

Efeito radioprotetor do extrato de *Ziziphus joazeiro* sobre embriões de *Biomphalaria glabrata* submetidos à radiação ionizante

W. N. Siqueira^{1,2}, M. L. O. Santos¹, L. R. S. Silva^{1,2}, F. T. J. Santos^{1,2}, H. A. M. F. Silva¹, L. B. N. Lacerda¹, J. L. F. Sá¹, E. B. Silva², A. M. M. A. Melo¹

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia/Laboratório de Biofísica e Radiobiologia/Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Energia Nuclear/Laboratório de Biofísica e Radiobiologia/Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

williams.wns@gmail.com

(Recebido em 20 de maio de 2014; aceito em 05 de agosto de 2014)

As radiações eletromagnéticas são energias que podem ser classificadas em ionizantes e não ionizantes. Este tipo de energia é propagado por um meio material e pelo vácuo. As radiações ionizantes são responsáveis por efeitos danosos aos organismos vivos a nível molecular, onde os danos ocorrem principalmente na molécula do ácido desoxirribonucléico, mais conhecida como DNA. Diante destes efeitos lesivos causados pelas radiações evidencia-se a importância de adquirir conhecimentos sobre as substâncias radioprotetoras, pois elas atuam protegendo o tecido vivo, diminuindo os danos a ele causados pelos efeitos da radiação. Neste trabalho investigamos a ação radioprotetora dos extratos aquosos do *Ziziphus joazeiro* (joazeiro) e *Anacardium occidentale* (cajueiro) frente a embriões de *Biomphalaria glabrata*. Foram utilizados embriões de *Biomphalaria glabrata* pigmentados, divididos em grupos de aproximadamente 100 espécimes. Os embriões dos grupos experimentais foram expostos ao extrato na concentração de 200 ppm e posteriormente, irradiados. Para a irradiação, foi utilizada uma fonte de ⁶⁰Co (gammacell da Radionics Labs. X = 4,359 Gy/h). A viabilidade dos embriões foi analisada utilizando um microscópio estereoscópico e para análises estatísticas, foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls e o χ^2 (Chi-quadrado). Nossos resultados mostraram que o extrato hidroalcoólico da folha do *Ziziphus joazeiro* apresentou efeito radioprotetor e que o extrato aquoso da casca do *Anacardium occidentale* exibiu uma redução no efeito embriotóxico causado pela casca.

Palavras-chaves: *Biomphalaria glabrata*, embriotoxicidade, radioproteção

Radioprotective effect of the extract of *Ziziphus joazeiro* and *Anacardium occidentale* on embryos of *Biomphalaria glabrata* subjected to ionizing radiation

The electromagnetic radiation is energy that can be classified as ionizing and non-ionizing. This type of energy is propagated through a material medium and the vacuum. Ionizing radiations are responsible for harmful effects to living organisms at the molecular level, where the damage occurs mainly in the molecule of deoxyribonucleic acid, better known as DNA. Given these harmful effects caused by radiation highlights the importance of acquiring knowledge about radioprotective substances because they act protecting living tissue, reducing the damage caused to it by the effects of radiation. In this paper we investigate the radioprotective effect of aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* (jujube) and *Anacardium occidentale* (cashew tree) front of embryos of *Biomphalaria glabrata*. We used embryos of *Biomphalaria glabrata* pigmented, divided into groups of approximately 100 specimens. Embryos of experimental groups were exposed to the extract at a concentration of 200 ppm and subsequently irradiated. For irradiation, we used a ⁶⁰Co source (Gammacell of Radionics Labs. 4.359 X = Gy/h). The viability of the embryos was analyzed using a stereoscopic microscope and statistical analysis was used to test Student-Newman-Keuls and χ^2 (chi-square) test. Our results showed that the hydroalcoholic leaf *Ziziphus joazeiro* showed radioprotective effect and that the aqueous extract from the bark of *Anacardium occidentale* exhibited a reduction in its embryotoxic effect.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*, Embryotoxicity, Radioprotection

