaceae, including cashew are the most know sources of resorcinolic lipids and phenolics, which they exhibit antioxidant properties (Kozubek et al., 2001). The cashew nut presents high concentrations of tannins, mono and polyunsaturated fatty acids, proteins and sugars (Venkatachalam and Sathe, 2006).

Some studies were done to evaluate the possible mutagenic or antimutagenic potential of *A. occidentale* L. or its constituents. Cavalcante et al. (2003) studied the cashew juice and verified, besides its nutritional benefits, bactericidal and antitumoral potentials. The tannic acid, a compound present in the cashew, presented antimutagenic effect in *Salmonella thyphimurium* TA 98 (Chen and Chung, 2000) and reduction in the frequency of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary (CHO) cells (Kuo et al., 1992).

In the present study, the methanolic extract obtained of the stem bark of the cashew (*Anacardium occidentale*) was used to assess the possible genotoxic or protective effects against DNA damages induced by methyl methanesulfonate (MMS) in mammalian culture cells *in vitro*, using the Comet assay.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Cell line and culture conditions

Chinese hamster lung fibroblasts (V79) were kindly provided by Prof. Dr. Sakamoto-Hojo (F.F.C.L. – Ribeirão Preto/USP). Cells were grown at 37° C in 10 mL DMEM/Ham-F-10 (1:1) medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), antibiotics (penicillin 0.06 g/L and streptomycin 0.12 g/L – Sigma) and HEPES (2.38 g/L – Sigma) in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Nunc).

### 2.2 Chemicals

As recommended by the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (Tice et al., 2000), for the positive control we used the mutagenic alkylant agent methyl methanesulfonate (MMS - CAS: 66-27-3, Aldrich) dissolved and diluted in phosphate-buffered saline (PBS) in a final concentration in culture medium of  $4 \times 10^{-4}$  M in all cases.

Agarose LMP (low melting point, CAS: 9012-36-6, Gibco) at 0.5% (w/v) and agarose NMP (normal melting point, CAS: 9012-36-6, Gibco) at 1.5% (w/v) were dissolved in Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free PBS.

### 2.3 Extract

The extract used was provided by the Chemistry Department of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN). The stem bark of *Anacardium occidentale* were collected in Natal, Capital City of Rio Grande do Norte, were identified by Maria Iracema Bezerra Loiola. A voucher specimen (number 1782) has been deposited in Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal- Brazil)

The adopted method in the phytochemical investigation involved the extraction of the powdered bark (1.3 kg) with MeOH in a Soxhlet apparatus, affording 62.28g. The MeOH extract was chromatography over silica gel column giving two different chemical-type fractions of a fixed oil rich in apolar hydrocarbon constituents and a polar tannin fraction.

The methanolic extract of the stem bark of the cashew (*Anacardium occidentale*) was diluted in water and used in three different concentrations at the genotoxicity and antigenotoxicity protocols.

### 2.4 Cell viability assay

In the experiments of cell viability, the cell lineage was treated with the concentrations of 500; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000 and 6000  $\mu\text{g/mL}$  of the cashew's stem bark, besides the positive (MMS) and negative (PBS) controls. The cultures were treated for two hours and afterwards trypsinized and 300 cells were seeded per flask of cultivation (3 flasks per concentration). The experiments lasted around 7 days, and the flasks were observed daily with a microscope of inverted objective. The culture medium was then removed, and the cellular colonies were washed with cold PBS and stained with Giemsa (1:20 phosphate buffer, pH 7.0) during 10 minutes. The colonies were counted with the assistance of a magnifying glass.

The results about cytotoxicity, determined the choice of three concentrations of the extract (500 µg/mL; 1000 µg/mL and 2000 µg/mL) to be evaluated in the genotoxicity and antigenotoxicity protocols.

### *2.5 Treatments*

Three totally independent experiments were performed to determine the genotoxicity and antigenotoxicity of the different concentrations of methanolic stem bark of the cashew. Positive (MMS) and negative (PBS) control groups were also included in the analysis. All experiments were carried out, in triplicate, using V79 cells between the 3<sup>rd</sup> and 8<sup>th</sup> culture passage after thawing. For the experiments, 10<sup>6</sup> cells were seeded into tissue-culture flasks, incubated for two cycles (24 h) in complete D-MEM/Ham-F-10 medium, washed with PBS and then submitted to one of the following treatments in serum-free medium: a) PBS for 2 h (negative control); b) MMS for 2 h (positive control); c) cashew extracts (500; 1000 and 2000 µg/mL) (extract treatment) for 2 h; d) extract plus MMS for 2 h (simultaneous-treatment); e) cashew extracts (500; 1000 and 2000 µg/mL) for 2 h before washing the cells and adding MMS for 2 h (pre-treatment with extracts); f) MMS for 2 h before washing the cells and adding cashew extracts (500; 1000 and 2000 µg/mL) for 2 h (post-treatment with extracts). Treatment “c” was the genotoxicity experiment and treatments “d”, “e” and “f” were the antigenotoxicity experiments.

### *2.6 Comet Assay*

The procedures reported by Singh et al. (1988) were used with minor modifications as described by Speit and Hartmann (1999). Briefly, a base layer of 1.5% NMP agarose was

placed on a microscope slide and 10  $\mu\text{L}$  of the V79 test cells suspended in 120  $\mu\text{L}$  of 0.5% LMP agarose at 37° C, were then spread on the base layer. A coverslip was added and the agarose was allowed to solidify at 4° C for 15 min, after which the coverslip was gently removed and the slide immersed in freshly made lysing solution composed by 89 mL a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10.0 and 1% sodium lauryl sarcosine) plus 10 mL of DMSO, 1 mL of Triton X-100; pH 10.0 at 4° C for at least 1h, protected from light. At the end of lysing period, slides were transferred to an electrophoresis box containing a high pH (13.0) buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) and incubated at 4° C for 20 min to allow the DNA to unwind. A current of 25 V (1.0 V/cm, 300 mA) was applied for 20 min, after which, the slides were submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethanol for 10 min.

The slides were stored overnight, briefly rinsed in distilled water, stained with 20 mg/mL ethidium bromide and covered with a coverslip. The stained nucleoids were immediately evaluated at 400X magnification using a Nikon fluorescence microscope fitted with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter.

### *2.7 Scoring procedures*

For each treatment, the extent and distribution of DNA damage indicated by the Comet assay were evaluated by examining 100 randomly selected and non-overlapping cells on the slides (*i.e.* 300 cells per treatment).

On each slide, the cells were visually scored and allocated to one of four classes (0, 1, 2 and 3) according to the tail size as follows: class 0, undamaged, no tail; class 1, a short tail with a length smaller than the diameter of the head (nucleus); class 2, tail length between 1 and 2 times the diameter of the head; and class 3, maximally damaged, with a long tail more

than twice the diameter of the head. The few comets observed with no head and those with almost all the DNA in the tail, or with a very wide tail, were excluded from the analysis since they could represent dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 300 comets was obtained according the formula of Manoharan and Banerjee (1985) with modifications:

$$\text{Score} = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$$

where n= number of cells in each class analyzed.

Thus, the total score could range from 0 to 300.

## *2.8 Statistical Analysis*

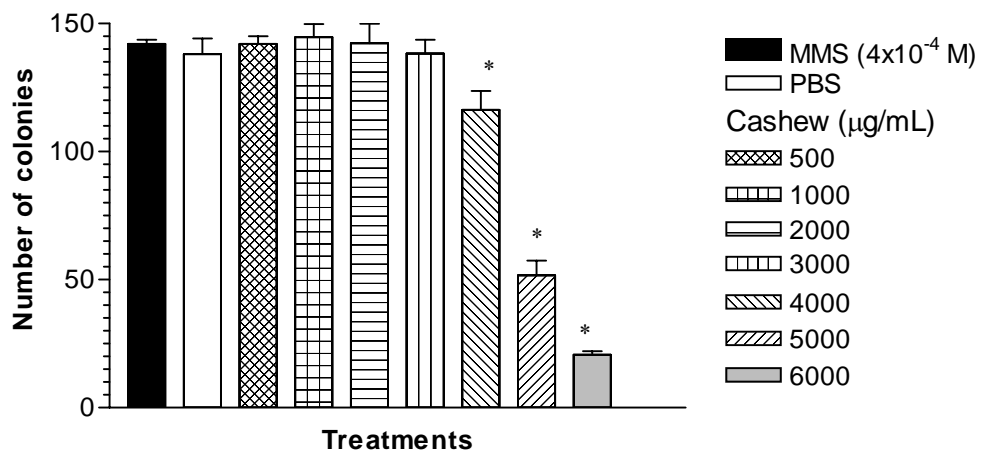
The means for the cellular survival test were calculated from three independent experiments. The ANOVA test ( $p < 0,05$ ) followed by the Dunett test were used to compare the averages of each treatment with the negative control.

The mean scores were calculated from three independent experiments for each treatment. The ANOVA ( $p < 0.05$ ) test followed by the Tukey test were used for comparing the means of each treatment with their negative control to assess the genotoxicity and with the positive control to assess the reduced genotoxicity.

