



**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**

SMYRNA LUIZA XIMENES DE SOUZA

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO:
AÇÃO ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E TOXICIDADE LOCAL E SISTÊMICA *IN
VIVO***

FORTALEZA

2019

SMYRNA LUIZA XIMENES DE SOUZA

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO:
AÇÃO ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E TOXICIDADE LOCAL E SISTÊMICA *IN
VIVO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro Universitário Christus como requisito para obtenção do grau de Mestre em Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Ciências Odontológicas. Linha de Pesquisa: Estomatologia e Patologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

FORTALEZA

2019

Ficha Catalográfica elaborada por Dayane Paula Ferreira Mota – Bibliotecária – CRB-3/1310

S729n Souza, Smyrna Luiza Ximenes de.
Nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico: ação antimicrobiana in vitro e toxicidade local e sistêmica in vivo / Smyrna Luiza Ximenes de Souza. – 2019.
66 f. : il. ; color.

Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Christus - Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima.
Área de concentração: Microbiologia.

1. Anacardium occidentale. 2. Streptococcus mutans. 3. Biofilme. I.
Título.

CDD 616.31

SMYRNA LUIZA XIMENES DE SOUZA

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO:
AÇÃO ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E TOXICIDADE LOCAL E SISTÊMICA *IN
VIVO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro Universitário Christus como requisito para obtenção do grau de Mestre em Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Ciências Odontológicas. Linha de Pesquisa: Estomatologia e Patologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

Aprovado em 23 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus
Orientadora

Profa. Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira

Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus
Avaliador Interno

Prof. Dr. Gustavo Gomes Agripino

Professor do Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Avaliador Externo

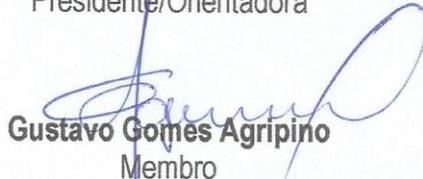
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

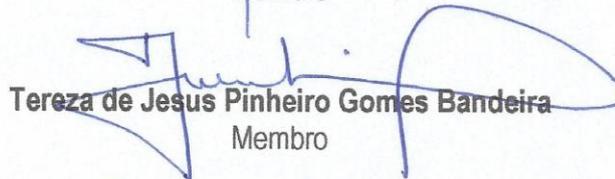
Aos 23 (vinte e três) dias do mês de fevereiro, do ano de 2019, às 08 horas, no Centro Universitário Christus – Unichristus, sede Parque Ecológico, Fortaleza - CE, realizou-se a Defesa de Dissertação do projeto intitulado **“NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO: AÇÃO ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E TOXICIDADE LOCAL E SISTÊMICA *IN VIVO*”**, de autoria da Mestranda, **Smyrna Luíza Ximenes de Souza**, aluna do Programa de Pós-Graduação no curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas para a obtenção do grau de Mestre em **Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas**. Como sua orientadora e presidente da mesa, apresentava-se a Professora Doutora **Ramille Araújo Lima** (Unichristus), o Professor Doutor **Gustavo Gomes Agripino** e a Professora Doutora **Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira**. Em sessão pública, após a exposição aproximada de 40 (quarenta) minutos, a mestranda foi arguida oralmente pelos membros da Banca, obtendo como resultado: aprovada, em acordo com o capítulo XV, artigo 67 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação e Pesquisa do Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas. Após a sessão de defesa do trabalho de conclusão, a aluna deverá, em um prazo de 45 (quarenta e cinco) dias, entregar, na Secretaria do Programa, uma via impressa e encadernada e uma via eletrônica de seu trabalho de conclusão, aprovado pelo orientador, com a inclusão das eventuais modificações sugeridas pela Comissão Examinadora na sessão de defesa oral, como condição final para a expedição do diploma. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente Ata, que está assinada pelos membros da Banca Examinadora, abaixo mencionados, e pela mestranda.

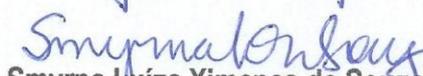
Fortaleza, 23 de Fevereiro de 2019.



Ramille Araújo Lima
Presidente/Orientadora


Gustavo Gomes Agripino
Membro


Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Membro


Smyrna Luíza Ximenes de Souza
Aluna

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Claudenor Gomes de Souza e Carolina Monteiro Ximenes de Souza (*in memoriam*) que nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação possível, que foram influenciadores diretos para que eu me tornasse quem sou e que são os maiores exemplos que uma pessoa pode ter.
Eu os amo incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que é o único que realmente sabe tudo o que aconteceu até que este dia chegasse, e que sempre esteve no controle de tudo, mesmo eu não entendendo ou aceitando acontecimentos ou circunstâncias. Obrigada por ser fiel mesmo quando eu não fui.

Ao meu pai, meu amigo, meu companheiro de vida e de sonhos, presente em todos os momentos, dando-me o apoio necessário para prosseguir. Sem você eu não teria conseguido. Obrigada por nestes últimos quatro anos termos sido um para o outro, e o outro para o um, desde a partida de nossa bonequinha amada. Por sempre sabermos que temos um ao outro incondicionalmente.

Aos responsáveis diretos por este novo e impensável direcionamento em minha vida – a docência: Fabrício Bitu e Gustavo Agripino, sem títulos, só amigos. Ao nosso reencontro que foi de almas, de consolo, de amizade renovada. Sempre lhes serei grata por terem enxergado em mim a professora que nem eu mesma enxergava.

A minha orientadora, Prof. Dra. Ramille Araújo Lima, que me acolheu de todas as formas possíveis, quer ensinando, orientando, partilhando ou tendo paciência com esta nova velha aluna. A você, Ramille, minha eterna gratidão por ter segurado na minha mão até este dia. Tenho sinceras esperanças que o dia de defesa seja somente o fechamento de um ciclo, e que eu possa ter a honra de estar presente em muitas mais pesquisas suas.

Prof. Dr. Gustavo Agripino, agora sim, posso agradecer-lhe como participante de minha banca, o que muito me honra. Muito obrigada por ter vindo, por ter colaborado neste momento tão importante de minha vida. E que muitos outros ciclos venham!

Profa. Dra. Teresa Bandeira, pela sua disponibilidade em participar de minha banca e pelas grandes contribuições, muito obrigada!

Obrigada especialmente ao querido casal Prof. Dr. Fabrício Bitu e Prof. Dra. Renata Mota pelo acolhimento durante esses dois anos de vindas à Fortaleza. Pela amizade, pelo encorajamento, pelo braço sempre estendido.

Aos meus colegas da Turma 1: de tão heterogêneos que somos, demorei-me muito! Obrigada por serem a cada mês minha família fora de casa. Em especial à minha conterrânea paraibana Jordana Decker pela companhia nas viagens quase intermináveis e pelo compartilhar da vida – crescemos juntas nesses dois anos que passaram tão rápido.

Obrigada a todos os professores que transmitiram conhecimento e me fizeram pensar de outra forma. Especialmente os agradeço na pessoa do Prof. Paulo Goberlânio, não

somente pelas contribuições nesta pesquisa, mas também por sempre se mostrar solícito da forma mais simples e singela possível.

Aos funcionários da Unichristus pelo cafezinho semprequentinho e pelo sorriso no rosto: muito obrigada.

Às mui especiais meninas da Iniciação Científica do Curso de Odontologia da Unichristus: Laís Aragão, Stéffani Vasconcelos, Larissa Ximenes e Fernanda Souza – sem vocês eu não teria conseguido. Só tenho a agradecer e a desejar uma vida profissional de muito sucesso.

RESUMO

Introdução: O ácido anacárdico (AA), produto extraído do líquido da castanha de caju, é um promissor agente antimicrobiano, tendo se mostrado efetivo na redução da viabilidade bacteriana de *Streptococcus mutans* (SM) em culturas planctônicas, porém ainda sem estudos avaliando seu efeito em biofilmes dentários. **Objetivo:** Avaliar o efeito antiplaca de formulação à base de nanopartículas de zeína carregadas com AA extraído da casca da castanha de caju em biofilmes de SM *in vitro* e analisar sua toxicidade *in vivo*. **Metodologia:** Inicialmente, foi determinada a atividade antibacteriana da formulação com AA através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para análise em biofilme, discos de hidroxiapatita, imediatamente após formação da película adquirida, foram imersos por dois minutos em quatro grupos teste: Grupo 1 - solução hidroetanólica; Grupo 2 - Nanopartícula de zeína + Solução hidroetanólica; Grupo 3 - Nanopartícula de zeína carregada com ácido anacárdico 9,337 µg/mL+ Solução hidroetanólica e Grupo 4 - Digluconato de clorexidina 0,12%. Em seguida, os discos foram imersos em caldo de cultura para formação de biofilme. Após cinco dias de troca de meio, os biofilmes foram coletados para análise da viabilidade bacteriana e peso seco. O grau de toxicidade subcrônica foi obtido através de estudo *in vivo* (modelo animal), após a administração oral (gavagem) e tópica (os fármacos foram pincelados sobre dorso e ventre de língua, mucosa jugal, palato duro e gengiva) em quatro grupos teste: Grupo Salina – solução salina estéril a 0,9%; Grupo Clorexidina – clorexidina 0,12%; Grupo AA1 – nanopartícula de zeína carregada com AA e Grupo AA2 – nanopartícula de zeína, por um período de 30 dias. **Resultados:** Foi encontrado o valor de 0,36 µg/mL tanto para a CIM quanto para a CBM. A solução testada no Grupo 3 foi eficaz na inibição da formação do biofilme de SM, pois não foram observadas unidades formadoras de colônia após 5 dias, o que também foi observado no Grupo 4. Após 30 dias de tratamento com os fármacos, os animais dos Grupos AA1 (-4,25±1,49) e AA2 (-4,00±1,30) mostraram maior perda de peso; não havendo diferença significativa na massa dos rins, pulmões, fígado e baço. Os Grupos AA1 (0,16±0,01) e AA2 (0,16±0,02) apresentaram menor massa cardíaca que os animais dos Grupos Salina (0,21±0,01) e Clorexidina (0,22±0,02) (p=0,045). Com relação à toxicidade local, a espessura média do epitélio de ventre lingual no Grupo Salina (3250±439 µm) foi significativamente inferior ao Grupo AA2 (8650±1079 µm) (p=0,001); os Grupos AA1 e AA2 apresentaram espessura média inferior do epitélio de mucosa jugal em relação ao Grupo Clorexidina (p<0,001) e a espessura dos epitélios de gengiva do Grupo Salina (134±13 µm)

foi significativamente inferior aos Grupos Clorexidina ($15192 \pm 4868 \mu\text{m}$), AA1 ($14171 \pm 1852 \mu\text{m}$) e AA2 ($7316 \pm 2507 \mu\text{m}$) ($p=0,001$). Não houve sinais significativos de infiltrado inflamatório. **Conclusões:** Os resultados denotam valor de CIM e CBM otimizado pela presença de nanopartículas como também potencial efeito anti-placa do AA na formulação testada. A administração sistêmica do AA reduziu, no modelo animal, a massa cardíaca, mas não exibiu sinais de toxicidade macroscópica e histológica.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*. Nanopartículas. *Streptococcus mutans*. Biofilme. Toxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Anacardic acid (AA), a product extracted from cashew nut liquid, is a promising antimicrobial agent and has been shown to be effective in reducing the bacterial viability of *Streptococcus mutans* (SM) in planktonic cultures – however there are no studies evaluating its effect on dental biofilms. **Objective:** This study aimed to evaluate the antiplaque effect of AA zein nanoparticle formulation extracted from cashew nuts on *in vitro* SM biofilms and their *in vivo* toxicity. **Methodology:** Initially, the antibacterial activity of the formulation with AA was determined through the tests of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). For biofilm analysis, hydroxyapatite disks, immediately after acquired film formation, were immersed for two minutes in four test groups: Group 1 - hydroethanolic solution; Group 2 – Zein Nanoparticle + Hydroethanolic solution; Group 3 – AA Zein Nanoparticle (9,337 µg/mL) + hydroethanolic solution and Group 4 - 0.12% chlorhexidine digluconate. Thus, the disks were immersed in culture broth for biofilm formation. After five days of exchanging culture medium, the biofilms were collected for analysis of bacterial viability and dry weight. The extent of subchronic toxicity was obtained by *in vivo* study (animal model) after oral (gavage) and topical administration (the drugs were brushed using individual sterile cotton swabs on the tongue ventral and dorsal surfaces, bucal mucosa, palate and gingiva) in four test groups: Group Saline - 0.9% sterile saline solution; Group Chlorhexidine - chlorhexidine 0.12%; Group AA1 – AA zein nanoparticle; and Group AA2 - zein nanoparticle, for a period of 30 days. **Results:** It was found a 0,36 µg/mL value to MIC and to MBC. The solution tested in Group 3 was effective in inhibiting the formation of SM biofilm because no colony forming units were observed after 5 days of biofilm formation, which was also observed in Group 4. After 30 days of treatment with the drugs, animals from Groups AA1 (-4.25 ± 1.49) and AA2 (-4.00 ± 1.30) showed greater weight loss; and there was no significant difference in the mass of the kidneys, lungs, liver and spleen. Groups AA1 (0.16 ± 0.01) and AA2 (0.16 ± 0.02) presented lower cardiac mass than the animals of Groups Saline (0.21 ± 0.01) and Chlorhexidine ($0.22 \pm 0, 02$) ($p = 0.045$). Regarding local toxicity, the mean thickness of the lingual epithelium in the Group Saline (3250 ± 439 µm) was significantly lower than the Group AA2 (8650 ± 1079 µm) ($p = 0.001$); the Groups AA1 and AA2 had a significantly lower mean bucal mucosa epithelial thickness than the Group Chlorhexidine ($p < 0.001$) and the thickness of saline gingival epithelium (134 ± 13 µm) was significantly lower in the Groups Chlorhexidine (15192 ± 4868 µm), AA1 (14171 ± 1852 µm) and AA2 (7316 ± 2507 µm) ($p = 0.001$). There

were no significant signs of inflammation. **Conclusions:** The results denote MIC and MBC values optimized by the presence of nanoparticles and potential anti-plaque effect of AA in the formulation tested. Systemic administration of AA reduced the cardiac mass in the animal model, but showed no signs of macroscopic and histological toxicity.

Key-words: *Anacardium occidentale*; Nanoparticles; *Streptococcus mutans*; Biofilm; Toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Anacárdico
CLX	Clorexidina
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
LCC	Líquido da Castanha de Caju
OMS	Organização Mundial da Saúde
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
TSB	Tryptone Soy Broth

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

1. Introdução Geral.....	15
2. Proposição.....	20
3. Capítulo 1.....	21
4. Capítulo 2.....	38
5. Discussão Geral.....	57
6. Conclusões Gerais.....	61
Referências.....	62
Anexo.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais são uma importante opção terapêutica para a população, especialmente no Brasil, devido suas propriedades biológicas, seu baixo custo e sua disponibilidade (NUNES et al., 1999; ARAÚJO et al., 2018). Aliado a isso, reitera a Organização Mundial da Saúde (OMS) que cerca de 80 a 85% da população mundial de países em desenvolvimento, por causa da pobreza e da falta de acesso a centros médicos, dependem primordialmente de plantas para a sua saúde primária. Porém, poucas plantas têm sido cientificamente estudadas para uma avaliação segura de suas propriedades, eficácia e toxicidade. A própria OMS, desde 1977, tem incentivado o estudo de plantas medicinais para que seus benefícios sejam cientificamente comprovados, assim como sejam conhecidos os riscos de seu uso indevido e sua possível toxicidade (PERAZZO et al., 2004).