1. INTRODUÇÃO

As radiações são energias que se caracterizam pela propagação através de um meio material ou no vácuo. Devido sua carga energética e interação com a matéria podem ser classificadas como ionizantes, quando possuem energia suficiente para retirar elétrons da eletrosfera de um átomo, provocando a ionização do mesmo; e não ionizantes, quando a energia interage com os elétrons dos átomos provocando excitação dos mesmos, ou seja, arrancando-os de sua camada de origem para uma camada mais externa. Podem ser citados como exemplos de radiações ionizantes, as partículas alfa, beta e prótons e as radiações indiretamente ionizantes, como nêutrons, gama e raios X. Em relação às radiações não ionizantes, podem ser citados como exemplo, os raios ultravioleta, infravermelho, as ondas de radiofrequência, o laser, as micro-ondas e a luz visível^{1,2,3,4}.

As radiações ionizantes ao interagirem com o sistema biológico podem causar danos ao DNA. Estes tipos de energias são capazes de quebrar a fita de DNA acarretando erros na divisão celular, podendo causar mutações e até mesmo morte do organismo⁵.

Na década de 1950 foi hipotetizado que os danos causados pela radiação após interação com moléculas de oxigênio estão relacionados com a formação de espécies reativas ao oxigênio, moléculas instáveis que podem causar danos ao sistema biológico ao interagir com biomoléculas. Esta forma de dano ao organismo é conhecida como efeito indireto da radiação⁶. As consequências biológicas à exposição das radiações ionizantes são mediadas por uma série de fenômenos físicos, químicos, bioquímicos e celulares iniciados após a absorção da radiação pelo sistema biológico⁷.

Estudos realizados em bactérias⁸, cultura de células⁹, peixes¹⁰, concha de moluscos¹¹, embriões de *Biomphalaria glabrata*^{12,13,14}, fantasmas de hemácias¹⁵ e cultura de linfócitos¹⁶ foram utilizados como modelos para avaliação dos efeitos deletérios provocados pela radiação nos sistemas biológicos. Os moluscos *B. glabrata* e seus embriões têm se mostrado excelentes modelos experimentais para avaliação dos efeitos biológicos das radiações ionizantes, por possuírem características como: curto ciclo de vida, fácil manutenção em laboratório, baixo custo de manutenção, boa reprodutibilidade e resposta rápida e precisa^{12,17,13}.

Devido a aplicação das radiações ionizantes na medicina, agricultura, indústria e a crescente ameaça terrorista no mundo, surge o interesse em encontrar substâncias com atividade radioprotetora. Entretanto, os radioprotetores até hoje estudados possuem pouca aplicabilidade devido à alta toxicidade. Portanto investigar substâncias de origem vegetal que possam desempenhar tal função passou a representar grande interesse¹⁸.

Os radioprotetores são substâncias que têm a propriedade de proteger o tecido vivo, diminuindo os danos a ele causados pela radiação. Sua ação é decorrente da interação química entre essas substâncias e as espécies reativas do oxigênio produzidas pela radiação, impedindo os efeitos danosos¹⁹. Este campo de estudo vem demonstrando que antioxidantes, tais como vitamina E, cisteína, glutatona e β -mercapitoetilamina, mostraram proteção contra os efeitos letais da radiação, prolongando o tempo de sobrevivência de ratos²⁰.

O objetivo deste trabalho é investigar a possível ação radioprotetora dos extratos aquosos do *Ziziphus joazeiro* e *Anacardium occidentale* frente a embriões de *Biomphalaria glabrata*. Estas plantas foram escolhidas para a investigação do potencial radioprotetor devido à presença de substâncias com poder antioxidante em seus extratos²¹.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O material botânico utilizado foi constituído por amostras das espécies arbóreas: *Z. joazeiro* e *A. occidentale* coletadas num fragmento de caatinga com cerca de 20 hectares dentro da Estação Experimental de Caruaru, órgão pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