## **3. Results**

### 3.1 Cell viability assay

The cell viability assay was used to obtain a dose-effect curve of the survival of the cells when exposed to different concentrations of the cashew's stem bark extract. After the analysis of variance test (ANOVA) and the Dunett test, it was observed that the cultures treated with the concentrations of 500; 1000; 2000 and 3000  $\mu\text{g/mL}$  of the extract and with the positive (MMS) and negative (PBS) control did not present significant differences between each other. Therefore, these concentrations did not present a cytotoxic effect ( $P \leq 0.05$ ). On the other hand, the cultures exposed to the concentrations of 4000; 5000 and 6000  $\mu\text{g/mL}$  of the extract did present significant difference when compared to the negative control (PBS), presenting a toxic effect on the cells ( $P \leq 0.05$ ). Thus, the concentrations of 500; 1000 and 2000  $\mu\text{g/mL}$  were chosen for the genotoxic and antigenotoxic evaluations (Figure 1).



**Figure 1:** Mean of the number of colonies formed after the exposure of the V79 cells to the concentrations of 500 to 6000  $\mu\text{g/mL}$  of the cashew's stem bark extract. 300 cells were seeded per flask of cultivation. \* Statistically different ( $P < 0.05$ ).

### 3.2 Genotoxicity assessment

The concentrations of 500  $\mu\text{g/mL}$  and 1000  $\mu\text{g/mL}$  of the methanolic extract of the stem bark of the *A. occidentale* did not demonstrate genotoxic effect in V79 cell culture *in vitro*, since the means of scores obtained were statistically similar to the means of negative control. The mean scores obtained with the concentration of 2000  $\mu\text{g/mL}$  was statistically different from that obtained with PBS treatment, what indicates a genotoxic activity (Table 1).

**Table 1** – Number of cells observed in each comet class in a total of 300 analyzed cells per treatment and their respective mean scores to assess the genotoxicity of three different concentrations of the methanolic extract of the cashew's stem bark in V79 cells *in vitro*.

| Treatment                       | Comet Class |    |    |    | Number of DC | Score | Mean $\pm$ SD                  |
|---------------------------------|-------------|----|----|----|--------------|-------|--------------------------------|
|                                 | 0           | 1  | 2  | 3  |              |       |                                |
| PBS<br>(20 $\mu$ L)             | 92          | 8  | 0  | 0  | 8            | 8     | 19.33 $\pm$ 18.77 <sup>a</sup> |
|                                 | 91          | 9  | 0  | 0  | 9            | 9     |                                |
|                                 | 61          | 37 | 2  | 0  | 39           | 41    |                                |
| MMS<br>(4 x 10 <sup>-4</sup> M) | 0           | 1  | 65 | 34 | 100          | 233   | 239 $\pm$ 17.77 <sup>b</sup>   |
|                                 | 0           | 5  | 65 | 30 | 100          | 225   |                                |
|                                 | 0           | 0  | 41 | 59 | 100          | 259   |                                |
| Extract<br>( $\mu$ g/mL)        | 87          | 13 | 0  | 0  | 13           | 13    | 25 $\pm$ 23.43 <sup>a</sup>    |
|                                 | 90          | 10 | 0  | 0  | 10           | 10    |                                |
|                                 | 56          | 36 | 8  | 0  | 36           | 52    |                                |
| 1000                            | 84          | 15 | 1  | 0  | 16           | 17    | 51.33 $\pm$ 44.04 <sup>a</sup> |
|                                 | 71          | 22 | 7  | 0  | 29           | 36    |                                |
|                                 | 3           | 93 | 4  | 0  | 97           | 101   |                                |
| 2000                            | 5           | 87 | 8  | 0  | 95           | 103   | 108 $\pm$ 12.28 <sup>c</sup>   |
|                                 | 5           | 89 | 5  | 1  | 95           | 99    |                                |
|                                 | 0           | 78 | 22 | 0  | 100          | 122   |                                |

PBS: control; MMS: methyl methanesulfonate; SD: standard deviation; DC: damage cells. Means with the same letter do not differ statistically ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.3 Antigenotoxicity assessment

In the pre-treatment, the only concentration that presented significant antigenotoxic activity was the 1000  $\mu$ g/mL. The values of scores obtained to other concentrations were statistically similar to the positive control (Table 2).

The Comet assay indicated significant antigenotoxic activity of the methanolic extract of the stem bark of the *A. occidentale* in the simultaneous treatment (Table 3) and in post treatment (Table 4). All concentrations presented protective activity, that is, the results

were statistically different from that obtained in the MMS treatment alone, indicating a reduction of DNA damage caused by MMS.

**Table 2**– Number of cells observed in each comet class in a total of 300 analyzed cells per treatment and their respective mean scores to assess the antigenotoxicity regarding the MMS in the pre-treatment with three different concentrations of the methanolic extract of the cashew's stem bark in V79 cells *in vitro*.

| Treatment                                    | Comet Class |    |    |    | Number of |       | Mean $\pm$ SD                   |
|--|-------------|----|----|----|-----------|-------|---------------------------------|
|  | 0           | 1  | 2  | 3  | DC        | score |                                 |
| PBS<br>(20 $\mu$ L)                          | 93          | 7  | 0  | 0  | 7         | 7     | 8.33 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>    |
|  | 88          | 12 | 0  | 0  | 12        | 12    |                                 |
|  | 94          | 6  | 0  | 0  | 6         | 6     |                                 |
| MMS<br>(4 x 10 <sup>-4</sup> M)              | 0           | 0  | 73 | 27 | 100       | 227   | 217.66 $\pm$ 8.32 <sup>b</sup>  |
|  | 0           | 0  | 89 | 11 | 100       | 211   |                                 |
|  | 0           | 0  | 85 | 15 | 100       | 215   |                                 |
| Extract ( $\mu$ g/mL) +<br>MMS<br><b>500</b> | 0           | 14 | 76 | 10 | 100       | 196   | 196.33 $\pm$ 16.50 <sup>b</sup> |
|  | 0           | 0  | 87 | 13 | 100       | 213   |                                 |
|  | 0           | 25 | 70 | 5  | 100       | 180   |                                 |
| <b>1000</b>                                  | 0           | 82 | 18 | 0  | 100       | 118   | 110.66 $\pm$ 6.65 <sup>c</sup>  |
|  | 0           | 95 | 5  | 0  | 100       | 105   |                                 |
|  | 0           | 91 | 9  | 0  | 100       | 109   |                                 |
| <b>2000</b>                                  | 0           | 14 | 75 | 11 | 100       | 197   | 191.33 $\pm$ 4.93 <sup>b</sup>  |
|  | 0           | 17 | 78 | 5  | 100       | 188   |                                 |
|  | 0           | 18 | 75 | 7  | 100       | 189   |                                 |

PBS: control; MMS: methyl methanesulfonate; SD: standard deviation; DC: damage cells.  
Means with the same letter do not differ statistically ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 3**– Number of cells observed in each comet class in a total of 300 analyzed cells per treatment and their respective mean scores to assess the antigenotoxicity in the simultaneous treatment with three different concentrations of the methanolic extract of the cashew's stem bark and MMS in V79 cells *in vitro*.

| Treatment                       | Comet Class |    |    |    | Number of DC | score | Mean $\pm$ SD                  |                                 |
|---------------------------------|-------------|----|----|----|--------------|-------|--------------------------------|---------------------------------|
|                                 | 0           | 1  | 2  | 3  |              |       |                                |                                 |
| PBS<br>(20 $\mu$ L)             | 92          | 8  | 0  | 0  | 8            | 8     | 19.33 $\pm$ 18.77 <sup>a</sup> |                                 |
|                                 | 91          | 9  | 0  | 0  | 9            | 9     |                                |                                 |
|                                 | 61          | 37 | 2  | 0  | 39           | 41    |                                |                                 |
| MMS<br>(4 x 10 <sup>-4</sup> M) | 0           | 1  | 65 | 34 | 100          | 233   | 239 $\pm$ 17.77 <sup>b</sup>   |                                 |
|                                 | 0           | 5  | 65 | 30 | 100          | 225   |                                |                                 |
|                                 | 0           | 0  | 41 | 59 | 100          | 259   |                                |                                 |
| Extract ( $\mu$ g/mL)<br>+ MMS  | 500         | 0  | 43 | 50 | 7            | 100   | 164                            | 167 $\pm$ 21.65 <sup>c</sup>    |
|                                 |             | 0  | 18 | 74 | 8            | 100   | 190                            |                                 |
|                                 |             | 0  | 53 | 47 | 0            | 100   | 147                            |                                 |
|                                 | 1000        | 0  | 88 | 12 | 0            | 100   | 112                            | 112.33 $\pm$ 6.50 <sup>c</sup>  |
|                                 |             | 0  | 81 | 19 | 0            | 100   | 119                            |                                 |
|                                 |             | 0  | 94 | 6  | 0            | 100   | 106                            |                                 |
|                                 | 2000        | 0  | 92 | 8  | 0            | 100   | 108                            | 123.66 $\pm$ 30.66 <sup>c</sup> |
|                                 |             | 0  | 41 | 59 | 0            | 100   | 159                            |                                 |
|                                 |             | 0  | 96 | 4  | 0            | 100   | 104                            |                                 |