O cajueiro (*Anacardium occidentale*), cultivado em várias regiões do mundo, é uma árvore tropical comumente encontrada no Nordeste brasileiro (GOMES, et al. 2016). O caju, seu pseudofruto, pode ser consumido *in natura* e pode ser convertido em vários produtos nutricionais, como sucos, chás e geleias. Além do pseudofruto, da folha e da castanha, uma parte que na maioria das vezes é considerada como resíduo é a casca da castanha, que contém 30% do que se chama líquido da castanha de caju (LCC). Neste sentido, sendo o Brasil um dos maiores produtores de resíduos agroindustriais do mundo, estudar compostos neles contidos tem grande importância na redução de poluentes e na possibilidade de se encontrar substâncias com potencial terapêutico (ROCHELLE, 2016).

O LCC tem em sua composição 80% de ácido anacárdico (AA), além de 15% de cardol e uma pequena quantidade de cardanol (HARLITA et al., 2016). Tem surgido como um composto promissor, devido à sua variedade de propriedades biológicas e não biológicas, como por exemplo, o uso como preservante de alimentos, tinta, cimento, estabilização de gasolina, sendo assim, um importante produto comercial para vários países tropicais (CARVALHO et al., 2011).

O ácido anacárdico (AA) é um dos componentes ativos extraídos do LCC (TREVISAN et al., 2006). Tem se mostrado efetivo na redução da viabilidade bacteriana de *Streptococcus mutans* (SM) em culturas planctônicas, além de atuar como anti-inflamatório, antibacteriano, antitumoral, antifúngico e antioxidante (HIMEJIMA & KUBO, 1991; MUROI & KUBO, 1993; ARAÚJO et al., 2005; KUBO et al, 2006; GREEN et al., 2008; RIVERO-CRUZ et al., 2011; AL-HAZZANI et al., 2012; SOUZA et al., 2018). Também tem sido descrito como gastroprotetor, inibidor de enzimas (CARVALHO et al., 2011) e como um

potencial candidato a agente para o desenvolvimento de nanomateriais (HAMAD & MUBOFU, 2015).

Embora haja uma grande gama de agentes antimicrobianos com indicação para controle e tratamento de inúmeras enfermidades, a questão do desenvolvimento de resistência antimicrobiana tem se tornado um grave problema de saúde pública nos últimos anos (CARVALHO et al., 2011). Desta forma, novos agentes antimicrobianos têm sido pesquisados, especialmente as plantas medicinais.

O AA consiste em uma molécula anfipática com regiões hidrofílica e hidrofóbica. Sua atividade antimicrobiana tem sido relacionada em função da interação entre o comprimento da cadeia lateral hidrofóbica com o grupo hidroxila hidrofílico – a porção hidrofílica se liga a um hidrogênio intermolecular da membrana plasmática da célula-alvo e, logo após, a porção hidrofóbica é capaz de entrar na bicamada lipídica da membrana celular, causando seu rompimento (GREEN et al., 2007). Quanto maior o número de duplas ligações na cadeia lateral, maior efeito antibacteriano o composto terá (HIMEJIMA & KUBO, 1991; MUROI & KUBO, 1993).

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar-dependente que ocorre pela progressiva destruição da estrutura mineral dos tecidos dentários, resultante de uma complexa interação de microrganismos, fatores do hospedeiro e da dieta (KLEIN et al., 2015). Na ausência de tratamento, a cárie progride podendo afetar desde os tecidos mineralizados do órgão dentário até a polpa (FEJERSKOV, 2005; CURY et al., 2016). É caracterizada pelo aparecimento de regiões definidas de desmineralização no esmalte dentário, as manchas brancas, que eventualmente podem coalescer para uma lesão mais ampla (KOO et al., 2013).

É a doença oral mais prevalente mundialmente e é considerada um grande problema de saúde bucal, apesar dos constantes estudos e esforços na descoberta de medidas que possam preveni-la (MARCENES et al., 2013). É tida como a doença oral biofilme-dependente mais onipresente e dispendiosa do mundo e que compromete a saúde e o bem-estar de crianças e adultos (KLEIN et al., 2015). No Brasil, de acordo com o último levantamento epidemiológico de 2010, a cárie está presente em 53,4% das crianças com cinco anos de idade e em 56,5% das crianças com 12 anos. Sendo a cárie um fenômeno sócio-econômico-dependente, no nosso país há grandes diferenças entre cidades de interior (com maior porcentagem de casos) e capitais (SB BRASIL 2010).

Mudanças nos eventos metabólicos que ocorrem entre o mineral dentário e o biofilme diante da queda do pH têm como resultado a cárie, queda esta que acontece devido à produção de ácidos por meio de bactérias presentes no biofilme, especialmente o SM, que é o

principal agente associado ao início e desenvolvimento da lesão cáriosa, apesar de nem sempre ser o mais numeroso. Esta bactéria sintetiza polissacarídeos intracelulares e extracelulares, principalmente do tipo glucano a partir da sacarose da dieta, e possui características acidogênicas e acidúricas, que são consideradas fatores de virulência críticos envolvidos na patogênese da cárie (LOESCHE, 1986; YAMASHITA et al., 1993; PAES LEME et al., 2006; DUARTE et al., 2008; KLEIN et al., 2015).

Esta produção de polissacarídeos extracelulares pelo SM auxilia na maturação do biofilme, na medida em que polissacarídeos produzidos por suas enzimas são os principais constituintes da matriz cariogênica e são reconhecidos como fatores de virulência associados à cárie dentária (KOO et al., 2013). Os biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos aderidos a uma superfície sólida e que se aglomeram dentro de uma matriz tridimensional de polissacarídeos extracelulares composta de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Ainda melhoram e promovem a aderência e co-aderência de microrganismos, atuam como reserva de energia, afetam a difusão de substâncias para dentro e fora do biofilme e ajudam a concentrar íons metálicos e outros nutrientes fisiológicos dentro de um microambiente. (MARSH, 1994; KOLENBRANDER, 2000; HAYACIBARA et al., 2003; ARPANA & YADAV, 2008; FLEMMING & WINGENDER, 2010; KOO et al., 2010; BOWEN & KOO, 2011). Somando-se a isto, biofilmes podem proteger os microrganismos de condições adversas, e o estado fisiológico das células bacterianas no biofilme confere um alto nível de resistência aos agentes antimicrobianos. (COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999).

A cavidade oral possui uma diversidade anatômica e uma interdependência entre as suas estruturas, tornando favorável o desenvolvimento do biofilme. Os dentes constituem superfícies duras favoráveis à sua formação e maturação, tanto na região supragengival como na região subgengival, diferentemente das superfícies mucosas nas quais ocorre uma constante descamação do epitélio e os microrganismos aderidos são renovados (MARSH, 1994).

A remoção mecânica através da escovação e do fio dental, o uso de antissépticos e antibióticos são meios de tratamento de doenças que se relacionam com a presença do biofilme (KOO et al., 2013; KLEIN et al., 2015). Na Odontologia, a clorexidina tem sido estudada à exaustão e é, atualmente, o agente antimicrobiano mais utilizado como padrão ouro por ter um amplo espectro de ação. Tem sido usada também como padrão ouro em grupos controle de experimentos, nos quais é medida a dosagem de uso de outros agentes. Porém tem sabor desagradável e capacidade de pigmentação de estruturas dentárias e de restaurações

estéticas, o que leva à abertura de espaço para a descoberta de outras substâncias que também sejam eficientes e que não tenham tantos efeitos colaterais (ANAND et al., 2015). Já os antibióticos podem levar à resistência das cepas, tendo consequência a diminuição de sua eficácia (HAMBLIN & HASAN, 2004; GOMES et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018).

Apesar de o AA já ter sua ação avaliada contra suspensões de SM (MUROI & KUBO, 1993; GREEN et al., 2008; RIVERO-CRUZ et al., 2011; ANAND et al., 2015; ARAÚJO et al., 2018), inexistem estudos que avaliem a sua ação em biofilmes cariogênicos. Neste sentido, mais estudos que avaliem a ação antibacteriana do AA em biofilmes são necessários.

As nanopartículas são materiais muitíssimo pequenos, menores que 1nm, apresentados pelo professor Noro em 1973 na Universidade de Tóquio. Seu uso terapêutico pode envolver o diagnóstico, prevenção e tratamento de várias doenças. Em Odontologia, tem e terá um vasto campo, desde nanorobôs até regeneração da articulação temporomandibular (KAVOOSKI et al., 2018). A incorporação de nanomateriais pode modificar as propriedades ópticas, químicas, elétricas e mecânicas de substâncias (BAPAT et al., 2018).

O pequeno diâmetro das nanopartículas aumenta não somente suas propriedades mecânicas, mas também sua ação antimicrobiana devido à sua alta relação superfície-volume, provocando dano às membranas celulares. Sua grande vantagem sobre os antimicrobianos convencionais é não ser afetada pelos mecanismos que fazem com que os organismos fiquem a eles resistentes, pois formam um contato direto com a parede celular bacteriana, em vez de penetrá-la, sendo também sistemas ideais de entrega de drogas (BAPAT et al., 2018; DEFRATES et al., 2018).

As nanopartículas podem ter uma diversidade de composições, tais como metais, polissacarídeos e proteínas (DEFRATES et al., 2018). As de prata tem sido pesquisadas devido a sua capacidade remineralizadora; as de ouro tem sido usadas como veículos para entrega de antimicrobianos e também como agentes de contraste para imagens; as de óxido de ferro tem sido pesquisadas na inibição da formação do biofilme; as de dióxido de titânio em resinas dentárias, dentre outras (BAPAT et al., 2018).

Já as nanopartículas com base biológica como seda, queratina, colágeno, elastina, zeína do milho e soja têm a grande vantagem de serem biodegradáveis e de relativo baixo custo. Podem ser processadas e modificadas para que alcancem as especificidades de tamanho, morfologia e peso desejadas (DEFRATES et al., 2018).

A zeína é uma proteína de baixo peso molecular encontrada no citoplasma celular do milho. Por ser insolúvel em água, a nanopartícula de zeína é promissora como veículo de

carreamento de drogas, na medida em que pode proteger seu conteúdo por ter alta estabilidade em uma variedade de ambientes, como por exemplo, o meio bucal, e também como base na engenharia tecidual e na formação de plataformas biodegradáveis para biosensores (DEFRATES et al., 2018).

Mesmo com o grande uso das plantas medicinais, estudos que avaliem sua toxicidade são escassos, apesar de grande importância, já que a toxicidade é um limite a este largo uso. A avaliação da toxicidade de uma droga tem o propósito de detectar a toxicidade da substância na medida em que se avaliam órgãos específicos em sua sensibilidade, verificando, assim, o dano que pode por ela ter sido causado, quer macroscopicamente ou microscopicamente.

Desta forma, protocolos de toxicidade aguda e crônica têm sido propostos, quer para detecção da dose máxima permitida com uma única administração, quer para avaliar os efeitos que a droga possa ter com administração mais prolongada (HARLITA et al., 2016). Carvalho et al., (2011) avaliaram a toxicidade do AA através de protocolos agudo (dose única) e subagudo (30 dias) em modelo animal e concluíram que o fármaco não produziu efeitos mutagênicos, observando ainda que doses menores que 300mg/kg não levaram às alterações bioquímicas e hematológicas.

Apesar da larga utilização do AA para as mais diversas finalidades terapêuticas, inexistem estudos que avaliem a toxicidade *in vivo* de nanopartículas de zeína carregados com ácido anacárdico.

2 - PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

- Analisar efeitos biológicos, quais sejam a ação antimicrobiana e a toxicidade, de formulação à base de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antibiofilme desta formulação na formação de biofilmes de *Streptococcus mutans in vitro*.

- Avaliar o grau de toxicidade subcrônica desta formulação, após a administração via oral e via tópica *in vivo* (modelo animal).

3 – CAPÍTULO 1

Título do Artigo:

Ação antimicrobiana de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico em biofilmes em formação de *Streptococcus mutans*

Periódico de publicação:

Archives of Oral Biology

Ação antimicrobiana de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico em biofilmes em formação de *Streptococcus mutans*

Smyrna Luiza Ximenes de Souza^a

Lais Aragão Lima^a

Ana Larissa Ximenes Batista^a

Jennifer Thyanne Cavalcante de Araújo^b

Francisco Fábio Oliveira Sousa^b

Ramille Araújo Lima^{a*}

^aCentro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Rua João Adolfo Gurgel, 133, Cocó, Fortaleza, CE, Brasil

^bUniversidade Federal do Amapá (UNIFAP), Rod. Juscelino Kubitschek, km 02, Macapá, AP, Brasil

Running Title: Ácido Anacárdico em biofilmes de S. mutans

* Corresponding Author:

Ramille Araújo Lima, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Rua João Adolfo Gurgel, 133, Cocó, Fortaleza, CE, Brasil

E-mail: ramillelima@yahoo.com.br

Phone: +55-85-998579898

Highlights

- Este estudo utilizou nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico.
- Modelo de estudo realizado com biofilme de SM.
- Houve inibição de desenvolvimento de biofilme dental de SM pelo ácido anacárdico.

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de formulação à base de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico (AA) extraído da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) em biofilmes em formação de *Streptococcus mutans* (SM) *in vitro*.

Design: Inicialmente, foi determinada a atividade antibacteriana da formulação à base de AA através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em sete grupos teste. Para análise em biofilmes de SM UA159, estes foram formados em discos de hidroxiapatita previamente expostos à saliva para formação da película adquirida. Em seguida, foram imersos por dois minutos em quatro grupos teste: Grupo 1 - solução hidroetanólica; Grupo 2 - Nanopartícula de zeína + Solução hidroetanólica; Grupo 3 – Nanopartícula de zeína carregada com Ácido Anacárdico (9,337 µg/mL) + Solução hidroetanólica e Grupo 4 - Digluconato de clorexidina a 0,12%. Após cinco dias de troca de meio, os biofilmes foram coletados para análise da viabilidade bacteriana e peso seco. Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados para logaritmo na base dez e foram calculadas as médias e desvios-padrões de cada grupo. Foi realizado o teste ANOVA seguido de Turkey.

Resultados: Foi encontrada a concentração de 0,36 µg/mL tanto para CIM quanto para CBM da formulação testada. A solução testada no Grupo 3 foi eficaz na inibição da formação do biofilme de SM, pois não foram observadas unidades formadoras de colônia após 5 dias de formação de biofilme, o que também foi observado no Grupo 4.

