



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

CAMILA FREITAS BEZERRA

**EFEITO DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*) ADICIONADO DE
FARINHAS DO BAGAÇO DE CAJU SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM
CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA – CE
2013**

CAMILA FREITAS BEZERRA

**EFEITO DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*) ADICIONADO DE
FARINHAS DO BAGAÇO DE CAJU SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Co-orientadora: Prof. Dra. Erika Freitas Mota

FORTALEZA – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- B469e Bezerra, Camila Freitas.
Efeito do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) adicionado de farinha de bagaço de caju sobre a resposta imunológica em camundongos / Camila Freitas Farias. – 2013.
84f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
Coorientação. Profa. Dra. Erika Freitas Mota.
1. Suco de caju. 2. Farinha de caju. 3. Antioxidantes. 4. Eritrócitos – carneiro. I. Título.

CAMILA FREITAS BEZERRA

**EFEITO DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*) ADICIONADO DE
FARINHAS DO BAGAÇO DE CAJU SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Dissertação aprovada em 26 / 02 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Dirce Fernandes de Melo
Profª. Dra. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Erika Freitas Mota
Profª. Dra. Erika Freitas Mota (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Neuza Felix Gomes
Pesquisadora Dra. Neuza Felix Gomes
Universidade Federal do Ceará – UFC

Diana Célia Nunes Pinheiro
Profª. Dra. Diana Célia Nunes Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Ao meu esposo, Leandro Bezerra de Oliveira, meus pais, Carlos e Ivonete, e aos meus irmãos Carla e Henrique.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter se mostrado de muitas formas quando menos esperei.

À Universidade Federal do Ceará - UFC, por toda minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo e pelo suporte financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical) por disponibilizar os frutos para realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo, pelo apoio constante, pelas palavras certas no momento certo, compreensão, incentivo, injeções de ânimo que sempre me fizeram tentar, por acreditar que eu seria capaz, pelo exemplo de competência, integridade, humildade, humanidade e sabedoria e acima de tudo pela agradável amizade.

À Profª. Dra. Erika Freitas Mota, pelo exemplo de coragem e persistência, pela atenção, pelos cuidados constantes na orientação deste trabalho, por todos os ensinamentos, incentivos, pela amizade e confiança em mim depositada.

À Profª. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, pelos valiosos ensinamentos e orientação, pela amizade, atenção, confiança, constante incentivo, indispensável ajuda e ter aceitado o convite para participar dessa banca. Obrigada por disponibilizar seu laboratório e seus estudantes para realização de etapas fundamentais desse trabalho.

À Profª. Dra. Ana Claudia Marinho da Silva, por todos os ensinamentos, pela incansável ajuda, apoio, força, incentivos e amizade. Obrigada por transformar em alegria os momentos difíceis.

À Dra. Neuza Felix Gomes, pelos ensinamentos, pela ajuda, extrema disponibilidade e atenção dispensadas desde a Iniciação Científica e por ter aceitado o convite para participar dessa banca. Obrigada pela paciência, pelas palavras de apoio e principalmente pela verdadeira amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a Andresiane, Beatriz, Carol, Carine, Lívia, Michelle, Georgia, Albert, Joanna e Samilly pela ajuda, apoio e amizade.

A todos os membros do Laboratório de Imunologia e Bioquímica (LIBA) da UECE, em especial Luana, Belize e Cláudio pela ajuda e atenção.

À Profª. Dra. Raquel Miranda, pelo fornecimento do caju, ensinamentos, sugestões e pela disponibilização do seu laboratório de Fisiologia dos Frutos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Produtos Naturais no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, pela ajuda e gentileza.

À amiga Aletheia Souza, pelo suporte em algumas etapas deste trabalho, pelo apoio e amizade.

Às amigas Camilla Salviano e Luana Guabiraba pelo carinho concedido, pela força, apoio, por estarem sempre dispostas a me ajudar e por transformarem em alegria meus momentos difíceis.

Aos meus amáveis pais, Carlos Alberto Bezerra e Francisca Ivonete de Freitas Bezerra, exemplo de força, amor e bondade, aos meus queridos irmãos, Carlos Henrique e Carla de Freitas, pelo carinho, pela confiança em mim depositada, pelo apoio de sempre, e aos meus adoráveis sobrinhos Laís, Rafael e Pedro, pela injeção de ânimo disponibilizada sendo fundamental para a continuidade deste trabalho. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida.

Em especial, agradeço ao meu esposo, amigo e companheiro, Leandro Bezerra de Oliveira, que esteve comigo durante todos os momentos difíceis e em todas as minhas conquistas. Obrigada pela força, pela paciência e pelas diversas vezes que me encheu de forças com suas palavras de apoio e carinho. Você é uma dádiva, um presente divino, obrigada por tudo.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para execução desta produção.

"Se pude ver mais longe, foi por ter-me
apoiado em ombros de gigantes."
(Isaac Newton)

RESUMO

O caju e a castanha, pseudofruto e fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), apresentam alto valor nutricional, porém menos de 10% do pedúnculo proveniente do beneficiamento da castanha são aproveitados. Uma alternativa para o aproveitamento do bagaço de caju seria seu processamento em farinha, a qual poderia ser adicionada ao suco de caju e assim aumentar suas propriedades nutricionais. O objetivo do trabalho foi avaliar a composição fitoquímica, o potencial antioxidante total e a atividade imunomoduladora do suco de caju adicionado com farinha do bagaço de caju maduro (SFM) e verde (SFV). Para tanto, avaliou-se a capacidade antioxidante do suco e das farinhas de caju (clone CCP-76) por dois métodos, ABTS e DPPH. Os compostos fitoquímicos determinados foram os polifenóis, vitamina C, carotenoides, antocianinas e flavonoides amarelos. Os testes *in vivo* foram realizados com camundongos Swiss machos, provenientes do Biotério Central da UFC. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal da UFC (Nº 102/2011). Para os ensaios toxicológicos, camundongos foram tratados por 19 dias, por via oral, com diferentes doses de SFM e SFV e os parâmetros fisiológicos como peso do animal, peso relativo dos órgãos, peroxidação lipídica e dosagem das enzimas ALT e AST foram determinados. Para avaliação da resposta imune humoral e celular, os animais foram imunizados com hemácias de carneiro (HC) para determinar o título de anticorpos pelo método de hemaglutinação e posteriormente desafiados com HC, para avaliar a resposta de hipersensibilidade tardia (DTH). Para verificar as diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos, aplicou-se o teste ANOVA seguido de Tukey ou Newman-Keuls, considerando as diferenças significativas quando $p < 0,05$. A farinha verde de bagaço de caju apresentou a maior capacidade antioxidante e os maiores teores de polifenóis, constituinte predominante também na farinha de caju maduro e no suco. Não se constatou alterações significativas em nenhum parâmetro avaliado no ensaio toxicológico. Na resposta humoral, o suco de caju e o SFV na dose de 300 mg/kg apresentaram os maiores títulos de anticorpos com aumento de 120,69 e 100% em relação ao controle. Já na resposta celular, o suco, SFM e SFV (dose de 300 mg/kg) induziram um aumento na DTH de 10,66; 10,66 e 11,11%, respectivamente, em relação ao controle. O suco adicionado da farinha do bagaço do caju em diferentes estádios de maturidade pode ser uma alternativa para melhoria da resposta imunológica. No entanto, são necessários estudos complementares para viabilizar essa suplementação do suco com as farinhas.

Palavras chave: *Anacardium occidentale*, Antioxidantes, Hemácias de Carneiro, Imunomodulação.

ABSTRACT

The cashew apple and cashew nut, pseudo fruit and fruit (*Anacardium occidentale L.*) have high nutritional value, but less than 10% of the cashew apple from the processing of cashew nut is availed. The cashew apple juice added with bagasse flour could therefore be an alternative for the improvement of its nutritional properties. The aim of this study was to evaluate the phytochemical composition, the total antioxidant potential and immunomodulatory activity of cashew apple juice with added of the flour mature bagasse (CAJM) and immature (CAJIM) of the cashew apple. Therefore, we evaluated the antioxidant capacity of juice and flour of cashew apple (clone CCP-76) by two methods, ABTS and DPPH. The phytochemicals quantified were polyphenols, vitamin C, carotenoids, anthocyanins and flavonoids yellow. *In vivo* tests were performed with male swiss mice, from the animal colony of UFC, with approval by the Ethics Committee on Animal Research (CEPA) under the UFC protocol No. 102/2011. Toxicity tests were carried out on mice treated for 19 days orally with CAJM and CAJIM at different doses. Physiological parameters such as body weight, relative organ to body weight, lipid peroxidation and dosage of the ALT and AST enzymes were determined. To evaluate the humoral and cellular immune response, the treated animals were immunized with sheep red blood cells (SRBC) to determine the antibody titer by hemagglutination method and later challenged with (SRBC) to evaluate the delayed type hypersensitivity (DTH) reaction. To analyze the significant differences between the means of different groups, we applied the ANOVA followed by Tukey or Newman-Keuls and differences were considered significant at $p < 0.05$. Flour Cashew green bagasse showed the highest antioxidant capacity and the highest levels of polyphenols, also predominant constituent in flour and ripe cashew juice. The ripe flour showed the highest antioxidant capacity and the highest levels of polyphenols, also predominant constituent in ripe flour and cashew apple juice. There were no significant changes in any parameters evaluated in toxicity test. In the humoral response, the cashew apple juice and CAJIM at dose of 300 mg / kg showed higher antibody titer with an increase of 120.69 and 100.00 % compared to the control group. Already in cellular response, juice, SFM and SFV (300 mg / kg) induced an increase in DTH of 10.66, 10.66 and 11.11% respectively, compared to control. The cashew apple juice added with the flour of cashew bagasse in stages of maturity different can be an alternative for improving the immune system. However, further studies are needed to enable this supplementation of juice with flours.

Keywords: *Anacardium occidentale*, Antioxidants, Sheep red blood cells, Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Planta de Cajueiro anão-precoce, clone CCP-76	20
Figura 02	Pedúnculos verdes e maduros de clone cajueiro anão-precoce CCP-76	22
Figura 03	Ativação de células B dependente de células T	29
Figura 04	Ativação de células B independente de células T	30
Figura 05	Gráfico representativo da resposta primária e secundária em relação à quantidade de anticorpos em diferentes dias após a exposição ao antígeno	33
Figura 06	Características gerais das células T com destaque para os linfócitos T auxiliares (subtipos Th ₁ e Th ₂), células Th ₁₇ , linfócitos T citolíticos, linfócitos T _{γδ} e células T reguladoras naturais (TREGs) e induzidas (TR-1 e Th3).	35
Figura 07	Fluxograma do preparo do suco de caju e das farinhas de bagaços de caju maduro e verde	41
Figura 08	Esquema de Imunização e Desafio com Hemácias de Carneiro.	52
Figura 09	Capacidade Antioxidante Total (ABTS) do suco de caju, farinha do bagaço de caju maduro (FM) e caju verde (FV)	53
Figura 10	Capacidade Antioxidante Total (DPPH) do suco de caju, farinha do bagaço de caju maduro (FM) e caju verde (FV).	54
Figura 11	Polifenóis Extraíveis Totais do suco de caju, farinha do bagaço de caju maduro (FM) e caju verde (FV)	56
Figura 12	Títulos de Anticorpos aglutinantes anti-hemácias de carneiro no 7° (título primário) e no 14° (título secundário) dia de imunização	61
Figura 13	Espessura da pata, em porcentagem, calculado entre os tempos zeros e 24 horas, 48 horas e 72 horas nos grupos Controle, Levamisol e Suco (A); SFM75 e SFM300 (B) e SFV75 e SFV300 (C)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Principais funções das Imunoglobulinas	31
Tabela 02	Caracterização Fitoquímica das Farinhas dos Bagaços de Caju Maduro (FM) e Verde (FV)	55
Tabela 03	Conteúdo de compostos fitoquímicos do Suco de Caju, da Farinha do Bagaço de caju maduro (FM) e da Farinha do Bagaço de caju verde (FV)	56
Tabela 04	Efeitos do tratamento com Suco de Caju adicionado com as Farinhas do Bagaço de Caju sobre parâmetros da toxicidade em camundongos	57
Tabela 05	Efeito do Suco de Caju adicionado com a Farinha do Baço sobre o peso relativo dos órgãos	58
Tabela 06	Efeito do Suco de Caju adicionado com a Farinha do Baço sobre a Enzimas Transaminases e a Peroxidação Lipídica	59
Tabela 07	Títulos de anticorpos aglutinantes anti - hemárias de carneiro	60
Tabela 08	Efeito da imunização com hemárias de carneiro sobre o peso relativo do timo e do baço	61
Tabela 09	Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH) induzida pelo desafio com Hemárias de Carneiro	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALT	Alanina aminotransferase
APCs	Células apresentadoras de抗ígenos
AST	Aspartato aminotransferase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animal
CD4+	correceptor presente em células T restritas ao MHC de classe II
CD8+	correceptor presente em células T restritas ao MHC de classe I
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DFI	2,6-dicloro-fenol-indofenol
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTH	Reação de Hipersensibilidade Tardia
EC50	Quantidade necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH
FM	Farinha do bagaço de caju maduro
FV	Farinha do bagaço de caju verde
HC	Hemárias de Carneiro
HCl	Ácido Clorídrico
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon Gama
LB	Linfócitos B
LT	Linfócitos T
MDA	Malondialdeído
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NaOH	Hidróxido de Sódio
NK	Natural killer
SFM	Suco adicionado com farinha do bagaço de caju maduro
SFV	Suco adicionado com farinha do bagaço de caju verde
Swiss	Linhagem de camundongos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TC	Célula T citotóxica

Th	“T help” (célula T auxiliar)
Th1	“T help” 1 (célula T auxiliar do tipo 1)
Th2	“T help” 2 (célula T auxiliar do tipo 2)
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	<i>Caju (Anacardium occidentale)</i>	21
2.2	<i>Alimentos Funcionais e Compostos Fitoquímicos</i>	23
2.3	<i>Compostos Fitoquímicos e Resposta Imunológica</i>	25
2.4	<i>Características Gerais do Sistema Imunológico</i>	26
2.4.1	<i>Imunidade Inata</i>	27
2.4.2	<i>Imunidade Adaptativa</i>	28
2.4.2.1	<i>Imunidade Humoral</i>	29
2.4.2.2	<i>Imunidade Celular</i>	33
2.5	<i>Imunomodulação</i>	36
2.6	<i>Modelo de Imunização por Hemárias de Carneiro</i>	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	<i>Objetivos Gerais</i>	38
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	38
4	MATERIAIS	39
4.1	<i>Material Vegetal</i>	39
4.2	<i>Animais</i>	39
4.3	<i>Reagentes Químicos</i>	39
5	MÉTODOS	40
5.1	<i>Preparo das Amostras</i>	40
5.1.1	<i>Amostra de Caju para Preparo do Suco</i>	40
5.1.2	<i>Farinha do Bagaço de Caju</i>	40
5.1.3	<i>Preparo do Suco Adicionado com as Farinhas</i>	40
5.1.4	<i>Preparo do Extrato Bruto para Análises de Antioxidante Total e Polifenóis Totais</i>	41
5.2	<i>Estudo da atividade antioxidante total e dos compostos fitoquímicos</i>	42
5.2.1	<i>Atividade Antioxidante Total pelo método do Radical ABTS</i>	42
5.2.2	<i>Atividade Antioxidante Total pelo método do Radical DPPH</i>	42
5.2.3	<i>Determinação qualitativa dos compostos fitoquímicos</i>	43
5.2.3.1	<i>Preparo dos extratos</i>	43

5.2.3.2	<i>Determinação de Fenóis e Taninos</i>	44
5.2.3.3	<i>Determinação de Flavonoides</i>	44
5.2.3.4	<i>Determinação de Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas</i>	44
5.2.3.5	<i>Determinação de Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas</i>	44
5.2.3.6	<i>Determinação de Catequinas</i>	45
5.2.3.7	<i>Determinação de Esteroides e Triterpenoides</i>	45
5.2.3.8	<i>Determinação de Saponinas</i>	45
5.2.3.9	<i>Teste confirmatório para saponinas</i>	45
5.2.3.10	<i>Determinação de Alcaloides</i>	46
5.2.4	<i>Determinação dos Antioxidante não enzimáticos</i>	46
5.2.4.1	<i>Determinação dos Polifenóis Extraíveis Totais</i>	46
5.2.4.2	<i>Determinação de Vitamina C Total</i>	47
5.2.4.3	<i>Determinação de Antocianinas</i>	47
5.2.4.4	<i>Determinação de Flavonoides Amarelos</i>	48
5.2.4.5	<i>Determinação de Carotenoides Totais</i>	48
5.3	<i>Avaliação da toxicidade sub-aguda das farinhas de caju</i>	48
5.3.1	<i>Grupos experimentais</i>	48
5.3.2	<i>Determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) no soro de camundongos</i>	49
5.3.3	<i>Ensaio de peroxidação lipídica</i>	49
5.4	<i>Estudo do efeito imunomodulador do caju</i>	50
5.4.1	<i>Antígenos</i>	50
5.4.2	<i>Divisão dos grupos</i>	50
5.4.3	<i>Desenho Experimental</i>	51
5.4.4	<i>Avaliação da Resposta Imune Humoral pelo teste de Hemaglutinação</i>	51
5.4.5	<i>Avaliação da resposta imune celular pela reação de hipersensibilidade tardia</i>	51
5.4.6	<i>Determinação do peso relativo do timo e do baço</i>	52
5.5	<i>Análise Estatística</i>	52
6	<i>RESULTADOS</i>	53
6.1	<i>Capacidade Antioxidante Total</i>	53
6.2	<i>Perfil Fitoquímico e Antioxidantes não enzimáticos</i>	54
6.2.1	<i>Perfil Fitoquímico</i>	54

6.2.2	<i>Antioxidantes não enzimáticos</i>	54
6.3	Toxicidade Sub-aguda	57
6.4	Resposta Imune Humoral	59
6.5	Resposta Imune Celular	61
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os hábitos alimentares estão sendo considerados fatores importantes associados à saúde (VO; KIM, 2012). Os consumidores estão atualmente interessados nos benefícios potenciais de um suporte nutricional para prevenir ou controlar uma possível enfermidade (HARDY, 2000). Diante deste novo perfil dos consumidores, a indústria alimentícia tem voltado sua atenção para a fabricação de novos produtos que visam melhorar a saúde (ANJO, 2004). Nesse contexto, podem ser citados os alimentos funcionais que são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento capaz de proporcionar benefícios para a saúde, como a prevenção e/ou tratamento de doenças. Esses produtos podem variar de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados até alimentos processados e derivados de plantas (POLLONIO, 2000).

O funcionamento adequado do sistema imune é fortemente influenciado pelo estado nutricional do organismo e pelos nutrientes ingeridos na alimentação. Diversos nutrientes apresentam propriedades moduladoras do sistema imunológico. O uso de substâncias com capacidade de modular a resposta imunológica, melhorando a defesa do hospedeiro, parece ser uma das alternativas mais promissoras para auxiliar o tratamento de doenças com antibióticos (TZIANABOS, 2000). Muitas dessas substâncias são comumente encontradas em espécies vegetais, tais como os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides, considerados os principais constituintes que potencializam a resposta imunológica (HALLIWELL; RAPTER; JENNER, 2005).

Diante do fato que as substâncias naturalmente encontradas nos vegetais, mais particularmente nos frutos, possuem capacidade de modular a resposta imunológica e de que o Brasil apresenta uma economia expressiva no mercado de fruticultura, essa é uma área promissora de estudos para validação desses frutos como nutracêuticos. Vale ainda ressaltar que poucos são os trabalhos que exploram as atividades imunomoduladoras dos frutos e principalmente dos frutos tropicais que são ricos em vitaminas e polifenóis (SHIVAPRASAD *et al.*, 2006).

Tendo em vista que a cultura do caju apresenta-se como importante atividade econômica na região nordestina, com ênfase maior ainda para o Estado do Ceará, esse fruto seria um bom candidato aos estudos sobre o potencial imunomodulador. O seu pseudofruto apresenta alto valor nutritivo com teores de vitamina C, cinco vezes superior ao determinado

em suco de laranja (SILVA *et al.*, 2007). Ademais, o caju possui vários compostos com propriedades antioxidantes, como os carotenoides (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003), flavonoides (BRITO *et al.*, 2007), ácidos fenólicos, taninos (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009) e ácido anacárdico (KUBO *et al.*, 2006; TREVISAN *et al.*, 2006). Porém, dependendo de fatores como variedade, solo, safra, grau de maturidade e condições climáticas, o caju pode ter sua composição química, físico-química e qualidade nutricional alterada (PINHEIRO, 2008). Para tanto é importante analisar as influências que esses fatores podem realizar no potencial imunológico do fruto, principalmente em relação ao grau de maturidade.