PBS: control; MMS: methyl methanesulfonate; SD: standard deviation; DC: of damage cells. Means with the same letter do not differ statistically ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 4**– Number of cells observed in each comet class in a total of 300 analyzed cells per treatment and their respective mean scores to assess the antigenotoxicity regarding the MMS in the post-treatment with three different concentrations of the methanolic extract of the cashew's stem bark in V79 cells *in vitro*.

| Treatment                       | Comet Class |    |    |    | Number of DC | score | Mean $\pm$ SD                  |
|---------------------------------|-------------|----|----|----|--------------|-------|--------------------------------|
|                                 | 0           | 1  | 2  | 3  |              |       |                                |
| PBS<br>(20 $\mu$ L)             | 93          | 7  | 0  | 0  | 7            | 7     | 8.33 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>   |
|                                 | 88          | 12 | 0  | 0  | 12           | 12    |                                |
|                                 | 94          | 6  | 0  | 0  | 6            | 6     |                                |
| MMS<br>(4 x 10 <sup>-4</sup> M) | 0           | 0  | 73 | 27 | 100          | 227   | 217.66 $\pm$ 8.32 <sup>b</sup> |
|                                 | 0           | 0  | 89 | 11 | 100          | 211   |                                |
|                                 | 0           | 0  | 85 | 15 | 100          | 215   |                                |
| MMS + Extract<br>( $\mu$ g/mL)  | 14          | 83 | 3  | 0  | 86           | 89    | 84.66 $\pm$ 16.92 <sup>c</sup> |
|                                 | 500         | 4  | 93 | 3  | 0            | 96    |                                |
|                                 | 35          | 64 | 1  | 0  | 65           | 66    |                                |
| 1000                            | 40          | 56 | 4  | 0  | 60           | 64    | 77 $\pm$ 17.57 <sup>c</sup>    |
|                                 | 7           | 89 | 4  | 0  | 93           | 97    |                                |
|                                 | 30          | 70 | 0  | 0  | 70           | 70    |                                |
| 2000                            | 11          | 82 | 7  | 0  | 89           | 96    | 99.66 $\pm$ 3.21 <sup>c</sup>  |
|                                 | 4           | 91 | 5  | 0  | 96           | 101   |                                |
|                                 | 6           | 86 | 8  | 0  | 94           | 102   |                                |

PBS: control; MMS: methyl methanesulfonate; SD: standard deviation; DC: damage cells. Means with the same letter do not differ statistically ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Epidemiological studies suggest that over two-thirds of cancers might be prevented through lifestyle modification (Ferguson, 1999). The dietary imbalance is one of the major influences on cancer risk, especially the lack of sufficient amounts of dietary fruits and vegetables (Ames and Gold, 1997).

In the present study, the concentrations of 500; 1000; 2000 e 3000  $\mu$ g/mL of the methanolic extract of stem bark of the cashew did not show cytotoxic effect when compared to negative control while the concentrations of 4000; 5000 and 6000  $\mu$ g/mL were cytotoxic. Studies with different strains of *S. typhimurium* have indicated that extracts or oils obtained of

*Anacardium* genus have shown cytotoxicity in high concentrations (George and Kuttan, 1997; Santos, F.V., personal communication).

In the face of the several benefits already described for the cashew's stem bark, the present study evaluated the genotoxic and antigenotoxic effects of three concentrations of the methanolic extract of cashew's stem bark (*A. Occidentale* L.) using the Comet assay.

The absence of genotoxicity was observed in V79 cells submitted to two concentrations of the extract: 500 µg/mL and 1000 µg/mL. The concentration of 2000 µg/mL presented a significant amount of cells with DNA damages when compared to the negative control. However, the damage class predominant after the treatment of the cells with 2000 µg/mL is mainly class 1, considered with low amount of damage and thus, with possibility of repair of the DNA damage. The mean score obtained for this treatment is 54,82% lower than the positive control, so the genotoxic activity presented can be considered as light. In another work done by our group using the concentration of 2000 µg/mL from the same extract in chromosomic aberration *in vitro* test, this concentration did not show mutagenic activity. Therefore, we can suggest that the lesion of genetic material observed in the Comet assay is passible for correction, since the result of the chromosomic aberration test (which detects already established lesions originated from DNA strand breaks) was negative.

Cavalcante et al. (2003) evaluated the fresh and processed (cajuina) cashew juice and characterized as complex mixtures, containing high concentrations of vitamin C, various carotenoids, phenolics compounds and metals. The tests with fresh and processed cashew juice, in *Salmonella typhimurium* indicated that *A. occidentale* have shown mutagenic, antimutagenic and co-mutagenic activity and these properties might be related with the chemical compounds of the juice.

The low concentrations of the cashew's stem bark methanolic extract seem to be the most indicated for consumption, since George and Kuttan (1997) treated strains of *S.*

*tyhimurium* with different concentrations of extract of cashewnut shell and demonstrated absence of mutagenicity in lower doses, while the higher concentration have shown cytotoxicity. Our results for cytotoxicity and genotoxicity confirm these data.

In the present study, to assess the antigenotoxicity of the cashew's stem bark extract, different treatments were used: pre, simultaneous and post treatments in relation to the DNA damage inducer agent, methyl methanesulfonate (MMS). MMS is a direct monofunctional alkylating agent that has the ability to break the DNA strands directly; it is able to form monoadducts in the DNA and *crosslinks* that are expressed as mutations involving different substitutions of bases.

In pre-treatment experiments, effective antimutagenic agents are capable to induce some metabolizing enzymes, which act as metabolic inactivators chemical or enzymatic of mutagenic agents or inhibit the activation of pro-mutagens (Kada et al., 1982; Kuroda et al., 1992). In the present study was observed in pre-treatment that only the 1000 µg/mL concentration had a protective effect, acting as a desmutagenic agent.

Desmutagenic agents are compounds that act directly on mutagens or on their precursors to inactivate them; they can bind to the mutagenic compound in an irreversible way, inactivating it chemically through a direct link or inhibiting the activation by the modulation of the enzymes of phase I and II (Kada et al., 1982). However, in the present study, it may be discharged the possibility of a modulation of these enzymes, because the used cells (Chinese hamster lung fibroblasts – V79) practically do not present this active metabolism system *in vitro*. Therefore, the methanolic extract of the stem bark of the cashew did not present a relevant protective effect when the V-79 cells were treated with the extract before of MMS treatment, that is, the extract used did not present a prominent desmutagenic activity. Although in the present study the protective activity have been observed only with 1000 µg/mL, there is the possibility that in the same kind of protocol,

other times of exposition of the cells or other extract concentrations may also lead to protecting effects.

When the simultaneous and post-treatments were used, the antigenotoxic activity was observed in all extract's concentrations evaluated. The three concentrations reduced the damages caused by MMS. In these kinds of treatments when the protective action is observed, generally it is by bio-antimutagenesis although on simultaneous treatments can be occurring desmutagenesis mechanisms. The bio-antimutagenic agents act on the physiologic mechanisms of DNA protection and repair, reverting the mutagenic effects and not allowing the fixation of mutations (Kada et al., 1982; De Flora, 1998). Therefore, the *A. occidentale* stem bark's methanolic extract probably acted as a bio-antimutagenic agent, because the protective effect was observed in the simultaneous treatment and confirmed in the post-treatment scheme, which showed a better efficient antimutagenic effect.

In the present study the dose of 2000 µg/mL showed genotoxicity and antigenotoxicity activities. This indicates that some compounds of this extract can be acting as “Janus carcinogens and mutagens” that, according von Borstel and Higgins (1998), are mutagenic agents that, under differing conditions of cell type or exposure, also are antimutagenic.

Cavalcante et al. (2005) assessed cashew juices (fresh and processed) to verify its inhibitory actions against mutations induced by Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), using the Ames test in different treatment protocols. Both juices presented antioxidant potential and suppressed the mutagenicity of hydrogen peroxide in simultaneous and post-treatments. According to the authors, the analyzed juices were considered promising candidates for control of mutagenicity induced by AFB<sub>1</sub>, and can be considered healthy food with anti-carcinogenic potency.

The data of the present study in eukaryote cells *in vitro* summed to the Cavalcante et al. (2005) with bacterias indicate the bio-antimutagenicity as the action mechanism most

probable of the compounds present in the *Anacardium occidentale*. Cavalcante et al. (2003) suggest that this anti-mutagenic potential can be attributed to the natural compounds of cashew, such as carotenoids, phenols, tannins, anacardic acid and ascorbic acid, all with antioxidants and anti-mutagenic properties.