Conclusão: Os resultados mostraram valor de CIM e CBM otimizado pela presença de nanopartículas e denotam potencial efeito antiplaca do AA na formulação testada.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; *Streptococcus mutans*; Biofilme.

1. Introdução

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar-dependente que ocorre pela progressiva destruição da estrutura mineral dos tecidos dentários, resultante de uma complexa interação de microrganismos, fatores do hospedeiro e da dieta. Na ausência de tratamento, a cárie progride podendo afetar desde os tecidos mineralizados do órgão dentário até a polpa (Cury et al., 2016). É a doença oral mais prevalente mundialmente e é considerada um grande problema de saúde bucal, apesar dos constantes estudos e esforços na descoberta de medidas que possam preveni-la (Marcenes et al., 2013). É caracterizada pelo aparecimento de regiões definidas de desmineralização no esmalte dentário, as manchas brancas, que eventualmente podem coalescer para uma lesão mais ampla (Koo, Falsetta & Klein, 2013; Klein et al., 2015).

A remoção mecânica através da escovação e do fio dental, o uso de antissépticos e antibióticos são meios de tratamento de doenças orais que se relacionam com a presença do biofilme (Koo et al., 2013; Klein et al., 2015). Na Odontologia, a clorexidina tem sido estudada à exaustão e é, atualmente, considerada o agente antiplaca padrão ouro. Porém tem sabor desagradável e capacidade de pigmentação de estruturas dentárias e de restaurações estéticas, o que leva à abertura de espaço para a descoberta de outras substâncias que também sejam eficientes e que não tenham tantos efeitos colaterais (Anand et al., 2015). Já os antibióticos podem levar à resistência das cepas, tendo consequência a diminuição de sua eficácia (Hamblin & Hasan, 2004; Gomes et al., 2016; Araújo et al., 2018).

Assim sendo, as plantas medicinais têm aparecido como uma importante opção terapêutica para o tratamento e prevenção das doenças biofilme-dependentes, devido às várias vantagens, dentre elas, suas propriedades biológicas, seu baixo custo e sua disponibilidade (Araújo et al., 2018). Aliado a isso, reitera a Organização Mundial da Saúde (OMS) que cerca de 80% da população mundial de países em desenvolvimento, por causa da pobreza e da falta de acesso a centros médicos, dependem primordialmente de plantas para a sua saúde primária (Perazzo et al., 2004).

O cajueiro (*Anacardium occidentale*), cultivado em várias regiões do mundo, é uma árvore tropical comumente encontrada no Nordeste brasileiro (Gomes et al., 2016). O líquido da castanha de caju (LCC) tem em sua composição 80% de ácido anacárdico (AA), além de 15% de cardol e uma pequena quantidade de cardanol (Trevisan et al., 2006; Harlita et al., 2016). Tem surgido como um composto promissor, devido à sua variedade de propriedades biológicas e não biológicas, como por exemplo, o uso para preservação de

alimentos, tinta, cimento, estabilização de gasolina, sendo assim, um importante produto comercial para vários países tropicais (Carvalho et al., 2011). O AA tem mostrado uma variedade de efeitos biológicos, tais como ação anti-inflamatória (Souza et al., 2018), antibacteriana (Himejima & Kubo, 1991; Muroi & Kubo, 1993; Green et al., 2008; Rivero-Cruz et al., 2011), antitumoral (Kubo et al., 1993; Al-Hazzani et al., 2012), antifúngica (Araújo et al., 2005) e antioxidante (Kubo et al., 2006). Também tem sido descrito como gastroprotetor, inibidor de enzimas (Carvalho et al., 2011) e como um potencial candidato a agente para o desenvolvimento de nanomateriais (Hamad & Mubofu, 2015).

Sua atividade antimicrobiana tem sido relacionada em função da interação entre o comprimento da cadeia lateral hidrofóbica com o grupo hidroxila hidrofílico – a porção hidrofílica se liga a um hidrogênio intermolecular da membrana plasmática da célula-alvo e, logo após, a porção hidrofóbica é capaz de entrar na bicamada lipídica da membrana celular, causando seu rompimento (Green et al., 2007). Quanto maior o número de duplas ligações na cadeia lateral, maior efeito antibacteriano o composto terá (Himejima & Kubo, 1991; Muroi & Kubo, 1993). Apesar de o AA já ter sua ação avaliada contra suspensões de SM (Muroi & Kubo, 1993; Green et al., 2008; Rivero-Cruz et al., 2011; Anand et al., 2015; Araújo et al., 2018), inexistem estudos que avaliem a sua ação em biofilmes cariogênicos.

As formas mais comuns de carreamento de substâncias de combate à cárie (líquidas e pastosas) têm fácil administração e são bem aceitas pelos pacientes, porém sua retenção na superfície dental é pobre, levando a uma menor eficácia (Ahmadian et al., 2018). As nanopartículas, sendo materiais muitíssimo pequenos, menores que 1nm, têm sido cada vez mais estudadas para serem carreadoras de substâncias, melhorando não somente suas propriedades mecânicas como também podendo ser modificadas de forma a alcançarem especificidades de tamanho, morfologia e peso desejadas (Defrates et al., 2018). Seu uso terapêutico pode envolver o diagnóstico, prevenção e tratamento de várias doenças. Em Odontologia, tem e terá um vasto campo, desde nanorobôs até regeneração da articulação temporomandibular (Kavooski et al., 2018). Podem ter uma diversidade de composições, tais como metais, polissacarídeos e proteínas. As nanopartículas de zeína do milho tem a grande vantagem de serem biodegradáveis e de relativo baixo custo. (Defrates et al., 2018). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibiofilme de formulação à base de nanopartículas de zeína carregadas com AA extraído da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) em biofilmes em formação de *Streptococcus mutans in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

2.1.1. Preparo do inóculo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi o *Streptococcus mutans* UA159 (SM). O inóculo foi preparado em TryptoneSoyBroth (TSB) contendo 1% de glicose em temperatura de 37°C e atmosfera parcial de 5% CO₂. A suspensão permaneceu em estufa por um período de 18h, e após esse período foi ajustada através de espectrofotômetro, a fim de se obter uma suspensão com 10⁶ unidades formadoras de colônia/mL, conforme recomendado pelo CLSI (2013).

2.1.2 Desenho Experimental

O experimento apresentou os seguintes grupos:

1. Grupo Teste: Caldo de cultura + Inóculo + [Extrato hexânico da castanha de caju (0.0093% p/v) + Nanopartícula zeína (0.0714% p/v) + Solução hidroetanólica 35%]. Concentrações do extrato de 93 µg/mL a 0,022 µg/mL
2. Grupo Controle Negativo 1: Caldo de cultura + inóculo+ [Agente diluente Nanopartícula zeína (0.0714% p/v) + Solução hidroetanólica 35%].
3. Grupo Controle Negativo 2: Caldo de cultura + Inóculo + Solução salina 0,89%.
4. Controle de Turvação: Caldo de cultura + [Extrato hexânico da castanha de caju (0.0093% p/v) + Agente dispersante (0.0714% p/v) + Solução hidroetanólica 35%]. Não contém inóculo.
5. Grupo controle positivo: Caldo de cultura + Inóculo + Digluconato de clorexidina 0,12%.
6. Grupo de crescimento: Caldo de cultura + Inóculo
7. Grupo controle de esterilidade: Caldo de cultura

Conforme o grupo experimental exposto acima, foram distribuídos em placas de cultura de células de 96 poços: 100 µL de caldo de cultura + 10 µL do inóculo + 100 µL da solução testada (cada poço). As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica, 5% de CO₂, a 37°C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorbâncias em leitora de Elisa Bio-Tek a 490nm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração da solução testada capaz de inibir o crescimento de SM, constatado mediante inspeção a olho nu (ausência de turvação visível) e leitura da absorbância.

Para determinação da CBM foram retirados 25 μL , de forma asséptica, da diluição que não apresenta turvação visível (CIM) e semeados, com auxílio de alça drigalski, pelo método de estriamento, em placas de BHI-Ágar. Também foram semeados 25 μL das duas diluições acima da que representa a CIM. O ensaio foi realizado em triplicatas. Após incubação durante 24 horas em estufa a 37°C, 5% CO_2 , foi realizada a contagem das colônias. Aquela concentração que determinou um crescimento microbiano inferior a 0,1% do inóculo inicial foi considerada como a CBM, ou seja, a menor concentração da droga testada (nanopartículas de ácido anacárdico) com ação letal sobre a cepa testada.

2.2. Experimento em Biofilmes de SM

2.2.1 Preparo do inóculo

SM (UA 159) foi utilizado como inóculo a fim de proporcionar formação de biofilme. Para tanto, SM foram primeiramente semeados em ágar sangue por 48h a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Posteriormente 5-10 colônias de SM foram transferidas para caldo de cultura TryptoneSoyBroth (TSB) (Difco Detroit, Michigan, USA) enriquecido com 0,5% de extrato de levedura e suplementado com 1% de glicose incubados por 18h em uma atmosfera de CO_2 a 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

2.2.2 Preparo do biofilme

Saliva humana foi colhida de um doador saudável por estimulação com filme flexível (Parafilm M, Pechiney Segurança laboratório Produtos e Equipamentos, EUA). Tampão de adsorção (KCl 50 mM, KPO_4 1,0 mM, CaCl 1,0 mM, MgCl_2 0,1 mM, pH = 6,5 - 1:1) foi adicionado à saliva, bem como fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF - 1:1000), na proporção de 1% PMSF + 48,5% saliva + 48,5% tampão de adsorção. Esta solução foi clarificada por centrifugação a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4°C e filtrada com um filtro de 0,22 μm de tamanho de poro (Stericup, Millipore, EUA) (Duarte et al., 2008). Após estes procedimentos, o conteúdo filtrado foi distribuído em 12 poços de uma placa de 24 poços (2mL em cada poço) e logo em seguida a amostra (discos de hidroxiapatita) foi nesta imersa, a fim de estimular a formação da película adquirida. Este conjunto (placa + conteúdo filtrado + discos de hidroxiapatita) foi colocado por uma hora em agitador orbital dentro de estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C.

2.2.3 Imersão dos discos nos grupos experimentais e controle:

Após a uma hora de contato com a película adquirida, os discos de hidroxiapatita foram transferidos para as soluções testes e controle, nos quais permaneceram por um período de dois minutos (12 discos para cada ocasião, três discos para cada grupo):

- Grupo 1: Solução hidroetanólica;

- Grupo 2: Nanopartícula de zeína + Solução hidroetanólica;
- Grupo 3: Nanopartícula de zeína carregada com Ácido Anacárdico (9,337 µg/mL) + Solução hidroetanólica
- Grupo 4: Digluconato de clorexidina a 0,12%.

Após o período de dois minutos, os discos foram transferidos para uma nova placa de cultura de 24 poços contendo 2mL do caldo TSB suplementado com extrato de levedura contendo 1% de sacarose (previamente inoculado com a cultura bacteriana (SM) na proporção de 100µl de cultura bacteriana para 45mL de meio TSB + Extrato de Levedura) e foram mantidos em repouso durante 24 horas em estufa bacteriológica (5% CO₂, 37°C), para permitir a formação de biofilme inicial.

O meio de cultura foi trocado uma vez ao dia (a cada 24 horas), e durante cinco dias seguidos os discos foram transferidos diariamente para uma nova placa contendo caldo de cultura e sacarose sem, porém, novo contendo com o SM e nem com as soluções testes e controle.

2.2.4 Análise do biofilme (viabilidade bacteriana e peso seco)

No quinto dia experimental, o biofilme presente nas superfícies dos discos de hidroxiapatita foi coletado por raspagem. O conteúdo coletado foi transferido para tubo de microcentrífuga com 1mL de solução salina. Estas soluções contendo os biofilmes coletados foram sonicados usando três pulsos de 15 s cada, com uma potência de 7 W (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator modelo 100; EUA), a fim de promover uma melhor ruptura entre células bacterianas e polissacarídeos.

Para a análise da viabilidade bacteriana, a suspensão contendo o biofilme homogeneizado foi diluída de forma decimal até 10⁻⁷. Em seguida, uma alíquota de cada diluição foi distribuída em placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar e estas placas foram incubadas em condições ideais para o crescimento desses microrganismos (estufa de CO₂ a 5% a 37°C por 48 horas). Após este período, as colônias foram contadas com a ajuda de um contador de colônias e a relação de unidades formadoras de colônia por mg de biofilme (UFC/mg) foi estabelecida.

Para a determinação do peso seco, três volumes de etanol frio (-20°C) foram adicionados a 200µL da suspensão de biofilme. O precipitado resultante foi centrifugado (10.000 g durante 10 min a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol frio e, em seguida, foi seco em dissecador e pesado (Duarte et al., 2006).

2.2.5 Análise de Dados

Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados para logaritmo na base dez e foram calculadas as médias e desvios-padrões de cada grupo. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e foi realizado o teste ANOVA seguido de Tukey. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 5.0.

3. Resultados

Os resultados dos testes de CIM e de CBM podem ser observados na tabela 1.

TABELA 1 NESTE LUGAR

Ressalta-se que a concentração letal ao microrganismo (CBM) foi quase 500x menor para o grupo teste (Nanopartícula de zeína carregadas com ácido anacárdico) do que para o grupo controle negativo 1 (nanopartículas de zeína não carregadas).

No ensaio em biofilmes de SM, verificou-se que a solução testada no Grupo 3 (Nanopartícula de zeína carregada com Ácido Anacárdico (9,337 µg/mL) + Solução hidroetanólica) foi eficaz na inibição da formação do biofilme em discos de hidroxiapatita, pois não foram observadas unidades formadoras de colônia após 5 dias de formação de biofilme, o que também foi observado no Grupo 4 (Digluconato de clorexidina a 0,12%) (Figura 1)

Ao contrário do que ocorreu nos Grupos 3 e 4, ou seja, ausência de formação de biofilme, nos Grupos 1 e 2 houve formação de biofilme, não existindo diferença estatística entre os Grupos 1 e 2 (Figura 2)

FIGURA 1 & 2 NESTE LUGAR

4. Discussão

O estudo de compostos provenientes de resíduos agroindustriais tem grande importância na redução de poluentes e na possibilidade de se encontrar substâncias com potencial terapêutico. O LCC, considerado resíduo da casca da castanha de caju, tem se mostrado um dos materiais de base biológica com o maior potencial de renovação (Hamad e Mubofu, 2015).

No presente estudo, foi observado o efeito antiplaca da formulação à base de nanopartículas de zeína carregadas com AA, princípio ativo do LCC, em biofilme de SM.