Os destinos dados aos pseudofrutos são diversos, porém muitas tecnologias devem ser desenvolvidas no intuito de aumentar o aproveitamento destes de forma mais significativa, principalmente devido suas imensuráveis propriedades terapêuticas. Uma grande problemática ocasionada pelas indústrias de processamento do pedúnculo do caju consiste na geração de resíduos provenientes da fabricação do suco integral, como a película e o bagaço do caju (AGUIAR *et al.*, 2000). Algumas alternativas são realizadas para minimizar esta problemática, utilizando os resíduos para a produção de rações ou fertilizantes (KOBORI ; JORGE, 2005). Estas medidas ainda são consideradas insuficientes diante da quantidade de resíduos gerados, sendo sempre necessárias novas ideias que gerem alternativas para o destino destes resíduos, diminuindo assim a poluição ambiental e melhorando o aproveitamento como um todo.

Uma alternativa para o aproveitamento do bagaço de caju poderia ser seu processamento em farinha, a qual pode ser adicionada ao suco de caju e assim aumentar suas propriedades fitoquímicas devido aos constituintes concentrados no bagaço. Nesse contexto, a avaliação do potencial imunomodular desta bebida em camundongos, torna-se interessante tanto para fins nutricionais, como econômicos e ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caju (*Anacardium occidentale*)

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma árvore tropical nativa do Nordeste do Brasil, onde é largamente cultivado e comercializado (ABREU *et al.*, 2013). O cajueiro anão precoce vem sendo eleito para o cultivo em função do pequeno porte e da produção precoce e elevada. Entre os clones cultivados no Ceará, o clone CCP-76 apresenta destaque pela grande preferência pela fruta fresca. O clone CCP-76 apresenta plantas de porte baixo, altura média de 2,68 m e diâmetro médio da copa de 4,98 m no sexto ano de idade. Os indicadores agroindustriais para o pedúnculo indicam o peso médio de 135 g e coloração laranja. A exploração comercial desse clone vem sendo feita tanto em cultivo de sequeiro, como irrigado, com aproveitamento do pedúnculo para o mercado de mesa, e da castanha para o mercado de amêndoas (EMBRAPA, 2013) (Figura 01).

Figura 01. Planta de Cajueiro anão-precoce, clone CCP-76



Fonte: EMBRAPA (2013).

O pseudofruto do caju apresenta alto valor nutritivo, sendo um dos frutos mais ricos em vitamina C, contendo cerca de 200 mg/100 mL de ácido ascórbico (LAVINAS *et al.*, 2006), com teores cinco vezes superiores ao suco de laranja (SILVA *et al.*, 2007). Além disso,

possui vários compostos com propriedades antioxidantes, como os carotenoides (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003), flavonoides (BRITO *et al.*, 2007), ácidos fenólicos, taninos (MICHODJEHOUN-MESTRES, *et al.*, 2009) e ácidos anacárdicos (KUBO *et al.*, 2006; TREVISAN *et al.*, 2006) que já foram identificados até o momento.

O perfil fitoquímico do caju revela uma complexa fonte natural de antioxidantes que faz deste suco um excelente alvo nas pesquisas medicinais (CAVALCANTE *et al.*, 2003). A cultura do cajueiro tem sido amplamente utilizada na medicina popular do Brasil, Índia e África para tratar desordens como a inflamação, doenças gastrointestinais e hipertensão (CAVALCANTE *et al.*, 2003; KONAN; BACCHI, 2007). Extrato hidroetanólico de folhas de caju, que são ricos em polifenóis, inibiu lesões gástricas induzida por HCl / etanol em ratos (KONAN; BACCHI, 2007). Já os extratos metanólicos do caule do cajueiro apresentaram atividades antimutagênicas e antigenotóxicas, reforçando as propriedades terapêuticas desta planta (BARCELOS *et al.*, 2007).

Cavalcante *et al.* (2003) mostraram que o suco de caju tem maior capacidade antioxidante do que o suco processado (cajuína), verificando a proteção de danos no DNA pelas espécies reativas de oxigênio. Esses autores correlacionaram as propriedades antioxidantes com o conteúdo de ácido anacárdico no suco de caju (17,9 mg/100 g) e na Cajuína (0,41 mg/100 g). Runnie *et al.* (2004) mostraram o efeito vasorrelaxador de folhas de *A. occidentale* em aorta isolado de ratos.

O caju pode ter sua composição química, físico-química e qualidade nutricional alterada dependendo de diversos fatores como: variedade, solo, safra, grau de maturidade (Figura 02) e condições climáticas (PINHEIRO, 2008). Mudanças sensoriais e bioquímicas que ditam as características de qualidade dos frutos ocorrem durante a pós-colheita e estão diretamente relacionadas com o metabolismo oxidativo (MATTOO *et al.*, 2001).

De acordo com o grau de maturidade, os teores dos compostos fitoquímicos podem variar e a atuação terapêutica do fruto será diretamente afetada. Vasconcelos (2011) avaliou a atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante do suco de caju nos estádios de maturidade e imaturidade e observou uma maior atividade anti-inflamatória e cicatrizante de feridas, induzidas em camundongos swiss, pelo suco de caju imaturo. Para tanto, torna-se importante considerar o grau de maturidade dos vegetais nos estudos com os compostos bioativos.

Figura 02. Pedúnculos verdes e maduros de clone cajueiro anão-precoce CCP-76



Fonte: RIBEIRO; SILVA; RIBEIRO (2013).

A cultura do caju gerou para o Brasil 1.687.565,00 de dólares no ano de 2011, sendo o Brasil, o país que mais lucrou com o caju seguido de Mali, Madagascar e Guiana (FAO, 2011). Esta cultura é de fundamental importância para a economia do Nordeste do Brasil com destaque para o Estado do Ceará, considerado um dos maiores produtores. Tanto o pseudofruto como a castanha do caju podem ser consumidos *in natura* e transformados em vários produtos nutricionais como sucos, chás, compotas e bebidas (TREVISAN *et al.*, 2006).

A castanha de caju é botanicamente definida como o fruto e é o principal produto de exportação (EMBRAPA, 2013). O pedúnculo ou pseudofruto, também conhecido como caju, é suculento, tem um sabor agradável e é de preferência comercializado como polpa congelada, suco e néctar (QUEIROZ *et al.*, 2011). Provavelmente não mais que 10% do potencial de produção do pedúnculo são consumidos ou utilizados na forma fresca ou processada. Embora o pedúnculo represente uma fonte rica de compostos nutritivos, sua aceitação fora do Brasil tem sido reduzida em função da elevada adstringência (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2002).

O processamento do pedúnculo do caju pode originar diversos produtos, sendo o suco integral o mais representativo, o qual gera como resíduo a película e a fibra ou bagaço do pedúnculo (AGUIAR *et al.*, 2000). Os resíduos industriais são muitas vezes utilizados como

ração ou na forma de fertilizantes. O custo de secagem, armazenagem e transporte de subprodutos são fatores que economicamente limitam seu aproveitamento (KOBORI; JORGE, 2005).

O sabor adstringente do pedúnculo do caju é decorrente da presença de taninos. Este constituinte, entre outros, contribui para a atividade antioxidante, capaz de prevenir doenças cardíacas e câncer, abrindo perspectivas para um melhor aproveitamento dos resíduos resultantes do processamento do pedúnculo (BROIZINI *et al.*, 2007; SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

A película do caju apresenta grandes quantidades de compostos fenólicos simples como quer cetina, miricetina, pentosídeos e raminosídeos, sendo estes constituintes encontrados em quantidades significativas em farinhas fabricadas a partir do bagaço do pedúnculo provenientes do processamento do suco integral do caju (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009).

Formas de aproveitamento do pedúnculo do caju e seus resíduos, gerados na indústria de processamento, são alvo de pesquisas que visam beneficiar ação dos seus constituintes e ao mesmo tempo proporcionar alternativas de manejo de resíduos para as indústrias, diminuindo assim a poluição ambiental.

2.2 Alimentos Funcionais e Compostos Fitoquímicos

Os meios de comunicação atualmente têm focado maciçamente no binômio alimentação e saúde, consequentemente a preocupação da sociedade ocidental com os alimentos tem aumentado de forma exponencial. Uma grande quantidade de novos produtos que supostamente proporcionam saúde tem sido apresentada pela indústria alimentícia diariamente (ANJO, 2004).

Segundo Jones e Jew (2007) e Siro *et al.*, (2008), alimentos funcionais representam uma das áreas mais interessantes de investigação e inovação na indústria de alimentos e são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que proporciona benefícios para a saúde, inclusive a prevenção e o tratamento de doenças. Esses produtos podem variar de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados até alimentos processados e derivados de plantas (POLLONI, 2000).

Alguns parâmetros devem ser levados em conta em relação aos alimentos funcionais. Para Borges (2001), eles devem exercer um efeito metabólico ou fisiológico que contribua

para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Nesse sentido, devem fazer parte da alimentação usual e proporcionar efeitos positivos, obtidos com quantidades não tóxicas e que exerçam tais efeitos mesmo após a suspensão da ingestão e que não se destinem a tratar ou curar doenças, estando seu papel ligado à redução do risco de contrair doenças.

Estudos sugerem que uma dieta rica em frutas e vegetais pode diminuir o risco de doenças crônicas, devido ao baixo teor de gordura e de altos níveis de fibra e substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico e polifenóis (QUEIROZ *et al.*, 2011). O papel desempenhado por fatores dietéticos sobre o estado de saúde humano tem sido reconhecido, mas foi apenas recentemente que estudos epidemiológicos e clínicos forneceram uma visão mais clara sobre a composição química e os efeitos de moléculas bioativas encontradas em alimentos sobre os mecanismos fisiológicos (SHAHIDI, 2009).

Os compostos fenólicos são fitoquímicos que estão presentes, em torno de 100%, em grupos de plantas da região da Caatinga (ALMEIDA *et al.*, 2005). Além disso, estes compostos aparecem em concentrações elevadas em algumas espécies que são intensamente utilizadas pelas comunidades locais e as propriedades terapêuticas destas espécies são atribuídas aos compostos fenólicos (MONTEIRO *et al.*, 2006). Os fenólicos desempenham um papel crucial na promoção da saúde e prevenção de doenças através de mecanismos relacionados com a diferenciação celular, desativação de pro-carcinógenos, manutenção no reparo do DNA, formação N-nitrosaminas e mudança no metabolismo do estrogênio, entre outros (SHAHIDI, 2004).

Taninos e flavonoides apresentam usos terapêuticos, devido às suas atividades anti-inflamatórias, antifúngicas e antioxidantes que lhes conferem propriedades curativas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; SANTOS; MELLO, 2004). Alguns tipos de taninos agem sobre o metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos, com papéis importantes na reversão do processo inflamatório (OKUDA, 2005) e são usados em tratamentos de cicatrização de feridas. Flavonoides podem afetar as funções das células ligadas a processos inflamatórios, agindo sobre as enzimas (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000) e nos teores de prostaglandina (PG) E2, TNF- α , macrófagos e COX- 2 mRNA (TALHOUK *et al.*, 2007).

Compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e ligninas podem eliminar as espécies reativas de oxigênio e, portanto, fornecer meios eficazes para prevenir doenças relacionadas (RAMFULA *et al.*, 2010).

2.3 Compostos Fitoquímicos e Resposta Imunológica

A modulação da resposta imunológica através da estimulação ou supressão pode ajudar na manutenção de um estado fisiológico livre de doenças (GHULE *et al.*, 2006). Os constituintes de muitas plantas com atividade imunomoduladora têm sido isolados (JUANITA, 2005). Estas substâncias têm como alvo a regulação do sistema imunológico que é constituído por órgãos, células e sistema linfático, protegendo o organismo de patógenos invasores e eliminando consequentemente as doenças relacionadas (OSADEBE; OMEJE, 2009).

Determinados nutrientes desempenham um papel crucial na manutenção da resposta imune, onde a deficiência ou ingestão excessiva dos mesmos pode afetar negativamente o número e a atividade das células do sistema imunológico. O mecanismo subjacente pelo qual os nutrientes dão suporte ao sistema imune é através do fornecimento de antioxidantes (GHATAK; PANCHAL, 2012). As membranas das células do sistema imune são ricas em ácidos graxos poli-insaturados e são suscetíveis a ação das espécies reativas de oxigênio (CHEW; PARK, 2004) e portanto, uma suplementação com nutrientes que possuem propriedades antioxidantes tais como carotenos, vitamina E, vitamina C, zinco e selênio, pode inibir esses radicais livres e influenciar na atividade de vários componentes do sistema imune (ERICKSON; MEDINA; HUBBARD, 2000).

Estudos realizados com extratos das sementes de *Nelumbo nucifera* Gaertn *in vivo* mostraram um aumento na estimulação do sistema imune avaliado através de vários parâmetros, sendo esse atividade atribuída ao potencial antioxidante desta planta (MUKHERJEE *et al.*, 2010). Outros estudos também avaliaram o funcionamento do sistema imune frente a compostos fitoquímicos presentes em diversos tipos de plantas. Cosentino e colaboradores (2008) realizaram um estudo com leucócitos humanos e observaram que o extrato aquoso das folhas de *Achyrocline satureoides*, rico em quercetina, induziu a proliferação dos leucócitos e produção de INF- γ e de IL-4 em humanos que receberam a infusão do extrato, constituindo-se um potente imunoestimulante. O extrato metanólico da raiz de *Curculigo orchoides* teve efeito imunoestimulante, com aumento da resposta imune humoral e celular induzidos por hemárias de carneiro, em camundongos imunossuprimidos

com ciclofosfamida. O estudo fitoquímico do extrato relevou a presença de alcaloides, fenóis, taninos, saponinas e esteróides (BAFNA; MISHRA, 2006a).

Além disso, a fração metabólica bioativa de *Sphaeranthus indicus*, produziu um aumento da resposta imune humoral e da resposta de hipersensibilidade tardia, evidenciando-se um aumento na produção de anticorpos e do edema de pata, induzidos por hemárias de carneiro, em animais imunossuprimidos com ciclofosfamida. A imunoestimulação conferida pelo extrato deve-se também a uma resposta exacerbada de macrófagos juntamente com linfócitos T e B. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de alcaloides, fenóis e flavonoides (BAFNA; MISHRA, 2006b).

2.4 Características Gerais do Sistema Imunológico

O sistema imunológico é um sistema fisiológico altamente dinâmico, composto por redes complexas e regulado por várias células linfoides e outros tipos celulares que interagem por contato direto célula-célula e que se comunicam através de mediadores solúveis como citocinas (HERZYK; GORE, 2004). A principal função deste sistema é prover proteção ao hospedeiro contra a invasão de micro-organismos. Baseia-se no reconhecimento do não próprio e possui habilidades para reconhecer um potente patógeno invasor, ativando assim uma efetiva resposta imune. O reconhecimento imunológico de determinantes não próprios ocorre de forma direta, através de interações, ligando-se a receptores e, indiretamente, via intermediários codificados pelo hospedeiro (CUNHA, MCFALL; MACKEY, 2006)

A resposta imunológica comprehende a resposta imune inata e a adquirida. A imunidade inata é constituída pelas barreiras físicas, mecânicas, bioquímicas, pelo sistema fagocítico, células citotóxicas naturais, sistema complemento e citocinas. A imunidade adquirida é composta pelos órgãos, células linfoides e seus produtos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Fagócitos como neutrófilos, monócitos e macrófagos são participantes - chave na resposta imune inata (BIRK *et al.*, 2001; LINGEN, 2001) entre os tipos celulares, são os que primeiro respondem à invasão de organismos patogênicos.

A imunidade inata pode usar uma variedade de mecanismos efetores para eliminar ou conter uma infecção. No entanto, em caso de falha destes mecanismos será acionado o sistema imune adaptativo (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003). Já as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos B e T, que proporcionam a imunidade duradoura (JANEWAY *et al.*, 2010; MANZ *et al.*, 2005).

2.4.1 Imunidade Inata

A primeira linha de defesa do sistema imunológico contra os invasores consiste na barreira física composta pela pele queratinizada, membranas mucosas que revestem o trato respiratório e gastrointestinal e barreiras químicas representadas por uma variedade de enzimas e outras substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais que têm ação direta ou inibem a aderência microbiana às superfícies orgânicas (MUSSI-PINHATA ; REGO, 2005).

A imunidade inata também envolve elementos humorais, como as proteínas do sistema complemento, as proteínas de fase aguda e as citocinas, e elementos celulares, como monócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas e células *natural killer* (NK) (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

Os macrófagos são os primeiros fagócitos que reconhecem imediatamente o invasor, quando esse atravessa a barreira epitelial e começa a se replicar no tecido do hospedeiro. Os neutrófilos e macrófagos são dois tipos de células fagocíticas que possuem um papel-chave na imunidade inata, porque podem reconhecer, fagocitar e destruir muitos patógenos sem a ajuda da resposta imune adaptativa (JANEWAY *et al.*, 2010).

A imunidade inata caracteriza-se por ter capacidade limitada de diferenciar um micro-organismo do outro e de apresentar resposta semelhante para diferentes micro-organismos (SOMPAYRAC, 1999). Há desenvolvimento de um número limitado de receptores de reconhecimento (PRR), com especificidade para as estruturas antigênicas microbianas, discriminando-as. Além disso, estes receptores são capazes de reconhecer o próprio sistema imunológico do hospedeiro (PEREIRA, 2008).

A imunidade inata não só faz a primeira defesa contra os micro-organismos como também desempenha importante papel na indução da resposta específica, e esta, por sua vez, aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata (SOMPAYRAC, 1999).

O sistema de complemento é mais um dos componentes da imunidade inata que também está presente na imunidade adaptativa. Ele é composto por aproximadamente 20 proteínas produzidas principalmente no fígado e muito abundantes no sangue e tecidos, requerendo ativação sequencial. Há três vias de ativação do sistema complemento: a via alternativa, a dependente de lectina e a clássica. As duas primeiras são ativadas de forma inespecífica pelo contato com certos componentes da superfície de micro-organismos, independente da presença de anticorpos específicos, característica da imunidade inata. Consequentemente, é gerada uma série de substâncias que liberam mediadores inflamatórios,

estimulam a quimiotaxia e fagocitose e, quando a ativação se completa, causam lise microbiana pelos componentes do complexo de ataque à membrana. A via clássica é iniciada pela ligação de anticorpos, normalmente existentes na circulação, à primeira proteína do sistema complemento (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

As citocinas apresentam também um papel fundamental na comunicação química entre os diversos componentes da resposta imune. São pequenas proteínas liberadas por várias células do organismo, normalmente em resposta a um estímulo ativador, e induzem respostas por meio de ligações a receptores específicos (JANEWAY *et al.*, 2010). Elas medeiam diretamente às interações entre as células, regulando assim as funções celulares e dos tecidos, coordenando a resposta imunológica (DUNLOP; CAMPBELL, 2000).

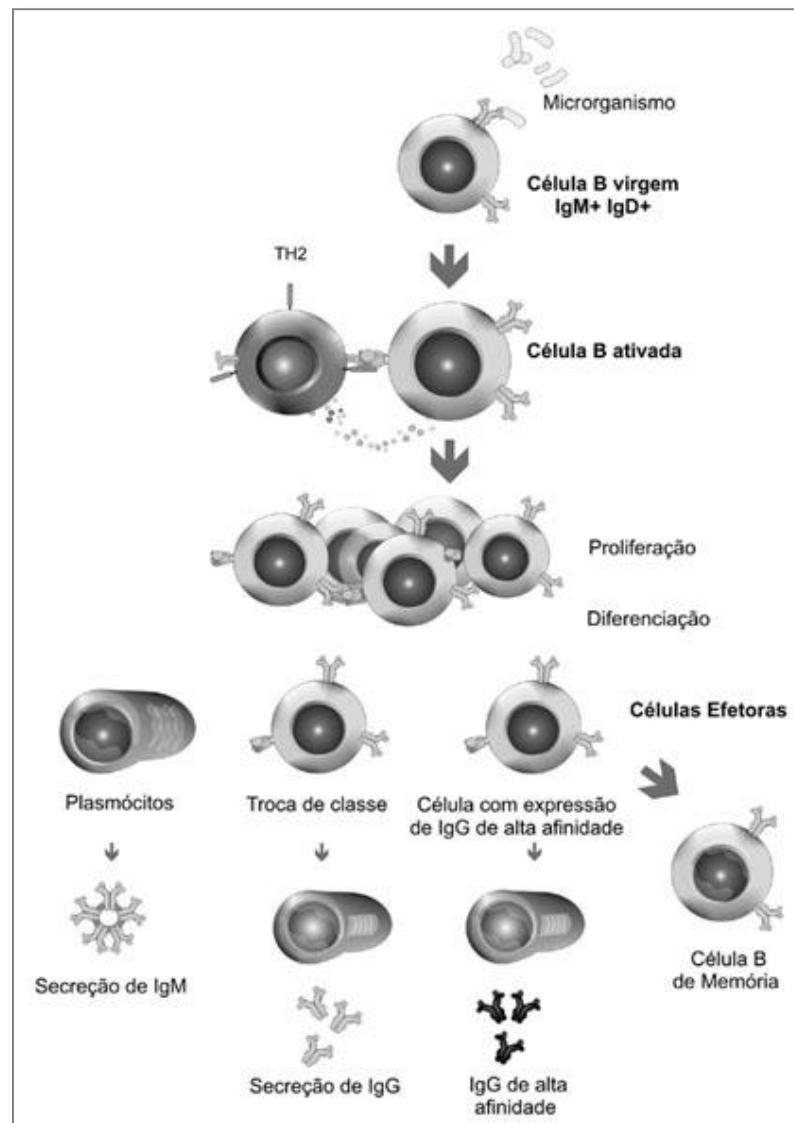
2.4.2 Imunidade Adaptativa

Uma resposta imune adaptativa é induzida quando uma infecção domina os mecanismos de defesa da imunidade inata. O patógeno continua sua replicação e antígenos tornam-se abundantes. A presença do patógeno e as mudanças no ambiente celular, decorrentes da imunidade inata, ativam a resposta imune adaptativa (JANEWAY *et al.*, 2010). Esta resposta está dividida entre imunidade humoral e imunidade celular.