Foram selecionadas plantas de parcela previamente demarcadas no interior do fragmento, em locais com maior umidade e melhor estado de conservação, considerados preferenciais para o desenvolvimento do vegetal²². As amostras foram coletadas de indivíduos com diâmetro ao nível do solo DNS ≥ 10 cm. Os critérios estabelecidos para a coleta do

material vegetal foram: folhas íntegras localizadas a partir de 1 metro do solo e cascas que não apresentassem marcas de extrativismo. Posteriormente, o material foi devidamente armazenado e transportado para o laboratório de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

As amostras foram secas em ambiente ventilado e com sombra, ao final deste procedimento, trituradas em moinho de faca. Em seguida, o material foi peneirado em uma peneira de malha de 2,0 x 2,0 mm. Posteriormente, as amostras foram postas em contato com etanol a 70% durante 72 horas para a realização da maceração. Ao término do procedimento anterior, os extratos hidroalcoólicos foram submetidos à filtração e evaporação a escura em evaporador rotativo (Fisaton modelo 803). Em seguida, as amostras foram pesadas para serem utilizadas nos bioensaios.

Os extratos aquosos de *Z. joazeiro* e *A. occidentale* submetidos à radiação gama (energias de 1,17 e 1,33 MeV) do cobalto 60 (^{60}Co) foram utilizados na concentração de 200 ppm.

Os extratos de cascas de caule e folhas de *Z. joazeiro* e *A. occidentale* foram preparados e colocados em placas de petri. Em seguida, os embriões foram colocados nas placas para proceder a irradiação numa fonte GammaCell ^{60}Co (Radionics Labs) do Departamento de Energia Nuclear da UFPE. A taxa de dose utilizada foi 4,359 Gy/h. As doses utilizadas foram de 2,5 e 5,0 Gy. Os embriões irradiados ficaram imersos na solução dos extratos durante todo o período de observação.

Foram utilizados aproximadamente 4500 embriões de moluscos da espécie *B. glabrata* – pigmentados (Figura 1), provenientes de adultos mantidos no moluscário do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Com o objetivo de facilitar a coleta das desovas dos moluscos, foram colocadas pequenas tiras de polietileno incolor (5x5 cm) sobre a superfície da água dos aquários criadouros. Após 24 horas, as tiras de polietileno foram retiradas do aquário para que fosse procedida a individualização das desovas. Em seguida os embriões foram analisados quanto à viabilidade e separados em grupos, com aproximadamente 100 espécimes por amostra, para os ensaios de embriotoxicidade e análise do efeito radioprotetor do extrato.

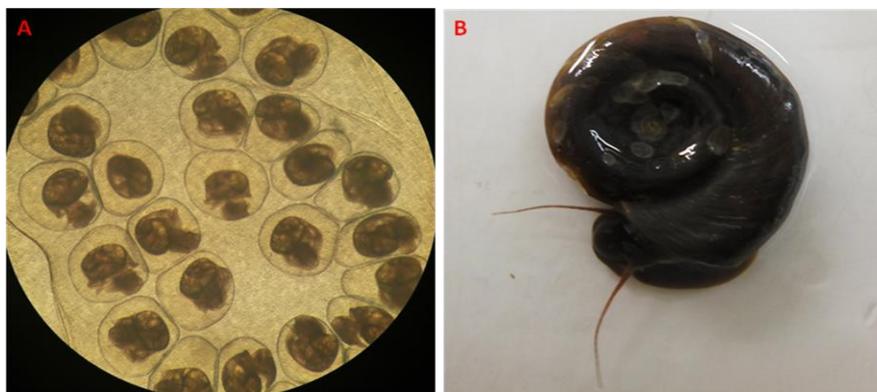


Figura 1. A) Embriões de *Biomphalaria glabrata*. B) *Biomphalaria glabrata* adulto.