Outros autores já haviam verificado a ação do AA frente ao SM, porém utilizando outros modelos *in vitro* (Muroi & Kubo, 1993; Green et al., 2008; Rivero-Cruz et al., 2011; Anand et al., 2015; Araújo et al., 2018). A escolha do modelo de biofilme, e não de suspensão planctônica, deveu-se ao fato de os biofilmes serem comunidades extremamente complexas e estruturadas de microrganismos aderidos a uma superfície sólida e que se aglomeram dentro de uma matriz tridimensional de polissacarídeos extracelulares composta de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Melhoram e promovem a aderência e co-aderência de microrganismos, atuam como reserva de energia, afetam a difusão de substâncias para dentro e fora do biofilme e ajudam a concentrar íons metálicos e outros nutrientes fisiológicos dentro de um microambiente (Marsh, 1994; Kolenbrander, 2000; Arpana & Yadav, 2008; Klein et al., 2015). A escolha do microrganismo SM deveu-se ao fato de este ter sido o principal agente associado ao início e desenvolvimento da lesão cáriosa, especialmente nos casos de lesões mais agressivas, apesar de nem sempre ser o mais numeroso (Koo et al., 2013; Krzyściak et al., 2014; Banas e Drake, 2018).

Himejima & Kubo (1991) testaram a atividade antimicrobiana do AA em cultura de SM em uma série de tubos contendo ambos, em protocolo de cinco dias. O crescimento do SM foi avaliado por turbidez a olho nu. Assim como em nossa pesquisa, mesmo com protocolos diferentes, estes autores também noticiaram a ação contra SM, e já neste ano sugeriram que o AA poderia ser utilizado como agente antimicrobiano. Em seguida, Muroi & Kubo (1993), expuseram SM a diferentes concentrações de AA e diferentes períodos de incubação, e, da mesma forma, relataram semelhante ação antimicrobiana.

Araújo et al. (2018) investigaram a atividade antimicrobiana de extratos do tronco e da casca do cajueiro contra bactérias com relevância no processo cariogênico em placas de 96 poços, de forma que cada um continha 100µL do extrato + 100µL de *Brain Heart Infusion* + 100µL de cada microrganismo testado (*Streptococcus mitis*, SM, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivars*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus*). Houve inibição do crescimento de todos os microrganismos testados, sendo o SM e o *Streptococcus mitis* os mais sensíveis.

Utilizando o AA advindo da casca do tronco da *Amphipterygium adstringens*, Rivero-Cruz et al. (2011) observaram atividade antimicrobiana contra SM e *P. gengivalis*, inclusive notando que, em seu estudo, a Clorexidina como droga controle teve um efeito antimicrobiano menor. Apesar de o AA já ter sua ação avaliada contra suspensões de SM (Muroi & Kubo, 1993; Green et al., 2008; Rivero-Cruz et al., 2011), nosso estudo é o primeiro a verificar a ação desse composto em biofilmes de SM.

A ação do LCC e do AA em biofilmes de outros microrganismos foi observada em alguns estudos. Anand et al. (2015) pesquisaram a atividade antimicrobiana do extrato macerado de folhas do cajueiro contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, SM, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, bem como sua possível ação na supressão do biofilme. Observaram que o extrato testado teve atividade antimicrobiana em todos os microrganismos testados. Além do mais, tanto a clorexidina (controle positivo) quanto o extrato, reduziram significativamente o desenvolvimento de biofilme. Os autores sugeriram que tais efeitos podem ser atribuídos a componentes bioativos de tal extrato. Sajeevan et al. (2018) impregnaram cateteres de silicone com diferentes concentrações de AA (0.002% a 0.25%) e observaram que houve inibição tanto da colonização do *S. aureus* como de formação de biofilme deste microrganismo na superfície dos mesmos, resultado este semelhante ao obtido em nosso estudo, no qual também observamos a inibição da formação de biofilme, porém de SM.

Grenn et al. (2008) sugerem que o efeito antimicrobiano do AA contra o SM pode não ser tão potente a ponto de possuir aplicações práticas e consideram que mais estudos devem ser feitos a fim de aumentar este efeito antimicrobiano. Nesse sentido, observamos que a incorporação da nanopartícula de zeína ao AA otimizou seus já presentes efeitos, o que claramente foi observado nos resultados das Concentrações Inibitória e Bactericida mínimas, ambas com valores de 0,36 $\mu\text{g/mL}$ - valores estes classificados como de forte atividade antimicrobiana de acordo com a classificação proposta por Aligiannis et al. (2001) (forte MIC $< 500 \mu\text{g/mL}^{-1}$; moderada MIC entre 600-1500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e fraca MIC $> 1600 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Comparando este valor com estudos que testaram o AA em diferentes concentrações como Himejima & Kubo (1991) e Muroi & Kubo (1993) que encontraram MIC de 3,13 $\mu\text{g/mL}$ e entre 1,56 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; ou com Green et al. (2008) que encontraram um MIC de 0,78 $\mu\text{g/mL}$, mesmo assim, o encontrado em nosso estudo é pelo menos duas vezes menor, corroborando a sugestão de que houve otimização do AA quando incorporado à nanopartícula de zeína. Já Anand et al. (2015) encontraram em seu estudo MIC de 78,12 $\mu\text{g/mL}$ e MBC de 156,25 $\mu\text{g/mL}$, concentrações bem superiores às observadas em nosso estudo.

O uso da nanotecnologia na Odontologia tem tido cada vez mais atenção nos últimos anos, já que possuem um vasto leque de aplicações, incluindo as farmacêuticas. Sua utilização em nosso trabalho teve o claro objetivo de observar se potencializaria ou não a ação do AA como agente contra a formação do biofilme dental. A incorporação de nanomateriais pode modificar as propriedades ópticas, químicas, elétricas e mecânicas de substâncias (Bapat

et al., 2018). O pequeno diâmetro das nanopartículas aumenta não somente suas propriedades mecânicas, mas também sua ação antimicrobiana devido à sua alta relação superfície-volume, provocando dano às membranas celulares. Sua grande vantagem sobre os antimicrobianos convencionais é não ser afetada pelos mecanismos que fazem com que os organismos fiquem a eles resistentes, pois formam um contato direto com a parede celular bacteriana, em vez de penetrá-la, sendo também sistemas ideais de entrega de drogas (Bapat et al., 2018; Debrates et al., 2018).

5. Conclusão

Os resultados evidenciam o potencial efeito antiplaca do AA na formulação testada. Mais estudos devem ser realizados a fim de analisar o efeito microbiológico dessa formulação em outras substratos e em modelos de biofilme multiespécie.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- Ahmadian, E., Shahi, S., Yazdani, J., Dizaj, S.M., Sharifi, S. (2018). Local treatment of the dental caries using nanomaterials. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 443-447.
- Al-Hazzani, A., Periyasamy, V., Subash-Babu, P., Alshatwi, A. (2012). Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Medical Chemistry Research*, 21, 1384–1388.
- Aliagiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 4168-4170.
- Anand, G., Ravinanthan, M., Basaviah, R., Shetty, A. V. (2015). *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(1), 69-74.
- Araújo, C.R.F., Pereira, M.S.V., Higino, J.S., Pereira, J.V., Martins, A.B.(2005) *In vitro* antifungal activity of *Anacardium occidentale* linn. bark upon leaves of the *Candida* gender. *Arquivos em Odontologia*, 41(3),193-272
- Araújo, J. S. C., Castilho, A. R. F., Lira, A. B., Pereira, A. V., Azevedo, T. K. B., Costa, E. M. M. B., Pereira, M. S. V., Pessoa, H. F. L., Pereira, J. V. (2018). Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts. *Archives of Oral Biology*, 85, 113-119.
- Arpana, M. S., Yadav, S. (2008). Biofilms: Microbes and Disease. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(6), 526-530.
- Banas, J.A., Drake, D.R. (2018). Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? *BMC Oral Health*, 18:129
- Bapat, R.A., Joshi, C.P., Bapat, P., Chaubal, T.V., Pandurangappa, R., Jnanendrappa, N., Gorain, B., Khurana, S., Kesharwani, P. (2018). The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discovery Today*, 00, 1-14.
- Carvalho, A. L. N., Annoni, R., Silva, P. R. P., Borelli, P., Fock, R. A., Trevisan, M. T. S., Mauad, T. (2011). Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 730-736.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2013.
- Cury, J. A., Noronha, M. S., Romão, D. A., Tabchoury, C. P. (2016). M. Effect of fluoride concentration on reduction of enamel demineralization according to the cariogenic challenge. *Brazilian Dental Journal*, 27(4), 393-398.

- Defrates, K., Markiewicz, T., Gallo, P., Rack, A., Weyhmler, A., Jarmusik, B., Hu, X. (2018). Protein polymer-based nanoparticles: fabrication and medical applications. *International Journal of Molecular Science*, 19, 1717.
- Duarte, S., Klein, M. I., Aires, C. P., Cury, J. A., Bowen, W. H., Koo, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 23, p. 206–212, 2008.
- Gomes, C. E. B., Cavalcante, D. G., Girão Filho, J. E., Costa, F. N., Pereira, S. L. S. (2016). Clinical effect of a mouthwash containing *Anacardium occidentale* Linn. On plaque and gingivitis control: A randomized controlled trial. *Indian Journal of Dental Research*, 27, 364-369.
- Green, I. R., Tocoli, F. E., Lee, S. H., Nihei, K. I., Kubo, I. (2007). Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 6236–6241.
- Green, I. R., Tocoli, F. E., Lee, S. H., Nihei, K. I., Kubo, I. (2008). Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 1315-1320.
- Hamad, F.B., Mubofu, E. B. (2015). Potential biological applications of bio-based Anacardic Acids and their derivatives. *International Journal of Molecular Science*, 16, 8569-8590.
- Hamblin, M. R., Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3, 436–450.
- Harlita, N. H., Satuti, N. H. N., Sagi, M., Astuti, P. (2016). Acute toxicity of cashew nut shell extract (*Anacardium occidentale* L.) in albino rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 19, 89-94.
- Himejima, M., Kubo, I. (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 418-421.
- Kavoosi, F., Modaresi, F., Sanaei, M., Rezaei, Z. (2018). Medical and dental applications of nanomedicines. *Journal of pathology, microbiology and immunology*, 126, 795-803.
- Klein, M.I., Hwang, G., Santos, P. H. S., Campanella, O. H., Koo, H. (2015). *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Cellular and infection microbiology*, 5(10).
- Kolenbrander, P.E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual Review of Microbiology*, 54, 413-437.
- Koo, H., Falsetta, M. L., Klein, M. I. (2013). The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *Journal of Dental Research*, 92(12), 1065-1073.
- Krzysciak, W., Jurezak, A., Koscielniak, D., Bystrowska, B., Skalniak, A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 499-515.

- Kubo, I., Masamitsu, O., Vieira, P.C., Sakae, K. (1993) Antitumor agentes from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 41(6), 1012-1015.
- Kubo, I., Masuoka, N., Ha, T.J., Tsujimoto, K. (2006) Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry*, 99, 555-562.
- Marcenes, W., Kassebaum, N.J., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., Murray, C.J.L. (2013). Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. *Journal of Dental Research*, 92(7):592-597.
- Marsh, P.D. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), 263-271.
- Muroi, H., Kubo, I. (1993). Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 1780-1783.
- Perazzo, F. F., Silva, R. S., Carvalho, J. C. T., Groppo, F. C. (2004). Utilización de sustancias naturales en Odontología. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, 2(1-4), 9-15.
- Rivero-Cruz, B. E., Esturau, N., Sanchez-Nieto, S., Romero, I., Castillo-Juarez, I., Rivero-Cruz, J. F. (2011). Isolation of the new anacardic acid 6-[16'Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Natural Product Research*, 25(13), 1282-1287.
- Sajeevan, S.E., Chatterjee, M., Paul, V., Baranwal, G., Kumar, V.A., Bose, C., Banerji, A., Nair, B.G., Prasanth, B.P., Biswas, R. (2018). Impregnation of catheters with Anacardic Acid from Cashew Nut Shell prevents *Staphylococcus aureus* biofilm development. *Journal of applied Microbiology*, 125(5), 1286-1295.
- Souza, M.Q., Teotonio, I.M.S.N., Almeida, F.C., Heyn, G.S., Alves, P.S., Romeiro, L.A.S., Pratesi, R., Nobrega, Y.K.M., Pratesi, C.B. (2018). Molecular evaluation of anti-inflammatory activity of phenolic lipid extracted from cashew nut shell liquid (CNSL). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(181).
- Trevisan, M. T. S., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R. W. (2006). Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 188-197.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Tabela 1. Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas para o Grupo Teste (Caldo de cultura + Inóculo + [Extrato hexânico da castanha de caju (0.0093% p/v) + Nanopartícula zeína (0.0714% p/v) + Solução hidroetanólica 35%]) e para o Grupo Controle Negativo 1 (Caldo de cultura + inóculo+ [Agente diluente Nanopartícula zeína (0.0714% p/v) + Solução hidroetanólica 35%]).

	CIM	CBM
Grupo Teste	0,36 µg/mL	0,36 µg/mL
Grupo Controle Negativo 1	89,25 µg/mL	178,5 µg/mL

Valores expressos em µg/mL.

Figura 1: Biofilmes de SM formados em discos de hidroxiapatita em modelo de formação de 5 dias. A) Grupo 1; B) Grupo 2; C) Grupo 3; D) Grupo 4. Podemos observar a ausência de biofilme nos grupos 3 e 4.

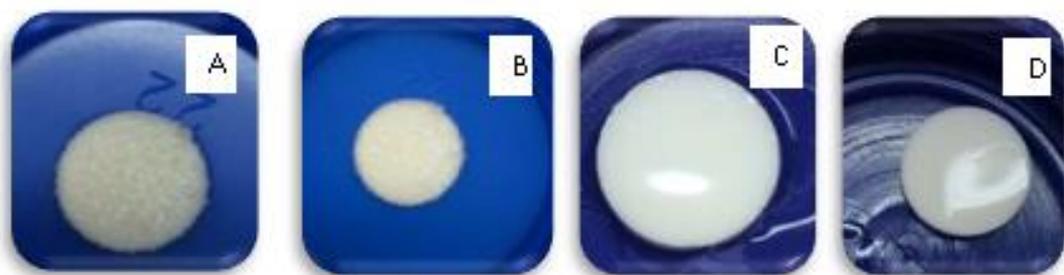
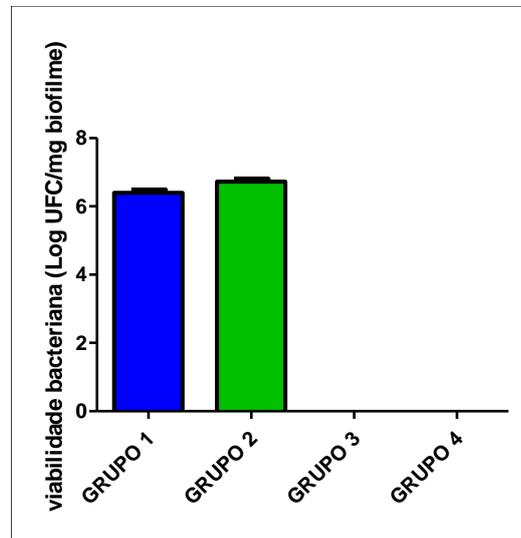


Figura 2. Análise da viabilidade bacteriana após 5 dias de formação de biofilme (Log UFC/mg de biofilme). Os grupos 3 e 4 apresentaram níveis indetectáveis de UFC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2.