2.4.2.1 Imunidade Humoral

Os componentes da imunidade humoral incluem os linfócitos B (LB) que secretam anticorpos antígeno-específicos, com a função de neutralizar e opsonizar patógenos extracelulares e suas toxinas (ESSER *et al.*, 2003). Sabe-se que a produção de anticorpos envolve, na maioria dos casos, pelo menos três principais tipos de células: os macrófagos, linfócitos B e linfócitos T (OSADEBE; OMEJE, 2009).

A resposta imune humoral envolve a produção e secreção de anticorpos por linfócitos B por duas vias, uma dependente de Linfócitos T (LT) e outra independente da participação de LT (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003). A via dependente de LT ocorre inicialmente quando as células T são ativadas por antígenos que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), em seguida as células B interagem com as células T auxiliares antígeno-específicas e só então, os linfócitos B ativados proliferam (expansão clonal) e diferenciam-se em plasmócitos e células B de memória (MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2005). Antígenos proteicos induzem uma resposta imune humoral dependente de LT, a qual estimulando a expansão clonal dos LB, a mudança de classe, a maturação de afinidade e a diferenciação em LB de memória (MESQUITA *et al.*, 2010) (Figura 03).

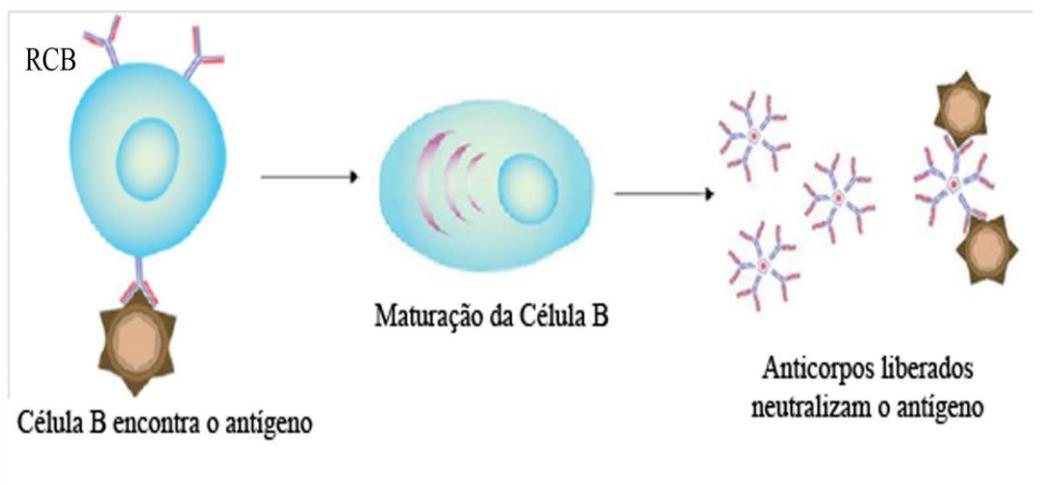
Figura 03. Ativação de células B dependente de células T

Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008).

A resposta imune humoral T- independente não necessita da presença de células T auxiliares, sendo induzida por antígenos T – independentes que se caracterizam por grandes moléculas poliméricas, não proteicas, altamente resistentes a degradação, sendo a maioria de origem bacteriana, que provocam respostas mais fracas que os antígenos T – dependentes (JANEWAY *et al.*, 2010). Estes antígenos geram, principalmente, resposta IgM e como não há ativação de LT, não serão geradas as citocinas necessárias para a mudança de classe, maturação de afinidade ou formação de LB de memória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Entretanto tais respostas têm papel crucial na defesa do hospedeiro contra os patógenos

cujos抗ígenos de superfície não possam desencadear respostas de células T peptídeo-específicas (MESQUITA *et al.*, 2010) (Figura 04).

Figura 04. Ativação de células B independente de células T



Fonte: MOSER ; LEO (2010) (modificada).

Estes anticorpos produzidos, dependentes ou não de LT, atuam de três formas principalmente: neutralização, opsonização e ativação do complemento. A neutralização inibe os efeitos tóxicos ou a infectividade dos patógenos ligando-se a eles. A opsonização atua recobrindo os patógenos, permitindo que células acessórias reconheçam porções Fc de arranjos de anticorpos e fagocitem o patógeno, inibindo sua ação. E por último, a ativação da via clássica do complemento que ocorre através dos anticorpos que ativam este sistema, que por sua vez podem aumentar fortemente a opsonização matando diretamente certas células bacterianas (JANEWAY *et al.*, 2010).

As células B são dotadas de genes altamente polimórficos que sofrem rearranjo, permitindo a diversidade das imunoglobulinas (anticorpos), que funcionam também como receptores expressos na membrana celular (RCB). Cada imunoglobulina (Ig) é constituída por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas por pontes dissulfetos. Existem cinco tipos de cadeias pesadas denominadas μ , δ , γ , α e ϵ , que definem as classes de imunoglobulina IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. As cadeias leves são de dois tipos, kappa (κ) e lambda (λ) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; THOMPSON *et al.*, 1998). As propriedades características de cada classe de Ig podem ser vistas na Tabela 01.

Tabela 01. Principais funções das Imunoglobulinas

Imunoglobulinas	Funções
1. IgG	Secretada durante a resposta secundária; Principal forma de anticorpo circulante
1.1 Subclasses: IgG ₁	Subclasse mais abundante, correspondendo a 65 % do total das IgG. Produz a resposta timo-dependente dominante contra antígenos protéicos/polipeptídicos.
IgG ₂	Subclasse que provê a resposta imune dominante contra antígenos de carboidratos e polissacarídiscos. Ela constitui 20 a 25 % do total das IgG.
IgG ₃	Contribui com 5 a 10 % do total das IgG e proporciona uma boa resposta a antígenos protéicos/polipeptídicos, às vezes até com maior afinidade que as IgG ₁ .
IgG ₄	Corresponde a menos de 5 % do total das IgG. A IgG ₄ não atua sobre antígenos polissacarídiscos. Seus níveis são altos em doenças alérgicas e podem bloquear as IgE.
2. IgA	Principal forma de anticorpo em secreção externa nas mucosas.
2.1 Subclasses: IgA ₁	É a subclasse de IgA predominante no plasma, representando ± 85 % das IgA plasmáticas. A IgA ₁ provê uma boa resposta contra antígenos protéicos, mediana contra antígenos polissacarídiscos e fraca contra antígenos lipopolissacarídiscos.
IgA ₂	Compreende ± 15 % do total das IgA plasmáticas e representa a resposta dominante das mucosas contra antígenos polissacarídiscos e lipopolissacarídiscos. Existem dois alotipos, A2m(1) e A2m(2), que são especificados por alelos alternativos nos loci das cadeias pesadas α-2.
3. IgE	Presente nas respostas de hipersensibilidade imediata ou reações alérgicas.
4. IgM	Secretada durante a resposta primária
5. IgD	Função exata desconhecida Agem como receptores de células B

Fonte: MOSER ; LEO (2010) (modificada).

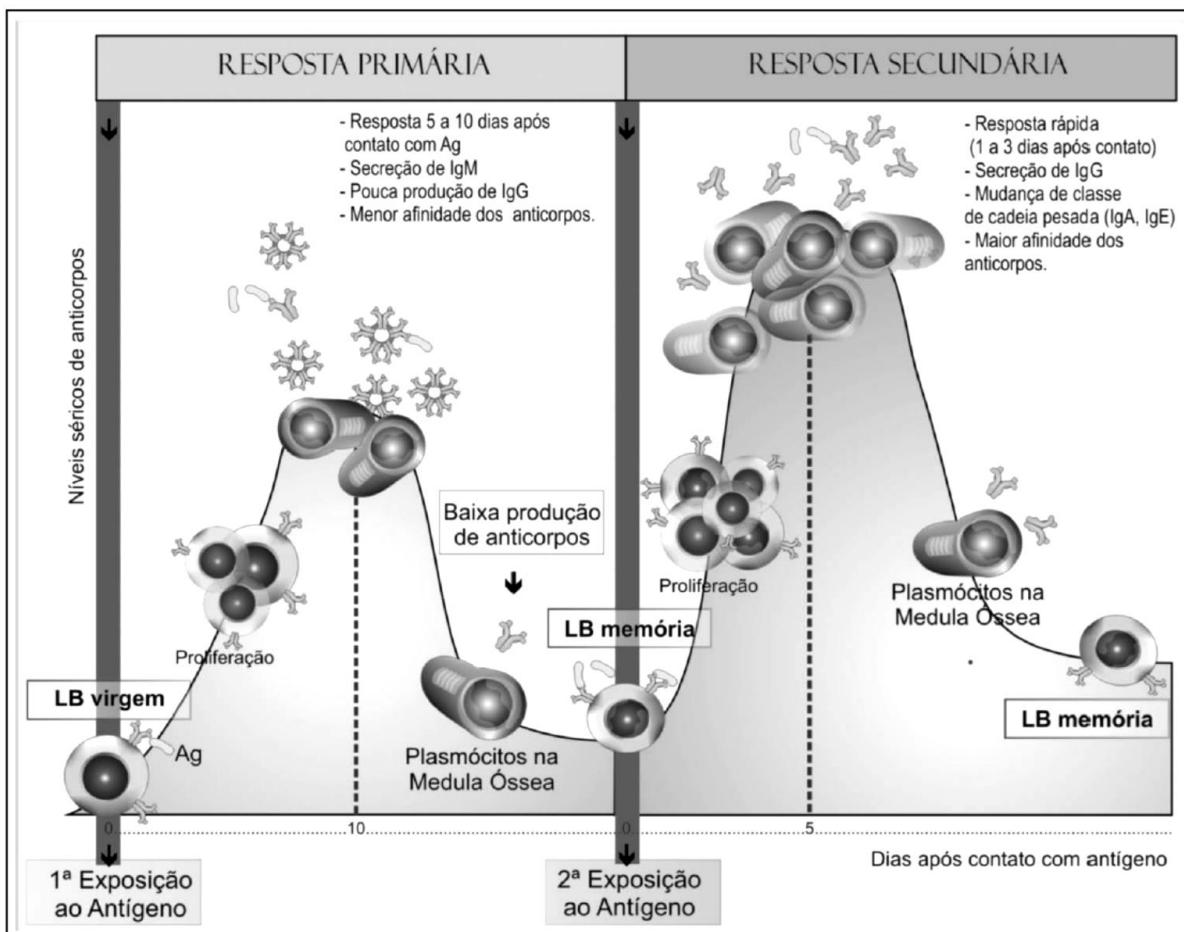
O processo de mudança de classe das imunoglobulinas ocorre através da troca da porção constante da cadeia pesada de μ ou δ para γ , α ou ϵ . Esta etapa envolve eventos moleculares complexos como rearranjo no DNA genômico e *splicing* do RNA mensageiro. Neste processo a resposta imune torna-se mais diversificada, uma vez que as diferentes

classes de Ig apresentam diferentes características funcionais. O aumento da afinidade de anticorpos para um dado antígeno, durante a progressão da resposta humoral T dependente, é resultado de mutação somática nos genes de Ig durante a expansão clonal. Algumas destas mutações vão gerar células capazes de produzir anticorpos de alta afinidade, contudo, outras podem resultar na diminuição ou mesmo na perda da capacidade de ligação com o antígeno (MESQUITA *et al.*, 2010).

A resposta imune humoral pode ser dividida de acordo com as exposições ao antígeno, em resposta imune primária e secundária. O primeiro contato com um antígeno, leva à ativação de LB virgens, que se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos e em células de memória, resultando na produção de anticorpos específicos contra o antígeno indutor. Ao entrar em contato com o antígeno pela segunda vez, já existe uma população de LB capazes de reconhecer esse antígeno devido à expansão clonal e células de memória geradas anteriormente, na resposta primária (MESQUITA *et al.*, 2010) (Figura. 06).

Nos dois tipos de resposta, primária e secundária, ocorre a produção de isotipos IgM e IgG, porém, na resposta primária, IgM é a principal Ig e a produção de IgG é menor e mais tardia. Na resposta secundária, a IgG é a imunoglobulina predominante. Nas duas respostas, a concentração de IgM sérica diminui rapidamente e após uma ou duas semanas, observa-se queda acentuada, enquanto que a produção de IgG continua persistindo (MESQUITA *et al.*, 2010).

Figura 05. Gráfico representativo da resposta primária e secundária em relação à quantidade de anticorpos em diferentes dias após a exposição ao antígeno



Fonte: MESQUITA *et al.* (2010).

2.4.2.2 Imunidade Celular

Os principais componentes da imunidade mediada por células compreendem os mecanismos especializados que envolvem a citotoxicidade mediada por linfócitos T e a ativação de macrófagos pelas células T auxiliares (JANEWAY *et al.*, 2010). Os linfócitos T amadurecem no timo, diferenciando-se em linfócitos T auxiliares, que expressam a proteína CD4, que modulam a intensidade, duração e eficácia da reação imunológica na membrana celular ou em linfócitos T citotóxicos, que expressam a proteína CD8 (PARHAM, 2001; MOSER; LEO, 2010).

Todas as funções efetoras dos linfócitos T envolvem a interação de um LT auxiliar com uma célula-alvo. As suas ações dependem de um conjunto de proteínas de membranas e proteínas secretadas que as mesmas expressam ou secretam após a ligação com o receptor (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003).

Os LT reconhecem apenas a sequência primária de pequenos peptídeos derivados de antígenos proteicos. Para tal reconhecimento é necessário que estes peptídeos estejam ligados a determinadas moléculas expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os antígenos proteicos extracelulares são fagocitados pelas (APCs), processados até pequenos peptídeos pela ação de proteases, e ligados às moléculas de MHC de classe II e expressos na membrana celular para que possam ser reconhecidos pelo LT CD4 (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007). As células T CD4 *naïves*, após reconhecerem o seu antígeno, diferenciam-se em duas vias distintas para produzir subpopulações de células efetoras com diferentes funções imunes.

As principais populações CD4 efetoras são atualmente distinguidas como $T_{H}1$, $T_{H}2$ e $T_{H}17$, as quais ativam suas células-alvo e várias subpopulações de células T reguladoras que têm atividade inibidora limitando a extensão da ativação imune (JANEWAY *et al.*, 2010). Já os antígenos proteicos intracelulares sintetizados no citosol são processados em pequenos peptídeos pelo proteossoma, transportados para o retículo endoplasmático e então ligados às moléculas do MHC de classe I e expressos na superfície da célula para posteriormente serem reconhecidos pelo LT CD8 (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007) que se diferenciam em células T efetoras citotóxicas que reconhecem e matam as células infectadas (JANEWAY *et al.*, 2010) (Figura 06).

Figura 06. Características gerais das células T com destaque para os linfócitos T auxiliares (subtipos Th₁ e Th₂), células Th₁₇, linfócitos T citolíticos, linfócitos T $\gamma\delta$ e células T reguladoras naturais (TREGs) e induzidas (TR-1 e Th3)



Fonte: MESQUITA *et al.* (2010).

As moléculas co-estimulatórias que interagem durante a apresentação do antígeno fornecem um segundo sinal para a ativação dos linfócitos T (MURTAUGH; FOSS, 2002). Sem este segundo sinal não há uma resposta adequada e as células T tornam-se inativas, produzindo um estado de tolerância imunológica específica, conhecido por anergia clonal (KAMRADT; MITCHISON, 2001).

As respostas imunes adquiridas declinam à medida que o antígeno vai sendo eliminado e a imunidade inata vai se extinguindo, cessando os estímulos que são necessários para a sobrevivência dos linfócitos. Esse processo mantém a homeostase do sistema imune, fazendo-o retornar ao seu estado de repouso basal (MURTAUGH; FOSS, 2002).

2.5 Imunomodulação

A imunomodulação é um procedimento que interfere nas funções do organismo, onde a imunoestimulação resulta no aumento das respostas imunes inata ou adaptativa, enquanto que a imunossupressão implica na redução das respostas imunes (SILVA, 2008).

As respostas imunes são estimuladas quando o organismo é ameaçado. A ativação do sistema imunológico frente à colonização por agentes infecciosos propaga os sinais de distúrbio na balança fisiológica do hospedeiro o qual dispõe de mecanismos reguladores para o retorno à homeostase, no entanto, em algumas situações esses mecanismos poderão estar prejudicados (HOLLAND; VIZI, 2002). Os imunomoduladores são capazes de simultaneamente estimular algumas células do sistema imune e suprimir outras. Por exemplo, alguns compostos podem estimular a produção de anticorpos IgG2 e simultaneamente inibir a produção de IgM, ou ainda estimular linfócitos T e inibir linfócitos B (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003).

Compostos imunoestimulantes podem induzir a produção de macrófagos citotóxicos contra células tumorais e micro-organismos, a atividade fagocítica, aumentar a secreção de citocinas e quimiocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL -1, IL-6, IL-8, IL -12), interferon gama (IFN- γ) e IFN- β 2. Como potente imunoestimulador podemos citar o Levamisol®, que possui a capacidade de aumentar a atividade imunológica mediada por células, em que se incluem a diferenciação e a proliferação dos LT, e da atividade dos LT efetores (ANDRADE; SANTARÉM, 2002; BRAGA *et. al.*, 2007).

O uso de substâncias imunomoduladoras para melhorar a resposta de defesa do hospedeiro é uma das alternativas mais promissoras no tratamento com antibiótico clássico no (TZIANABOS, 2000). A ativação do sistema imune, em algumas situações, pode culminar

em patologias, necessitando de substâncias imunossupressoras para o controle, em contrapartida, fatores ambientais, parasitas e imunodeficiências tornam necessário o uso de substâncias imunoestimulantes (VASCONCELOS, 2006).

2.6 Modelo de Imunização por Hemácias de Carneiro

Muitos são os fatores que modulam o resultado de qualquer resposta imune e estes incluem o próprio antígeno. Quanto à natureza química do antígeno, os antígenos proteicos induzem imunidade celular e humoral. Os polissacarídeos e lipídios são incapazes de estimular células T através das moléculas de MHC classes I e II. No tocante às quantidades, doses elevadas do antígeno podem induzir tolerância específica das células T, ou em algumas vezes, das células B (KAMRADT; MITCHISON, 2001). A via de administração do antígeno também influencia a resposta imune, os antígenos administrados por via subcutânea ou intradérmica induzem uma resposta imune, sendo considerados como imunogênicos, enquanto que os antígenos administrado por via endovenosa, oral ou aerossol, muitas vezes induzem a falta de imunidade específica. O histórico anterior da exposição ao antígeno em questão também influencia na resposta imune. Se o animal já estiver sido exposto a um determinado antígeno, a memória imunológica permitirá uma resposta mais rápida (JANEWAY *et al.*, 2010).

As hemácias de carneiro são antígenos potentes, pois estimulam tanto a resposta mediada por linfócitos T, quanto por linfócitos B através da cooperação entre T e B, são caracterizadas como antígeno T – dependente, portanto o primeiro contato do antígeno com o organismo sensibiliza os linfócitos T tornando-os ativos, os quais sintetizam e liberam substâncias fisiologicamente ativas em células como macrófagos, monócitos, leucócitos polimorfonucleares e, provavelmente, outros leucócitos não- sensibilizados na área de contato com o antígeno (OSADEBE; OMEJE, 2009). Os linfócitos T auxiliares interagem com os linfócitos B promovendo sua diferenciação e consequentemente liberação de anticorpos.