The chemistry analysis of the methanolic extract of the stem bark of the cashew used in this work have shown a high concentration of tannins (Maciel, M.A.M. Personal communication). Chen and Chung (2000) evidenced that the tannin acid and its hydrolyzed compounds did not present mutagenic effect in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100, in the absence or in the presence of S9 fraction. The tannic acid presented antimutagenic effect in *S. typhimurium* TA 98 in the presence of S9 fraction against benzidine, 4-aminobiphenyl, 3,3'-4,4'-tetraaminobiphenyl and *N,N-N',N'*-tetramethylbenzidine (Chen and Chung, 2000); 1-nitropyrene (1-NP) and 1.6 dinitropyrene (1.6-DNP) and reduced the frequency of sister chromatid exchanges and the cytotoxicity induced by 1-NP and 1.6-DNP in CHO cells (Kuo et al., 1992).

According to Inyang et al. (1997), the cashew juice presents high concentrations of vitamin C (VitC), so it can be considered a natural source of this nutrient. Franke et al. (2005) investigated the genotoxic effect of two doses of VitC associated with direct and indirect mutagens in cells of mice *in vivo*, using the comet assay. DNA damage caused by MMS was significantly reduced by the lower dose, but not by the higher dose of VitC. In the present study, the two lowers concentrations of cashew's stem bark extract assessed in V79 cells, were the ones that did not induce primary lesions in the DNA. These results and a lot of others related to *A. occidentale* L. or its constituents suggest beneficial effects from this extract, especially if used in low concentrations which they can be used for prevention of some diseases. However, there is still the need to carry out future studies that might elucidate the antigenotoxic mechanism of the cashew observed in this work.

## References

- Ames, B.N., Gold, L.S., 1997. The prevention of cancer. *Drug Metabolism Reviews* 30, 201-223.
- Cavalcante, A.A.M., Rübensam, G., Picada J.N., Gomes da Silva, E., Fonseca Moreira JC, Henriques J.A., 2003. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41, 360-369.
- Cavalcante, A.A.M., Rübensam, G., Erdtmann, B., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2005. Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. typhimurium* TA 102. *Genetics and Molecular Biology* 28, 328-333.
- Cecchi, H.M., Rodriguez-Amaya, D.B., 1981. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew apple juice. *Journal of Food Science* 46, 147-149.
- Chen, S., Chung, K., 2000. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Food and Chemical Toxicology* 38, 1-5.
- Correa, M.P., 1978. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. IBDF, Rio de Janeiro, p. 57. [in Portuguese]
- De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 402, 151-158.
- DeMarini, D.M., 1998. Dietary interventions of human carcinogenesis. *Mutation Research* 400, 457-465.
- Eichbaum, F.W., 1988. Biological properties of anacardic acid (O-pentadecadienyl-salicylic acid) and related compounds. *Memórias do Instituto Butantã*, 19, 119-133. [in Portuguese]
- Ferguson, L.R., 1999. Prospects for cancer prevention. *Mutation Research* 428, 329-338.
- França, F., Cuba, C.A., Moreira, E.A., Miguel, O., Almeida, M., das Virgens, M. L., Marsden, P.D., 1993. An evaluation of the effect of a bark extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) on infection by *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 26, 151-155. [in Portuguese]
- Franke S.I.R., Prá, D., Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P., 2005. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research* 583, 75-84.
- George, J., Kuttan, R., 1997. Mutagenic, carcinogenic and cocarcinogenic activity of cashewnut shell liquid. *Cancer letters* 112, 11-16.

Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity of edible mushroom in a histidine-independent bacterial test system. *Food and Chemical Toxicology*, 29, 159-165.

Inyang, U.E., Abah, U.J., 1997. Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice. *Plant Foods for Human Nutrition* 50, 295-300.

Kada T., Inoue T., Namiki N., 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowsky, E.J. (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, pp. 137-151.

Knasmüller S., Steinkellner H.B.J., Majer E.C., Nobis G., Scharf G., Kassie F., 2002. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1051-1062.

Kozubek, A., Zamowski, R., Stasiuk, M., Gubernator, J., 2001. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds. *Cellular & Molecular Biology Letters* 6, 351-355.

Kuo, M.L., Lee, K.C., Lin, J.K., 1992. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutation Research* 270, 87-95.

Kuroda, Y., Jain, K.A., Tezuka, H., Kada, T., 1992. Anmutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research* 267, 201-209.

Maciel, M.I., Hansen, J.T., Aldinger, S.B., Labows, J.N., 1986. Flavor chemistry of cashew apple juice. *Journal of Agricultural and Chemistry* 34, 923-927.

Manoharan, K; Banerjee, M.R., 1985.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, 9, 783-789.

Mota, M.L.R., Thomas, G., Barbosa Filho, J.M., 1985. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology* 13, 289-300.

Morton, J.F., 1961. The cashews brighter future. *Economic Botany* 15, 57-78.

Paolini, M. and Nestle, M., 2003. Pitfalls of enzyme-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. *Mutation Research* 543, 181-189.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.

Speit, G., Hatmann, A., 1999. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (ed). *Methods in molecular biology*, 113 DNA-repair protocols: eukaryotic systems. Human Press Inc., Totowa, pp 203-212.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. Miyamae, Y., Rojas, E., Ruy, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

Venkatachalam, M., Sathe, S.K., 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Chemistry* 54, 4705-4714.

Von Borstel, R.C., Higgins, J.A., 1998. Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research* 402, 321-329.

## 4. ARTIGO 2

### **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato da casca do cajueiro *in vitro***

Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos<sup>a</sup>, Fernanda Shimabukuro<sup>a</sup>, Mateus Pratis Mori<sup>a</sup>, Maria Aparecida Medeiros Maciel<sup>b</sup>, Ilce Mara de Syllos Cólus<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

\*Corresponding author:  
+55.43.3371-4527  
e-mail: [colus@sercomtel.com.br](mailto:colus@sercomtel.com.br)

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology

## Resumo

As plantas continuam a ser uma grande fonte de medicamentos para a humanidade. Dentre elas, está a espécie *Anacardium occidentale* L., popularmente conhecida como cajueiro, o qual possui indicações terapêuticas variadas, tais como: cicatrizante, antihipertensivo, hipoglicêmico e antitumoral. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a mutagenicidade e a antimutagenicidade do extrato metanólico da casca do cajueiro em culturas de células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79). As culturas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (500; 1000 e 2000 µg/ml) ou com os extratos associados com doxorrubicina (DXR) (0,75 µg/mL), nas fases G1, S e G2 do ciclo celular e também em tratamento contínuo. Além destes tratamentos, culturas de células foram tratadas com PBS (controle-negativo) e DXR (controle-positivo). Os dados obtidos no teste de aberrações cromossômicas (AC) mostraram uma significativa redução na frequência de AC nas culturas tratadas com o extrato e DXR em relação àquelas que receberam somente DXR, nas fases G1 e S do ciclo celular e em todo o ciclo, bem como ausência de mutagenicidade em todos os tratamentos realizados. O efeito antimutagênico observado neste trabalho reforça as propriedades terapêuticas já descritas para o caju e sinaliza um uso mais seguro deste extrato.

## 1. Introdução

Nos últimos 20 anos, o interesse pelas plantas medicinais tem aumentado o volume de investigações sobre seus efeitos biológicos em seres humanos e animais (Veiga Jr. e Maciel, 2005). Dentre as plantas utilizadas para fins terapêuticos, está a espécie *Anacardium occidentale* L., pertencente à família Anacardiaceae e popularmente conhecida como cajueiro.

Caracteriza-se por ser uma árvore frondosa, facilmente encontrada em todo o Brasil, sendo mais abundante na região nordeste (Correa, 1978).

Existem vários relatos na literatura demonstrando o uso de folhas, cascas, caule e frutos desta espécie na medicina popular. A casca do tronco é adstringente, rica em tanino, o que justificaria sua indicação popular como cicatrizante. Também é indicada no combate à hipertensão, no tratamento de distúrbios gástricos, como anti-inflamatório (Mota et al., 1985) e bactericida (Akinpelu, 2000). A infusão das cascas do cajueiro apresenta propriedades analgésicas, afrodisíacas, sendo também indicada para cólicas intestinais, úlceras gástricas, asma e bronquites. A castanha do fruto produz uma resina com propriedades anti-sépticas, vermífugas e vesicantes (Correa, 1978) e foi observada uma forte capacidade antioxidante contra a hepatocarcinogênese induzida pela aflatoxina B1 em ratos Wistar (Premalatha e Sachdandaum, 1999).

Estudos pré-clínicos realizados com metabólitos isolados da casca da árvore desta espécie demonstraram ação antipirética para o ácido anacárdico (Eichbaum, 1988) e a atividade antiinflamatória foi correlacionada com o extrato metanólico, com frações hidroalcoólicas obtidas de extrato etanólico e com taninos isolados destas frações (Mota et al., 1985). A atividade contra leishmania foi verificada por França et al. (1993).

Polasa e Rukmini (1987) realizaram testes mutagênicos com óleo vegetal da castanha do caju e este apresentou-se mutagênico, com ou sem ativação da fração S-9 em *Salmonella typhimurium*. Entretanto, Chen and Chung (2000) demonstraram que o ácido tanínico, composto presente no caju (Venkatachalaman e Sathe, 2006), apresentou efeito antimutagênico em *Salmonella typhimurium* linhagem TA 98. Kuo et al. (1992) também realizaram estudos com o ácido tanínico e observaram uma redução na frequência de trocas entre cromátides irmãs em células de ovário de hamster Chinês (CHO). Cavalcante et al.