4 – CAPÍTULO 2

Título do Artigo:

Toxicidade local e sistêmica *in vivo* de nanopartículas de zeína carregadas de ácido anacárdico

Periódico de publicação:

Journal of Oral Patology and Medicine

Toxicidade local e sistêmica *in vivo* de nanopartículas de zeína carregadas de ácido anacárdico

Running title: Toxicidade local e sistêmica do ácido anacárdico

Keywords: *Anacardium occidentale*, Animal model , Plant extracts

Smyrna Luiza Ximenes de Souza ^{1*}, Laís Aragão Lima², Milena Oliveira Freitas², Paulo Goberlânio de Barros Silva¹, Francisco Fábio Oliveira Sousa³, Ramille Araújo Lima¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil

²Curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil

³Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

*Corresponding author: Smyrna Luiza Ximenes de Souza, Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Rua João Adolfo Gurgel, 133, Cocó, Fortaleza, CE, Brasil. Phone: +5583981405839
E-mail: smynasouza@hotmail.com

RESUMO

Background: Ácido anacárdico, produto extraído do líquido da castanha de caju, é promissor agente antimicrobiano, porém ainda sem avaliação segura de sua toxicidade. O objetivo deste estudo foi avaliar toxicidade local e sistêmica de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico *in vivo*. **Metodologia:** Administração oral (gavagem) e tópica (pincelamento usando cotonetes estéreis individuais em dorso e ventre de língua, mucosa jugal, palato duro e gengiva) em modelo animal (camundongos c57bl/6j fêmeas) divididos em quatro grupos: Grupo Salina – solução salina estéril a 0,9%; Grupo Clorexidina – clorexidina 0,12%; Grupo AA1 – nanopartícula de zeína carregada com ácido anacárdico e Grupo AA2 – nanopartícula zeína, por um período de 30 dias. Foram calculadas médias e desvios-padrões. Dados submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov; realizado teste ANOVA seguido de Tukey. **Resultados:** Grupos AA1 (-4,25±1,49) e AA2 (-4,00±1,30) mostraram maior perda de peso; sem diferença significativa na massa dos rins, pulmões, fígado e baço. Os Grupos AA1 (0,16±0,01) e AA2 (0,16±0,02) apresentaram menor massa cardíaca que os animais dos Grupos Salina (0,21±0,01) e Clorexidina (0,22±0,02) (p=0,045). Espessura média do epitélio de ventre lingual no Grupo Salina (3250±439 µm) foi significativamente inferior ao Grupo AA2 (8650±1079 µm) (p=0,001); Grupos AA1 e AA2 apresentaram espessura média do epitélio de mucosa jugal significativamente inferior em relação ao Grupo Clorexidina (p<0,001) e espessura dos epitélios de gengiva do Grupo Salina (134±13 µm) foi significativamente inferior aos demais grupos (p=0,001). Não houve sinais significativos de infiltrado inflamatório. **Conclusões:** A administração sistêmica do AA reduziu a massa cardíaca, sem exibir sinais de toxicidade local e sistêmica.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; Toxicidade; Nanopartícula

1. Introdução

As plantas medicinais são uma importante alternativa terapêutica, sobretudo em países em desenvolvimento, nos quais, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80 a 85% de sua população, devido à pobreza e à carência de acesso a centros médicos, delas necessitam para sua saúde.^{1, 2} Além do mais, são de baixo custo, disponíveis e notadamente possuem propriedades terapêuticas.³

A castanha de caju (*Anacardium occidentale*) é uma árvore tropical cultivada em várias regiões do mundo.⁴ O caju, seu pseudofruto, e a castanha, seu fruto verdadeiro, além de consumidos *in natura*, podem ser convertidos em muitos produtos nutricionais. Porém, a casca da castanha, considerada como resíduo, contém 30% do líquido da castanha de caju (LCC), que possui em sua composição 80% de ácido anacárdico (AA), 15% de cardol e uma pequena quantidade de cardanol.⁵ O AA tem uma gama de propriedades biológicas e não biológicas, que vão desde a redução da viabilidade bacteriana de *Streptococcus mutans* (SM), ação anti-inflamatório, antitumoral, analgésico, até o uso para conservação de alimentos, cimento.⁶⁻⁹ Some-se a tudo isto, ser um potencial candidato a ser agente para desenvolvimento de nanomateriais.¹⁰

Nanopartículas são materiais muitíssimo pequenos, menores que 1nm, apresentados pelo professor Noro em 1973 na Universidade de Tóquio. Seu uso terapêutico pode envolver o diagnóstico, prevenção e tratamento de várias doenças, inclusive na Odontologia.¹¹ A incorporação de nanomateriais pode modificar propriedades ópticas, químicas, elétricas e mecânicas de substâncias,¹² bem como potencializar a ação antimicrobiana, na medida em que sua alta relação superfície-volume provoca dano às membranas celulares, sem, contudo, fazer com que os organismos fiquem resistentes, o que é uma consequência de grave problema de saúde pública, do uso indiscriminado de antibióticos.^{13, 14}

A zeína é uma proteína de baixo peso molecular encontrada no citoplasma celular do milho. Por ser insolúvel em água, a nanopartícula de zeína é promissora como veículo de carreamento de drogas, na medida em que pode proteger seu conteúdo por ter alta estabilidade em uma variedade de ambientes, como por exemplo, o meio bucal, e também como base na engenharia tecidual e na formação de plataformas biodegradáveis para biosensores. Além de

ter baixo custo, a nanopartícula de zeína pode ser processada e modificada para que consiga as especificidades de tamanho, morfologia e peso desejadas.¹⁴

Mesmo com o grande uso das plantas medicinais, estudos que avaliem sua toxicidade são escassos, apesar de grande importância, já que a toxicidade é um limite a este largo uso. Devem ser avaliados órgãos específicos em sua sensibilidade, verificando, assim, o dano que pode por ela ter sido causado, quer macroscópica ou microscopicamente.³ Isto ocorre com o AA, que vem sendo utilizado para as mais diversas finalidades terapêuticas, porém sem estudos que avaliem a toxicidade *in vivo* de nanopartículas que sejam dele carregadas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o grau de toxicidade subcrônica local e sistêmica de nanopartículas de zeína carregadas com AA, após a administração via oral e via tópica *in vivo* (modelo animal).

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e grupos experimentais

O projeto foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitários Christus com protocolo 020/2018.

Foram utilizados cinco camundongos c57bl/6j fêmeas por grupo, sendo, no total, 20 animais pesando entre 25 e 30 gramas procedentes do Biotério do Centro Universitários Christus. Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas apropriadas de polipropileno medindo 49x34x16cm, em número de seis animais por gaiola, e numerados individualmente através de marcação no rabo refeitas quando necessário. Receberam ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, foram mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas em ambiente climatizado em 23°C e permaneceram nestas condições durante todo o experimento. O peso dos animais foi avaliado no primeiro e no último dia do experimento.

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: Grupo Salina: animais tratados com solução salina estéril 0,9%; Grupo Clorexidina (CLX): animais tratados com clorexidina 0,12%; Grupo AA1: animais tratados com o nanopartícula de zeína carregada com Ácido Anacárdico na concentração de 9,337 ug/mL; Grupo AA2: animais tratados apenas com a nanopartícula zeína.

2.2. Teste de toxicidade local e sistêmica subcrônica *in vivo*

Com finalidade de avaliar a toxicidade local aos epitélios de boca, os animais foram imobilizados manualmente por pega no dorso, tiveram suas cavidades bucais abertas com abridor confeccionado e, assim, os fármacos foram pincelados usando cotonetes estéreis individuais sobre dorso e ventre de língua, mucosa jugal, palato duro e gengiva. Em

seguida foi realizada administração de 0,3 mL dos fármacos de estudo por gavagem, a fim de avaliar a toxicidade sistêmica.

Esses procedimentos foram repetidos a cada 24h por 30 dias, estabelecendo assim, o protocolo de toxicidade subcrônica. Os animais foram monitorados diariamente para avaliação de sinais de toxicidade e mortalidade, e pesados no primeiro e no último dia de experimento.

Ao fim de 30 dias os animais foram eutanasiados com xilazina (50 mg/kg) e quentamina (150 mg/kg) com conseqüente deslocamento cervical. Para análise histopatológica, os epitélios de boca para toxicidade local (dorso e ventre de língua, mucosa jugal, palato duro e gengiva), e coração, pulmões, fígado, estômago, baço e rins para toxicidade sistêmica foram coletados e armazenados em formol tamponado a 10% para processamento e confecção de lâminas histológicas, com coloração com hematoxilina/eosina a fim de analisar sinais de inflamação ou toxicidade nos órgãos.

Clinicamente foi mensurada a razão órgão/peso animal. Foi realizada análise macroscópica dos órgãos supracitados e a análise histopatológica foi realizada por dois patologistas experientes para avaliação de sinais de toxicidade (micro-estrutura, mudanças degenerativas, necrose e sinais de inflamação).¹⁶ Também foram fotografados cinco campos no aumento de 200 vezes para análise da espessura do epitélio.

2.3. Análise Histológica dos epitélios

A região subepitelial foi avaliada quanto à presença e intensidade do infiltrado inflamatório. Este foi classificado de acordo com a intensidade em ausente, leve (até 25 células por microcampo), moderado (entre 26 e 125 células por microcampo) e intenso (mais de 125 células por microcampo) como sugerido por Gomes-Filho et al., 2009¹⁷. Nenhum animal mostrou escore moderado ou intenso, assim, o infiltrado inflamatório foi mostrado como presente ou ausente.

2.4. Análise de Dados

Os resultados do ensaio de toxicidade tiveram calculadas suas médias e desvios-padrões. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados de espessura do epitélio foi realizado o teste ANOVA seguido de Tukey. A presença de infiltrado inflamatório subepitelial foi expresso em forma de frequência absoluta/relativa e analisada pelo teste qui-quadrado de Pearson. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 5.0.

3. Resultados

3.1. Toxicidade Sistêmica

Após 30 dias de tratamento com os fármacos, os grupos AA1 ($-4,25 \pm 1,49$) e AA2 ($-4,00 \pm 1,30$) mostraram maior perda de peso que os animais tratados com solução salina ($+0,60 \pm 0,50$) ($p=0,011$), que tiveram ganho de peso. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos e o grupo CLX ($1,58 \pm 0,71$) (Figura 1A) (Tabela 1).

Não houve diferença significativa na massa dos rins ($p=0,645$), pulmões ($p=0,579$), fígado ($p=0,261$) e baço ($p=0,249$), como mostra a figura 1 B,C,D,E, respectivamente (Tabela 1). Os grupos AA1 ($0,16 \pm 0,01$) e AA2 ($0,16 \pm 0,02$) apresentaram menor massa cardíaca que os animais dos grupos salina ($0,21 \pm 0,01$) e CLX ($0,22 \pm 0,02$) ($p=0,045$) (Figura 1F) (Tabela 1).

Além disso, a massa média dos estômagos do grupo AA1 ($0,27 \pm 0,01$) foi significativamente superior aos dos grupos salina ($0,16 \pm 0,02$) e CLX ($0,18 \pm 0,01$) ($p < 0,001$). O grupo AA2 ($0,22 \pm 0,01$) não mostrou diferença significativa na massa média do estômago com os demais grupos (Figura 1G) (Tabela 1).

O epitélio de revestimento da mucosa gástrica mostrou-se significativamente aumentado no grupo CLX ($11983 \pm 185 \mu\text{m}$) em comparação com o grupo salina ($7079 \pm 756 \mu\text{m}$). Não houve diferença significativa entre os grupos AA1 ($9336 \pm 1381 \mu\text{m}$), AA2 ($6355 \pm 1148 \mu\text{m}$) e o grupo salina (Figura 1H) (Tabela 1).

3.2. Toxicidade Local

A espessura média do epitélio de ventre lingual no grupo tratado com solução salina foi $3250 \pm 439 \mu\text{m}$, valores que não mostraram diferença significativa com o grupo CLX ($4874 \pm 34 \mu\text{m}$), AA1 ($5031 \pm 522 \mu\text{m}$), porém foi significativamente inferior ao grupo AA2 ($8650 \pm 1079 \mu\text{m}$) ($p=0,001$) (Figura 3A) (Tabela 1).

Com relação aos epitélios de dorso da língua, o grupo tratado com solução salina ($2805 \pm 2735 \mu\text{m}$) mostrou espessura média significativamente inferior aos grupos tratados com CLX ($15812 \pm 1362 \mu\text{m}$), AA1 ($13384 \pm 860 \mu\text{m}$) e AA2 ($13364 \pm 2042 \mu\text{m}$) ($p=0,001$) (Figura 3B) (Tabela 1).

A espessura média dos epitélios de mucosa jugal no grupo tratado com solução salina ($49 \pm 4 \mu\text{m}$) foi significativamente inferior ao grupo tratado com clorexidina ($16864 \pm 2202 \mu\text{m}$) e em relação aos grupos AA1 ($5629 \pm 499 \mu\text{m}$) e AA2 ($6276 \pm 432 \mu\text{m}$). Os grupos AA1 e AA2 apresentaram espessura média do epitélio de mucosa jugal

significativamente inferior em relação ao grupo tratado com CLX ($p < 0,001$) (Figura 3C) (Tabela 1).

A espessura dos epitélios de gengiva do grupo salina ($134 \pm 13 \mu\text{m}$) foi significativamente inferior aos grupos tratados com CLX ($15192 \pm 4868 \mu\text{m}$), AA1 ($14171 \pm 1852 \mu\text{m}$) e AA2 ($7316 \pm 2507 \mu\text{m}$) ($p = 0,001$) (Figura 3D) (Tabela 1).

No palato duro, o grupo tratado com salina ($3513 \pm 375 \mu\text{m}$) apresentou espessura média significativamente inferior aos grupos CLX ($9604 \pm 531 \mu\text{m}$), AA1 ($9774 \pm 1904 \mu\text{m}$) e AA2 ($9773 \pm 1509 \mu\text{m}$) ($p = 0,006$) (Figura 3E) (Tabela 1).

A administração tópica de AA não exibiu sinais de toxicidade histológica significativa (Figura 4).