Para o experimento foi realizada a seguinte geometria experimental em triplicata:

- Grupo Controle com água e submetidos à irradiação;
- Grupo Controle com extratos da folha e da casca do juazeiro e cajueiro não irradiados na concentração de 200 ppm. A concentração escolhida deveu-se a testes prévios realizados em nosso laboratório (dados não publicados);
- Grupo com extratos na concentração de 200 ppm da folha e casca do juazeiro e cajueiro irradiados com 2,5 e 5,0 Gy.

Para análise dos embriões expostos aos extratos foi utilizado um microscópio estereoscópico (Tecnival-SQZ). A avaliação dos efeitos foi realizada por meio da metodologia padronizada por Okazaki *et al.*¹⁷.

Os resultados foram expressos como \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). A análise estatística foi realizada por meio do teste Student-Newman-Keuls e χ^2 (Chi-quadrado) para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significantes quando P (nível de significância) $< 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2 é possível observar os gráficos referentes aos embriões que foram expostos a radiação gama de ^{60}Co nas doses de 2,5 e 5,0 Gy (gráficos A e B, respectivamente), na presença dos extratos aquosos da folha e casca do *Z. joazeiro*.

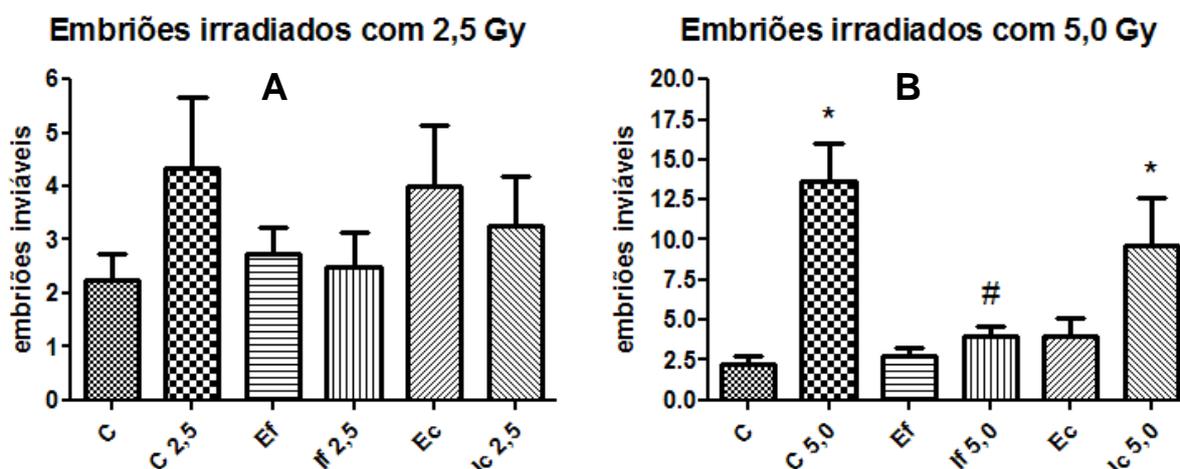


Figura 2. Embriões expostos à radiação ionizante na dose de 2,5 e 5,0 Gy em presença dos extratos de folha e casca do *Z. joazeiro*. As letras presentes no eixo X representam os grupos: controle (C), controle irradiado a 2,5 Gy (C 2,5), controle irradiado a 5,0 Gy (C 5,0), extrato da folha (Ef), extrato da folha irradiado a 2,5 Gy (If 2,5), extrato da folha irradiado a 5,0 Gy (If 5,0), extrato da casca (Ec), extrato da casca irradiado a 2,5 Gy (Ic 2,5) e extrato da casca irradiado a 5,0 Gy (Ic 5,0). Os dados foram expressos \pm E.P.M, $p < 0,05$: * vs. C, # vs. C 5,0.