Este antígeno promove a reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) que é uma reação desencadeada por linfócitos TCD4+ e células CD8+, e ambas secretam citocinas que ativam macrófagos (Interferon- γ) e induzem inflamação (fator de necrose tumoral (TNF)) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Esta reação é conhecida por iniciar reações entre as células T antígeno-específicos e o antígeno, que resulta na liberação de linfocinas que afetam uma variedade de células, especialmente os macrófagos (OSADEBE; OMEJE, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a composição fitoquímica, o potencial antioxidante total *in vitro* e a atividade imunomoduladora *in vivo* do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) adicionado com farinha do bagaço de caju em diferentes estádios de maturidade.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade antioxidante total do suco e da farinha do bagaço de caju maduro e verde *in vitro*;
- Identificar a composição fitoquímica do suco de caju maduro e da farinha do bagaço do caju maduro e verde *in vitro*;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do suco de caju maduro e do mesmo suco adicionado com farinha do bagaço de caju maduro e verde;
- Estudar a atividade do suco de caju maduro e do mesmo suco adicionado com farinhas do bagaço de caju maduro ou verde na modulação da resposta imune humoral de camundongos imunizados com hemácias de carneiro;
- Estudar a atividade do suco de caju maduro e do mesmo suco adicionado com farinhas do bagaço de caju maduro ou verde na modulação da resposta imune celular de camundongos imunizados com hemácias de carneiro.

4. MATERIAIS

4.1 Material Vegetal

O trabalho experimental foi realizado com pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP-76, coletados em setembro de 2011. Os pedúnculos foram obtidos do plantio da estação experimental da EMBRAPA em Horizonte-CE, colhidos manualmente e previamente selecionados quanto as suas características físicas, tais como aspecto, tamanho, maturidade (estádios 2 e 6) e qualidade sensorial. Estes estádios de maturidade foram escolhidos com base no trabalho de Vasconcelos, 2011, que investigou as atividades antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante do caju (*Anacardium occidentale* L.) nos estádios 2 e 6 de maturidade. Os pseudofrutos foram transportados para o laboratório de Bioenergética da Universidade Federal do Ceará (UFC) e armazenados a – 20°C, em sacos plásticos devidamente identificados.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, pesando entre 30-40 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, cujas matrizes são oriundas do Centro de Bioterismo da UNICAMP/São Paulo. Os animais foram mantidos sob-regime alimentar conveniente, água *ad libitum*, com ciclos de 12 horas no escuro e 12 horas no claro e condições de controle da temperatura e umidade.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) da UFC com protocolo de N° 102/2011 e os animais foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Reagentes Químicos

2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS); 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) adquiridos na Sigma Aldrich. Kits Labtest ref.: 53-200 (ALT) e 52-200 (AST). Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico.

5. MÉTODOS

5.1 Preparo das Amostras

5.1.1 Amostra de Caju para Preparo do Suco

Os pseudofrutos, em estádio 6 de amadurecimento, foram triturados em multiprocessador e filtrados em peneira para a obtenção da polpa e do bagaço que fica retido na peneira (figura 08). A partir da polpa de caju maduro, o suco foi preparado com água em uma proporção de 1:1 (v:v), acondicionado em microtubos âmbares a -20°C por 10 dias e utilizados para determinação dos compostos fitoquímicos, da atividade antioxidante total e atividade imunomoduladora.

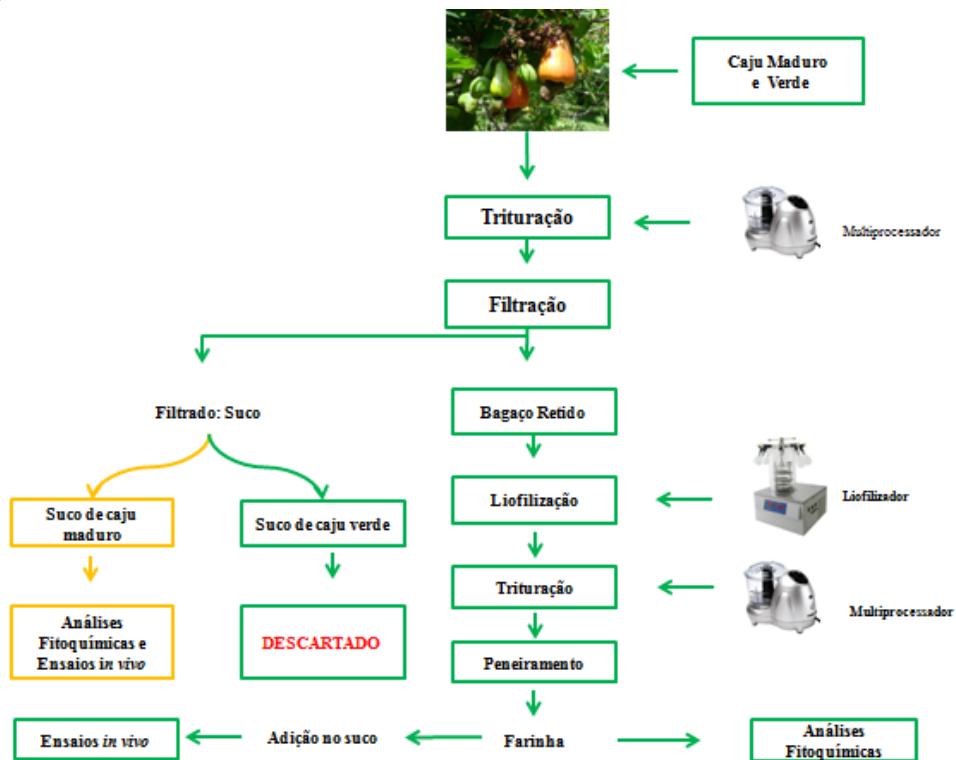
5.1.2 Farinha do Bagaço de Caju

Para preparar a farinha, foram utilizados bagaços de caju nos estádios 2 e 6 de maturidade, submetidos à liofilização durante um período de 14 horas para manter as propriedades nutricionais e sensoriais. Posteriormente, os resíduos liofilizados foram triturados em multiprocessador (figura 08) e logo após, os mesmos foram peneirados para obtenção da farinha de caju maduro e de caju verde (PINHO, 2009). As farinhas foram armazenadas em recipientes âmbares a 10°C por tempo indeterminado e utilizadas para determinação dos compostos fitoquímicos, da atividade antioxidante total e atividade imunomoduladora.

5.1.3 Preparo do Suco Adicionado com as Farinhas

As farinhas dos bagaços de caju maduro e verde nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg foram adicionadas ao suco de caju maduro (figura 08), homogeneizadas manualmente e armazenadas em microtubos âmbares a -20°C por 10 dias. As amostras foram administradas aos camundongos posteriormente para a realização das análises toxicológicas e imunomoduladoras.

Figura 08. Fluxograma do preparo do suco de caju e das farinhas de bagaços de caju maduro e verde



Fonte: BEZERRA (2013).

5.1.4 Preparo do Extrato Bruto para Análises de Antioxidante Total e Polifenóis Totais

O extrato utilizado para determinação da atividade antioxidante total e polifenóis totais foi obtido a partir de 2 g das amostras de suco de caju maduro e das farinhas de caju maduro e verde seguindo a metodologia de Larruri e colaboradores (1997) com adaptações por Rufino e colaborados (2007). Primeiramente 2 gramas de cada amostra foram colocados em um bêquer, adicionado com 40 mL de metanol 50%, homogeneizados e deixados em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. A centrifugação foi realizada a 15.000 rpm durante 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e denominado sobrenadante 1. Ao precipitado da primeira extração, foram adicionados 40 mL de acetona 70% e depois homogeneizados e deixado em repouso por 60 minutos a temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi realizada a 15.000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (sobrenadante 2) adicionado ao balão volumétrico contendo o sobrenadante 1. O volume final (balão) foi ajustado para 100 mL com água destilada.

Os extratos foram armazenados em recipientes âmbaras a -20°C durante 30 dias para realização das análises posteriores.

5.2 Estudo da atividade antioxidante total e dos compostos fitoquímicos

5.2.1 Atividade antioxidante total pelo método ABTS

A atividade antioxidante total foi determinada através de ensaio com o radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico] (ABTS), obtido pela reação de 5mL de ABTS 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM. A solução foi mantida em repouso, à temperatura ambiente (25°C), durante 16 h, na ausência de luz. Uma vez formado o radical ABTS, 1 mL do mesmo foi diluído em álcool etílico até se obter um valor de absorbância de 0,700± 0,05 nm em um comprimento de onda de 734 nm.

Para o preparo da curva padrão com o reagente Trolox, foram preparadas soluções variando as concentrações de 100 a 1500 µM a partir de uma solução estoque de Trolox de 2000 µM. Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL de cada solução de Trolox foi adicionada a 3 mL da solução do radical ABTS•+ e homogeneizada em agitador de tubos. O decréscimo da absorbância a 734 nm foi medido depois de 6 min. A partir dos dados obtidos foi possível construir uma curva com os valores das absorbâncias e concentrações das amostras, obtendo-se uma equação da reta ($y = -ax + b$) e calculou-se a absorbância referente a 1000 µM trolox.

A partir dos extratos obtidos no item **5.1.4**, foram preparadas três diluições diferentes, em triplicata, para cada amostra e procedeu-se o experimento de forma similar ao realizado no preparo da curva padrão. Os valores da atividade antioxidante total foram obtidos a partir da equação da reta ($y = -ax + b$), substituindo o valor de y pela absorbância equivalente a 1000 µM de Trolox, sendo os resultados expressos como TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) em µM de Trolox/g de amostra (RUFINO et al., 2007)a.

5.2.2 Atividade antioxidante total pelo método DPPH

O método do radical DPPH é baseado na captura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) com modificações de Rufino e colaboradores (2007b).

Para o preparo da curva padrão foi utilizada a solução inicial de DPPH (60µM) da qual foram preparadas várias soluções variando a concentração de 10 a 50 µM e utilizando álcool metílico como diluente. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 4 mL de cada

solução de DPPH para cubetas de vidro e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Logo após, calculou-se a equação da reta a partir das concentrações das soluções de DPPH e das respectivas absorbâncias.

A partir dos extratos obtidos no item **5.1.4**, foram preparadas três diluições diferentes, em triplicata, para cada amostra e transferiu-se uma alíquota de 0,1mL de cada diluição para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH[•] (60 µM) e homogeneizou-se em agitador de tubos. Uma alíquota de 0,1 mL da solução controle (álcool metílico 50%, acetona 70% e água destilada) também foi adicionada ao radical DPPH[•] e homogeneizada em agitador de tubos.

As leituras foram lidas a 515 nm e monitoradas a cada minuto, observando-se a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo da quantidade da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50) só foi feita após a estabilização da absorbância.

Para encontrar o consumo em g DPPH, foi utilizado o valor da absorbância do controle e substituído na equação da reta obtido no ensaio da curva padrão. As absorbâncias obtidas pelas diferentes diluições das amostras foram utilizadas para determinar a equação da reta e calcular a atividade antioxidante total da seguinte forma:

$$y = -ax + b$$

onde:

y = Absorbância inicial do controle / 2

x = EC50 (mg/L).

O valor de EC50 foi dividido pelo valor encontrado em g DPPH para obter o resultado final que é expresso em g de fruta / g DPPH.

5.2.3 Determinação qualitativa dos compostos fitoquímicos

5.2.3.1 Preparo dos extratos

Para avaliar as amostras de farinhas de bagaço de caju maduro e verde foi preparado um extrato hidroetanólico utilizando 200 mg de cada amostra com 12 mL de água destilada e 28 mL de etanol. A partir destes extratos foram realizados vários testes para determinação dos fitoquímicos (itens **5.2.3.2** até **5.2.3.10**), seguindo metodologia proposta por MATOS (2009).

5.2.3.2 Determinação de fenóis e taninos

Para avaliar a presença de fenóis foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico a dois tubos de ensaio contendo, cada um, 3-4 mL dos extratos. Depois de agitar vigorosamente cada tubo, observou-se cada reação em relação à variação da cor ou formação de precipitado escuro em abundância. O teste em branco foi realizado usando somente água destilada.

Uma coloração variável entre azul e o vermelho confirma a presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo. Já para identificar os taninos, a formação de um precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos) (MATOS, 2009).

5.2.3.3 Determinação de flavonoides

Para determinar a presença de flavonoides, como flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavonónois, pegou-se um tubo e alcalinizou-se até um pH 11. A observação de mudança de coloração para vermelho-laranja indica possível presença de flavanonóis, já para amarela, possível presença de flavonas, flavonóis e xantonas; quando a mudança de cor é para vermelho púrpura, possível presença de chalconas e auronas (MATOS, 2009).

5.2.3.4 Determinação de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

A presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas foi verificada utilizando dois tubos de ensaios com 3-4 mL das amostras, de modo que um dos tubos foi acidificado com HCl até atingir uma faixa de pH 1-3 e o outro tubo foi alcalinizado com NaOH até atingir o pH 11. Com o auxílio de uma lamparina, durante 2-3 minutos, o material foi aquecido. No tubo com pH ácido, a mudança de coloração para vermelho indica a possível presença de leucoantocianidinas e pardo-amarela a possível presença de catequinas. Já no tubo que foi alcalinizado, a mudança de coloração para vermelho alaranjado indica a possível presença de flavanonas (MATOS, 2009).

5.2.3.5 Determinação de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

A confirmação da presença de alguns constituintes do teste do item 5.2.3.3 e 5.2.3.4 foi realizada adicionando-se alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado em tubos de ensaio contendo 3-4 mL de cada extrato. Depois do término da reação, identificado pelo fim da efervescência, observou-se a reação a fim de detectar

mudanças na coloração da mesma. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é positivo para a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (MATOS, 2009).

5.2.3.6 Determinação de catequinas

Para confirmar a presença de catequinas avaliadas no item **5.2.3.4**, utilizou-se um palito de fósforo embebido nos extratos hidroetanólico preparados de acordo com o item **5.2.3.1**. Foi realizada a evaporação do etanol que estava embebido no palito e o mesmo foi novamente umedecido, em apenas uma face, com ácido clorídrico concentrado. Aqueceu-se o palito por 2-3 minutos ao calor de uma chama de álcool e então se observou aparecimento ou não de uma de coloração do lado acidulado do palito. A presença de cor vermelha ou pardavermelhada confirma a presença de catequinas (MATOS, 2009).

5.2.3.7 Determinação de esteróides e triterpenóides

A presença ou ausência de esteróides e triterpenóides foi determinada. As amostras foram submetidas a uma extração com 2 mL de clorofórmio, formando uma solução que, em seguida, foi filtrada em um funil fechado com um fragmento de algodão, coberto com 100 mg de sulfato de sódio anidro. Logo após, foi adicionado 1 mL de anidrido acético, agitou-se cuidadosamente e juntou-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Tornou-se a agitar suavemente e observou-se em relação à mudança de coloração.

Coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteróides livres e coloração parda até vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres (MATOS, 2009).

5.2.3.8 Determinação de saponinas

A presença ou ausência de saponinas foi determinada a partir do resíduo insolúvel em clorofórmio obtido do teste anterior. Este foi redissolvido em 5-10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. Agitou-se, fortemente por 2-3 minutos, o líquido obtido e em seguida observou-se quanto à formação ou não de espumas.

Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponina (heterosídeos saponínicos) (MATOS, 2009).

5.2.3.9 Teste confirmatório para saponinas

Para confirmar a presença de saponinas, ao tubo obtido no item **5.2.3.8**, foram adicionados 2 mL de HCl concentrado. Então o tubo foi deixado, durante pelo menos uma hora, imerso em banho-maria. Após retirar o tubo do banho-maria, deixou-se que este atingisse a temperatura ambiente (25°C) e realizou-se a neutralização seguida de agitação.

A presença de precipitado e a não formação de espuma, confirma a presença de saponinas (MATOS, 2009).

5.2.3.10 Determinação de alcalóides

A presença ou ausência de alcaloides foi determinada dissolvendo-se algumas miligramas das amostras brutas (farinha do bagaço de caju maduro e verde) em 5 mL de uma solução de HCl a 5%. A partir desta solução, separou-se 1 mL da mesma e adicionaram-se algumas gotas do reagente de Dragendorff, que é um reagente de precipitação de alcaloides.

Teste positivo para alcaloides se confirma com a formação de um precipitado de cor vermelho tijolo (MATOS, 2009).

5.2.4 Determinação dos Antioxidante não enzimáticos

5.2.4.1 Determinação dos polifenóis extraíveis totais

A quantificação de compostos polifenólicos foi realizada para as amostras de suco de caju maduro e para as farinhas dos bagaços de caju maduro e verde, conforme descrito por Obanda e Awuor (1997). Esse método envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteau pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 700 nm. Para a quantificação de polifenóis, foram preparadas diferentes concentrações dos extratos do suco de caju e das farinhas (extrato preparado conforme item 5.2.4.1) e em seguida foi retirado de cada extrato uma alíquota de 250 μ L do extrato de suco ou farinha e adicionados, em microtubos, juntamente com 250 μ L do reagente de Folin Ciocalteau (1:3), 500 μ L da solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) a 20 % e 500 μ L água destilada. A mistura foi submetida à homogeneização e deixada em repouso à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos, protegida da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 700 nm. Como padrão, foi utilizada uma solução de ácido gálico em diferentes concentrações e procedeu-se o experimento de forma semelhante ao realizado com os extratos. As concentrações de polifenóis solúveis totais foram calculadas com base nos dados obtidos a partir da curva padrão do ácido gálico 98%. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/ 100 g de amostra.

5.2.4.2 Determinação de Vitamina C Total

Para a determinação do teor de vitamina C nas diferentes amostras, foi utilizada a solução de Tilman (2,6-dicloro-fenol-indofenol, 0,02%-DFI) segundo metodologia de Strohecker e Henning (1967). Primeiramente, realizou-se a padronização da solução de Tilman, tomando-se 5 mL da solução da ácido ascórbico (50 µg/ml) em um erlenmeyer de 125 mL e completando o volume com ± 50 mL de água destilada. Realizou-se a titulação com a solução de Tilman refrigerada até o ponto de viragem, róseo claro, persistente por 15 segundos. A titulação foi realizada em triplicata e os volumes obtidos foram utilizados para calcular o título do reagente, ou seja, quantidade de ácido ascórbico necessária para titular 1 mL da solução de Tilman.

Já para determinar a quantidade de vitamina C nas amostras de suco de caju e farinhas do bagaços de caju, utilizou-se 1 ou 3 g do suco e das farinhas, respectivamente e adicionou-se ácido gálico a 0,5% até aferição em um balão de 100 mL. A partir desta solução com ácido gálico, pegou-se 5 mL de cada extrato e colocou-se em um erlenmeyer de 125 mL e completou-se com ± 50 mL de água destilada. A titulação com a solução de Tilman foi realizada até o ponto de viragem. Foram feitas 3 repetições por amostra. O teor de vitamina C foi calculado utilizando os volumes das titulações juntamente com o título determinado na padronização da solução de Tilman. Os valores foram expresso em mg de vitamina C por 100 g da amostra.

5.2.4.3 Determinação de antocianinas

Para o preparo do extrato utilizado na determinação de antocianinas foi utilizado 1 g da amostra de suco de caju maduro e 0,5 g das amostras de farinhas de bagaço de caju maduro e verde, seguindo metodologia proposta por Francis (1982). As amostras foram transferidas para um balão volumétrico âmbar (50 mL), aferidas com solução extratora (etanol-HCl 1,5 M), agitadas e por fim mantidas em repouso a 4°C overnight. Após esse tempo, o material foi filtrado para um bêquer (50 mL) protegido da luz e em seguida, a absorbância foi medida a 535 nm. O branco foi composto apenas pela solução extratora. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de amostra através da fórmula:

Absorbância x fator de diluição
98,2

5.2.4.4 Determinação de flavonoides amarelos

Para a determinação dos flavonoides amarelos nas amostras de suco de caju maduro e farinha do bagaço de caju maduro e verde, as análises foram realizadas de forma semelhante à análise de antocianinas, porém com uma leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 374 nm.

Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de amostra através da fórmula:

$$\frac{\text{Absorbância x fator de diluição}}{76,6}$$

5.2.4.5 Determinação de carotenoides totais

Os carotenoides totais de suco de caju maduro e das farinhas dos bagaços de caju maduro e verde foram determinados pelo método de Higby (1962). Em um bêquer de 100 mL, foram adicionados as amostras, 5 g de suco ou 1 g de farinha, 15 mL de álcool isopropílico e 5mL de hexano, seguido de agitação por 1 min. A solução foi transferida para um funil de separação âmbar de 125 mL e o volume do mesmo foi ajustado com água destilada. Após repouso por 30 minutos, a lavagem do material foi realizada retirando a fase aquosa e deixando a fase de cor amarela. Esta operação foi realizada por mais 2 vezes. O conteúdo foi filtrado com o auxílio de um algodão pulverizado com sulfato de sódio anidro para um balão volumétrico de 50 mL protegido da luz, ao qual foram adicionados 2,5 mL de acetona e o volume ajustado com hexano. O branco foi composto de 2,5 mL de acetona e 22,5 mL de hexano. As leituras foram feitas a 450 nm e os resultados expressos em mg/100 g.

5.3 Avaliação da toxicidade sub-aguda das farinhas de caju

5.3.1 Grupos experimentais

Para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do suco de caju maduro suplementado com a farinha do bagaço de caju maduro nas concentrações de 75 (SFM75), 150 (SFM150) e 300 (SFM300) mg/kg de peso corporal, suco de caju maduro adicionado com a farinha do bagaço de caju verde nas concentrações de 75 (SFV75), 150 (SFV150) e 300 (SFV300) mg/kg de peso corporal e para os grupos controle e suco, foram utilizados 80 camundongos swiss machos pesando entre 30-40 g, divididos em 8 grupos experimentais (n=10).

Os animais receberam 200 µL das diferentes amostras em dose única diária por via oral, através de sonda orogástrica, durante 19 dias consecutivos de acordo com o seguinte protocolo: Grupo Controle: animais que receberam água destilada; Grupo Suco: animais que

receberam suco de caju; Grupos SFM75, SFM150 e SFM300: animais que receberam suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju maduro nas concentrações de 75, 150 e 300 mg/kg, respectivamente; Grupos SFV75, SFV150 e SFV300: animais que receberam suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju verde nas concentrações de 75, 150 e 300 mg/kg, respectivamente.

Os animais foram observados diariamente após a administração das amostras. Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e estes avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade. O exame clínico foi realizado baseado na observação das frequências respiratória e cardíaca; mudanças comportamentais e parâmetros como: diarréia e constipação, lacrimejamento, sialorreia, eriçamento de pelos, cianose e mortalidade. No último dia (19º dia), os animais foram pesados, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital e, em seguida, estes foram eutanasiados por deslocamento cervical e necropsiados para observação macroscópica.

A retirada do timo, do baço, do rim e do fígado de forma asséptica foi realizada para registro de seus pesos. O peso relativo de cada órgão foi calculado pela fórmula: 100x (peso do órgão)/peso corporal do animal. O fígado de cada animal foi assepticamente retirado, uma porção de 0,1 g foi pesada e congelada rapidamente em nitrogênio líquido e armazenado a - 80°C para análise posterior de peroxidação lipídica.

5.3.2 Determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) no soro de camundongos

Foram realizados ensaios para a avaliação da função hepática através da dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST). Para tanto, foram utilizados os soros dos animais de cada grupo teste. Os resultados foram expressos em UI/mL. Todas as dosagens foram realizadas utilizando-se Kit's comerciais (Labtest®) e as metodologias específicas foram seguidas conforme instruções do fabricante, utilizando espectrofotômetro para obtenção dos resultados.

5.3.3 Ensaio de peroxidação lipídica

O ensaio de peroxidação lipídica foi realizado de acordo com Agar e colaboradores (1999). Esse método avalia o estresse oxidativo pela medida do malondialdeído (MDA), que consiste no último produto da quebra dos lipídios causada pelo estresse oxidativo.

Primeiramente, pegou-se 0,1 g de fígado de camundongos e macerou-se com 1 mL de tampão cloreto de potássio 10% (pH 7,4). Logo após, foram retirados 250 µL desse

homogenato e as amostras foram mantidas a 37°C durante 60 minutos em banho-maria. Posteriormente, 400 µL de ácido perclórico 35% foram adicionados ao homogenato e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (600 µL) foi misturado com 200 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2% e aquecido a 98°C durante 30 minutos em banho-maria. Após esse período, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente até o resfriamento e depois foram colocadas em placas de 96 poços sendo a absorbância lida em leitor de placa a 532 nm. Para a realização dos cálculos, utilizou-se o reagente 1,1,3,3 tetrametoxipropano como padrão, construindo-se uma curva com diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA por grama de tecido (nmol MDA/g de tecido).

5.4 Estudo do efeito imunomodulador do caju

5.4.1 Antígenos

As hemácias de carneiro (HC) foram obtidas por punção da veia jugular de carneiros oriundos da FAVET (Faculdade de Veterinária) da Universidade Estadual do Ceará. O sangue dos carneiros coletados em tubos com EDTA foi submetido a três lavagens com solução salina estéril (NaCl, 0,9%) através de centrifugações a 5000 rpm por 10 min. O concentrado de hemácias obtido foi ajustado para uma concentração de 5% (imunização) ou 1% (desafio) (VASCONCELOS, 2006).

5.4.2 Divisão dos grupos

Foram utilizados 70 camundongos *swiss* machos pesando entre 30-40 g, distribuídos em 7 grupos de 10 animais, recebendo doses diárias de 200 µL por via oral dos diferentes tratamentos, por 19 dias consecutivos, de acordo com o seguinte protocolo: Grupo Controle: animais que receberam água destilada; Grupo Leva: animais que receberam levamisol (10 mg/kg) diluído em água destilada; Grupo Suco: animais que receberam suco de caju; Grupos SFM75 e SFM300: animais que receberam suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju maduro nas concentrações de 75 e 300 mg/kg, respectivamente; Grupos SFV75 e SFV300: animais que receberam suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju verde nas concentrações de 75 e 300 mg/kg, respectivamente. Todos os grupos foram imunizados com 100 µL de HC 5% por via intraperitoneal (via i.p.) nos dias 5 e 12 após início dos tratamentos.

5.4.3 Desenho Experimental

Os animais foram submetidos aos diferentes tratamentos (levamisol, suco, SFM75, SFM 300, SFV75 e SFV300), por via oral, durante 19 dias consecutivos. A metodologia seguiu protocolo estabelecido por Sharma e colaboradores (1996) com modificações. Após 5 dias de tratamento, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital e imunizados com HC 5% (via i.p.) (dia zero da imunização). No 7º dia após a primeira imunização, os animais foram novamente sangrados e imunizados nas mesmas condições. Finalmente, no 14º dia após a primeira imunização (7 dias após o reforço), os animais foram sangrados. Todos os soros obtidos (0, 7 e 14 dias) foram armazenados a -80°C (Figura 09).

5.4.4 Avaliação da resposta imune humoral pelo teste de hemaglutinação

Os títulos de anticorpos específicos para hemácias de carneiro foram determinados pelo método de hemaglutinação (SHARMA *et al.*, 1996). Para uma alíquota de 25 µL do soro de cada animal, foram realizadas diluições em série com solução salina estéril (NaCl 0,9%) em placas de microtitulações de 96 poços. Em seguida, sensibilizou-se cada poço com hemácia de carneiro a 1%. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. A reação de aglutinação foi observada ao microscópio óptico e o título de anticorpos de cada animal foi expresso como o inverso da maior diluição positiva para hemaglutinação.

5.4.5 Avaliação da resposta imune celular pela reação de hipersensibilidade tardia

Para avaliação da resposta imune celular, no 19º dia de tratamento os camundongos foram desafiados com 50 µL de HC a 1% no coxim plantar da pata traseira direita (Figura 09). Após 24, 48 e 72 horas do desafio, as patas direitas foram medidas com um micrômetro circular para a determinação do edema. Tais medidas referem-se à reação de hipersensibilidade tardia (DTH) (TITUS; CHILLER, 1981)

Figura 08. Esquema de Imunização e Desafio com Hemácias de Carneiro



Fonte: BEZERRA (2013).

5.4.6 Determinação do peso relativo do timo e do baço

Ao final do experimento que avaliou a resposta imune celular, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos timo e baço foram retirados de forma asséptica para registro de seus pesos. O peso relativo de cada órgão foi calculado pela fórmula: $100 \times (\text{peso do órgão}) / \text{peso corporal do animal}$.

5.5 Análise estatística

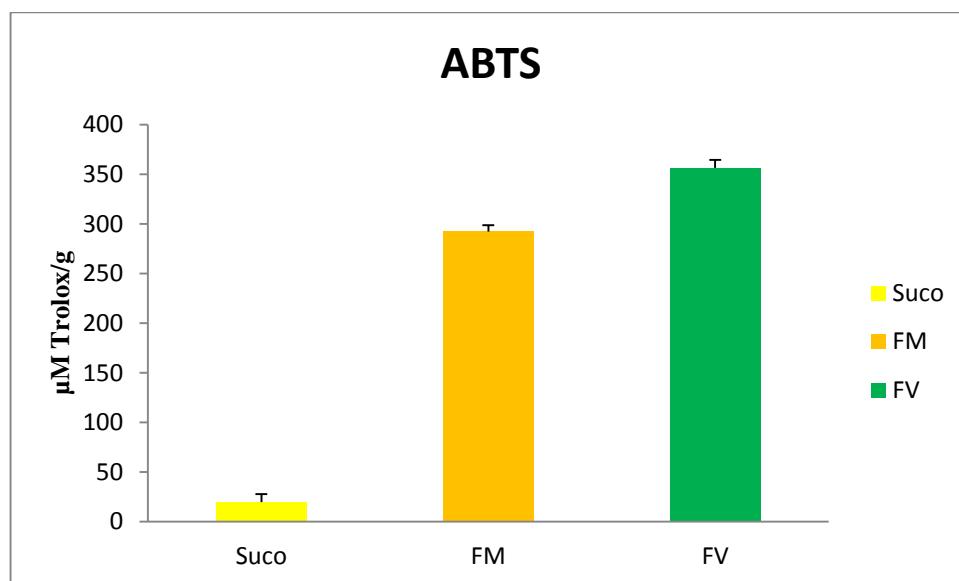
Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão. Para comparar os dados entre os grupos, foi realizada a análise estatística dos dados, utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ou Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Capacidade Antioxidante Total

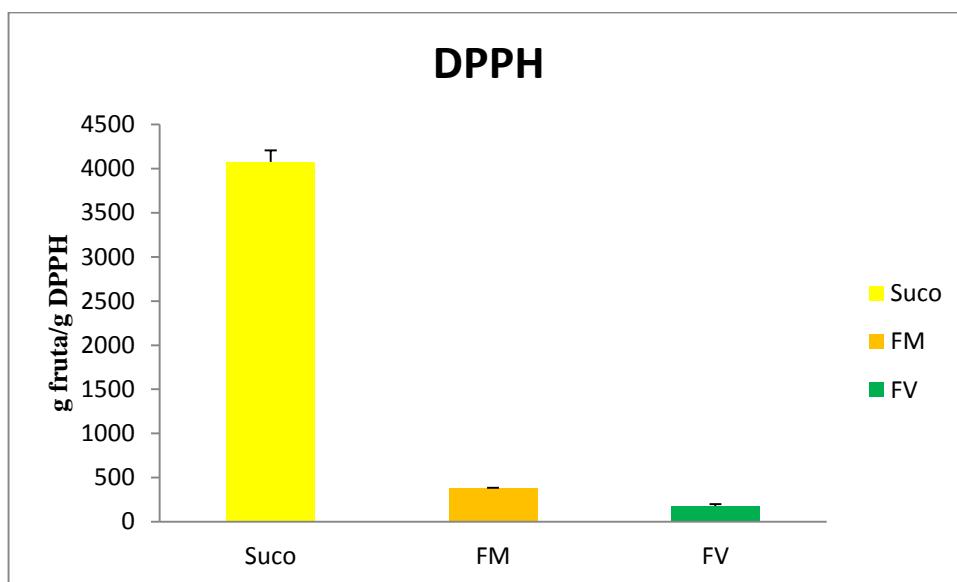
O suco de caju e a farinha do bagaço de caju maduro (FM) e de caju verde (FV) foram avaliados quanto à capacidade antioxidante total pelo método de sequestro do radical ABTS e do radical DPPH. Os resultados obtidos foram calculados através das médias de análises realizadas em duplicita de dois experimentos independentes. Em relação ao método do radical ABTS, as atividades obtidas para as duas farinhas do bagaço de caju (maduro e verde) e para o suco de caju foram de $292,10 \pm 6,4$; $356,52 \pm 7,94$ e $19,83 \pm 8,11 \mu\text{M}$ Trolox/g, respectivamente (Figura 10). Já para o método do radical DPPH, os valores encontrados foram $382,68 \pm 0,43$; $176,82 \pm 22,49$ e $4076,3 \pm 131,35$ g de fruta/g de DPPH para as farinhas do bagaço de caju maduro e verde e para o suco de caju, respectivamente (Figura 11).

Figura 09. Capacidade antioxidante total do suco de caju, farinha do bagaço de caju maduro (FM) e caju verde (FV) obtida pelo método ABTS



Os resultados representam a média de dois experimentos independentes \pm erro padrão.

Figura 10. Capacidade antioxidante total do suco de caju, farinha do bagaço de caju maduro (FM) e caju verde (FV) obtida pelo método DPPH



Os resultados representam a média de dois experimentos independentes \pm erro padrão.

6.2 Perfil Fitoquímico e Antioxidantes não enzimáticos

6.2.1 Perfil Fitoquímico

A determinação qualitativa dos compostos fitoquímicos foi realizada em amostras de farinha de bagaço de caju maduro e verde. Foi determinada presença de fenóis, taninos pirogálicos, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas e esteroides em ambas as amostras (Tabela 02).

6.2.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos do suco de caju, da farinha do bagaço de caju maduro e da farinha do bagaço de caju verde estão apresentados na tabela 03 e na figura 12.

Os teores encontrados no suco de caju para vitamina C; antocianinas; flavonoides amarelos e carotenoides foram $81,43 \pm 0,0$; $0,6 \pm 0,09$; $1,33 \pm 0,16$; $0,26 \pm 0,03$ mg/100g de amostra, respectivamente. Os valores de vitamina C, antocianinas, flavonoides amarelos e carotenoides para a farinha de caju maduro foram $242,05 \pm 41,19$; $5,95 \pm 0,40$; $56,76 \pm 1,06$; $10,35 \pm 0,15$ mg/100g de amostra, respectivamente, enquanto que para a farinha verde foram de $31,76 \pm 0,80$; $4,17 \pm 0,45$; $57,70 \pm 1,7$; $3,45 \pm 0,07$ mg/100g de amostra para vitamina C, antocianinas, flavonoides amarelos e carotenoides, respectivamente (Tabela 03).

Tabela 02. Caracterização Fitoquímica das Farinhas dos Bagaços de Caju Maduro (FM) e Verde (FV)

Constituintes fitoquímicos	FM	FV
Fenóis	+	+
Taninos Pirogálicos	+	+
Taninos Flobabênicos	-	-
Flavonas	+	+
Flavonóis	+	+
Xantonas	+	+
Chalconas	-	-
Auronas	-	-
Flavanonóis	-	-
Flavanonas	+	+
Leucoantocianidinas	-	-
Catequinas	-	-
Esteróides	+	+
Triterpenóides	-	-
Saponinas	-	-
Alcaloides	-	-

(+) Presença e (-) Ausência

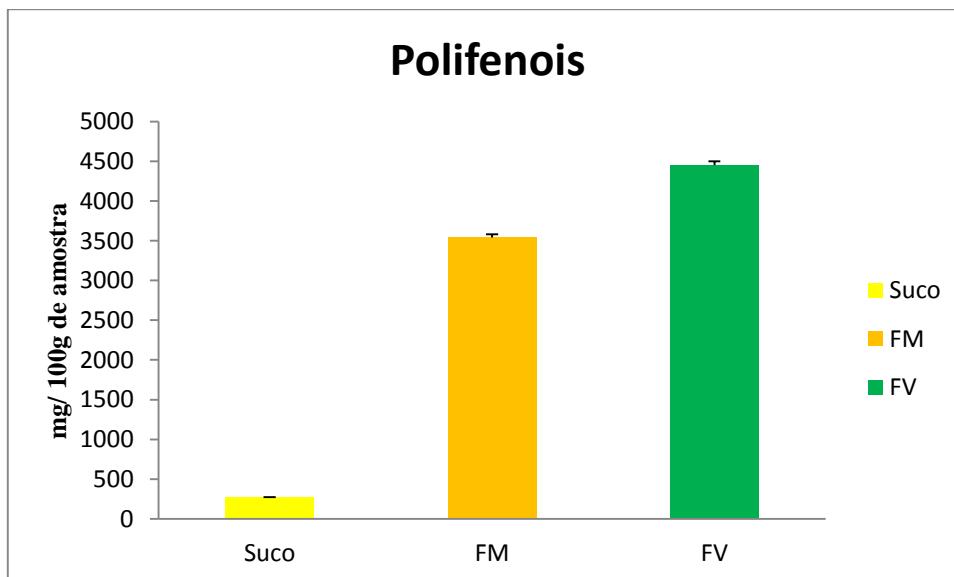
Tabela 03. Conteúdo de compostos fitoquímicos do Suco de Caju, da Farinha do Bagaço de caju maduro (FM) e da Farinha do Bagaço de caju verde (FV)

Fitoquímicos (mg/100g amostra)	Suco	FM	FV
Vitamina C	81,43 ± 0,0	242,05 ± 41,19	31,76±0,80
Antocianinas	0,6 ± 0,09	5,95 ± 0,40	4,17 ± 0,45
Flavonoides Amarelo	1,33 ± 0,16	56,76 ± 1,06	57,70 ± 1,7
Carotenoides Totais	0,26± 0,03	10,35 ± 0,15	3,45 ± 0,07

Os resultados representam a média de dois experimentos independentes ± erro padrão

Foram determinados teores de polifenóis extraíveis totais. Para a amostra de suco de caju foi de $270,04 \pm 2,17$; para a farinha do bagaço de caju maduro de $3.541,44 \pm 49,63$ e para a farinha do bagaço de caju verde de $4.450,62 \pm 24,81$ mg/100g de amostra (Figura 12).

Figura 11. Polifenóis extraíveis totais do suco de caju, farinha do bagaço de caju maduro (FM) e caju verde (FV)



Os resultados representam a média de dois experimentos independentes ± erro padrão.

6.3 Toxicidade Sub-aguda

Para avaliar a toxicidade em animais alimentados com suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju maduro ou verde, parâmetros comportamentais, fisiológicos e bioquímicos foram avaliados.

Não foi observado nenhum sintoma de toxicidade, tais como alterações nas frequências respiratória e cardíaca, diarreia, lacrimejamento, sialorréia e eriçamento de pelos. Os órgãos, avaliados macroscopicamente, não apresentaram nenhum sinal de anormalidade e o peso corporal aumentou de acordo com o esperado para o desenvolvimento fisiológico normal dos animais durante o período do experimento (Tabela 04). Não houve morte de animais em nenhum dos grupos. Em relação ao peso relativo dos órgãos, não foi observada variação significativa para nenhum dos órgãos avaliados de qualquer grupo em relação ao controle (Tabela 05).

Tabela 04. Efeitos do tratamento com suco de caju adicionado com as farinhas do bagaço de caju sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais em camundongos

Tratamento	Mortalidade (nº de morte/ n)	Peso (g)		Sintomas Tóxicos
		Dia 0	Dia 19	
Controle	0/10	32,55 ± 0,69	39,59 ± 0,49 ^a	Nenhum
Suco	0/10	30,10 ± 0,41	38,84 ± 0,40 ^a	Nenhum
SFM75	0/10	32,56 ± 0,80	35,94 ± 1,15 ^a	Nenhum
SFM150	0/10	33,89 ± 0,76	37,83 ± 0,97 ^a	Nenhum
SFM300	0/10	34,10 ± 0,69	37,65 ± 0,75 ^a	Nenhum
SFV75	0/10	31,78 ± 0,70	35,17 ± 0,67 ^a	Nenhum
SFV150	0/10	33,20 ± 0,96	36,65 ± 1,16 ^a	Nenhum
SFV300	0/10	32,85 ± 0,76	36,80 ± 0,98 ^a	Nenhum

Dados apresentados como média ± erro padrão. Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Maduro nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg (SFM75, SFM150 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Verde nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg (SFV75, SFV150 e SFV300).

(a) Diferença estatística em relação ao peso do animal no dia zero ($p < 0,05$).