3.3. Infiltrado inflamatório

Não houve diferença significativa entre o número de animais exibindo infiltrado inflamatório nos quatro grupos experimentais. No ventre lingual e na mucosa jugal apenas um animal no grupo AA2 exibiu discreto infiltrado inflamatório disposto subepitelialmente ($p = 0,295$). Na gengiva, apenas um animal do grupo AA1 exibiu pequeno foco inflamatório sob o epitélio de revestimento ($p = 0,175$), nenhum animal exibiu inflamação sob o epitélio de dorso de língua ($p = 1,000$); um animal do grupo salina e um animal do grupo AA1 exibiram ocasionais células inflamatórias no mesmo sítio de avaliação no palato duro ($p = 0,609$). (Tabela 2)

4. Discussão

Tendo em vista o variado leque de possibilidades de uso de derivados do cajueiro, buscamos encontrar mais respostas no tocante à toxicidade local do AA nos tecidos bucais e à toxicidade sistêmica, visto que especialmente o peso da massa corporal e dos órgãos vitais pode trazer indicações sobre a saúde geral do usuário quando do uso da referida substância. O peso dos órgãos é um importante meio de observação do status fisiológico e patológico, de certa forma podendo mostrar se o órgão foi exposto à injúria ou não. Coração, fígado, rins, baço e pulmões são os primeiros órgãos a ser afetados por reações metabólicas causadas por substâncias tóxicas.⁵ Além do mais, estudar compostos contidos em resíduos agroindustriais, como os da casca da castanha do cajueiro, tem grande importância na redução de poluentes e na possibilidade de se encontrar substâncias com potencial terapêutico.¹⁸

Após os 30 dias de administração dos fármacos na nossa pesquisa, os grupos AA1 e AA2 mostraram maior perda de peso que os animais tratados com solução salina. Téodong

et al (2007)¹⁹ fizeram protocolo de administração do extrato das folhas do cajueiro por 8 semanas (56 dias), e o fizeram com diferentes quantidades administradas (6, 10 e 14 g/kg dos animais). Os animais dos grupos com administração de 10 e 14 g/kg tiveram significativa perda de peso se comparados com os do grupo controle a partir do 35º dia de administração.

Carvalho et al (2011)⁷ realizaram estudo de toxicidade *in vivo* em ratos machos e fêmeas com dois protocolos. O primeiro foi de toxicidade aguda com uma única dose de AA isolado do LCC aplicada via oral e observação dos animais por 14 dias – houve decréscimo na média de peso corporal nos machos tratados com o fármaco se comparado ao peso corporal de machos dos outros grupos. O segundo protocolo foi de toxicidade subaguda oral com administração do fármaco por trinta dias – neste protocolo todos os animais ganharam peso, tanto nos grupos teste quanto no grupo controle, sem diferença estatística entre eles, ao contrário do nosso estudo. Ao contrário de nossos achados, Harlita et al (2016)⁵ observaram aumento de peso em todos os animais num protocolo de administração de dose única do extrato da casca da castanha do caju com posterior acompanhamento de 14 dias, sem diferença estatística entre os grupos de seu estudo. Já Konan et al (2007)²⁰ observaram que todos os animais em sua pesquisa com protocolo de 30 dias de administração do extrato das folhas do cajueiro tiveram ganho de peso total tanto nos grupos teste quando no grupo controle, que teve aumento de peso ainda maior.

No nosso estudo não houve diferença significativa na massa dos rins, pulmões, fígado e baço, assim como no estudo de Harlita et al (2016)⁵, no qual, além de observar que não houve mudança significativa no peso destes órgãos vitais, observou que macroscopicamente os mesmos não apresentaram anormalidade patológica. Da mesma forma Konan et al (2007)²⁰, em análise histológica, não encontrou alterações morfológicas renais ou hepáticas.

Já Téodong et al (2007)¹⁹, contrariamente aos nossos achados, observaram que houve aumento no peso da massa do fígado com degeneração centrolobular dos hepatócitos que seguiu para necrose celular e aumento também no peso da massa dos rins com pequena degeneração do epitélio tubular e congestão glomerular.

Okonkwo et al (2010)²¹ sugeriram toxicidade hepática em sua pesquisa realizada com ratos Wistar, quando ingeriram doses entre 1,44 e 2,87 g/kg de extrato de AA por um período de duas semanas, concluindo, desta forma que houve moderada degeneração de hepatócitos, ao contrário do nosso estudo, no qual não foi evidenciado qualquer sinal de toxicidade ou inflamação no fígado e demais órgãos na análise histopatológica.

O estudo de Carvalho et al (2011)⁷, neste aspecto, também se mostrou adverso ao nosso, na medida em que encontrou decréscimo na massa dos pulmões no grupo tratado com AA em relação ao grupo controle nos ratos machos, e o inverso nas ratas fêmeas, ou seja, nestas houve aumento da massa dos pulmões no grupo tratado com AA. Nos demais órgãos, quais sejam, baço, fígado e rins, não houve diferença estatisticamente significativa em suas massas, corroborando o nosso estudo, em seu protocolo de toxicidade aguda. Já no seu protocolo de toxicidade subaguda, seus achados foram de aumento na massa do baço em ratos machos e nas fêmeas.

Nos nossos achados, a massa média dos estômagos do grupo AA1 foi significativamente superior aos estômagos dos grupos salina e CLX. Já Harlita et. al. (2016)⁵ observaram que a massa média dos estômagos não teve aumento e nem diminuição, e ainda sugeriram que a medição do peso de cada órgão é de fundamental importância para saber se foi exposto a injúria ou não.

A diminuição da massa cardíaca encontrada em nossa pesquisa nos grupos AA1 e AA2 em comparação com os animais dos grupos salina e CLX corroborou achados de algumas pesquisas com este fármaco. Já em 2005, Davidson et al²² concluíram que o AA preveniu completamente a estimulação da p300, proteína essencial para a formação do coração, pela fenilefrina, retornando-a a seus níveis normais em seu experimento com ratos, tendo como consequência a prevenção da indução de hipertrofia em cardiomiócitos.

Assim como Davidson et al (2005)²², Peng et al (2014)²³ pesquisaram a atividade do AA sobre a proteína p300. Examinaram o impacto da exposição ao álcool durante o desenvolvimento cardíaco, na medida em que utilizaram em seu experimento ratas grávidas com 9 a 11 semanas de vida que receberam etanol a 56% por gavagem e também o AA via intraperitoneal, já que é sabido que o álcool é um fator teratogênico comum durante a gestação e que pode causar malformações durante o desenvolvimento embriológico. Concluíram que o AA reduziu significativamente a atividade da p300. Considerando a hipertrofia cardíaca como o estágio inicial da insuficiência cardíaca, Li et al. (2019)²⁴ tendo por certa a ação do AA na reversão da hipertrofia cardíaca em ratas, observaram que o AA, além de inibir a expressão da p300, melhorou a função cardíaca em modelo animal.

Continuando seus estudos, Peng et al, no ano seguinte (2015)²⁵, investigaram a hipertrofia cardíaca causada também pela ingestão de álcool bem como o efeito protetivo que o AA poderia ter contra a hipertrofia cardíaca induzida pelo álcool em ratas grávidas. Observaram que a exposição ao álcool durante a gravidez levou à hipertrofia cardíaca fetal e que o AA regulou a expressão de genes cardíacos, revertendo a hipertrofia causada pelo

álcool. Em 2017, Peng et al²⁶, pesquisaram novamente a hipertrofia cardíaca e a ação do AA, mas desta vez uma hipertrofia induzida por fenilefrina. Administraram os fármacos em ratos C57BL/6 que foram eutanasiados após o experimento de 30 dias e tiveram seu coração coletado para exames. Assim como nos nossos achados de diminuição de massa cardíaca, concluíram que o AA diminuiu a massa cardíaca, desta vez na hipertrofia cardíaca induzida pela fenilefrina.

Porém Konan et al (2007)²⁰ perceberam que, ratos machos, que receberam dose do extrato do fármaco de 1000mg/kg diariamente por 30 dias, tiveram um significativo aumento da massa cardíaca, contrariando nossos achados. Ressalta-se que em nosso estudo os animais receberam a formulação na concentração de 9,33 µg/kg.

Com relação ao estudo de toxicidade local, não foram encontrados em nossa busca outros estudos que testassem o AA em epitélio da cavidade oral. Ressalta-se que não foram observadas grandes alterações nas análises histomorfométrica e de infiltrado inflamatório.

5. Conclusões

A administração tópica de nanopartículas de zeína carregadas com AA não exibiu sinais de toxicidade histológica significativa.

A administração sistêmica nanopartículas de zeína carregadas com AA reduziu, no modelo animal proposto, a massa cardíaca, mas não exibiu sinais de toxicidade macroscópica e histológica.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida sem relações comerciais ou financeiras que poderia ser tidas como conflito de interesses.

Referências

1. Nunes DA, Araújo-Filho R, Lima RSN, Correia ACC. A utilização de agentes fitoterápicos em Odontologia. *Revista da FO UFBA*. 1999;18:11-14.
2. Araújo JSC, Castilho ARF, Lira AB, et al. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts. *Arch Oral Biol*. 2018;85:113-119.
3. Perazzo FF, Silva RS, Carvalho JCT, Groppo FC. Utilización de sustancias naturales en Odontologia. *Braz J Phytomedicine*. 2004;2(1-4):9-15.
4. Gomes CEB, Cavalcante DG, Girão Filho JE, Costa FN, Pereira SLS. Clinical effect of a mouthwash containing *Anacardium occidentale* Linn. On plaque and gingivitis control: A randomized controlled trial. *Indian J Dental Rest*. 2016;27:364-369.
5. Harlita NH, Satuti NHN, Sagi M, Astuti P. Acute toxicity of cashew nut shell extract (*Anacardium occidentale* L.) in albino rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769). *Pak J Biol Sci*. 2016;19:89-94.
6. Muroi H, Kubo I. Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. *J Agric Food Chem*. 1993;41:1780-1783.
7. Carvalho ALN, Annoni R, Silva PRP, Borelli P, Fock RA, Trevisan MTS, Mauad T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *J Ethnopharmacol*. 2011;135:730-736.
8. Rivero-Cruz BE, Esturau N, Sanchez-Nieto S, Romero I, Castillo-Juarez I, Rivero-Cruz JF. Isolation of the new anacardic acid 6-[16'Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Nat Prod Res*. 2011;25(13):1282-1287.
9. Al-Hazzani A, Periyasamy V, Subash-Babu P, Alshatwi A. Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Med Chem Res*. 2012;21:1384-1388.
10. Hamad FB, Mubofu EB. Potential biological applications of bio-based Anacardic Acids and their derivatives. *Int J Mol Sci*. 2015;16: 8569-8590.
11. Kavooosi F, Modaresi F, Sanaei M, Rezaei Z. Medical and dental applications of nanomedicines. *J pathol microbiol immunol*. 2018;126:795-803.
12. Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, et al. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov Today*. 2018;00:1-14.
13. Gomes CEB, Cavalcante DG, Girão Filho JE, Costa FN, Pereira SLS. Clinical effect of a mouthwash containing *Anacardium occidentale* Linn. On plaque and gingivitis control: A randomized controlled trial. *Indian J Dental Rest*. 2016;27:364-369.

14. Debrates K, Markiewicz T, Gallo P, et al. Protein polymer-based nanoparticles: fabrication and medical applications. *Inl J Mol Sci*. 2018;19:1717.
15. Anand G, Ravinanthan M, Basaviah R, Shetty AV. *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacarium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *J Pharm Bioall Sci*. 2015;7(1):69-74.
16. Oliveira MC, Lemos LMS, Oliveira RG, Dall'oglio EL, Sousa-Junior PT, Martins DTO. Evaluation of toxicity of *Calophyllum brasiliense* stem bark extract by in vivo and in vitro assays. *J Ethnopharmacol*. 2014;155:30–38.
17. Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S, et al. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cements (CER) and Angelus MTA. *JOE*. 2009;35(10):1377-1380.
18. Rochelle SLA. *Evaluation of the antimicrobial activity of agroindustrial residues on oral and systemic pathogens*. 2016;Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia – Unicamp. Campinas.
19. Téodong L, Dzeufiet PDD, Dimo TP, et al. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* linn (anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. *Afr J Trad Cam*. 2007;4(2):140-147.
20. Konan NA, Bacchi EM, Lincopan N, Varela SD, Varanda EA. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J Ethnopharmacol*. 2007;110:30-38.
21. Okonkwo TJN, Okorie O, Okonta JM, Okonkwo CJ. Sub-chronic hepatotoxicity of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) inner stem bark extract in rats. *Indian J Pharm Sci*. 2010;72(3):353-357.
22. Davidson SM, Townsend PA, Carrol C, et al. The transcriptional coactivator p300 plays a critical role in the hypertrophic and protective pathways induced by phenylephrine in cardiac cells but is specific to the hypertrophic effect of urocortin. *ChemBioChem*. 2005; 6:162-170.
23. Peng C, Zhu J, Sun HC, et al. Inhibition of histone H3K9 acetylation by Anacardic Acid can correct the over-expression of Gata4 in the hearts of fetal mice exposed to alcohol during pregnancy. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104135.
24. Li S, Peng B, Luo X, Sun H, Peng C. Anacardic acid attenuates pressure-overload cardiac hypertrophy through inhibiting histone acetylases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2019;1-9.
25. Peng C, Zhang W, Zhao W, Zhu J, Huang X, Tian J. Alcohol-induced histone H3K9 hyperacetylation and cardiac hypertrophy are reversed by a histone acetylases inhibitor anacardic acid in developing murine hearts. *Biochimie*. 2015;113:1-9.
26. Peng C, Luo X, Li S, Sun H. Phenylephrine-induced cardiac hypertrophy is attenuated by a histone acetylase inhibitor anacardic acid in mice. *Mol. BioSys*. 2017;13:714.

Legenda das Figuras

Fig 1: Avaliação Histomorfométrica de camundongos c57bl/6J submetidos a administração por gavagem - $p < 0,05$ versus Salina (ANOVA/Bonferroni; média \pm erro-padrão da média): A - Massa corpórea. B - Massa do rim. C - Massa do pulmão. D - Massa do fígado. E - Massa do baço. F - Massa do coração. G - Massa do estômago. H - Espessura da mucosa gástrica.

