

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale*)

STUDY OF THE ANIMICROBIAL ACTIVITY OF THE CASHEW NUT SHELL (*Anacardium occidentale*)

A. S. MONTEIRO¹, R. C. E. RODRIGUES², G. F. da SILVA¹ e P. M. ALBUQUERQUE^{1,2}

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Laboratório de Química Aplicada à Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia

² Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia

E-mail: andre_monteiro95@hotmail.com

article info

Article history:

Received 20 May 2016

Accepted 3 January 2017

Available online 27 July 2017

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Antimicrobiana; Anacardium Occidentale; Ácido Anacárdico.

KEYWORDS: Antimicrobial Activity; Anacardium Occidentale; Anacardic Acid.

RESUMO: A resistência de microrganismos às drogas atuais incentiva a busca de novos fármacos com atividade antimicrobiana. A espécie *Anacardium occidentale*, o cajueiro, vem sendo usado na medicina popular como anti-séptico, no tratamento de aftas e feridas. Com atividade antimicrobiana comprovada contra espécies patogênicas de humanos, a atividade frente à fungos fitopatogênicos ainda não foi estudada. Neste trabalho avaliou-se a atividade antimicrobiana do líquido da casca da castanha de caju (LCC) frente bactérias e fungos patogênicos. Foi utilizado o LCC extraído das cascas das castanhas de caju em hexano, e também o ácido anacárdico (AcA) isolado do LCC. Para verificar a atividade antimicrobiana foram utilizados os fungos patogênicos *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*; os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia sp.* e *Corynespora sp.* e cepas de bactérias patógenas a humanos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas *S. aureus* e *S. pyogenes* foram susceptíveis ao LCC e ao AcA, com concentração inibitória mínima de 4 mg/mL para ambos. Na comparação das duas atividades positivas, o LCC mostrou-se mais ativo que o AcA, onde no teste de difusão em meio sólido, o LCC desenvolveu um halo de inibição maior que do AcA. Uma concentração mais alta, 20 mg/mL, foi testada contra os fungos, porém o resultado se manteve o mesmo. Os extratos da castanha de caju, LCC e o AcA, mostram-se, então, potências agente com atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas.

Abstract: The resistance of microorganisms to current drugs encourages the search of new drugs with antimicrobial activity. The species *Anacardium occidentale*, the cashew tree, is used in traditional medicine as antiseptic in the treatment of mouth ulcers and wounds. With proved antimicrobial activity against human pathogenic species, although the activity against phytopathogenic fungi has not been studied. In this research was evaluated the antimicrobial activity of the cashew shell liquid (LCC) and the anacardic acid (AcA) against pathogenic bacteria and fungi. The LCC was extracted from the cashew nut shells in hexane, and the AcA was isolated from the LCC. To evaluate the antimicrobial activity were used the following fungi: *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*; the phytopathogenic fungi *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia sp.* and *Corynespora sp.* and strains of human pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Only *S. aureus* e *S. pyogenes* were sensitive to LCC and AnA, with minimal

inhibitory concentration of 4 mg/mL for both. Comparing the two positive results, the LCC was more active than AcA in the diffusion in solid assay with a wider halo. A higher concentration was tested, of 20 mg/mL, against fungi, however the result remained the same. The cashew nut shell extracts, LCC and AnA, appear to be potential agents with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos adquiriram nos últimos anos uma resistência pronunciada sobre os atuais fármacos devido às suas habilidades mutagênicas (COUTINHO et al., 2004), o que estimula a busca por novas fontes de antibióticos.

A utilização de plantas como fitoterápico datam 4.000 a.C., com algumas sendo utilizadas até hoje. Com isso o estudo sobre atividade antimicrobiana de óleos vegetais e extratos de plantas vem se intensificando em lugares de rica biodiversidade, como no Brasil (CASTRO e LIMA, 2010).