No gráfico A, onde estão representados os grupos que foram irradiados nas doses de 2,5 Gy, não ocorreu diferença significativa entre os grupos experimentais (If 2,5; If 5,0; Ic 2,5 e Ic 5,0) e os grupos controles (C; C 2,5; C 5,0; Ef e Ec). Todos os grupos apresentaram um baixo percentual de embriões malformados ou mortos. Em relação aos grupos que foram irradiados com dose de 5,0 Gy, pode-se observar no gráfico B que o grupo irradiado na presença do extrato aquoso da folha (If 5,0) apresentou um menor número de embriões inviáveis quando comparado com o grupo controle irradiado (C 5,0), ou seja, o extrato da folha quando irradiado com 5,0 Gy apresentou um efeito radioprotetor, minimizando os danos causados pela radiação ionizante. Entretanto, o grupo irradiado na presença do extrato aquoso da casca (Ic 5,0) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle irradiado (C 5,0).

O efeito radioprotetor do extrato da folha do *Z. joazeiro* (figura 1) pode estar relacionado com o aumento da atividade antioxidante de possíveis metabólitos secundários presentes na folha do *Z. joazeiro* e que, possivelmente, estão presentes em pequenas concentrações na casca. No entanto, são necessários novos testes, bem como a utilização de uma metodologia mais sofisticada para elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade radioprotetora das substâncias presentes no extrato.

Em 2001, Leite *et al.*²³ observaram, após estudos realizados com infusão de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*, propriedades antiulcerogênicas possivelmente relacionada aos

flavonóides, substâncias que apresentam elevado potencial antioxidante e que estão presentes no extrato do *Z. joazeiro*.

Estudos realizados por Alviano *et al.*²⁴ demonstraram, *in vitro*, que o extrato aquoso da casca de *Z. joazeiro* apresentou baixa toxicidade e elevada atividade antioxidante.

Silva *et al.*²⁵ avaliaram, através do método de captação do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), o potencial antioxidante dos extratos etanólicos da folha e casca do *Z. joazeiro*. Demonstrando que o extrato etanólico da folha apresentou atividade antioxidante superior ao da casca.

Na figura 3 é possível observar os gráficos referentes aos embriões que foram expostos a radiação de gama de ⁶⁰Co nas doses de 2,5 e 5,0 Gy (gráficos C e D, respectivamente), na presença dos extratos aquosos da folha e casca do *A. occidentale*.