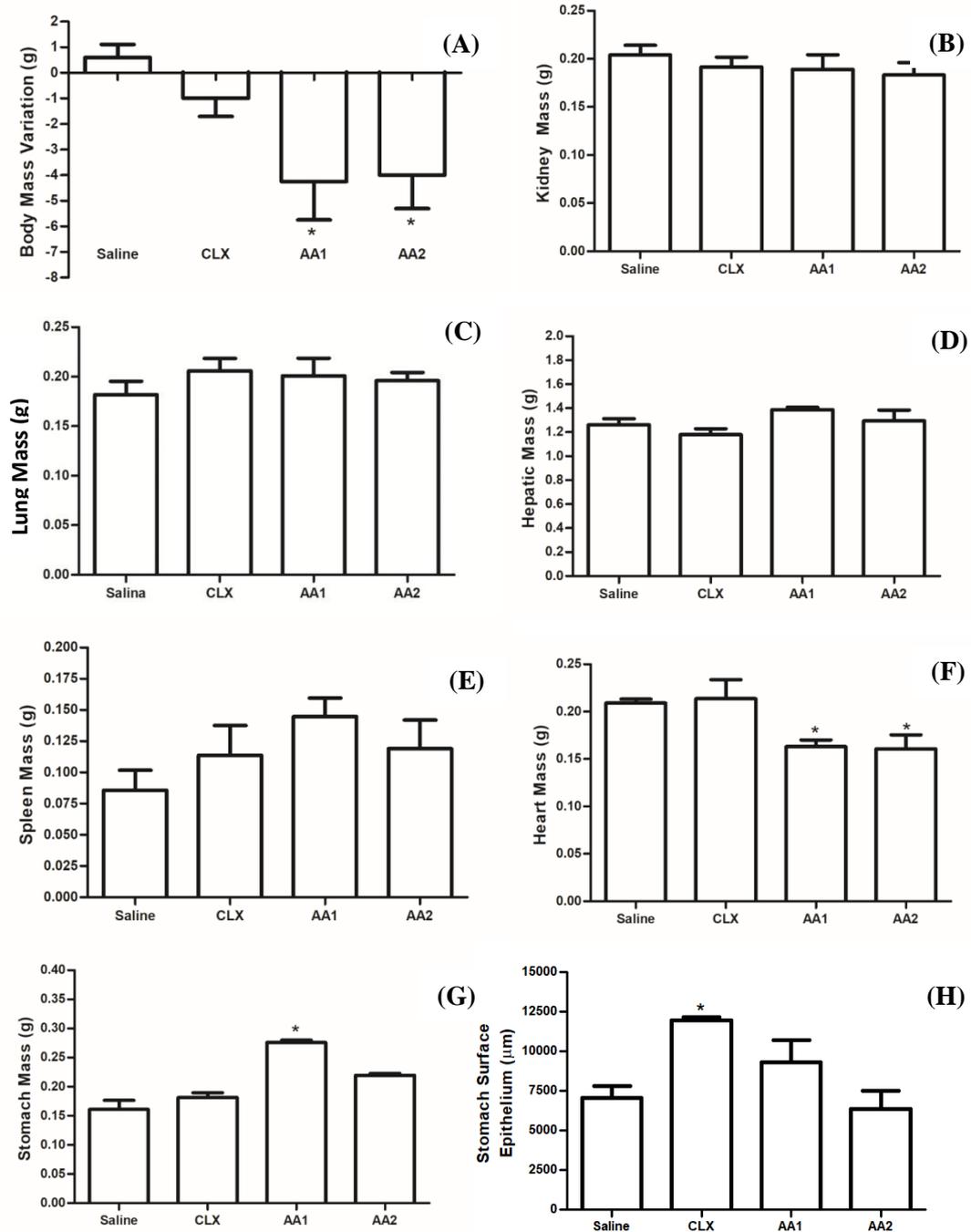


Fig. 2: Características microscópicas do músculo estriado cardíaco do átrio direito com aumento de 400x: (A) Grupo AA1. (B) Grupo AA2. C) Grupo CLX. D) Grupo Salina
Características microscópicas do epitélio de estômago com aumento de 400x: (E) Grupo AA1. (F) Grupo AA2. (G) Grupo CLX. (H) Grupo Salina.

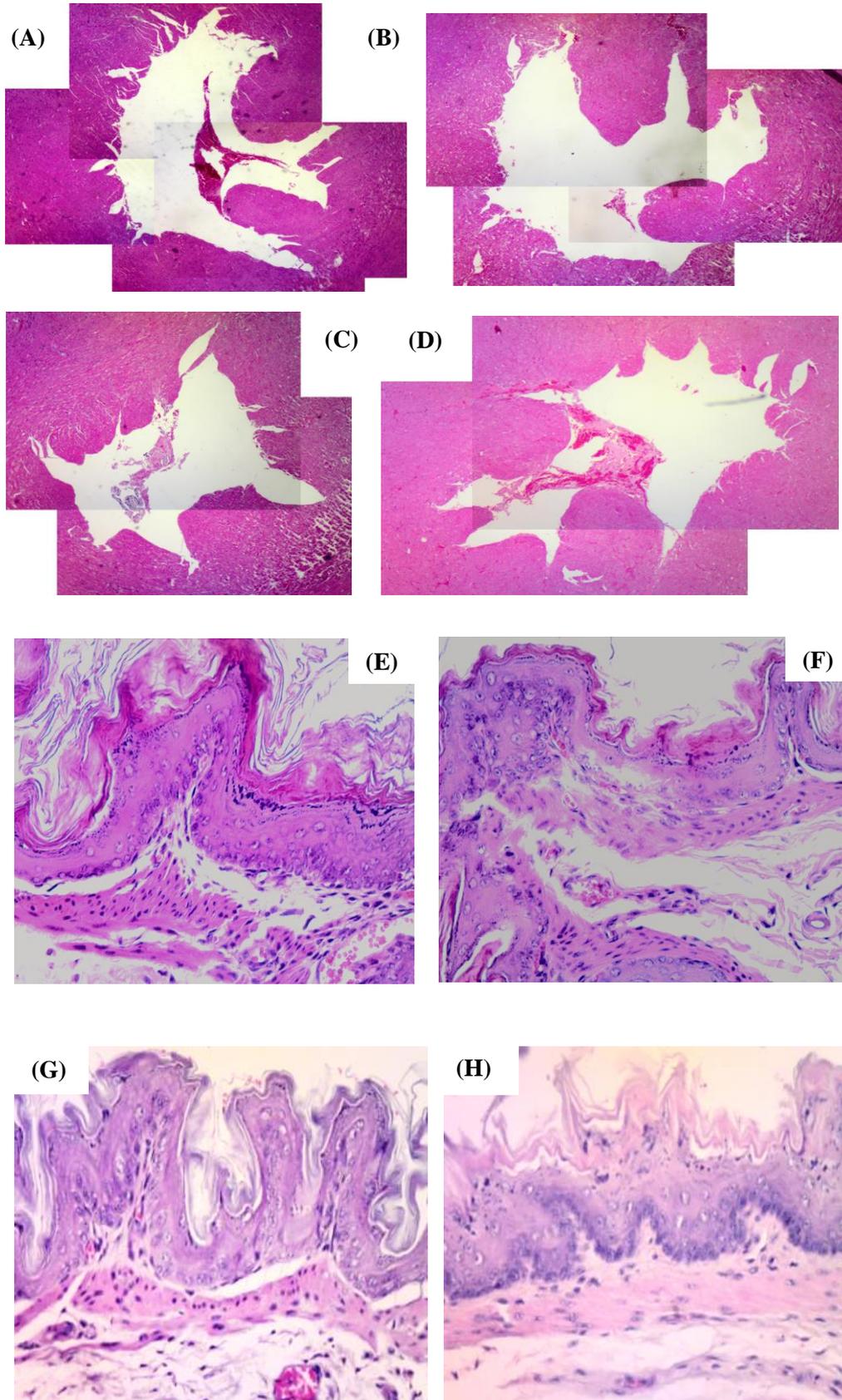


Fig. 3: Avaliação histomorfométrica em camundongos c57bl/6J submetidos a aplicação crônica tópica - $p < 0,05$ versus Salina (ANOVA/Bonferroni; média \pm erro-padrão da média): A - epitélio da superfície ventral da língua. B - epitélio da superfície dorsal da língua. C - epitélio da superfície da mucosa jugal. D - epitélio gengival. E - epitélios da superfície do palato duro.

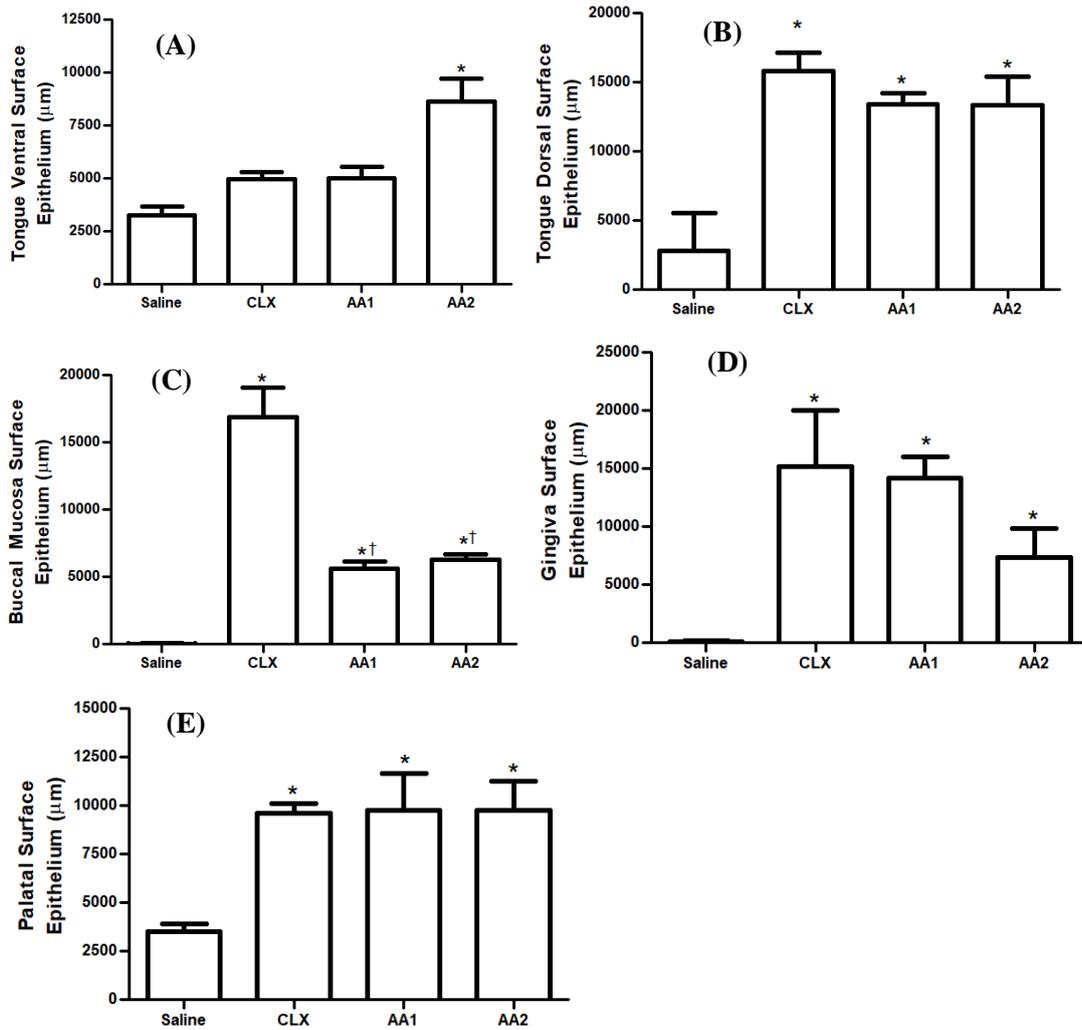
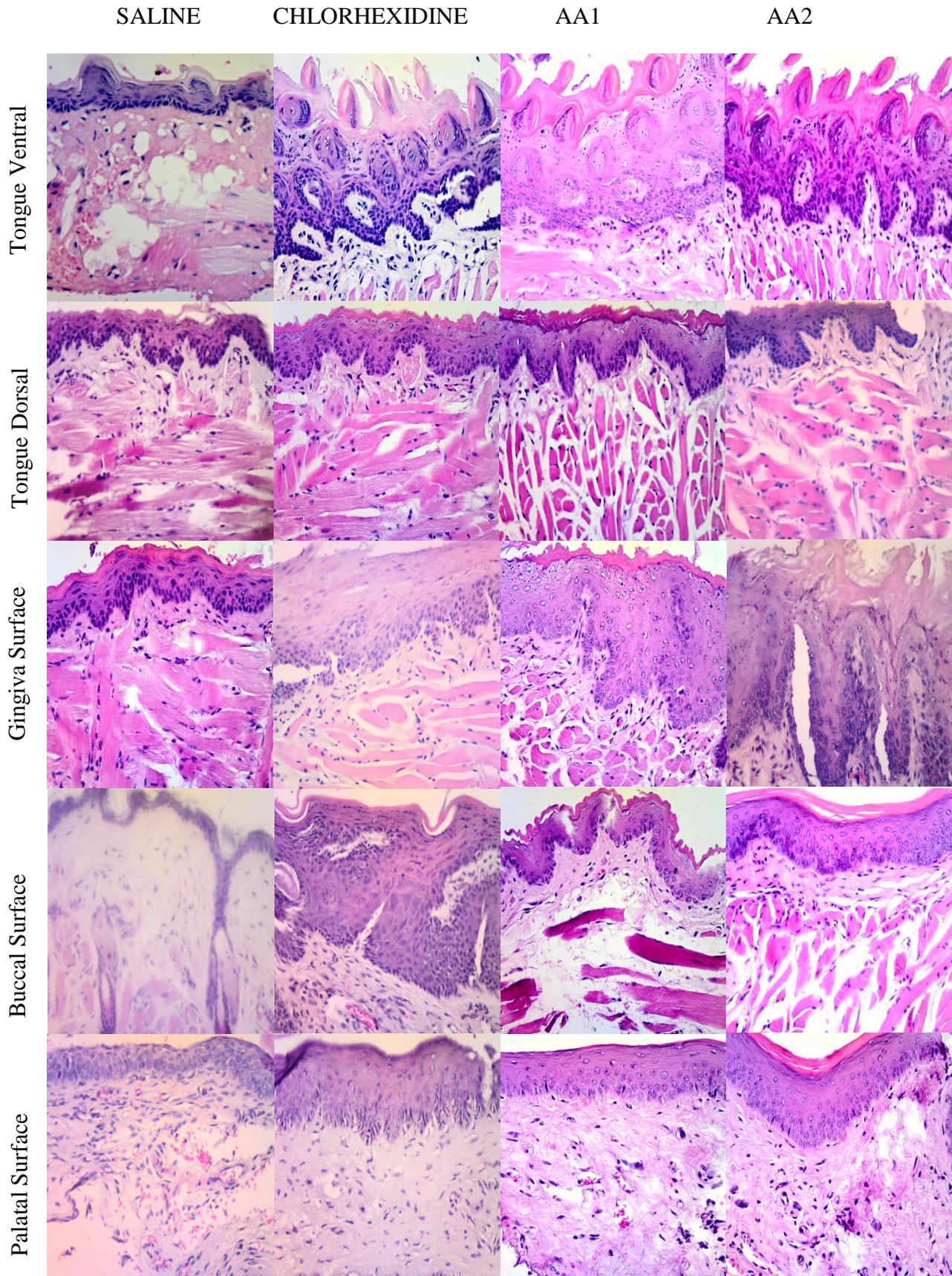


Fig. 4. Características microscópicas dos epitélios orais de camundongos c57bl/6j submetidos a modelo de aplicação tópica crônica de AA nanoparticulado. H&e (400x)



Tab 1: Resultados de Toxicidade Local e Sistêmica, segundo os grupos experimentais

	Salina	Clorexidina	AA1	AA2	p-Valor
Toxicidade sistêmica					
Massa corporal (g)	+0,60±0,50	+1,58±0,71	-4,25±1,49*	-4,00±1,30*	0,045
Rins (g)	0,20±0,01	0,19±0,01	0,18±0,02	0,18±0,01	0,645
Pulmões (g)	0,18±0,01	0,21±0,01	0,20±0,02	0,20±0,01	0,579
Fígado (g)	1,26±0,05	1,18±0,05	1,39±0,01	1,29±0,08	0,261
Baço (g)	0,08±0,02	0,11±0,02	0,14±0,01	0,11±0,02	0,294
Coração (g)	0,21±0,01	0,22±0,02	0,16±0,01*	0,16±0,02*	0,045
Estômago (g)	0,16±0,02	0,18±0,01	0,27±0,01*	0,22±0,02	<0,001
Mucosa gástrica (µm)	7079±756	11983±185*	9336±1381	6355±1148	0,004
Toxicidade local					
Ventre lingual (µm)	3250±439	4874±34	5031±522	8650±1079*	0,001
Dorso lingual (µm)	2805±2735	15812±1362*	13384±860*	13364±2042*	0,001
Mucosa jugal (µm)	49±4	16864±2202*	5629±499*†	6276±432*†	<0,001
Gengiva (µm)	134±13	15192±4868*	14171±1852*	7316±2507*	0,001
Palato duro (µm)	3513±375	9604±531*	9774±1904*	9773±1509*	0,006

Valores expressos em Média±EPM

*p<0,05 versus Salina; †p<0,05 versus Clorexidina (ANOVA/Tukey)

Tab2: Valores do infiltrado inflamatório

	Grupo				p-Valor^a
	Sal	Clx	AA1	AA2	
Infiltrado inflamatório					
Ventre Lingual	0/5	0/5	1/4	1/4	0,295
Gengiva	0/5	0/5	1/3	1/4	0,175
Mucosa Jugal	0/5	0/5	1/3	1/4	0,295
Dorso Lingual	0/5	0/5	1/4	1/4	1,000
Palato duro	1/5	0/5	1/4	1/4	0,609

^ap<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

5 – DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos vem aumentando o número de pessoas que fazem uso da medicina alternativa, em especial de extratos de plantas ou de seus derivados. Em países em desenvolvimento estima-se que 80% da população faça uso de plantas medicinais. Mesmo com tal uso, a questão da toxicidade não tem sido largamente estudada, embora seja uma limitação para este uso. Com o AA, derivado do óleo da casca da castanha de caju não tem sido diferente (NUNES et al., 1999; PERAZZO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2018).