Tabela 05. Efeito do suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju sobre o peso relativo dos órgãos

Tratamento	Fígado	Rim	Baço	Timo
Controle	3,695 ± 0,08	0,646 ± 0,02	0,309 ± 0,03	0,102 ± 0,01
Suco	3,657 ± 0,08	0,689 ± 0,03	0,277 ± 0,02	0,108 ± 0,01
SFM75	3,743 ± 0,08	0,662 ± 0,02	0,363 ± 0,03	0,091 ± 0,01
SFM150	3,782 ± 0,08	0,698 ± 0,01	0,265 ± 0,02	0,104 ± 0,01
SFM300	3,603 ± 0,05	0,693 ± 0,02	0,261 ± 0,02	0,090 ± 0,01
SFV75	3,761 ± 0,13	0,658 ± 0,02	0,329 ± 0,03	0,090 ± 0,01
SFV150	3,655 ± 0,11	0,628 ± 0,03	0,267 ± 0,01	0,114 ± 0,01
SFV300	3,895 ± 0,07	0,710 ± 0,01	0,302 ± 0,02	0,097 ± 0,01

Dados apresentados como média ± erro padrão. Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Maduro nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg (SFM75, SFM150 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Verde nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg (SFV75, SFV150 e SFV300).

Os valores dos pesos dos órgãos foram calculados como $100 \times (\text{peso do órgão}) / (\text{peso do animal})$.

A tabela 06 apresenta o efeito do tratamento com suco de caju adicionado ou não com a farinha do bagaço de caju maduro ou verde sobre a atividade da ALT, da AST e sobre a peroxidação lipídica no fígado.

Em relação à atividade da ALT, foram obtidos valores para o grupo Controle de 61,09 ± 5,25; Suco de 73,36 ± 4,46; SFM 75 de 49,35 ± 6,85; SFM150 de 37,47 ± 3,19; SFM300 de 37,73 ± 6,54; SFV75 de 38,53 ± 3,27; SFV150 de 46,82 ± 4,05 e SFV300 de 54,68 ± 5,69 U/L. Não foi observada diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos, entretanto houve uma diminuição significativa nos grupos SFM150 (48,92%), SFM300 (48,98%) e SFV75 (47,48%) em relação ao grupo Suco.

Perfil semelhante foi evidenciado para a atividade da AST, foram obtidos valores em U/L para os grupos: Controle de 146,2 ± 6,93; Suco de 164,3 ± 5,73; SFM 75 de 134,0 ± 6,79; SFM150 de 125,6 ± 6,46; SFM300 de 129,1 ± 4,72; SFV75 de 134,8 ± 5,22; SFV150 de 135,7 ± 7,83 e SFV300 de 140,4 ± 9,30, observando-se uma diminuição significativa nos grupos SFM150 (23,55%) e M300 (21,42%) em relação ao grupo Suco (Tabela 06).

Para a peroxidação lipídica, foram evidenciados valores de nmol MDA/g tecido para os grupos controle e suco de 166,2 ± 20,94 e 214,1 ± 30,51, respectivamente; para os grupos SFM75, SFM 150 e SFM 300 de 229,8 ± 23,79; 157,3 ± 21,83 e 147,3 ± 21,31,

respectivamente; enquanto para os grupos SFV75, SFV150 e SFV300 de $170,1 \pm 25,71$; $190,4 \pm 23,94$ e $173,9 \pm 29,73$, respectivamente (Tabela 06). Não foi observado nenhuma diferença significativa nos níveis de MDA dos grupos tratados com suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju maduro e com a farinha do bagaço de caju verde (75, 150 e 300 mg/kg) quando comparados ao controle.

Tabela 06. Efeito do suco de caju adicionado com a farinha do bagaço do caju sobre as enzimas: alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) e sobre a peroxidação lipídica

Tratamento	ALT (U/L)	AST (U/L)	Peroxidação Lipídica (nmol MDA/g tecido)
Controle	$61,09 \pm 5,25$	$146,2 \pm 6,93$	$166,2 \pm 20,94$
Suco	$73,36 \pm 4,46$	$164,3 \pm 5,73$	$214,1 \pm 30,51$
SFM75	$49,35 \pm 6,85$	$134,0 \pm 6,79$	$229,8 \pm 23,79$
SFM150	$37,47 \pm 3,19^b$	$125,6 \pm 6,46^b$	$157,3 \pm 21,83$
SFM300	$37,73 \pm 6,54^b$	$129,1 \pm 4,72^b$	$147,3 \pm 21,31$
SFV75	$38,53 \pm 3,27^b$	$134,8 \pm 5,22$	$170,1 \pm 25,71$
SFV150	$46,82 \pm 4,05$	$135,7 \pm 7,83$	$190,4 \pm 23,94$
SFV300	$54,68 \pm 5,69$	$140,4 \pm 9,30$	$173,9 \pm 29,73$

Dados apresentados como média \pm erro padrão. Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Maduro nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg (SFM75, SFM150 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Verde nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg (SFV75, SFV150 e SFV300).

A letra **a** representa diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle e a letra **b** em relação ao suco.

6.4 Resposta Imune Humoral

A Tabela 07 e a Figura 13 apresentam os resultados dos títulos de anticorpos primários e secundários do soro de camundongos imunizados com hemácias de carneiro, que foram tratados ou não com suco de caju adicionado com as farinhas dos bagaços de caju maduro ou verde.

Na resposta primária, houve produção de anticorpos anti-hemácias de carneiro em todos os grupos (Tabela 07 e Figura 13). Foram evidenciados títulos de anticorpos aglutinantes anti-hemácia de carneiro que variaram de $73,60 \pm 9,60$ (Grupo Suco) a $124,8 \pm 24,53$ (Grupo SFM300), entretanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 07).

Na resposta secundária, foi evidenciado um aumento na produção de anticorpo anti-hemácias de carneiro para todos os grupos em relação à sua resposta primária (Figura 13). Como mostrado na Tabela 07, os títulos de anticorpos variaram de $371,2 \pm 48,46$ (Grupo Controle) a $819,2 \pm 106,6$ (Grupo Suco). Os grupos Levamisol, Suco e SFV300 apresentaram os maiores títulos de anticorpos, com aumento significativo ($p < 0,05$) de 99,25%; 120,6%; e 100,00%, respectivamente, em relação ao Controle. Ademais, o grupo suplementado com o suco apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos SFM75 (46,18%), SFM300 (53,13%) e SFV75 (44,45%) (Tabela 07).

A figura 13 mostra que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos título de anticorpos secundários, em todos os tratamentos, em relação aos títulos de anticorpos primários correspondentes. Esse aumento foi de 1013,04% para Suco; 376,96% para SFM75; 207,69% para SFM300; 312,98% para SFV75; 603,03% para SFV300; 824,50% para Levamisol e 262,50% para controle.

Na tabela 08 podem ser observados os pesos relativos dos órgãos timo e baço dos camundongos no último dia dos tratamentos. Não houve diferença estatística, entre o peso do timo e do baço dos animais tratados quando comparados com o controle ($p > 0,05$).

Tabela 07. Títulos de anticorpos aglutinantes anti-hemácias de carneiro

Tratamento	Título de Anticorpos		Estimulação (%) [*]
	Título Primário	Título Secundário	
		7 Dias	
Controle	$102,4 \pm 28,14^A$	$371,2 \pm 48,46^B$	262,50
Levamisol	$80,00 \pm 13,70^A$	$739,6 \pm 89,95^{a,B}$	824,50
Suco	$73,60 \pm 9,60^A$	$819,2 \pm 106,6^{a,B}$	1013,04
SFM75	$92,44 \pm 27,94^A$	$440,9 \pm 88,25^{b,B}$	376,96
SFM300	$124,8 \pm 24,53^A$	$384,0 \pm 85,33^{b,d,B}$	207,69
SFV75	$110,2 \pm 32,49^A$	$455,1 \pm 37,63^{b,B}$	312,98
SFV300	$105,6 \pm 11,73^A$	$742,4 \pm 96,92^{a,B}$	603,03

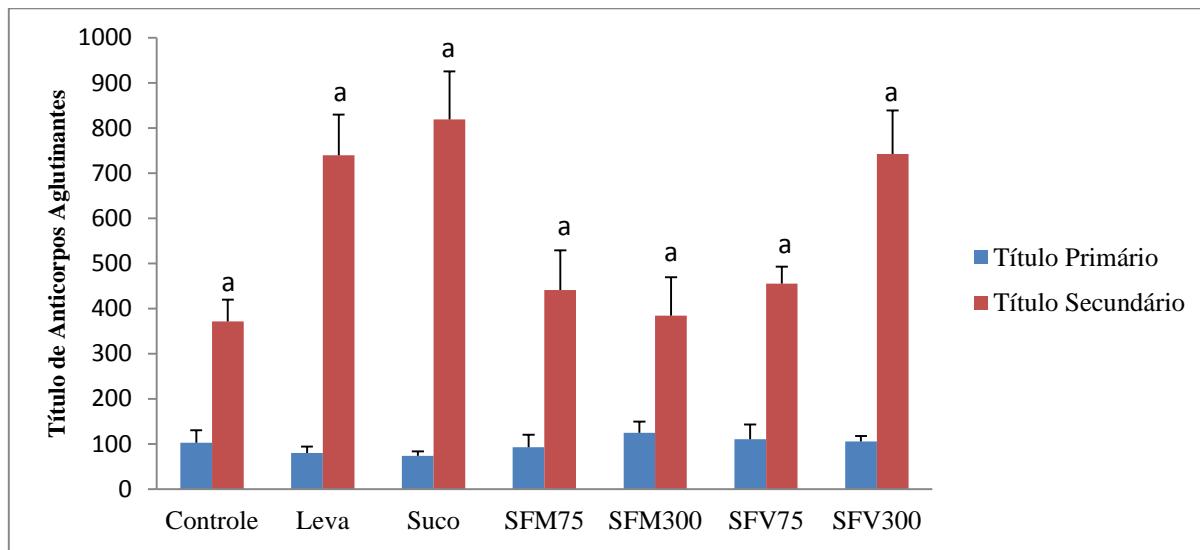
Dados apresentados como média ± erro padrão ($n = 10$). Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Levamisol 10 mg/kg (Levamisol), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Maduro nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFM75 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Verde nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFV75 e SFV300).

A letra **a** representa diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle, a letra **b** em relação ao suco, a letra **c** em relação ao Levamisol e a letra **d** em relação ao SFV300.

Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os intervalos de tempo analisados dentro de cada grupo foram representadas pelas letras A e B.

* Estimulação do título de anticorpos da resposta secundária em relação à resposta primária.

Figura 12. Títulos de anticorpos aglutinantes anti-hemácias de carneiro no 7º (título primário) e no 14º (título secundário) dia de imunização



Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Levamisol 10mg/kg (Levamisol), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Maduro nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFM75 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Verde nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFV75 e SFV300).

A letra **a** representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao dia 7 (resposta primária).

Tabela 08. Efeito da imunização com hemácias de carneiro sobre o peso relativo do timo e do baço

Tratamento	Timo	Baço
Controle	$0,102 \pm 0,01$	$0,309 \pm 0,03$
Levamisol	$0,113 \pm 0,01$	$0,311 \pm 0,03$
Suco	$0,108 \pm 0,01$	$0,277 \pm 0,02$
SFM75	$0,091 \pm 0,01$	$0,363 \pm 0,03$
SFM300	$0,090 \pm 0,01$	$0,261 \pm 0,02$
SFV75	$0,090 \pm 0,01$	$0,329 \pm 0,03$
SFV300	$0,097 \pm 0,01$	$0,302 \pm 0,02$

Dados apresentados como média \pm erro padrão. ($n = 10$)

6.5 Resposta Imune Celular

A Tabela 09 e a Figura 14 apresentam os resultados obtidos para reação de hipersensibilidade tardia (DTH), após desafio com hemácias de carneiro, de camundongos imunizados com hemácias de carneiro, que foram tratados ou não com suco de caju adicionado com as farinhas dos bagaços de caju maduro ou verde. A espessura da pata foi medida em quatro tempos: antes (tempo zero), 24, 48 e 72 horas após o desafio com hemácias

de carneiro. Não foi evidenciada variação na espessura das patas do grupo Controle, sendo os valores (expressos em mm) para o dia zero de $2,25 \pm 0,07$; para 24 h de $2,26 \pm 0,07$; para 48 h de $2,27 \pm 0,07$ e para 72 h de $2,25 \pm 0,07$ (Tabela 9). Para o Levamisol, os valores (em mm) foram de $2,35 \pm 0,05$ para o dia zero; de $2,46 \pm 0,04$ após 24 h; de $2,50 \pm 0,02$ após 48 h e de $2,42 \pm 0,03$ após 72 h (Tabela 9). Os valores de DTH para o Suco foram de $2,29 \pm 0,03$ para o tempo zero; $2,40 \pm 0,05$ após 24 h; $2,49 \pm 0,04$ após 48 h e $2,46 \pm 0,03$ para 72 h. Para SFM75, nos tempos zero, 24, 48 e 72 h, os valores de DTH (em mm) foram de $2,31 \pm 0,05$; $2,30 \pm 0,03$; $2,37 \pm 0,02$ e $2,34 \pm 0,03$; respectivamente. Já para SFM300, nos tempos zero, 24, 48 e 72 h, os valores de DTH (em mm) foram de $2,29 \pm 0,03$; $2,34 \pm 0,02$; $2,49 \pm 0,02$ e $2,47 \pm 0,03$; respectivamente. Os valores de DTH para o SFV75 foram de $2,26 \pm 0,01$ para o tempo zero; $2,35 \pm 0,03$ após 24 h; $2,43 \pm 0,05$ após 48 h e $2,38 \pm 0,02$ após 72 h. Para SFV300, foram determinados valores de DTH (em mm) de $2,27 \pm 0,02$ para o tempo zero; $2,43 \pm 0,03$ após 24 h; $2,40 \pm 0,02$ após 48 h e $2,50 \pm 0,03$ após 72 h.

Os maiores valores de DTH foram evidenciados nos grupos suco, SFM300 e SFV300, com um aumento da espessura da pata de 8,66% entre o tempo zero e 48 h; 8,58% entre o tempo zero e 48 h e de 10,27% entre o tempo zero e 72 h, respectivamente (Figura 14).

Os grupos Levamisol, Suco, SFM300 e SFV75 exibiram o pico da reação em 48 horas, diferindo significativamente do Controle ($p < 0,05$) com um aumento de 11,11%; 10,66%; 10,66% e 8,00%, respectivamente. Enquanto o grupo SFV300 exibiu o pico da reação em 72 horas com um aumento significativo ($p < 0,05$) de 11,11% em relação ao controle.

Tabela 09. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH) induzida em camundongos imunizados com hemácia de carneiro

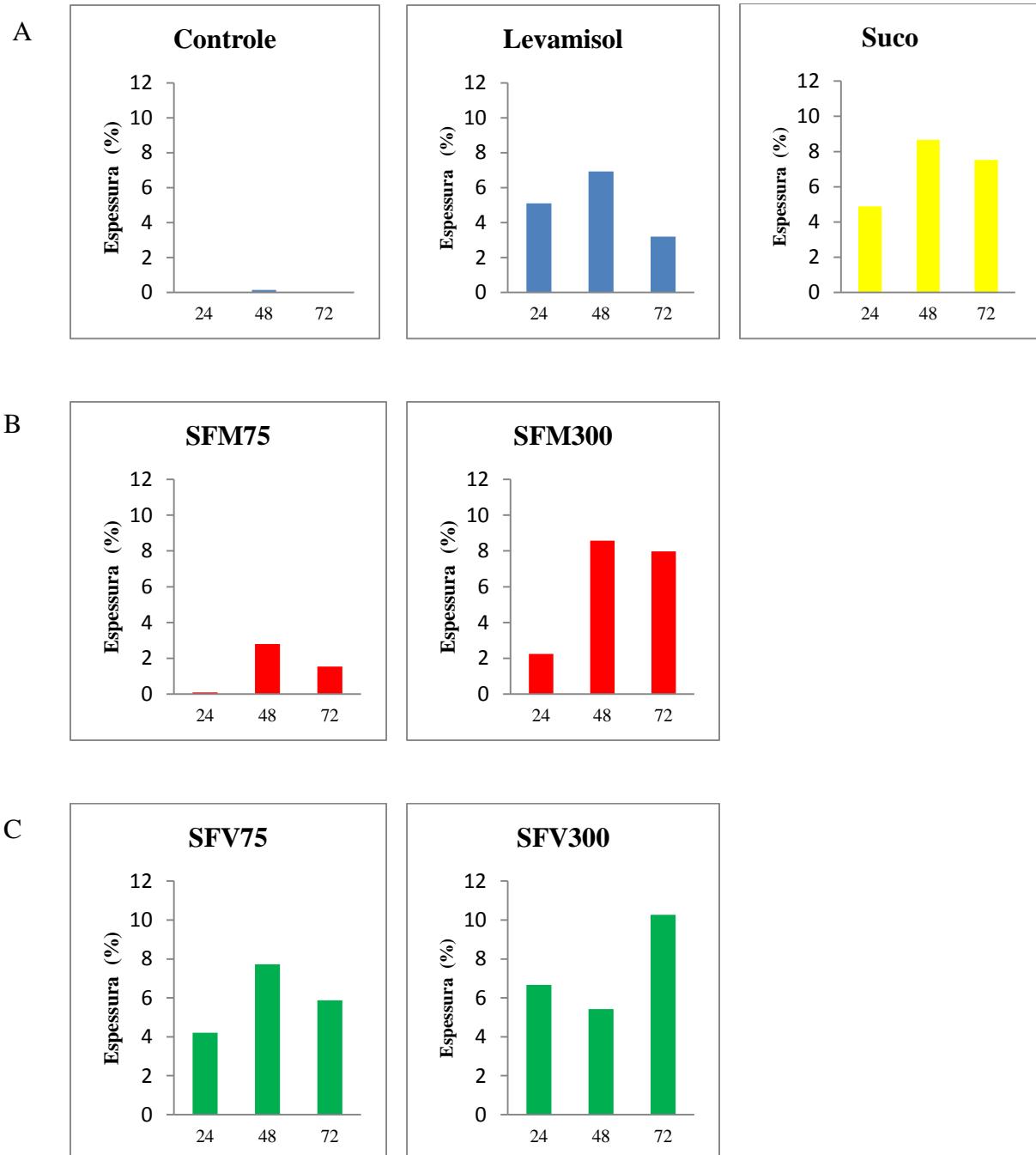
Tratamento	Espessura da pata (mm)			
	0	24	48	72
Controle	2,25 ± 0,07	2,26 ± 0,07	2,27 ± 0,07	2,25 ± 0,07
Levamisol	2,35 ± 0,05	2,46 ± 0,04 ^{a,A}	2,50 ± 0,02 ^{a,A}	2,42 ± 0,03 ^a
Suco	2,29 ± 0,03	2,40 ± 0,05 ^A	2,49 ± 0,04 ^{a,A}	2,46 ± 0,03 ^{a,A}
SFM75	2,31 ± 0,05	2,30 ± 0,03	2,37 ± 0,02	2,34 ± 0,03
SFM300	2,29 ± 0,03	2,34 ± 0,02	2,49 ± 0,02 ^{a,A}	2,47 ± 0,03 ^{a,A}
SFV75	2,26 ± 0,01	2,35 ± 0,03 ^A	2,43 ± 0,05 ^{a,A}	2,38 ± 0,02 ^A
SFV300	2,27 ± 0,02	2,43 ± 0,03 ^A	2,40 ± 0,02 ^A	2,50 ± 0,03 ^{a,A}

Dados apresentados como media ± erro padrão. (n = 10). Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Levamisol 10mg/kg (Levamisol), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço de Caju Maduro nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFM75 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço Verde nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFV75 e SFV300).

Diferença estatística em cada hora em relação ao controle (**a**), suco (**b**) e levamisol (**c**). p < 0,05.

Diferença estatística em cada grupo em relação 0 h (**A**). p < 0,05.

Figura 13. Espessura da pata, em porcentagem, calculado entre a 0 hora e 24 horas, 48 horas e 72 horas nos grupos Controle, Levamisol e Suco (A); SFM75 e SFM300 (B) e SFV75 e SFV300 (C)



Os grupos fazem referência a animais tratados com Água (Controle), Levamisol 10mg/kg (Levamisol), Suco de Caju (Suco), Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço Maduro nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFM75 e SFM300) e Suco de Caju adicionado de Farinha do Bagaço Verde nas doses de 75 e 300 mg/Kg (SFV75 e SFV300).

7. DISCUSSÃO

Uma das estratégias das políticas de saúde pública é promover o aumento da ingestão de frutas e legumes, pois são boas fontes de antioxidantes naturais (QUEIROZ *et al.*, 2011). Uma boa nutrição, rica em antioxidantes, promove impactos sobre processos fisiológicos corporais e pode ter implicações importantes sobre as funções do sistema imunológico, a resistência à infecção e a autoimunidade (GHATAK; PANCHAL, 2012).