A castanha de caju é utilizada popularmente contra aftas, úlceras, impingens e leucorréia. O extrato da casca da castanha de caju possui como componente principal o ácido anacárdico que possui atividade comprovada contra *Candida albicans* e *Candida utilis*, e atividade antimicrobiana em células Gram-positivas (DUARTE et al., 2005).

Outros compostos também estão presentes no extrato, em menor quantidade, como o cardol (3-n-pentadecilresorcinaol) e o metilcardol (2-metil-5-n-pentadecilresorcinol). Derivados do cardol vêm sendo utilizados como germicidas e desinfetantes, também como antioxidante para estabilizar alimentos, combustíveis, lubrificantes e polímeros (LIMA et al., 2000; PRABHAKARAN et al., 2001; KLEMCHUCK, 1999).

A atividade antimicrobiana de compostos extraídos da casca da castanha de caju é conhecida contra espécies patogênicas de humanos, mas ainda não foi reportada frente a fungos fitopatogênicos. Assim, esse trabalho se propõe a avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da casca da castanha de caju sobre diferente microrganismos patogênicos, visando contribuir com novas descobertas que levem a elucidação de biomoléculas para a indústria farmacêutica.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Coleta do Material Vegetal

As castanhas de caju foram coletadas no município de Coari, interior do Estado do Amazonas, em um sítio localizado na estrada do aeroporto, AM - 343 Coari/Mamiá, a coleta foi realizada durante a segunda quinzena de outubro de 2014, e ocorreu quando o pedúnculo estava completamente desenvolvido, ou seja, com o tamanho máximo, textura firme e com a coloração amarela ou avermelhada, após a coleta as castanhas foram lavadas com água corrente e secas ao sol durante 3 dias e reviradas diariamente, durante a secagem eliminou-se as castanhas chochas, furadas e enrugadas (OLIVEIRA, 2007).

2.2 Preparo do LCC

As cascas trituradas foram divididas em 4 porções iguais de 250 g, cada porção foi colocada em 1 frasco âmbar de 1 L, e em cada frasco foram adicionados 750 mL de hexano P.A, depois de 6 dias a solução hexânica foi filtrada em papel filtro e rotoevaporada a 60 °C até a retirada de todo o hexano (por aproximadamente 6 h). Desta forma se obteve 254 g de LCC natural (extrato bruto) que foi colocado num frasco e armazenado na geladeira, (CHAVES et al., 2010).

Foi pesado 60 g de LCC natural e solubilizado em 400 mL de metanol e sob agitação vigorosa, adicionou-se 35 g de hidróxido de cálcio (até o pH 10), a temperatura foi aumentada para 50 °C, mantendo a agitação durante 3 h. Após o término desse tratamento, o precipitado do anacardato de cálcio foi filtrado e lavado com 200 mL de metanol. A massa foi seca sob vácuo a 45 °C por 3 h. O anacardato de cálcio (64 g) foi suspenso em 300 mL de água destilada e sob agitação, adicionou-se HCl concentrado (50 mL) até pH 1, mantendo a agitação por 1 h. Com o produto desta reação, fez-se uma extração com acetato de etila (3 x 150 mL), a camada orgânica combinada foi lavada com água destilada (3 x 150 mL), secou-se sobre sulfato de sódio anidro, filtrou-se e concentrou-se a pressão reduzida, obtendo o ácido anacárdico (30 g) (FRANÇA, 2007).

2.3 Microrganismos

Foram utilizadas culturas de fungos fitopatogênicos provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e culturas conhecidas como patógenos humanos (fungos e bactérias). Cada espécie fúngica foi reativada em meio ágar batata dextrose (BDA), por 7 dias na temperatura de 27°C. Foram utilizados os seguintes fungos: *Candida albicans* (CCCD – CC001), *Aspergillus brasiliensis* (CCCD – AA001), *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. e *Corynespora* sp. As bactérias foram reativadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas na temperatura de 36°C. As seguintes cepas bacterianas (patógenos humanos) foram utilizadas: *Staphylococcus aureus* (CCCD – S009), *Streptococcus pyogenes* (CCCD – S012), *Escherichia coli* (CCCD – E005) e *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD – P004).