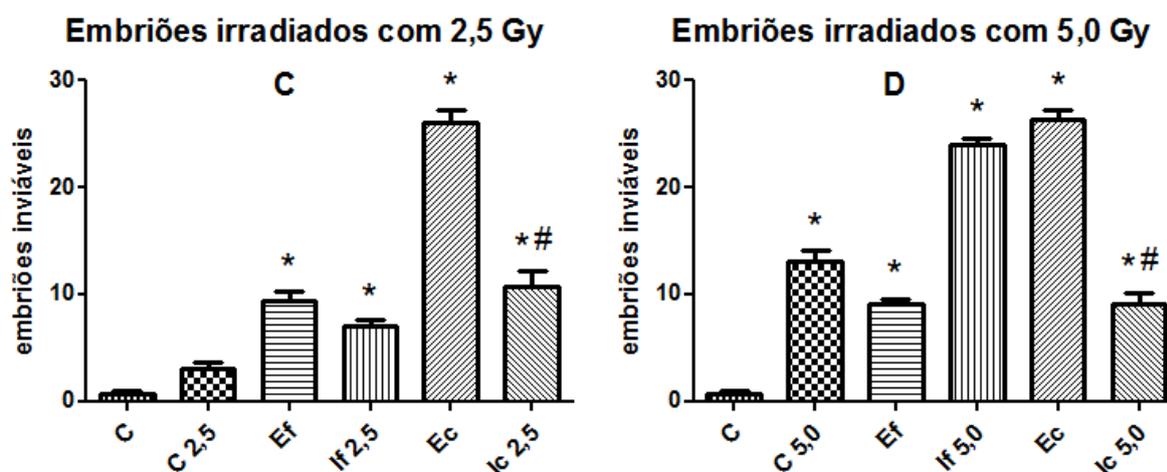


Figura 3. Embriões expostos à radiação ionizante na dose de 2,5 e 5,0 Gy em presença dos extratos de folha e casca do *A. occidentale*. As letras presentes no eixo X representam os grupos: controle (C), controle irradiado a 2,5 Gy (C 2,5), controle irradiado a 5,0 Gy (C 5,0), extrato da folha (Ef), extrato da folha irradiado a 2,5 Gy (If 2,5), extrato da folha irradiado a 5,0 Gy (If 5,0), extrato da casca (Ec), extrato da casca irradiado a 2,5 Gy (Ic 2,5) e extrato da casca irradiado a 5,0 Gy (Ic 5,0). Os dados foram analisados através do teste χ^2 , $p < 0,05$: * vs. C, # vs. Ec.

Para os procedimentos nos quais os embriões foram submetidos à radiação com dose de 2,5 Gy (gráfico C), foi observado que os grupos submetidos, de forma separada, à presença do extrato da folha e da casca (Ef e Ec) apresentaram um efeito embriotóxico em relação ao grupo controle (C), sendo a toxicidade da casca mais acentuada quando comparada com a da folha. Contudo, quando o extrato aquoso da casca foi irradiado com 2,5 Gy (Ic 2,5), ocorreu uma acentuada diminuição do efeito embriotóxico.

Quanto aos embriões que foram expostos a radiação com dose de 5,0 Gy (gráfico D) na presença dos extratos, semelhante aos resultados do gráfico C, observou-se que os grupos na presença do extrato na concentração de 200 ppm da folha e casca (Ef e Ec) mostraram-se tóxicos para os embriões e que o extrato irradiado da casca com 5,0 Gy (Ic 5,0) apresentou uma expressiva redução do efeito embriotóxico.

Os resultados obtidos com o extrato de *Anacardium occidentale* (figura 2) mostram uma redução significativa dos efeitos embriotóxicos, sugerindo que a redução do número de embriões inviáveis pode estar correlacionada com a maior presença de compostos fenólicos e/ou taninos na casca do extrato de *A. occidentale* e que após a irradiação esses compostos potencializaram sua atividade antioxidante.

Kubo *et al.*²¹ e Kamath e Rajini²⁶ analisaram a idade farmacológica, como ação antitumoral e antimicrobiana, na presença nos lipídios fenólicos do extrato de *A. occidentale* devido as suas propriedades antioxidantes.

Haslam²⁷ evidenciou que os compostos fenólicos naturais inibem a peroxidação lipídica e a atividade da lipooxigenase *in vitro*. Estes compostos estão presentes em concentrações significantes, principalmente na casca do extrato *A. occidentale*^{28,29}.

Chaves *et al.*³⁰ mostraram que o extrato etanólico da casca de *A. occidentale* apresenta alto potencial antioxidante no ensaio do DPPH, radical livre estável utilizado para avaliar atividade antioxidante de extratos e substâncias puras^{31,32}, principalmente compostos fenólicos. Contudo, os extratos hidroalcológicos da folha e casca do *A. occidentale* exibiram propriedade moluscicida, possivelmente relacionada à presença do ácido anacárdico³³.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostraram que o extrato da casca de *Ziziphus joazeiro*, espécie do Nordeste brasileiro, possui propriedades antioxidante protegendo os embriões expostos a 5,0 Gy de radiação gama. Estes dados são considerados de grande importância no estudo de novos compostos, naturais e não tóxicos, capazes de prevenir os efeitos adversos da radiação ionizante.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