(2003) verificaram que o suco do caju, além de seu benefício nutricional, apresentou atividades bactericida e antimutagênica.

Diante do grande consumo do caju na alimentação da população brasileira, seja em forma de suco ou *in natura*, dos proeminentes potenciais terapêuticos atribuídos à casca do tronco do cajueiro e dos poucos estudos para compreensão de seu mecanismo de ação, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar a possível mutagenicidade ou antimutagenicidade do extrato metanólico da casca do cajueiro (EMCC) contra danos no material genético de células V79 induzidos pelo quimioterápico doxorubicina (DXR), utilizando o teste de aberrações cromossômicas (AC).

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Extrato*

O EMCC foi gentilmente fornecido pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O método adotado na investigação fitoquímica envolveu a extração da casca triturada (pó) (1.3 kg) com metanol em um aparato Soxhlet. O extrato metanólico passou por separação cromatográfica em coluna de gel de sílica, originando dois diferentes tipos de frações químicas, uma rica em óleo (constituintes apolares) e uma fração polar rica em taninos.

O extrato metanólico da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi diluído em água. As concentrações de 500; 1000 e 2000 µg/mL de meio de cultura foram utilizadas para a avaliação das atividades mutagênicas e antimutagênicas deste extrato e foram determinadas previamente a partir de experimentos de citotoxicidade (Barcelos et al., dados não publicados).

## 2.2 Linhagem celular e cultivo

As células de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79) foram gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Sakamoto-Hojo (F.F.C.L. – Ribeirão Preto/USP). As células foram cultivadas em frascos plásticos de cultura (25 cm<sup>2</sup>, Nunc) em meio de cultura HAM-F10 (Gibco) e DMEM (Gibco) (1:1), suplementado com 10% de soro bovino fetal, antibióticos (0,01 mg/mL streptomicina e 0,005 mg/mL de penicilina; Sigma) e 2,38 mg/mL de HEPES (Sigma) em estufa BOD a 37° C.

## 2.3 Tratamentos

As células foram cultivadas durante o período de 20 horas em meio de cultura completo, lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio novo sem soro para a realização dos seguintes tratamentos: controle negativo (PBS, 10µL/mL); controle positivo (DXR, 0,75 µg/mL); tratamentos com o EMCC em três concentrações (500; 1000 e 2000 µg/mL) e tratamentos simultâneos, onde o EMCC foi adicionado à cultura concomitantemente com a DXR. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as células foram expostas pelo período de uma hora nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, 12, 8 e 3 horas antes da fixação, respectivamente (Preston et al., 1981). Foi realizado também tratamento simultâneo contínuo, onde as células permaneceram expostas ao EMCC e DXR pelo período de 12 horas (aproximadamente 1 ciclo de divisão celular) em meio de cultura completo. Visando a obtenção de células metafásicas, empregou-se a técnica de Preston et al. (1981) onde Colcemide (Demecolcine, 5µg/mL – Sigma) foi adicionado às culturas duas horas antes da fixação. As preparações citológicas foram coradas com Giemsa 3% por 5 minutos.

#### 2.4 Análise das lâminas

Para a avaliação de AC, foram analisadas 100 células por repetição, totalizando 300 metáfases por tratamento, as quais foram observadas em microscópio óptico (Nikon, com amplificação de 1000 X). As AC foram classificadas de acordo com Savage (1975) e o índice mitótico (número de metáfases dentre 1000 células analisadas, para cada repetição) foi calculado. A capacidade do EMCC reduzir danos promovidos pela DXR foi calculada pela fórmula (Waters et al., 1990):

$$\%R = \frac{A - B}{A - C}$$

onde: %R = Porcentagem de Redução

A: Frequência de AC após o tratamento com DXR

B: Frequência de AC após o tratamento com EMCC e DXR

C: Frequência de AC após o tratamento com PBS

#### 2.5 Análise estatística

As frequências médias de aberrações cromossômicas e índice mitótico foram calculadas a partir de dados obtidos em três experimentos independentes. Os testes de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ) seguido pelo teste de Dum foram usados para a comparação das médias entre si.

### 3. Resultados

#### 1. Mutagenicidade

As frequências médias de AC observadas após o uso das concentrações de 500; 1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$  do EMCC em todos os tratamentos simultâneos realizados (tratamento contínuo e nas fases G1, S e G2 do ciclo celular) em culturas de células V79 *in vitro* foram estatisticamente semelhantes às obtidas no grupo controle negativo (PBS), ou seja, não apresentaram efeito mutagênico (Tabelas I, II, III e IV). Os valores obtidos para os índices mitóticos de todos os tratamentos realizados em todas as fases do ciclo celular não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabelas I, II, III e IV).

#### 2. Antimutagenicidade

Todas as concentrações do EMCC em tratamento simultâneo com a DXR durante tratamento contínuo apresentaram efeito antimutagênico, pois frequências médias de AC foram estatisticamente diferentes daquelas obtidas no grupo controle-positivo (DXR), sendo que a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  reduziu os danos aos níveis do controle-negativo (Tabela I).

No tratamento realizado durante a fase G1 do ciclo celular, foi observado efeito antimutagênico das concentrações de 500 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  não apresentou redução de danos cromossômicos quando comparados os dados com os do grupo positivo (DXR) (Tabela II). No tratamento realizado durante a fase S do ciclo celular, somente a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  exerceu efeito antimutagênico. As médias das frequências de AC obtidas com as demais concentrações (1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram-se estatisticamente semelhantes às do controle positivo (Tabela III). Já no tratamento

realizado na fase G2 do ciclo celular, nenhuma concentração exerceu efeito protetor aos danos causados pela DXR (Tabela IV).

Os valores de índices mitóticos de todos os tratamentos realizados em todas as fases do ciclo celular não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (Tabelas I, II, III e IV).

**Tabela I:** Frequências de aberrações cromossômicas (AC), porcentagem de redução de danos (% R) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células V79 submetidas ao tratamento simultâneo contínuo com diferentes concentrações do extrato metanólico da casca do cajueiro (EMCC), associado ou não com o quimioterápico doxorrubicina (DXR) e seus respectivos controles.

| Tratamentos      | Aberrações Cromossômicas |    |    |    |    | % R                        | IM (X ± DP) |             |
|------------------|--------------------------|----|----|----|----|----------------------------|-------------|-------------|
|                  | QC                       | Fr | Ex | Di | Fi |                            |             | Média ± DP  |
| PBS (10µL/mL)    | 3                        | 0  | 0  | 0  | 0  | 1,00 ± 1,00 <sup>a</sup>   | 7,20 ± 0,75 |             |
| DXR (0,75 µg/mL) | 18                       | 12 | 2  | 5  | 3  | 13,33 ± 0,58 <sup>b</sup>  | 5,80 ± 0,60 |             |
| EMCC (µg/mL)     |                          |    |    |    |    |                            |             |             |
| 500              | 3                        | 1  | 0  | 0  | 0  | 1,33 ± 1,15 <sup>a</sup>   | 7,80 ± 1,73 |             |
| 1000             | 1                        | 0  | 0  | 1  | 0  | 0,67 ± 0,58 <sup>a</sup>   | 8,83 ± 2,05 |             |
| 2000             | 3                        | 1  | 0  | 3  | 1  | 2,67 ± 1,53 <sup>a</sup>   | 7,43 ± 2,66 |             |
| EMCC + DXR       |                          |    |    |    |    |                            |             |             |
| 500 + 0,75       | 7                        | 3  | 1  | 4  | 1  | 5,33 ± 2,52 <sup>a,c</sup> | 68,57       | 7,57 ± 1,32 |
| 1000 + 0,75      | 9                        | 8  | 1  | 5  | 1  | 8,00 ± 2,00 <sup>c</sup>   | 45,71       | 7,37 ± 1,59 |
| 2000 + 0,75      | 11                       | 2  | 0  | 0  | 4  | 6,33 ± 3,05 <sup>c</sup>   | 60          | 6,37 ± 1,20 |

QC, quebras cromossômicas; Fr, fragmentos; Ex, “exchange”; Di, dicêntrico; Fi: figuras tri e quadrirradiais. Letras iguais são semelhante estatisticamente entre si (P≤0.05).