2.4 Teste da Atividade Antimicrobiana

Para a padronização dos inóculos foram adicionados 4 mL de solução salina a 0,9% com Tween 80 a 1% sobre a placa sendo feita a raspagem com a alça de platina. Essa suspensão foi adicionada a um tubo de ensaio com 3 mL de solução salina, e através da câmara de Neubauer foi padronizado o número de esporos para $0,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. As cepas bacterianas foram padronizadas da mesma maneira na escala McFarland até a concentração final de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹.

Foi utilizada a técnica de difusão em meio sólido para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos. 100 µL da suspensão de esporos foi adicionada, uniformemente, a uma placa de petri com meio BDA. Após absorção, foram feitas quatro cavidades, onde foi colocado 50 µL da solução de LCC ou ACA em água na concentração de 20 mg.mL⁻¹, o controle positivo cetoconazol na concentração de 20 mg.mL⁻¹, e o controle negativo DMSO a 1%. Após incubação por 7 dias a 27°C, foram analisados os halos produzidos pelas cavidades com atividade positiva (NCCLS, 2002).

Para as bactérias, 100 µL da solução do inóculo foi adicionada uniformemente em uma placa de petri com ágar Mueller Hinton, onde depois de absorvido foram feitas novamente, quatro cavidades. Foi adicionado à solução de LCC e AcA em água na concentração de 20 mg.mL⁻¹, o controle positivo gentamicina ou amoxicilina na concentração de 20 mg.mL⁻¹, e o controle negativo DMSO a 1%. Após incubação durante 24 horas na temperatura de 36°C foi analisada a produção dos halos de inibição (NCCLS, 2007).

2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para as bactérias a solução de inóculo foi padronizada na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e as soluções de LCC, AcA e o controle positivo (amoxicilina) foram preparados na concentração de 20 mg.mL⁻¹. A dispersão na placa de ELISA foi feita da mesma maneira que no teste para os fungos. A placa foi, então, incubada por 24 horas a 36°C e foi revelada com resazurina, que muda sua coloração de azul para rosa em enzimas ativas revelando células vivas (CANILLAC e MOUREY, 2001).

Após determinação da CIM, a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram feitas retirando-se uma alíquota de cada poço da placa de ELISA e colocado-a em uma placa de petri contendo meio ágar Mueller Hinton. O período de incubação foi de 24 horas a 36°C para as bactérias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 1 e 2.

Tabela 1- Testes de atividade antimicrobiana, realizados com o LCC e AnA contra bactérias patogênicas.

Microrganismo	LCC	á. anacárdico	Amoxicilina	Gentamicina	DMSO (1%)
<i>S.aureus</i>	18,7±0,5	16,6±0,5	58,5±0,5	TR	N
<i>S.pyogenes</i>	16,5±0,5	16,0±0,5	40,0±0,5	TR	N
<i>E.coli</i>	N	N	N	31,5±0,5	N
<i>P. aeruginosa</i>	N	N	N	34,7±0,5	N

N - resultado negativo. TR - teste não realizado. Resultado expresso em mm, referente ao halo de inibição ± desvio padrão. As bactérias foram padronizadas conforme a escala McFarland na concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

Tabela 2- Testes da atividade antimicrobiana do LCC e AnA contra fungos.

Microrganismo	LCC	á. anacárdico	Cetoconazol	DMSO (1%)
<i>A. brasiliensis</i>	N	N	17,5±0,5	N
<i>C. albicans</i>	N	N	38,0±0,5	N
<i>C. cassicola</i>	N	N	25,0±0,5	N
<i>C. gloeosporioides</i>	N	N	19,0±0,5	N
<i>C. guaranicola</i>	N	N	25,0±0,5	N
<i>M. fijiensis</i>	N	N	45,0±0,5	N
<i>Rhizoctonia</i> sp.	N	N	40,0±0,5	N
<i>S. rolfsii</i>	N	N	36,0±0,5	N

N - Sem resultado. Resultado expresso em mm, referente ao halo de inibição ± desvio padrão. Os fungos foram padronizados conforme a escala McFarland na concentração de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ UFC/ml.