O interesse em se estudar os efeitos de uma boa nutrição e seus compostos naturais sobre as respostas imunológicas dá-se em grande parte porque o sistema imune está envolvido tanto na etiologia como na fisiopatologia de muitas doenças. A modulação da resposta imune para aliviar essas doenças, tem sido de grande interesse por muitos anos (SARAVANAN *et al.*, 2012). Muitos grupos de pesquisa têm focado na identificação de substâncias naturais de plantas que podem servir como imunomoduladores, controlando certas respostas imunes (MUKAND; CHORGADE, 2006). Nesse contexto, buscou-se avaliar uma cultura de interesse regional, o caju, sobre a modulação da resposta imunológica.

Vale ainda salientar que a cultura do caju no Nordeste do Brasil é uma agroindústria geradora de milhares de empregos diretos e indiretos que sustentam toda a cadeia produtiva do caju (LOPES *et al.*, 2011). No entanto, o principal foco na indústria que trabalha com esta cultura é o beneficiamento da castanha, sendo o pedúnculo e o bagaço gerado do seu processamento muitas vezes descartado. Esses produtos são grandes fontes de compostos bioativos, o que despertou o interesse de estudar suas propriedades na modulação da resposta imunológica, gerando com isso também o aproveitamento de resíduos, como o bagaço do caju, normalmente descartados.

Para tanto, primeiramente foi analisada a capacidade antioxidante do suco de caju e das farinhas do bagaço de caju, de clones de cajueiro CCP 76, pelos métodos de sequestros do radical ABTS^{•+} e DPPH[•]. A capacidade antioxidante de uma substância é definida como a sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e eletrólitos. Estas espécies são formadas durante os processos normais do organismo, mas a sua acumulação conduz a várias doenças, entre elas o câncer (QUEIROZ *et al.*, 2011). No presente estudo, as farinhas do bagaço de caju maduro (FM) e verde (FV) apresentaram o maior potencial antioxidante em relação ao suco de caju, em média 16,5 vezes superiores, nos dois métodos, tendo a FV ainda capacidade superior a FM (Figuras 08 e 09). Rufino e colaboradores (2010) evidenciaram uma capacidade antioxidante para a polpa de caju (matéria fresca) de 11,2 µmol Trolox/g

(ABTS) e 7142 g de fruta/g de DPPH (DPPH), classificando o caju como um fruto com potencial antioxidante médio. Estes valores são inferiores aos encontrados neste trabalho para o suco de caju. Entretanto, quando comparados os valores encontrados por Contreras-Calderón e colaboradores (2010), foi possível observar um aumento considerável na atividade antioxidante da polpa de caju que foi de 115 µmol Trolox/g para o método ABTS, superiores aos encontrados neste trabalho. Já Queiroz e colaboradores (2011) encontraram um forte potencial antioxidante para polpa de caju pelo método de DPPH, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. As grandes variações evidenciadas nos diferentes resultados devem-se, muitas vezes, as diferenças no preparo das amostras, tornando difícil a comparação de resultados, sendo um problema que merece bastante atenção dos pesquisadores (RUFINO *et al.*, 2010). Diversos estudos mostram que o potencial antioxidante do bagaço de caju maduro é superior ao da polpa de caju, concordando com os valores encontrados neste trabalho para farinha do bagaço de caju maduro em relação ao suco de caju. Broinizi e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de bagaço de caju e encontraram uma forte capacidade antioxidante pelo método de DPPH, esses resultados foram superiores aos evidenciados por Queiroz e colaboradores (2011) para polpa de caju. O processamento realizado por Rufino e colaboradores (2010) para matéria seca (lioofilizada) é semelhante ao realizado para as farinhas do bagaço de caju do presente trabalho, porém utilizando o pedúnculo inteiro, polpa e pele. Esses pesquisadores encontraram valores superiores para polpa de caju liofilizada (79,4 µmol Trolox/g para o teste ABTS e 906 g de fruta/g de DPPH para o teste DPPH) em relação aos valores encontrados para polpa de caju matéria fresca citados anteriormente (RUFINO *et al.*, 2010). No presente trabalho, a farinha do bagaço de caju verde apresentou o maior potencial antioxidante em ambos os métodos. Sua capacidade antioxidante pode ser considerada alta quando comparamos com os valores encontrados por Rufino e colaboradores (2010) pelo método DPPH para jaboticaba (138 g de fruta/g de DPPH), murici (238 g de fruta/g de DPPH) e uvaia (276 g de fruta/g de DPPH) e pelo método de ABTS para jaboticaba (317 µmol Trolox/g), murici (412 µmol Trolox/g) e puça-preto (346 µmol Trolox/g). Esses frutos são considerados potentes antioxidantes e apresentaram valores de atividade antioxidante similares aos da farinha do bagaço de caju verde. Lopes e colaboradores (2012) avaliaram diversos clones de caju, entre eles o CCP 76, em diferentes estádios de maturidade e observaram pelo método de ABTS que a capacidade antioxidante do fruto tende a reduzir

com o amadurecimento, ou seja, o fruto possui a maior capacidade antioxidante no estádio de imaturidade. Este resultado corrobora com o valor encontrado para a farinha de caju verde, que apresentou maior capacidade antioxidante que a farinha de caju maduro pelo método ABTS.

A partir de análises qualitativas, foi determinado, nas farinhas de caju, a presença de fenóis, taninos pirogálicos, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas e esteroides em ambas as amostras (Tabela 04). Esses resultados estão de acordo com Omena e colaboradores (2012) que realizaram um ensaio fitoquímico em pele de siriguela, fruto também da família Anacardiaceae, e identificaram a presença de fenóis, taninos, flavonoides e esteroides. Vasconcelos (2011) trabalhou com suco de caju (clone CCP 76) e observou maior teor de polifenóis totais, vitamina C, flavonoides amarelos, antocianinas e carotenoides no suco de caju maduro quando comparado ao suco de caju verde. O autor sugere que há diferença no perfil fitoquímico de sucos de caju relacionada com os diferentes estádios de maturação.

Para as amostras de suco de caju e farinhas do bagaço de caju maduro e verde, foram determinados os teores de vitamina C, antocianinas, flavonoides amarelos, carotenoides totais (Tabela 5) e polifenóis extraíveis totais (Figura 10). Dentre os fitoquímicos analisados, os polifenóis foram os compostos majoritários, seguidos da vitamina C para quase todas as amostras. O perfil encontrado para os polifenóis foi semelhante ao encontrado para capacidade antioxidante total, tendo a farinha de caju verde os maiores teores de polifenóis seguida pela farinha de caju maduro e suco de caju (Figura 10). Vários estudos relatam uma correlação positiva entre atividade antioxidante e conteúdo total de polifenóis encontrados em alguns vegetais tropicais (KAUR; KAPOOR, 2002; MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007), sugerindo que as plantas que contêm elevada composição de compostos fenólicos podem ser uma boa fonte de antioxidantes. Polifenóis agem como potentes antioxidantes, em virtude de seus grupos hidroxilas que facilitam a doação de elétrons e diminuem efetivamente os radicais livres. Os valores de polifenóis do suco de caju e da farinha do bagaço de caju maduro do presente estudo foram superiores aos encontrados por Rufino e colaboradores (2010) para polpa de caju e para polpa liofilizada. A variação no conteúdo de polifenóis pode ser justificada pelas diferenças no solo, nas condições climáticas, no período de cultivo, no armazenamento pós-colheita e nos métodos de extração de polifenóis. Além disso, as plantas podem ativar a síntese de polifenóis em resposta a uma

situação de estresse, tais como lesões, patógenos ou baixos nutrientes (QUEIROZ *et al.*, 2011).

Rufino e colaboradores (2010) definiram uma classificação para frutos de acordo com os teores de polifenóis, sendo baixo (< 100 mg/100g), médio (100-500 mg/100g) e alto (> 500 mg/100g) teores de polifenóis para matéria fresca e baixo (< 1000 mg/100g), médio (1000-5000 mg/100g) e alto (> 5000 mg/100g) teores de polifenóis para frutos liofilizados. Os teores de polifenóis do suco de caju e das farinhas do bagaço do caju (maduro e verde) determinados neste trabalho encontram-se dentro da faixa de níveis médios de polifenóis classificados por Rufino e colaboradores. Lopes e colaboradores (2012) observaram uma diminuição significativa nos teores de polifenóis no decorrer do amadurecimento do caju, clone CCP76, como evidenciado no presente estudo com as farinhas do bagaço de caju maduro e verde, em que a farinha do bagaço de caju verde apresentou um valor superior de polifenóis em comparação com a farinha do bagaço de caju maduro. Esses resultados divergem dos de Vasconcelos (2011), trabalhando com suco de caju maduro e verde, evidenciou valores de polifenóis maiores no suco de caju maduro.

Em relação ao conteúdo de vitamina C, a farinha de bagaço de caju maduro apresentou o maior valor, seguida do suco e da farinha do bagaço de caju verde. Os valores encontrados para suco de caju foram inferiores aos encontrados por Rufino e colaboradores (2010) com 190 mg/100g e por Queiroz e colaboradores (2011) com 163 mg/100 g. Contreras-Calderón e colaboradores (2010) analisaram vitamina C no caju de forma integral, ou seja, polpa juntamente com a pele e encontraram 228 mg/100g de vitamina C, mostrando um aumento no conteúdo de vitamina C quando a polpa é analisada juntamente com a pele, concordando com os valores encontrados neste trabalho que foram superiores para a farinha do bagaço de caju maduro em relação ao suco de caju. Sabe-se que baixos níveis de vitamina C podem induzir a síntese de polifenóis (REYS; VILLAREAL; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007), portanto os altos níveis de polifenóis encontrados na farinha de caju verde podem ser justificados pelos baixos níveis de vitamina C. A diferença entre a quantidade de vitamina C da farinha do bagaço de caju maduro em relação à farinha do bagaço de caju verde estão de acordo com o estudo de Lopes e colaboradores (2012) que mostraram um aumento no teor de vitamina C com o amadurecimento do caju e também corroboram com os estudos de Vasconcelos (2011) que observou um maior quantidade de vitamina C no suco de caju maduro em relação ao suco de caju verde.

Os demais compostos analisados (antocianinas, carotenoides e flavonoides amarelos) apresentaram baixas quantidades em relação aos polifenóis e a vitamina C. Valores de carotenoides encontrados por Lopes e colaboradores (2012) (0,30 mg/100g) e Rufino e colaboradores (2010) (0,40 mg/100g) para polpa de caju estão de acordo com os valores evidenciados neste trabalho. Já os valores encontrados para antocianinas e flavonoides amarelos, por esses mesmos pesquisadores, mostram-se superiores aos determinados no presente trabalho. A farinha do bagaço de caju maduro apresentou valores de carotenoides superiores aos determinados por Abreu e colaboradores (2013) que evidenciaram 0,6 mg/100g de carotenoides para extrato aquoso de bagaço de caju. Carotenoides são precursores de vitamina A que exibem atividade de sequestro do oxigênio singlet (ABREU *et al.*, 2013). Apesar dos baixos teores de carotenoides quantificados nas diferentes amostras de caju neste trabalho, quando comparados com outros frutos, ainda assim estes podem contribuir para o potencial antioxidante do caju.

Tendo em vista que o perfil fitoquímico do suco do caju e das farinhas do bagaço do caju verde e maduro, os mesmos revelaram-se uma complexa fonte natural de antioxidantes, partiu-se para avaliação do potencial toxicológico do suco de caju adicionado com a farinha do bagaço de caju em camundongos, a fim de poder verificar o grau de segurança da adição das farinhas do bagaço de caju como suplemento a serem utilizados como nutracêuticos.

Essa etapa dos estudos toxicológicos é de extrema relevância uma vez que a toxicidade é um parâmetro importante a ser determinado para posteriores utilizações das substâncias *in vivo*. A toxicidade pode ser classificada em quatro categorias, considerando a exposição de animais a produtos químicos: aguda, subaguda, subcrônica e crônica (KLAASSEN, 2001). A exposição aguda é definida como a exposição a um produto químico por menos de 24 h. A exposição subaguda refere-se à exposição repetida a um produto químico por um período menor ou igual a um mês ou menos, a subcrônica por 1-3 meses e a crônica por mais de 3 meses (KLAASSEN, 2001).

O ensaio de toxicidade realizado foi de exposição subaguda e os animais não apresentaram nenhum sinal de toxicidade em relação aos parâmetros observados, tais como peso corporal, peso relativo dos órgãos e mudanças no comportamento dos animais (Tabelas 06 e 07). Outro parâmetro avaliado foi o da atividade das enzimas transaminases, ALT e AST. Após as análises, não foi evidenciado aumento na atividade dessas enzimas nos grupos tratados com as diferentes amostras em relação ao grupo controle. Porém foi observada uma

diminuição na atividade de ALT para SFM150, SFM300 e SFV75 e na atividade de AST para SFM150 e SFM300 em relação ao grupo tratado com suco de caju (Tabela 08). Níveis elevados dessas enzimas combinados com evidências histopatológicas são usados para identificar injúrias hepatocelulares agudas (RAMAIAH, 2007). Essas alterações ocorrem no sangue quando a permeabilidade celular hepática é alterada ou quando ocorrem injúrias e necroses celulares (UPUR *et al.*, 2009). O fato de ter havido uma diminuição nas atividades de ambas as enzimas pode ser relacionado com o aumento do potencial antioxidante do suco quando adicionado das farinhas, amenizando possíveis injúrias nas células hepáticas. Vale salientar que os valores de ALT e AST para os grupos SFM e SFV diminuíram em relação ao grupo tratado com suco, mas mesmo assim se mantiveram dentro da faixa determinada por Araújo (2012) para os parâmetros bioquímicos em camundongos machos, que foram de 32 - 86 U/L para ALT e de 73 - 188 U/L para AST.

Para a determinação da peroxidação lipídica, os níveis de MDA, que é produto final da peroxidação de lipídios de membrana celular, foram determinados pelo método do TBARS em homogenatos de fígados. Como apresentado na Tabela 06, não foram evidenciadas mudanças significativas nos níveis de MDA dos grupos que receberam os diversos tratamentos em relação ao grupo controle. Portanto, o suco adicionado com as farinhas de bagaço de caju maduro ou verde não apresentou toxicidade hepática, como indicado pela não elevação das atividades das enzimas transaminases e nem dos níveis de MDA.

Após os resultados obtidos no estudo toxicológico, o suco adicionado com as farinhas foi considerado seguro para avaliação de suas propriedades funcionais sobre o sistema imunológico. Para tanto, camundongos foram tratados ou não com suco de caju, adicionado ou não com farinha de bagaço de caju maduro ou verde, e imunizados com hemácia de carneiro, a fim de avaliar o efeito imunomodulador *in vivo*. O modelo de avaliação da resposta imune por hemácias de carneiro possui vantagens, tais como determinar a resposta imune humoral e celular na mesma espécie sob condições ideais de experimento, além de ser fácil de executar e viável economicamente (GHATAK; PANCHAL, 2012). Hemácias de carneiro são antígenos T- dependente, portanto, o primeiro contato do antígeno com o organismo promove a sensibilização dos linfócitos T para se tornarem ativados para sintetizarem e segregarem substâncias fisiologicamente ativas tais como os macrófagos, monócitos, leucócitos polimorfonucleares e, provavelmente, outros leucócitos não sensibilizadas para a área de contato com o antígeno (OSADEBE; OMEJE, 2009).

Em relação à resposta imune humoral, observou-se um aumento significativo ($p<0,05$) na produção de anticorpos anti-hemácias de carneiro, quando se comparou o título de anticorpos secundários em relação ao título de anticorpos primários no mesmo grupo (Figura 11). Vale ainda ressaltar que os grupos suco e SFV300 apresentaram comportamento semelhante ao levamisol que foi utilizado como imunoestimulante padrão. O levamisol é reconhecido por estimular as células B, células T, monócitos e macrófagos (KOGANEI *et al.*, 2007). Mangathayarua, Umadevi e Reddy (2009) observaram um aumento no título de anticorpos anti-hemácia de carneiro em camundongos tratados com suco de *Cynodon dactylon*. Esses autores sugerem que o potencial imunomodulador do suco de caju e SFV300 que estimularam uma maior produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro e apresentaram como principais constituintes dentre os compostos fitoquímicos determinados, os polifenóis.

Os grupos SFM75, SFM300 e SFV75 apresentaram uma menor produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro na resposta secundária, quando comparados com o suco, SFV300 e levamisol, entretanto aumentaram os níveis dos títulos de anticorpos da resposta secundária em relação à resposta primária significativamente. O aumento na resposta secundária em relação à resposta primária é resultante da expansão clonal de células de memória originais após primeira exposição ao antígeno. Na resposta primária a imunoglobulina presente principalmente é a imunoglobulina M (IgM), já na resposta secundária, há predominância de outras classes de imunoglobulinas, tais como IgG, pela indução da troca de classe de anticorpos nos plasmócitos e com isso também aumentando a eficiência e especificidade da resposta imunológica (OSADEBE ; OMEJE, 2009). A maior eficiência e especificidade da resposta secundária podem ser atribuídas não só à troca de classe de anticorpo, mas também ao fato dos mesmos serem derivados de poucas células precursoras, como muitas mutações somáticas, o que confere a esta resposta uma reação mais vigorosa do que na resposta primária e com ação quase imediata frente à exposição do antígeno (JANEWAY *et al.*, 2010).

Os grupos suplementados com suco de caju e suco adicionado da farinha do bagaço de caju maduro ou verde, assim como o grupo que foi tratado com levamisol não apresentaram mudanças significativas no peso relativo dos órgãos: timo e baço ($p>0,05$).

Quando comparados ao controle, os grupos SFM75, SFM300 e SFV75 parecem não influenciar a indução da resposta imune humoral. Rasool e Varalakshmi (2006) avaliaram os títulos de anticorpos anti-hemácias de carneiros em ratos tratados com extrato aquoso das raízes de *Withania somnifera* e mostraram que este extrato não teve influência na resposta imune humoral, não alterando os níveis de título de anticorpos e relacionaram a não estimulação com a presença de alguns flavonoides e lactonas esteroidais no extrato. Xu e colaboradores (2008) submeteram camundongos a um tratamento com extrato das raízes de *Tetrastigma hemsleyanum*, imunizaram com hemácias de carneiros para avaliar o efeito desse extrato na resposta humoral e celular. Esses autores evidenciaram um efeito estimulador do extrato na resposta de DTH e nenhuma influência sobre o título de anticorpos, relacionando essa não estimulação aos flavonóis, como quercetina, kaempferol e β -sitosterol, encontrados nas raízes desta planta. Com isso, pode-se sugerir que o efeito das farinhas do bagaço de caju maduro e verde, em estimular ou inibir a resposta imunológica, pode estar associado aos seus constituintes predominantes que são os polifenóis, os quais, dependendo da classe, podem ter atividades imunoestimulantes ou imunossupressoras.

Para avaliarmos o efeito suco de caju, adicionado ou não com farinha de bagaço de caju maduro ou verde, sobre a resposta imune celular, foi utilizado um modelo de reação de hipersensibilidade tardia (DTH) induzida em camundongos imunizados com hemácias de carneiro. A DTH está relacionada com a resposta imune mediada por células. Os linfócitos T sensibilizados, quando desafiados por抗ígenos, são convertidos em linfoblastos e secretam linfocinas, atraiendo assim mais células acessórias ao local da reação, promovendo uma reação inflamatória (GHATAK; PANCHAL, 2012). Vale ainda salientar que a DTH é mediada por interferon-gama (IFN- γ), produzido por células T CD4 $^{+}$ (Th₁) ou células T CD8 $^{+}$ (CTL) (BIEDERMANN *et al.*, 2001). Esta reação geralmente leva de 24 a 72 h para se desenvolver e envolve a ativação de células T, que resulta na mobilização de monócitos e linfócitos em áreas que estão necessitando de estimulação imune. É iniciada quando ocorre uma reação entre células T antígeno-específico e o antígeno, resultando na liberação de linfocinas que afetam uma grande variedade de tipos de células, especialmente os macrófagos (OSADEBE; OMEJE, 2009).

Em relação à imunidade celular, todos os grupos, exceto o SFM75, apresentaram significativa reação de DTH, com aumento significativo da espessura das patas, quando

comparados com o controle, sendo o aumento mais expressivo nos grupos suplementados com o suco e com o suco adicionado com as farinhas nas maiores doses. Esses resultados corroboram com os encontrados por Osadebe e Omeje (2009) que identificaram um aumento na reação de DTH e no título de anticorpos em animais tratados com extratos hidrometanólicos de folhas de *Loranthus micranthus Linn.* O ensaio fitoquímico com esse extrato identificou a presença de flavonoides, taninos e esteroides, assim como foi determinado no presente trabalho para as amostras de suco de caju e de farinha de bagaço do caju maduro e verde. Mishra e Bhatia (2010) encontraram valores superiores de títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro para a resposta secundária, quando comparados com a resposta primária, em camundongos tratados com extratos hidroetanólicos de sementes de *Ziziphus mauritiana Lamk.*, também evidenciaram uma modulação da resposta imune celular pelo aumento na reação de DTH. A análise fitoquímica deste extrato identificou a presença de alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e saponinas; já em nossas amostras foi evidenciada presença de flavonoides e taninos. Estes fitoquímicos poderiam ser os responsáveis pela modulação da resposta imune humoral e celular.