-
1. Tauhata L, Almeida ES. Radiações nucleares: usos e cuidados, Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear; c1984 a. 47 p.
 2. Tauhata L, Almeida ES. Radiações nucleares: usos e cuidados, Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear; c1984 b. 25 p.
 3. Okuno E. Radiações: efeitos, riscos e benefícios, São Paulo: HARBRA; c1988. 81 p.
 4. Bitelli T. Física e dosimetria das radiações, São Paulo: Atheneu; c2006. 442 p.
 5. Dowd SB, Tilson ER. Practical radiation protection and applied radiobiology, Philadelphia: Saunders Company, c1999.
 6. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science*. 1954; 119:623–626.
 7. Mitchell JB, Russo A, Kuppusamy P, Krishna MC. Radiation, radicals and images. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 899:28-43.
 8. Moraes IR, Gelli DS, Jakabi M, Mastro NLD. Study about the sensibility *in vitro* of different strains of *Vibrio Cholerae* 01 exposed to ⁶⁰Co gamma radiation. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1998; 35(6):239-242.
 9. Costa RFB, Fagundes DJ. Modelos experimentais de hiperplasia intimal: Efeitos da radiação ionizante. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002; 17(3):189-193.
 10. Chaty S, Rodius F, Vasseur PA. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (fresh mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 2004; 69(1):81-94.
 11. Frantsevich LI, Pan'kov IV, Ermakov AA, Korniyushin AV, Zakharchuk TN. Molluscs indicator of environmental pollution by radionuclides. *Russian Journal of Ecology*. 1995; 26(1):47-52.
 12. Okazaki K, kawano T. Morphogenetic and cytogenetic effects of Co⁶⁰ Gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* embryos (SAY, 1889). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1989; 84:251.
 13. Melo AMMA, Okazaki K, Kawano T. Study of ⁶⁰Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. *Journal of Medical and Applied Malacology*. 1996; 8:140-141.
 14. Cantinha RS, Nakano E, Borrelly S, Amaral AJ, Silva LRS, Melo AMMA. Effects of High dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. *International Journal of Low Radiation*. 2010; 4:245-251.
 15. Amâncio FF. Ação da radiação ionizante sobre hemácias humanas e suas proteínas de membrana [Tese]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 1998. 58 p.

16. Fernandes TS. Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos no biomonitoramento individual: estudo comparativo [Dissertação]. [Pernambuco]: Universidade Federal de Pernambuco; 2005. 69 p.
17. Okazaki K, Andrade HF, Kawano T. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1996; 29:1057-1067.
18. Tung-kwang L, O'Brien KF, Wang W, Johnke RM, Sheng C, Benhabib SM, Wang T, Allison RR. Radioprotective Effect of American Ginseng on Human Lymphocytes at 90 Minutes Postirradiation: A Study of 40 Cases. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2010; 16(5):561-567.
19. Rajagopalan R, Wani K, Huilgol NG, Kagiya TV, Nair CK. Inhibition of gamma-radiation induced DNA damage in plasmid pBR322 by TMG, a water-soluble derivative of vitamin E. *Journal of Radiation Research*. 2002; 43:153-159.
20. Weiss JF, Landauer MR. Radioprotection by antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 899:44-60.
21. Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry*. 2006; 99(3):555-562.
22. Araújo EL. Aspectos da dinâmica populacional de duas espécies em floresta tropical seca (caatinga), Nordeste do Brasil [Tese]. [São Paulo]: Universidade Estadual de Campinas; 1998. 78 p.
23. Leite JP, Rastrelli L, Romussi G. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(8):3796-3801.
24. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano CS, Farias LM, Carvalho MAR, Souza MMG, Bolognese AM. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*. 2008; 53(6):545-552.
25. Silva TCC, Almeida CCBR, Veras Filho J, Peixoto Sobrinho TJS, Amorim ELC, Costa EP, Araújo JM. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2011; 32(2):193-199.
26. Kamath V, Rajini PS. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chemistry*. 2007; 103:428-433.
27. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 1996; 59(2):205-215.
28. Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(7):1811-1815.
29. Naczek M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1054(1-2):95-111.
30. Chaves MH, Citó AMGL, Lopes JAD, Costa DA, Oliveira CAA, Costa AF, Júnior FEMB. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010; 20(1):106-112.
31. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LC D, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 2007; 30:351-355.
32. Jung MJ, Heo S, Wang M.-H. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry*. 2008; 108:482-487.
33. Kubo I, Komatsu S, Ochim M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1986; 34:970-973.