No teste antimicrobiano, *S. aureus* e *S. pyogenes* (Gram-positivas) foram as únicas cepas susceptíveis ao LCC e ao AcA, enquanto *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gram-negativas), bem como os fungos patogênicos (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*), e fitopatogênicos (*Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. e *Corynespora* sp.) foram resistentes. Testou-se ainda a concentração de 20 mg/mL de LCC e de AcA para os fungos, mas mesmo nessa concentração não houve atividade. O LCC mostrou-se mais ativo, pois formaram-se halos de inibição maiores do que na presença do AcA. Os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima (CMI) encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI)

Cepa	Concentração do LCC (mg/mL)											
	20	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>S.pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Cepa	Concentração do ácido anacárdico (mg/mL)											
	20	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>S.pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Cepa	Concentração da amoxicilina (mg/mL)											
	20	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S.pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda - S: Sensível, R: Resistente.

Em relação à mudança de coloração da resazurina a partir do azul para rosa, não se observou nenhuma mudança de cor até a diluição de 1:1024 para *S. aureus* quando testado com LCC e de 1:512 quando testado com AcA.

Já quando se trata da Atividade Inibitória Mínima sobre o *S. pyogenes*, não se observou nenhuma mudança de coloração até a diluição de 1:256 quando testado com LCC e de 1:128 quando avaliado com AcA.

Não se observou nenhum crescimento microbiano no teste com amoxicilina.

A permanência de cor azul da resazurina indica que não existe atividade microbiana, já a coloração rosa indica o crescimento de microrganismos.

4. CONCLUSÕES

O líquido da casca da castanha de caju não apresentou atividade antifúngica, e apenas revelou-se com atividade inibitória frente a duas bactérias patogênicas Gram-positivas, *S. aureus* e *S. pyogenes*.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao grupo de pesquisa, à Universidade do Estado do Amazonas pelo incentivo à pesquisa, ao CNPq pela bolsa concedida e CAPES pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

- COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, 2004.
- CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v. 18, p. 261-268. 2001.
- CASTRO, R. D., LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia UNESP**, 39, 179-184, 2010.

- CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. das G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; ELEODORO, F. M.; JUNÍOR, B. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 106112, 2010.
- DUARTE M.C.T., FIGUEIRA G.M., SARTORATTO A., REHDER V.L.G., MACHADO A.L.M., DELARMELINA C. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **J.of Etnopharmacol.** 97: 305-311.2005.
- FRANÇA, F. C. F. Síntese e caracterização de surfactantes glicosídicos a partir da amilose e aquil fenóis extraídos do LCC. **Dissertação**, Fortaleza, Ceará, 2007.
- KLEMCHUCK, P. P. Antioxidants. **Úllmann's encyclopedia of industrial chemistry**, v. A3, 5ed., 1999.
- LIMA, C. A. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. A. Estudo da atividade dos ácidos anacárdicos do óleo da castanha de caju (CNSL) dos clones de Cajueiro anão precoce CCP 76 e CCP 09 em cinco estágios e maturação sobre microorganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p.358362, 2000.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada.** 2ed. M27-A2, v. 22, n. 15, 2002. (atual CLSI - www.clsi.org).
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada.** 6ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2007. (atual CLSI - www.clsi.org).
- PRABHAKARAN, K.; NARASYANAN, A.; PAVITRAN, C. Cardanol as a dispersant plasticizer for na alumina/toluene tape casting slip. **Journal of the European Ceramica Society**, v. 21, p. 28732878, 2001.