**Tabela II:** Frequências de aberrações cromossômicas (AC), porcentagem de redução de danos (% R) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células V79 submetidas ao tratamento simultâneo na fase G1 do ciclo celular com diferentes concentrações do extrato metanólico da casca do cajueiro (EMCC), associado ou não com o quimioterápico doxorrubicina (DXR) e seus respectivos controles.

| Tratamentos      | Aberrações Cromossômicas |    |    |    |    | % R                        | IM (X ± DP) |             |
|------------------|--------------------------|----|----|----|----|----------------------------|-------------|-------------|
|                  | QC                       | Fr | Ex | Di | Fi |                            |             | Média ± DP  |
| PBS (10µL/mL)    | 3                        | 2  | 0  | 1  | 0  | 2,00 ± 1,73 <sup>a</sup>   | 8,60 ± 1,40 |             |
| DXR (0,75 µg/mL) | 18                       | 8  | 2  | 7  | 5  | 14,00 ± 2,00 <sup>b</sup>  | 8,10 ± 2,90 |             |
| EMCC (mg/mL)     |                          |    |    |    |    |                            |             |             |
| 500              | 2                        | 2  | 0  | 2  | 3  | 3,00 ± 2,00 <sup>a</sup>   | 8,60 ± 0,92 |             |
| 1000             | 9                        | 6  | 0  | 0  | 0  | 5,00 ± 1,00 <sup>a,c</sup> | 9,00 ± 0,25 |             |
| 2000             | 9                        | 5  | 0  | 2  | 1  | 5,00 ± 1,00 <sup>a,c</sup> | 8,70 ± 1,57 |             |
| EMCC + DXR       |                          |    |    |    |    |                            |             |             |
| 500 + 0,75       | 11                       | 9  | 1  | 2  | 2  | 8,33 ± 1,15 <sup>c</sup>   | 48,57       | 8,13 ± 0,85 |
| 1000 + 0,75      | 14                       | 5  | 3  | 5  | 1  | 9,33 ± 2,89 <sup>b,c</sup> |             | 6,77 ± 0,51 |
| 2000 + 0,75      | 10                       | 7  | 1  | 8  | 1  | 9,00 ± 1,00 <sup>c</sup>   | 42,86       | 8,80 ± 0,10 |

QC, quebras cromossômicas; Fr, fragmentos; Ex, “exchange”; Di, dicêntrico; Fi: figuras tri e quadrirradiais. Letras iguais são semelhante estatisticamente entre si (P≤0.05).

**Tabela III:** Frequências de aberrações cromossômicas (AC), porcentagem de redução de danos (% R) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células V79 submetidas ao tratamento simultâneo na fase S do ciclo celular com diferentes concentrações do extrato metanólico da casca do cajueiro (EMCC), associado ou não com o quimioterápico doxorubicina (DXR) e seus respectivos controles.

| Tratamentos      | Aberrações Cromossômicas |    |    |    |    | % R                         | IM (X ± DP) |             |
|------------------|--------------------------|----|----|----|----|-----------------------------|-------------|-------------|
|                  | QC                       | Fr | Ex | Di | Fi |                             |             | Média ± DP  |
| PBS (10µL/mL)    | 5                        | 0  | 0  | 0  | 0  | 1,67 ± 0,58 <sup>a</sup>    | 7,73 ± 2,05 |             |
| DXR (0,75 µg/mL) | 11                       | 14 | 1  | 7  | 3  | 12,33 ± 1,53 <sup>b</sup>   | 8,37 ± 3,31 |             |
| EMCC (mg/mL)     |                          |    |    |    |    |                             |             |             |
| 500              | 3                        | 2  | 0  | 1  | 0  | 1,33 ± 1,52 <sup>a</sup>    | 8,80 ± 3,12 |             |
| 1000             | 5                        | 1  | 0  | 1  | 1  | 2,67 ± 0,58 <sup>a</sup>    | 8,10 ± 2,01 |             |
| 2000             | 6                        | 7  | 1  | 0  | 0  | 4,67 ± 0,58 <sup>a,c</sup>  | 6,73 ± 2,06 |             |
| EMCC + DXR       |                          |    |    |    |    |                             |             |             |
| 500 + 0,75       | 9                        | 19 | 2  | 4  | 2  | 7,67 ± 1,52 <sup>c,d</sup>  | 43,75       | 7,70 ± 2,31 |
| 1000 + 0,75      | 18                       | 7  | 1  | 3  | 2  | 9,00 ± 2,00 <sup>b,d</sup>  |             | 8,90 ± 1,81 |
| 2000 + 0,75      | 21                       | 4  | 0  | 3  | 1  | 10,33 ± 1,53 <sup>b,d</sup> |             | 8,33 ± 1,96 |

QC, quebras cromossômicas; Fr, fragmentos; Ex, “exchange”; Di, dicêntrico; Fi: figuras tri e quadrirradiais. Letras iguais são semelhante estatisticamente entre si ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela IV:** Frequências de aberrações cromossômicas (AC), porcentagem de redução de dano (% R) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células V79 submetidas ao tratamento simultâneo na fase G2 do ciclo celular com diferentes concentrações do extrato metanólico da casca do cajueiro (EMCC), associado ou não com o quimioterápico doxorubicina (DXR) e seus respectivos controles.

| Tratamentos      | Aberrações Cromossômicas |    |    |    |    | IM (X ± DP)                  |             |
|------------------|--------------------------|----|----|----|----|------------------------------|-------------|
|                  | QC                       | Fr | Ex | Di | Fi |                              | Média ± DP  |
| PBS (10µL/mL)    | 3                        | 1  | 0  | 0  | 0  | 1,33 ± 1,53 <sup>a</sup>     | 7,40 ± 0,53 |
| DXR (0,75 µg/mL) | 9                        | 12 | 2  | 9  | 2  | 11,33 ± 1,15 <sup>b</sup>    | 6,73 ± 0,81 |
| EMCC (mg/mL)     |                          |    |    |    |    |                              |             |
| 500              | 3                        | 3  | 0  | 1  | 0  | 2,33 ± 1,15 <sup>a,d</sup>   | 8,43 ± 1,53 |
| 1000             | 2                        | 3  | 0  | 4  | 0  | 3,33 ± 2,08 <sup>a,d</sup>   | 6,43 ± 0,23 |
| 2000             | 10                       | 2  | 0  | 0  | 1  | 4,33 ± 2,31 <sup>a,c,d</sup> | 6,90 ± 0,53 |
| EMCC + DXR       |                          |    |    |    |    |                              |             |
| 500 + 0,75       | 11                       | 11 | 1  | 5  | 2  | 9,67 ± 2,52 <sup>b,c</sup>   | 8,10 ± 0,89 |
| 1000 + 0,75      | 12                       | 6  | 0  | 0  | 0  | 5,67 ± 2,31 <sup>a,b,c</sup> | 8,10 ± 0,89 |
| 2000 + 0,75      | 10                       | 6  | 1  | 4  | 1  | 7,33 ± 2,52 <sup>b,c,d</sup> | 9,00 ± 1,25 |

QC, quebras cromossômicas; Fr, fragmentos; Ex, “exchange”; Di, dicêntrico; Fi: figuras tri e quadrirradiais. Letras iguais são semelhante estatisticamente entre si ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Akerele, 1993).

O presente trabalho avaliou a possível mutagenicidade e citotoxicidade do EMCC, bem como sua influência sobre os danos cromossômicos causados pelo quimioterápico doxorubicina nas fases do ciclo celular (G1, S e G2) e durante todo o ciclo, utilizando como parâmetro o teste de AC e IM. Os resultados mostraram que todas as concentrações do EMCC não exerceram efeito mutagênico em nenhuma fase do ciclo celular e nem quando avaliadas durante todo o ciclo. As células utilizadas neste experimento, por serem provenientes de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79), não apresenta capacidade de metabolização de drogas, não podendo, desta maneira, ativar e/ou detoxificar o agente mutagênico. Portanto, os resultados negativos obtidos na avaliação de mutagenicidade *in vitro* do EMCC sugerem que os compostos presentes no EMCC, sem sofrerem modificações em sua estrutura química, não causaram danos cromossômicos.

O EMCC associado com DXR levou a uma redução na frequência média de AC nas culturas tratadas nas fases G1 com a menor e a maior concentração testada e S com a menor concentração avaliada do ciclo celular e em tratamento contínuo, em comparação às frequências de AC obtidas no tratamento com DXR.

O quimioterápico DXR é um antibiótico do tipo antraciclina e é um dos mais efetivos contra uma ampla variedade de cânceres, pois é capaz de gerar quebras nas fitas de DNA,

promover aductos, gerar inúmeras espécies de radicais livres e bloquear a replicação do material genético (Quiles et al., 2002).

A análise química do EMCC utilizado no presente estudo mostrou que este é um composto rico em taninos hidrossolúveis e não-hidrossolúveis (dados não publicados). Chen e Chung (2000) relataram que o ácido tanínico não apresentou efeito mutagênico em *Samonella typhimurium* TA 98 e 100, tanto na presença como na ausência da fração S9. No entanto, o ácido tanínico, na presença da fração S9, mostrou atividade antimutagênica contra danos causados por 4-aminobiphenyl, 3,3'-4,4'-tetraaminopiphenyl e *N,N-N',N'*-tetramethylbenzidine. Kuo et al. (1992) também relataram uma redução significativa na frequência de trocas entre cromátides irmãs inducidas por nitropirenos em células de ovário de hamster chinês (CHO) submetidas ao ácido tanínico.