Há alguns estudos mostrando efeito de extratos em estimular tanto a resposta humoral, com aumento do título de anticorpos; quanto a resposta imune celular, com indução da reação de DTH em animais imunizados com hemácia de carneiro. Ghule e colaboradores (2006) encontraram um aumento no título de anticorpos e na reação de DTH em camundongos tratados com extratos etanólicos e aquosos de folhas de *Capparis zeylanica L.* O ensaio fitoquímico deste trabalho identificou a presença de flavonoides, esteroides e taninos. Shukla e colaboradores (2009) também evidenciaram aumento no título de anticorpos anti-hemácias de carneiro e na DTH em ratos tratados com extrato etanólico de sementes de *Caesalpinia bonduc* e o teste fitoquímico identificou a presença de alcaloides, saponinas, terpenoides, compostos fenólicos e polissacarídeos.

O suco e o grupo SFV300 aumentaram as respostas imunes humoral e celular, isto provavelmente está relacionado com o fato do modelo de indução da resposta imune por hemácias de carneiro ser antígeno T- dependente, ou seja, promove o aumento da resposta mediada por células T que ativa os linfócitos B e consequentemente a liberação de anticorpos (MOSER ; LEO, 2010).

Zhang e colaboradores (2009), estudaram o sinergismo entre o levamisol e o adjuvante potássio de alumínio em vacinas contra Hepatite B e constataram que esta combinação pode aumentar uma resposta mediada por células Th₁, que por sua vez ativa linfócitos B induzindo a liberação de IgG2a. Como os grupos suco e SFV300 apresentaram comportamento semelhante ao levamisol, sugere-se que o efeito estimulatório sobre a imunidade celular pode ser atribuído às células Th₁ com produção de IFN- γ , induzindo assim a proliferação de células B e consequentemente a diferenciação de classes de imunoglobulinas aumentando os títulos de anticorpos. Th₁ é considerado como fundamental para a regulação de抗ígenos específicos clássicos mediados por DTH, macrófagos e ativação de células B (BOURGEOLS ; CORINNE, 2003).

Os grupos SFM75, SFM300 e SFV75, entretanto, apresentaram o comportamento clássico, com aumento da DTH e diminuição dos títulos de anticorpos, indicando regulação entre as células Th₁ e Th₂ do sistema imune (SIERRA *et al.*, 2005). A homeostasia imunológica requer uma expressão diferencial e regulada da resposta imune humoral e mediada por células. Vários estudos indicam haver necessidade de pesquisar compostos que são capazes de modular o equilíbrio entre Th₁/Th₂ (WHELAN *et al.*, 2003) e com isso promover melhora do sistema imune em indivíduos doentes (STEPHENS *et al.*, 2002).

Como evidenciado, o suco de caju e o suco adicionado com as farinhas maduras ou verdes, dependendo da dose, podem vir a serem usados como imunoestimulante ou como reguladores da resposta humoral e celular. Entretanto, mais estudos devem ser realizados, com maiores doses, a fim de uma melhor compreensão dos resultados.

8. CONCLUSÕES

O suco de caju e as farinhas do bagaço de caju maduro e verde apresentaram elevada capacidade antioxidante e quantidades significativas de polifenóis e vitamina C. Ademais, o suco de caju adicionado com as farinhas do bagaço de caju maduro ou verde não apresentaram efeitos tóxicos em nenhum dos parâmetros avaliados. Em modelos de imunização de camundongos com hemácias de carneiro, o suco de caju e o suco adicionado com a farinha do bagaço de caju verde na dose de 300 mg/kg modularam positivamente as respostas imunes humoral e celular.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular.** 6^a edição, Editora Elsevier, 2008.
- ABREU, F. P.; DORNIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, p. 25–31, 2013.
- AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat, **Neuroreport**, v. 10, p.1799-1801, 1999.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, M. V.; LIMA, A.; AGUIAR, M. J.; LIMA, J. B.; PAIVA, J. Tanino em pedúnculos de caju: efeito de algumas variações genéticas e climáticas. **Boletim CEPPA**, v. 20, p. 267-278, 2002.
- AGUIAR, L. P.; ALVES, R. E.; LIMA, D. P.; BASTOS, M. do S. R.; BARROS, F. F. C. Carotenóides totais em pedúnculos de clones de caju anão precoce (*Anacardium occidentale, L. var. Nanum*). Resumo – **Congresso Brasileiro de Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 55, 2000.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; LIMA E SILVA, T. C.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127–142, 2005.
- ANDRADE, S. F.; SANTARÉM, V. A. Endopa rasiticidas e ectoparasiticidas. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária.** 2^a edição, Editora São Paulo: Roca, 2002.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, p. 145-154, 2004.
- ARAÚJO, F. T. M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ.** Belo Horizonte, 2012. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. FIOCRUZ.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale, L.*): A variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495–502, 2003.

- BAFNA, A. R.; MISHRA, S. H. Immunoestimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchoides* on immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 1-4, 2006a.
- BAFNA, A. R.; MISHRA, S. H. Protective effect of bioactive fraction of *Sphaeranthus indicus Linn.* against cyclophosphamide induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 426-429, 2006b.
- BARCELOS, G. R. M.; SHIMABUKURO, F.; MORI, M. P.; MACIEL, M. A. M.; CÓLUS, I. M. S. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 268–273, 2007.
- BIEDERMANN, T. R.; MAILHAMMER, A.; MAI, C.; SANDER, A.; OGILIVIE, F.; BROMBACHER, K.; MAIER, A. D.; LEVINE, M. R. Reversal of established delayed-type hypersensitivity reactions following therapy with IL-4 or antigen specific Th2 cells. **European Journal of Immunology**, v. 5, p. 1582–1591, 2001.
- BIRK, R.W.; GRATCHEV, A.; HAKIY N; POLITZ O; SCHLEDZEWSKI K, GUILLOT P. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. **Hautarzt**, vo. 52, p. 193–200, 2001.
- BORGES, V. C. Nutrição oral enteral e parenteral na prática clínica. 3^a edição. Editora: Atheneu; 2001.
- BOURGEOLS, C.; CORINNE, T. CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 3225–3231, 2003.
- BRAGA, L. T; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; SOUSA, J. A. V.; SILVA, F. M. S.; FARIA, V. M.; LEITE, A. K. R. M.; LOPES, C. A. P.; FAÇO, O.; CAMPELLO, C. C.; COSTA, J. H.; NOGUEIRA, T. N. A. G. Efeito do levamisol e do extrato etanólico de folhas de *Momordica charantia* sobre a dermatofitose experimental em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, p. 285-95, 2007.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30. 1995.
- BRITO , E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LIN, L. Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1112–1118, 2007.
- BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. de; SILVA, A. M de O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 902-908, 2007.
- BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. de; SILVA, A. M de O.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Propriedades antioxidantes

em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 773-781, 2008.

CAVALCANTE, A. A. M.; RUBENSAM, G.; PICADA, J. N.; SILVA, E. G.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. P. 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.

CHEW, B. P.; PARK, J. S. Carotenoid action on the immune response. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 257S-261S, 2004.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v.40, p. 1-7, 2010.

COSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; MARINO, F.; CREMAB, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of Achyrocline satureioides (Lam.) D. C. infusion: A study on human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 501-507, 2008.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-61, 2010.

CUNHA, L.; MCFALL, A. J.; MACKEY, D. Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1372 – 1381, 2006.

DUNLOP, R. J.; CAMPBELL, C. W. Cytokines and Advanced Cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.20, p. 3, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cajueiro Anão Precoce - Clone CCP76**. Data, 2013. Disponível em: <<http://www.cnpat.embrapa.br/home/portfolio/tecnologia.php?id=24>>. Acesso em: 05/02/2013.

ERICKSON, K. L.; MEDINA, E. A.; HUBBARD, N. E. Micronutrients and innate immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.182, p. S5-S10, 2000.

ESSER, M. T.; MARCHESE, R. D.; KIERSTEAD, L. S.; TUSSEY, L. G.; WANG, F. CHIRMULE, N.; WASHABAUGH, M. W. Memory T Cells Vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 419-430, 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT Agriculture**. Data, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 05/02/2013.

- FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS,P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 181-207, 1982.
- GHATAK, S. B.; PANCHAL, S. J. Investigation of the Immunomodulatory Potential of Oryzanol Isolated from Crude Rice Bran Oil in Experimental Animal Models. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1701–1708, 2012.
- GHULE, B. V.; MURUGANANTHAN, G.; NAKHAT, P. D.; YEOLE, P. G. Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 311–315, 2006.
- HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p.268S-276S, 2005.
- HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. **Nutrition**, v. 16, p. 688–689, 2000.
- HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 42-49, 1962.
- HERZYK, D. J; GORE, E. R. Adequate immunotoxicity testing in drug development. **Toxicology Letters**, v. 149, p. 115-122, 2004.
- HOLLAND, S. M.; VIZI, E. S. Immunomodulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 425- 427, 2002.
- JANEWAY; MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia**. 7^a ed. Editora Artmed, 2010.
- JUANITA, E. Mistletoe: good for more than free kisses. **Herbal Gram**, v. 68, p. 50–59, 2005.
- JONES, P. J.; JEW, S. Functional food development: Concept to reality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 387–390, 2007.
- KAMRADT, T., MITCHISON, N. A. Tolerance and autoimmunity. New England. **Journal of Medicine**, v. 344, p. 655–664, 2001.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 153–161, 2002.
- KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 6^a ed. Editora Medical Publications Division, 2001.

- KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutos como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciências Agrárias**, v. 29, p. 1008 – 1014, 2005.
- KOGANEI, A.; TSUCHIYA, T.; SAMURA, K.; NISHIKIBE, M. Use of whole sheep red blood cells in ELISA to assess immunosuppression in vivo. **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, p. 77-82, 2007.
- KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale L.*) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 237–242, 2007.
- KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, p. 555–562, 2006.
- LAVINAS, F. C.; ALMEIDA, N. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. N. Study of the chemical and microbiological stability of cashew apple juice in different storage conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 875–883, 2006.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390-1393, 1997.
- LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. v. 125, p. 67–71, 2001.
- LOPES, M. M. de A.; MOURA, C. F. H.; ARAGÃO, F. A. S.; CARDOSO, T. G.; ENÉAS FILHO, J. Caracterização física de pedúnculos de clones de cajueiro anão precoce em diferentes estádios de maturação. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 914-920, 2011.
- LOPES, M. M. de A.; MIRANDA, M. R. A.; MOURA, C. F. H.; ENÉAS FILHO, J. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 325-332, 2012.
- MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v.100, p. 1409–1418, 2007.
- MANGATHAYARUA, K.; UMADEVI, M.; REDDY, C. U. Evaluation of the immunomodulatory and DNA protective activities of the shoots of *Cynodon dactylon*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 181–184, 2009.
- MANZ, R. A; HAUSER, A. E.; HIEPE, F.; RADBRUCH A. Maintenance of serum antibody levels. **Annual reviews in immunology**, v. 23, p. 367-386, 2005.

- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, 3º edição, Editora UFC, 2009.
- MATTOO, A. K.; MURATA, T.; PANTASTICO, E. B.; CHACHIN, K.; OGATA, K.; MELO, D. F. de; LIMA, M. da G. S.; NOGUEIRA, F. D. L. Manejo na Pós Colheita Melhora a Conservação de Frutas Tropicais. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 2, p. 16 - 17, 2001.
- MCHEYZER-WILLIAMS L. J.; MCHEYZER-WILLIAMS M. G. Antigen-specific development. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 487-513, 2005.
- MESQUITA J., D.; ARAÚJO, J. A. P; CATELAN, T. T. T; SOUSA, A. W. S; CRUVINEL, W. M; ANDRADE, L. E. C; SILVA, N. P. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, p. 552-580, 2010.
- MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; SOUQUET, J. M.; FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*). **Food Chemistry**, v. 112, p. 851–857, 2009.
- MIDDLETON, J. R. E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Review**, v. 52, p. 673–751, 2000.
- MISHRA, T.; BHATIA, A. Augmentation of expression of immunocytes functions by seed extract of *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 341–345, 2010.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173–183, 2006.
- MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**; v. 28, p. C2-C13; 2010.
- MUKAND, S.; CHORGADE, P. **Drug Discovery and Development (vols. I and II)**. Editora John Wiley & Sons Publications Ltd., 2006.
- MUKHERJEE, D.; KHATUA, T. N.; VENKATESH, P.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera Gaertn.* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 490–494, 2010.
- MURTAUGH, M. P.; FOSS, D. L. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 109-121, 2002.
- MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A. C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo:um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. **Jornal de Pediatria**, v.81, p. 59-68, 2005.

- NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LEITE A. K. R. de M.; FARIA, V. M.; BRAGA, L. T. LOPES, C. A. P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**, v. 13, p. 23-32, 2003.
- OBANDA, M.; OWUOR, P. O. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 74, p. 209-215, 1997.
- OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012–2031, 2005.
- OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. da S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G. da, FERREIRA, R. C. S.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 49, p. 334–344, 2012.
- OSADEBE, P. O.; OMEJE, E. O. Comparative acute toxicities and immunomodulatory potentials of five Eastern Nigeria mistletoes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 287–293, 2009.
- PARHAM, P. **O sistema immune**. 1^a edição. Editora Artes Médicas, 2001.
- PEREIRA, J. C. B. Systemic lupus erythematosus association with tuberculosis. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.14, p. 843-855, 2008.
- PINHEIRO, A. M. **Desenvolvimento de néctares mistos à base de caju ((Anacardium occidentale L.) e açaí (Euterpe oleracea mart)**. Fortaleza, 2008. Dissertação. Depto. de Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Ceará.
- PINHO, L. X. **Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (Anacardium occidentale L.) para a alimentação humana**. Fortaleza, 2009. Dissertação. Curso de pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará.
- POLLONIO, M. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os envolvidos no consumo. **Higiene Alimentar**, v. 14, p. 26-31, 2000.
- QUEIROZ , C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut cashew apple. **Food Research International**, v. 44, p. 1459–1462, 2011.
- RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1551–1557, 2007.
- RAMFULA , D.; BAHORUNB, T.; BOURDONC, E.; TARNUSC, E.; OKEZIE, I. A. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits:

Potential prophylactic ingredients for functional foods application. **Toxicology**, v. 278, p. 75–87, 2010.

RASOOL, M.; VARALAKSHMI, P. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An in vivo and in vitro study. **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 406–410, 2006.

REYES, L. F.; VILLARREAL, J. E.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. **Food Chemistry**, v. 101, p.1254-1262, 2007.

RIBEIRO, J. L.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, H. A. M. Desempenho produtivo de oito clones de cajueiro anão precoce cultivados no semi-árido piauiense sob regime de sequeiro. **Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**. Data, 2013. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/65743>>. Acesso em: 05/01/2013.

ROCHA, K. C.; GORESCU, R. A. G.; BELTRAME, R. L. **Metodologia laboratorial para estudo da resposta imune celular**. 1^a edição, Editora Guanabara Koogan, 2007.

RUNNIE, I.; SALLEH, M. N.; MOHAMED, S.; HEAD, R. J.; ABEWARDENA, M. Y. Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 311–316, 2004.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. **Comunicado Técnico 128**. Data, 2007a. Disponível em <www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf>. Acesso em: 05/05/2011.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico 127**. Data, 2007b. Disponível em <www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf>. Acesso em: 05/05/2011.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Review protoanthocyanidins and tanin-like compounds, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v. 80, p. 1094 – 1117, 2000.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. **Taninos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Simões, C.M.O., Guerra, M. P. et al. 5^a edição, Editora UFSC, 2004.

SARAVANANA, S.; BABU, N. P.; PANDIKUMAR, P.; RAJA, M. K.; PAULRAJA, M. G.; IGNACIMUTHUA, S. Immunomodulatory potential of *Enicostema axillare* (Lam.) A.

- Raynal, a traditional medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 239– 246, 2012.
- SHAHIDI, F. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 146–149, 2004.
- SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. **Trends and Food Science & Technol.**, v. 20, p. 376–387, 2009.
- SHARMA, M. L.; SINGH, B.; CHANDAN, B. K.; KHAJURIA, A.; KAUL, A.; BANI, S.; BANERJEE, S. K.; GAMBHIR, S. S. Actions of some flavonoids on specific and non-specific immune mechanisms. **Phytomedicine**, v. 3, p. 191–195, 1996.
- SHIVAPRASAD, H. N.; KHARYA, M. D.; RANA, A. C.; MOHAN, S. Preliminary immunomodulatory activities of aqueous extract of *Terminalia chebula*. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 32–34, 2006.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; MEHTA, P.; VYAS, S. P.; SHUKLA, S. Immunomodulatory activities of the ethanolic extract of *Caesalpinia bonduc* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 252–256, 2009.
- SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J.; XAUS, J. Increased immune response in mice consuming rice bran oil. **European Journal of Nutrition**, v. 44, p. 509–516, 2005.
- SILVA , L. C. R. DA . **Efeito do extrato acetato de etila de cocos nucifera linn (palmae) sobre a resposta inflamatória e sobre a resposta imunológica in vivo**. Fortaleza, 2008. Dissertação. Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará.
- SILVA, P. T.; OLIVEIRA, E. F.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Estabilidades química, físico-química e microbiológica do suco de laranja cv. “pera” submetido a diferentes condições de estocagem. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, p. 235–246, 2007.
- SIRO, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. **Appetite**, v. 51, p. 456–467, 2008.
- SOMPAYRAC, L. **How the immune system works**. 1^a edição, Editora Malden, MA: Blackwell Science, 1999.
- STEPHENS, R.; EISENBARTH, S. C.; CHAPLIN, D. D. T helper type I cells in asthma: friend or foe? **Current Opinion in Allergy and Clinically Immunology**, v. 2, p. 31–37, 2002.
- STROHECKER , R.; HENNING, H. M. **Analises de vitaminas: métodos comprovados**. 1^o edição. Editora: Madrid: Paz Montalvo, 1967.

- TALHOUK, R. S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E. K.. Antiinflammatory bioactivities in plant extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.10, p. 1–10, 2007.
- TITUS, R.G.; CHILLER, J. M. A simple and effective method to assess murine delayed-type hypersensitivity to proteins. **Journal of Immunological Methods**, v. 45, p. 65–78, 1981.
- THOMPSON, R. C. M. CB. B-Cell Development and Maturation. **Seminar in Oncology**, v. 25, p. 435-46, 1998.
- TREVISAN, M. T. S.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.; WURTELE, G.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.88–197, 2006.
- TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p. 523–33, 2000.
- UPUR, H.; AMAT, N.; BLAZEKOVIC, B.; TALIP, A. Protective effect of Cichorium glandulosum root extract on carbon-tetrachloride induced and galactosamine induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2022-2030, 2009.
- VASCONCELOS, A. K. P. **Ação biológica dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Momordica charantia* sobre a resposta imune e a cicatrização em animais de experimentação.** Fortaleza, 2006. Dissertação. Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará.
- VASCONCELOS, M. da S. **Atividades Antioxidante, Anti-inflamatória e Cicatrizante do caju (*Anacardium occidentale L.*).** Fortaleza, 2011. Dissertação. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará.
- VO, T. S.; KIM, S. K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of functional foods**, v. 14, p. 250-255, 2012 .
- WHELAN, M.; WHELAN, J.; RUSSEL, N.; DALGLEISH, A. Cancer immunotherapy: an embarrassment of riches. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 253-258, 2003.
- XU, C. J.; DING, G. Q.; FU, J. Y.; MENG, J.; ZHANG, R. H.; LOU, X. M. Immunoregulatory Effects of Ethyl-acetate Fraction of Extracts from *Tetrastigma Hemsleyanum* Diels et. Gilg on Immune Functions of ICR Mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p. 325-331, 2008.
- ZHANG, W.; DU1, X.; ZHAO, G.; JIN, H.; KANG, Y.; XIAO, C.; LIU, M.; WANG, B. Levamisole is a potential facilitator for the activation of Th1 responses of the subunit HBV vaccination. **Vaccine**, v. 27 p. 4938–4946, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Simões, C. M. O., Guerra, M.P. *et al.* 5 edição, Editora da UFSC, 2004.