Estudos realizados com o pseudofruto do caju mostraram que este apresenta aproximadamente 5 vezes mais ácido ascórbico (vitamina C) que a quantidade encontrada em laranjas (Cavalcante et al.; 2003; Inyang et al., 1997). O ácido ascórbico atua como um potente antioxidante hidrosolúvel em fluidos biológicos (Frei et al., 1989; Frei et al., 1990). Franke et al. (2005) demonstraram que a vitamina C atua como um modulador das enzimas de reparo em células do sangue periférico de camundongos tratadas com metilmetanosulfonato (MMS) no ensaio do cometa e Cooke et al. (1998) observaram uma redução dos níveis plasmáticos de 8-oxo-2'-deoxiguanosina em células mononucleares de sangue periférico humano quando comparado àqueles que receberam somente placebo.

Em trabalho anteriormente realizado por nosso grupo (em preparação), também foi utilizado o MMS como agente indutor de danos em células V79 e observado que o EMCC reduziu os danos primários causados pelo MMS. Foi sugerido que o EMCC atuou como um agente bio-antimutagênico, pois foi mais eficiente em células tratadas simultaneamente com o extrato e o MMS e em células tratadas com o EMCC após 2 horas do tratamento com o MMS.

Em tratamentos simultâneos, agentes antimutagênicos efetivos são capazes de induzir algumas enzimas metabolizadoras, as quais atuam inativando física ou quimicamente o mutágeno, antes que este entre em contato com o DNA ou inibindo a ação de prómutágenos (modulação de enzimas de fase I e fase II), propriedades denominadas de desmutagênicas. Estes agentes podem também aumentar a fidelidade de replicação do DNA e ativar algumas enzimas de reparo e, neste caso, são denominados bio-antimutagênicos (Kada et al., 1982; Kuroda et al., 1992).

A redução das freqüências médias de AC obtidas no presente estudo em tratamentos realizados durante todo o ciclo e nas fase G1 e S do ciclo celular corroboram os dados obtidos no ensaio do cometa, anteriormente realizado por nosso grupo com células V-79 expostas ao EMCC e MMS (dados não publicados). Portanto, o mecanismo pelo qual os compostos presentes no EMCC protegem o DNA, possivelmente seja do tipo bio-antimutagênese, ou seja, os compostos presentes no extrato provavelmente atuam aumentando a fidelidade de replicação do DNA (Kada et al., 1982).

De acordo com Ferguson (2001), há evidências indicando que alguns compostos podem tanto induzir como prevenir danos no DNA. Por esta razão, antes de estabelecer qualquer tipo de estratégia quimiopreventiva, faz-se necessário saber sob quais condições tal composto promove benefícios e previne danos no genoma. O presente estudo mostrou que baixas concentrações do EMCC são mais recomendáveis para a sua utilização, já que a menor dose apresentou uma maior redução na freqüência média de AC e nenhuma das concentrações avaliadas apresentaram atividade mutagênica.

Portanto, nossos resultados indicam que o EMCC poderia ser utilizado na prevenção de danos contra inúmeros compostos com potenciais mutagênicos, os quais apresentam o mesmo mecanismo de ação da DXR. Estudos futuros *in vitro* e *in vivo* são necessários para uma melhor compreensão das propriedades protetoras atribuídas ao extrato metanólico da

casca do tronco do cajueiro e seus componentes, bem como para sua utilização mais segura na medicina popular.

## Referências

- Akerele, O., 1993. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum* 14, 390-395.
- Akinpelu, D.A., 2000. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale*. *Fitoterapia* 72, 286-287.
- Cavalcante, A.A.M., Rübensam, G., Picada J.N., Gomes da Silva, E., Fonseca Moreira JC, Henriques J.A., 2003. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41, 360-369.
- Chen, S., Chung, K., 2000. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Food and Chemical Toxicology* 38, 1-5.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Podmore, I.D., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P., Hickenbotham, P.T., Hussieni, A., Griffiths, H.R., Lunec, J., 1998. Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS Letters* 363, 363-367.
- Correa, M. P., 1978. Dicionário de plantas úteis do Brasil. Ministério da Agricultura, IBDF: Rio de Janeiro, p. 55.
- Eichbaum, F. W., 1988. Biological properties of anacardic acid (O-pentadecadienyl-salicylic acid) and related compounds. *Memórias do Instituto Butantã* 19, 119-133.
- Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475, 89-111.
- França, F., Cuba, C.A., Moreira, E.A., Miguel, O., Almeida, M., das Virgens, M. L., Marsden, P.D., 1993. An evaluation of the effect of a bark extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) on infection by *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 26, 151-155. [in Portuguese]
- Franke S.I.R., Prá, D., Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P., 2005. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research* 583, 75-84.
- Frei, B., England, L., Ames, B.N., 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Professional National Academic Science USA* 86, 6377-6381.

Frei, B., Stocker, r., England, L., Ames, B.N., 1990. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Advanced Experimental in Biology* 264, 155-163.

Inyang, U.E., Abah, U.J., 1997. Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice. *Plant Foods for Human Nutrition* 50, 295-300.

Kada T., Inoue T., Namiki N., 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski, E.J. (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, pp. 137-151.

Kuo, M.L., Lee, K.C., Lin, J.K., 1992. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutation Research* 270, 87-95.

Kuroda, Y., Jain, K.A., Tezuka, H., Kada, T., 1992. Anmutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research* 267, 201-209.

Mota, M.L.R., Thomas, G., Barbosa Filho, J.M., 1985. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology* 13, 289-300.

Polasa K., Rubkmini, B., 1987. Mutagenicity tests of cashewnut shell liquid, rice-bran oil and other vegetable oils using the *Salmonella typhimurium*/microsome system. *Food And Chemical Toxicology* 25, 763-766.

Premalatha, B., Sachdanandam, P., 1999. *Semecarpus Anacardium* L. nut extract administration induces the in vivo antioxidant defence system in aflatoxin B1 mediated hepatocellular carcinoma. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 131-139.

Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolf, S, Wassom, J.S., 1981. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of de U. S. EPA's Gene-Tox Program, *Mutation Research* 87, 143-188.

Quiles, J.L., Huertas, J.R., Battino, M., Matais, j., Ramirez-Tortosa, M.C., 2002. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180, 79-25.

Savage, J.R.K., 1975. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics* 12, 103-122.

Veiga Jr., V.F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M., 2005. Plantas Mediciniais: Cura Segura? *Química Nova* 28, 519-528.

Venkatachalam, M., Sathe, S. K., 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Chemistry* 54, 4705-4714.

Waters, M.D., Brady, A.L. Satack, H.F., Brockman. H.E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research* 238, 57-85.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com os ensaios cometa e de aberrações cromossômicas em sistema-teste de células de mamíferos *in vitro* (células V79), realizados com o extrato metanólico da casca do cajueiro, podemos concluir que:

- 1) O extrato metanólico da casca do cajueiro apresentou citotoxicidade nas maiores concentrações avaliadas: 4000, 5000 e 6000 µg/mL de meio de cultura;
- 2) A avaliação da genotoxicidade de três concentrações do extrato (500, 1000 e 2000 µg/mL) utilizando o ensaio do cometa indicou que somente a concentração de 2000 µg/mL apresentou genotoxicidade;
- 3) Os resultados dos experimentos de antígenotoxicidade indicaram que somente a concentração de 1000 µg/mL exerceu atividade antígenotóxica em pré tratamento e que as três concentrações utilizadas em tratamento simultâneo e em pós tratamento tiveram efeito protetor contra danos causados pelo metilmetanosulfonato (MMS);
- 4) Na avaliação da mutagenicidade do extrato da casca do cajueiro, utilizando o teste de aberrações cromossômicas, não foi observado efeito mutagênico de nenhuma das três concentrações avaliadas;
- 5) Quanto à sua antimutagenicidade em relação aos danos causados pela doxorrubicina (DXR), as três concentrações do extrato da casca do cajueiro apresentaram efeito protetor quando avaliadas em tratamento simultâneo durante todo o ciclo celular;
- 6) Quando as células foram submetidas ao tratamento com o extrato da casca do cajueiro associado à DXR em diferentes fases do ciclo celular, foi

observado efeito antimutagênico nas fases G1 e S do ciclo celular, porém, isso não ocorreu na fase G2 do ciclo.

- 7) O mecanismo pelo qual o extrato metanólico da casca do cajueiro exerceu atividade antimutagênica é provavelmente do tipo bio-antimutagênese. Entretanto, a ocorrência de mecanismos de desmutagênese não pode ser descartada diante dos resultados obtidos em pré-tratamento no ensaio do cometa.
- 8) Os resultados do presente estudo indicam que as menores concentrações do extrato metanólico da casca do cajueiro são as mais adequadas para o consumo popular e que este extrato pode ser um candidato promissor para futuros usos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ALVES, I.; OLIVEIRA, N.G.; LAIRES, A.; RODRIGUES, A.S.; RUEFF, J.. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. **Mutagenesis**, v. 15, p. 229- 234, 2000.
- AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. **World Health Forum**, v. 14, p. 390-395, 1993.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286-287, 2000.
- AMES, B.N.; GOLD, L.S. The prevention of cancer. **Drug Metabolism Reviews**, v. 30, p. 201-223, 1997.
- ANDERSON, D.; PLEWA M.J. The international Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67-73, 1998.
- Arboles ornamentales <http://www.arbolesornamentales.com/Anacardiumoccidentale.htm>, 21/08/05.
- BENDER, M.A.; GRIGGS, H.G.; WALKER, P.L. Mechanisms of chromosomal aberration production: I. Aberration induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light. **Mutation Research**, v. 20, p. 403-416, 1973.
- BONASSI, S.; ABBONDANDOLO, A.; CAMURRI, L.; DAL PRA, L.; DE FERRARI, M.; DEGRASSI, F.; FORNI, A.; LAMBERTI, L.; LANDO, C.; OADOVANI, P. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. **Cancer Genetic and Cytogenetic**, v. 79, p. 133-135, 1995.
- BROWN, T.A. **Genética um Enfoque Molecular**, 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- BURNS, G.W.; BOTTINO, P.J. **Genética**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- CAVALCANTE, A.A.M.; RÜBENSAM, G.; PICADA J.N.; GOMES DA SILVA, E.; FONSECA MOREIRA J.C.; HENRIQUES J.A. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 360-369, 2003.
- CAVALCANTE, A.A.M.; RÜBENSAM, G.; ERDTMANN, B.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. typhimurium* TA 102. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 328-333, 2005.

CECCHI, H.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew apple juice. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 147-149, 1981.

CHEN, S.; CHUNG, K. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 1-5, 2000.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, p. 183-193, 1997.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; PODMORE, I.D.; HERBERT, K.E.; MISTRY, N.; MISTRY, P.; HICKENBOTHAM, P.T.; HUSSIENI, A.; GRIFFITHS, H.R.; LUNEC, J. Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. **FEBS Letters**, v. 363, p. 363-367, 1998.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Ministério da Agricultura, IBDF: Rio de Janeiro, p. 55, 1978.

CORTÉS, F.; DAZA, P.; PIÑERO, J.; ESCALZA, P. Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. **Mutation Research**, v. 24, p. 203-207, 1994.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.

DEMARINI, D.M. Dietary interventions of human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 400, p. 457-465, 1998.

EICHBAUM, F.W. Biological properties of anacardic acid (O-pentadecadienyl-salicylic acid) and related compounds. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 19, p. 119-133, 1988.

FAIRBAN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FRANÇA, F.; CUBA, C.A.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.; ALMEIDA, M.; DAS VIRGENS, M. L.; MARSDEN, P.D. An evaluation of the effect of a bark extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) on infection by *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 151-155, 1993.

FRANKE S.I.R.; PRÁ, D., SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. **Mutation Research**, v. 583, p. 75-84, 2005.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Professional National Academic Science USA**, v. 86, p. 6377-6381, 1989.

FREI, B.; STOCKER, R.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. **Advanced Experimental in Biology**, v. 264, p. 155-163, 1990.

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W.. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, p. 133-137, 2001.

GALLOWAY, S.M.; AARDEMA, M.J.; IISHIDATE, M. J.R.; IVETT, J.L.; KIRKLAND, D.J.; MORITA, T.; MOSESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group in vitro tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 312, p. 241-261, 1994.

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 211-220, 1992.

GENTILE, J.M.; GENTILE, G.; LOHMAN, P.H.; FERGUSON, L.R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: mechanistic studies. **Mutation Research**, v. 480, p. 1-7. 2001.

GEORGE, J.; KUTTAN, R. Mutagenic, carcinogenic and cocarcinogenic activity of cashewnut shell liquid. **Cancer letters**, v. 112, p. 11-16, 1997.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STROMBERG, U.; MIKOCZY, Z.; LANDO, C.; HANSTEEN, I.L.; MONTAGUD, A.H.; KNUDSEN, L.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C.; TINNERBERG, H.; BROGGER, A.; FORNI, A.; HOGSTEDT, B.; LAMBERT, B.; MITELMAN, F.; NORDESTON, I.; SALOMAA, S.; SKERFVING, S. Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. **Mutation Research**, v. 405, p. 171-178, 1998.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity of edible mushroom in a histidine-independent bacterial test system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, p.159-165, 1997.

HARTMANN, A.; AGUREL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R.. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HEO, M.Y.; SOHN, S. J.; AU, W. W. Anti-genotoxicity of galangin as cancer chemopreventive agent candidate. **Mutation Research**, v. 488, p. 135-150, 2001.

INYANG, U.E.; ABAH, U.J. Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 50, p. 295-300, 1997.

KADA T.; INOUE T.; NAMIKI N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski, E.J. (Ed.), **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**, Praeger, New York, p. 137-151, 1982.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KNASMÜLLER S.; STEINKELLNER H.B.J.; MAJER E.C.; NOBIS G.; SCHARF G.; KASSIE F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1051-1062, 2002.

KOZUBEK, A.; ZAMOWSKI, R.; STASIUK, M.; GUBERNATOR, J. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 6, p. 351-355, 2001.

KUO, M.L.; LEE, K.C.; LIN, J.K. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. **Mutation Research**, v. 270, p. 87-95, 1992.

KURODA, Y.; JAIN, K.A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Animutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

JOHNSTON, P.J.; MACPHAIL, S.H.; STAMATO, T.D.; KIRCHGESSNER, C.U. ; OLIVE, P.L.. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. **Radiation Research**, v. 149, p. 455-462, 1998.

MACIEL, M.I.; HANSEN, J.T.; ALDINGER, S.B.; LABOWS, J.N. Flavor chemistry of cashew apple juice. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 34, p. 923-927, 1986.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M.R.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, v. 9, p. 783-789, 1985.

MATSUOKA, A.; OZAKI, M.; TAKESHITA, K.; SAKAMOTO, H.; GLATT, H.R.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.. Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. **Mutagenesis**, v. 12, p. 365-372, 1997.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 33, p. 167-172, 1999.

MILLER, B.; ALBERTI, S.; LOCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E.. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research**, v. 192; p. 45-59, 1997.

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

MORTON, J.F. The cashews brighter future. **Economic Botany**, v. 15, p. 57-78, 1961.

OLIVE, P.L.; WLODEK, D.; DURAND, R.E.; BANÁTH, P.. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 198, p. 259-267, 1992.

PALITTI, F. Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 404, p. 133-137, 1998.

PAOLINI, M.; NESTLE, M. Pitfalls of enzyme-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. **Mutation Research**, v. 543, p. 181-189, 2003.

PINTO, L. R. F.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

POLASA K.; RUBKMINI, B. Mutagenicity tests of cashewnut shell liquid, rice-bran oil and other vegetable oils using the *Salmonella typhimurium*/microsome system. **Food And Chemical Toxicology**, v. 25, p. 763-766, 1987.

PREMALATHA, B.; SACHDANANDAM, P. *Semecarpus Anacardium* L. nut extract administration induces the in vivo antioxidant defence system in aflatoxin B1 mediated hepatocellular carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 131-139, 1999.

PRESTON, R.J.; AU, W.; BENDER, M.A.; BREWEN, J.G.; CARRANO, A.V.; HEDDLE, J.A.; MCFEE, A.F.; WOLF, S.; WASSOM, J.S. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of de U. S. EPA's Gene-Tox Program, **Mutation Research**, v. 87, p. 143-188, 1981.

PRESTON, R. J. Short/medium term carcinogenicity tests and genetic and related effects. **IARC Meeting**, France, 1997.

QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MATAIS, J.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v. 180, p. 79-25, 2002.

RABELLO-GAY, M.N. Teste do Micronúcleo em medula óssea. In: **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese. Métodos e critérios de avaliação**. Ed. Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. L. R.; Monteleone-Neto, R. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP, 1991.

RUSSEL, P.J., 2002. Chromosomal mutations, in: B. Cummings (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595-621, 2002.

SASAKI, Y.F.; SAKAGUCHI, M.; YAMAGISHI, T.; YAMADA, H.; SHIRASU, Y.. Bio-anticlastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil-docosahexaenoic acid,

docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 320, p. 9-22, 1994

SAVAGE, J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. **Journal of Medical Genetics**, v. 12, p. 103-122, 1975.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SKJELBRED, C.F.; SVENDEN; M. HAUGAN, V.; EEK, A.D.; CLAUSEN, K.O.; SVENDSEN, M.V.; HANSTEEN, I. Influence of DNA repair gene polymorphisms of *hOGG1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC2* and the folate metabolism gene *MTHFR* on chromosomal aberration frequencies. **Mutation Research**, 602, 151-162, 2006.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SPEIT, G.; HATMANN, A. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (ed). **Methods in molecular biology, 113 DNA-repair protocols: eukaryotic systems**. Human Press Inc., Totowa, p. 203-212, 1999.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RUY, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 387-395, 2000.

SWIERENGA, S.H.H.; HEDDLE, J.A.; SIGAL, E.A.; GILMAN, J.P.; BRILLINGER, R.L.; DOUGLAS, G.R.; NESTMANN, E.R. Recommended protocols based in a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, I. V. Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 246, p. 301-322, 1991.

TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidias. In: **Mutagênese Ambiental**. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.

VEIGA JR.; V.F., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 54, p. 4705-4714, 2006.

VON BORSTEL, R. C.; HIGGINS, J. A. Janus carcinogens and mutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 321-329, 1998.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; SATACK, H.F.; BROCKMAN, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57-85, 1990.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.