Buscamos observar não somente a viabilidade do fármaco estudado, o AA, quanto a sua ação antimicrobiana, mas também buscamos encontrar mais respostas no tocante à sua toxicidade local, nos tecidos bucais, e toxicidade sistêmica, visto que especialmente o peso da massa corporal e dos órgãos vitais pode trazer indicações sobre a saúde geral do usuário da referida droga. O peso dos órgãos é um importante meio de observação do status fisiológico e patológico, de certa forma podendo mostrar se o órgão foi exposto à injúria ou não. Coração, fígado, rins, baço e pulmões são os primeiros órgãos a ser afetados por reações metabólicas causadas por substâncias tóxicas (HARLITA et al., 2016).

Além do mais, o uso da nanotecnologia na Odontologia tem tido cada vez mais atenção nos últimos anos, já que possuem um vasto leque de aplicações, incluindo as farmacêuticas. Sua utilização em nosso trabalho teve o claro objetivo de observar se potencializaria ou não a ação do AA como agente contra a formação do biofilme dental.

5.1. Análise antimicrobiana *in vitro*

Himejima & Kubo (1991) testaram a atividade antimicrobiana do AA em cultura de SM em uma série de tubos contendo ambos, em protocolo de cinco dias. O crescimento do SM foi avaliado por turbidez a olho nu. Assim como em nossa pesquisa, mesmo com protocolos diferentes, estes autores também noticiaram a ação contra SM, e já neste ano sugeriram que o AA poderia ser utilizado como agente antimicrobiano. Em seguida, Muroi & Kubo (1993), expuseram SM a diferentes concentrações de AA e diferentes períodos de incubação, e da mesma forma relataram semelhante ação antimicrobiana.

Grenn et al. (2008) sugerem que o efeito antimicrobiano do AA contra o SM pode não ser tão potente a ponto de possuir aplicações práticas e consideram que mais estudos devem ser feitos a fim de aumentar este efeito antimicrobiano. Isto corrobora nossa pesquisa na medida em que observamos que a nanopartícula de zeína carregada com AA obteve êxito

na inibição de biofilme de SM. Logo, a incorporação da nanopartícula de zeína ao AA otimizou seus já presentes efeitos.

Anand et al. (2015) pesquisaram a atividade antimicrobiana do extrato macerado de folhas do cajueiro contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, SM, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, bem como sua possível ação na supressão do biofilme. Observaram que o extrato testado teve atividade antimicrobiana em todos os microrganismos testados. Além do mais, tanto a clorexidina como padrão ouro quanto o extrato, reduziram significativamente o desenvolvimento de biofilme. Os autores sugeriram que tais efeitos podem ser atribuídos a componentes bioativos de tal extrato, o que, de certa forma, foi encontrado no nosso estudo, que foi realizado com parte integrante da mesma planta.

Araújo et al. (2018) investigaram a atividade antimicrobiana de extratos do tronco e da casca do cajueiro contra bactérias com relevância no processo cariogênico (*Streptococcus mitis*, SM, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivars*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus*). Houve inibição do crescimento de todos os microrganismos testados, sendo o SM e o *Streptococcus mitis* os mais sensíveis.

5.2. Análise de toxicidade *in vivo*

Após os 30 dias de administração dos fármacos na nossa pesquisa, os grupos AA1 e AA2 mostraram maior perda de peso que os animais tratados com solução salina. Téodong et al (2007) fizeram protocolo de administração do extrato da folha do cajueiro por 8 semanas (56 dias), e o fizeram com diferentes quantidades administradas (6, 10 e 14 g/kg dos animais). Os animais dos grupos com administração de 10 e 14 g/kg tiveram significativa perda de peso se comparados com os do grupo controle a partir do 35º dia de administração.

Carvalho et al (2011) realizaram seu estudo de toxicidade *in vivo* em ratos machos e fêmeas com dois protocolos. O primeiro foi de toxicidade aguda com uma única dose de AA isolado do LCC aplicada via administração oral e observação dos animais por 14 dias – houve decréscimo na média de peso corporal nos machos tratados com o fármaco se comparado ao peso corporal de machos dos outros grupos. O segundo protocolo foi de toxicidade subaguda oral com administração do fármaco por trinta dias – neste protocolo todos os animais ganharam peso, tanto nos grupos teste quanto no grupo controle, sem diferença estatística entre eles, ao contrário do nosso estudo. Ao contrário de nossos achados, Harlita et al (2016) observaram aumento de peso em todos os animais num protocolo de administração de dose única do extrato da casca da castanha do caju com posterior acompanhamento de 14 dias, sem diferença estatística entre os grupos de seu estudo. Já Konan et al (2007) observaram que

todos os animais em sua pesquisa com protocolo de 30 dias de administração do extrato das folhas do cajueiro tiveram ganho de peso total tanto nos grupos teste quando no grupo controle, que teve aumento de peso ainda maior.

No nosso estudo não houve diferença significativa na massa dos rins, pulmões, fígado e baço, assim como no estudo de Harlita et al (2016), no qual, além de observar que não houve mudança significativa no peso destes órgãos vitais, observou que macroscopicamente os mesmos não apresentaram anormalidade patológica. Da mesma forma Konan et al (2007), em análise histológica, não encontrou alterações morfológicas renais ou hepáticas.

Já Téodong et al (2007), contrariamente aos nossos achados, observaram que houve aumento no peso da massa do fígado com degeneração centrolobular dos hepatócitos que seguiu para necrose celular e aumento também no peso da massa dos rins com pequena degeneração do epitélio tubular e congestão glomerular.

Okonkwo et al (2010) sugeriram toxicidade hepática em sua pesquisa realizada com ratos Wistar, quando ingeriram doses entre 1,44 e 2,87 g/kg de extrato de AA por um período de duas semanas, concluindo, desta forma que houve moderada degeneração de hepatócitos, ao contrário do nosso estudo, no qual não foi evidenciado qualquer sinal de toxicidade ou inflamação no fígado e demais órgãos na análise histopatológica.

O estudo de Carvalho et al (2011), neste aspecto, também se mostrou adverso ao nosso, na medida em que encontrou decréscimo na massa dos pulmões no grupo tratado com AA em relação ao grupo controle nos ratos machos, e o inverso nas ratas fêmeas, ou seja, nestas houve aumento da massa dos pulmões no grupo tratado com AA. Nos demais órgãos, quais sejam, baço, fígado e rins, não houve diferença estatisticamente significativa em suas massas, corroborando o nosso estudo, em seu protocolo de toxicidade aguda. Já no seu protocolo de toxicidade subaguda, seus achados foram de aumento na massa do baço em ratos machos e nas fêmeas.

Nos nossos achados, a massa média dos estômagos do grupo AA1 foi significativamente superior aos estômagos dos grupos salina e CLX. Já Harlita et. al. (2016) observaram que a massa média dos estômagos não teve aumento e nem diminuição, e ainda sugeriram que a medição do peso de cada órgão é de fundamental importância para saber se foi exposto a injúria ou não.

A diminuição da massa cardíaca encontrada em nossa pesquisa nos grupos AA1 e AA2 em comparação com os animais dos grupos salina e CLX corroborou achados de algumas pesquisas com este fármaco. Já em 2005, Davidson et al concluíram que o Ácido

Anacárdico preveniu completamente a estimulação da p300, proteína essencial para a formação do coração, pela fenilefrina, retornando-a a seus níveis normais em seu experimento com ratos, tendo como consequência a prevenção da indução de hipertrofia em cardiomiócitos.

Porém Konan et al (2007) perceberam que, ratos machos, que receberam dose do extrato do fármaco de 1000mg/kg diariamente por 30 dias, tiveram um significativo aumento da massa cardíaca, contrariando nossos achados. Ressalta-se que em nosso estudo os animais receberam a formulação na concentração de 9,33 µg/kg.

Assim como Davidson et al (2005), Peng et al (2014) pesquisaram a atividade do AA sobre a proteína p300. Examinaram o impacto da exposição ao álcool durante o desenvolvimento cardíaco, na medida em que utilizaram em seu experimento ratas grávidas com 9 a 11 semanas de vida que receberam etanol a 56% por gavagem e também o AA via intraperitoneal, já que é sabido que o álcool é um fator teratogênico comum durante a gestação e que pode causar malformações durante o desenvolvimento embriológico. Concluíram que o AA reduziu significativamente a atividade da p300. Considerando a hipertrofia cardíaca como o estágio inicial da insuficiência cardíaca, Li et al. (2019)²⁴ tendo por certa a ação do AA na reversão da hipertrofia cardíaca em ratas, observaram que o AA, além de inibir a expressão da p300, melhorou a função cardíaca em modelo animal.

Continuando seus estudos, Peng et al, no ano seguinte (2015), investigaram a hipertrofia cardíaca causada também pela ingestão de álcool bem como o efeito protetivo que o AA poderia ter contra a hipertrofia cardíaca induzida pelo álcool em ratas grávidas. Observaram que a exposição ao álcool durante a gravidez levou à hipertrofia cardíaca fetal e que o AA regulou a expressão de genes cardíacos, revertendo a hipertrofia causada pelo álcool. Em 2017, Peng et al, pesquisaram novamente a hipertrofia cardíaca e a ação do AA, mas desta vez uma hipertrofia induzida por fenilefrina. Administraram os fármacos em ratos C57BL/6 que foram eutanasiados após o experimento de 30 dias e tiveram seu coração coletado para exames. Assim como nos nossos achados de diminuição de massa cardíaca, concluíram que o AA diminuiu a massa cardíaca, desta vez na hipertrofia cardíaca induzida pela fenilefrina.

6 – CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados evidenciam o potencial efeito antiplaca do AA na formulação testada.

A administração tópica de AA não exibiu sinais de toxicidade histológica significativa.

A administração sistêmica de AA reduziu, no modelo animal proposto, a massa cardíaca, mas não exibiu sinais de toxicidade macroscópica e histológica.

Mais estudos devem ser realizados a fim de analisar o efeito microbiológico dessa formulação em outras concentrações e em modelos de biofilme multiespécie, bem como analisar os mecanismos de tal alteração cardíaca.

REFERÊNCIAS

- AL-HAZZANI, A.; PERIYASAMY, V.; SUBASH-BABU, P.; ALSHATWI, A. A. Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. **Medical Chemistry Research**, v. 21, p. 1384–1388, 2012.
- ANAND, G.; RAVINANTHAN, M.; BASAVIAH, R.; SHETTY, A. V. *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n.1, p. 69-74, 2015.
- ARAÚJO, C.R.F., PEREIRA, M.S.V., HIGINO, J.S., PEREIRA, J.V., MARTINS, A.B. *In vitro* antifungal activity of *Anacardium occidentale* linn. bark upon leaves of the *Candida* gender. **Arquivos em Odontologia**, 41(3),193-272, 2005.
- ARAÚJO, J. S. C.; CASTILHO, A. R. F.; LIRA, A. B.; PEREIRA, A. V.; AZEVEDO, T. K. B.; COSTA, E. M. M. B.; PEREIRA, M. S. V.; PESSOA, H. F. L.; PEREIRA, J. V. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts. **Archives of Oral Biology**, v. 85, p. 113-119, 2018.
- ARPANA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.
- BAPAT, R.A.; JOSHI, C.P.; BAPAT, P.; CHAUBAL, T.V.; PANDURANGAPPA, R.; JNANENDRAPPA, N.; GORAIN, B.; KHURANA, S.; KESHARWANI, P. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. **Drug Discovery Today**, v.00, p.1-14, 2018.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- CARVALHO, A. L. N.; ANNONI, R.; SILVA, P. R. P.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T. S.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 730-736, 2011.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-131322, 1999.
- CURY, J. A.; NORONHA, M. S.; ROMAO, D. A.; TABCHOURY, C. P. M. Effect of fluoride concentration on reduction of enamel demineralization according to the cariogenic challenge. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n.4, p. 393-398, 2016.
- DAVIDSON, S.M.; TOWNSEND, P.A.; CARROL C.; YUREK-GEORGE, A.; BALASUBRAMANYAM, K.; KUNDU, T.K.; STEPHANOU, A.; PACKHAM, G.; GANESAN, A.; LATCHMAN, D.S. The transcriptional coactivator p300 plays a critical role in the hypertrophic and protective pathways induced by phenylephrine in cardiac cells but is specific to the hypertrophic effect of urocortin. **ChemBioChem**, v. 6, p. 162-170, 2005.

DEFRATES, K.; MARKIEWICZ, T.; GALLO, P.; RACK, A.; WEYHMILLER, A.; JARMUSIK, B.; HU, X. Protein polymer-based nanoparticles: fabrication and medical applications. **International Journal of Molecular Science**, 19, 1717, 2018.

DUARTE, S.; KLEIN, M. I.; AIRES, C. P.; CURY, J. A.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 206–212, 2008.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária - a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Ed. Santos, 2005.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

GOMES, C. E. B.; CAVALCANTE, D. G.; GIRÃO FILHO, J. E.; COSTA, F. N.; PEREIRA, S. L. S. Clinical effect of a mouthwash containing *Anacardium occidentale* Linn. On plaque and gingivitis control: A randomized controlled trial. **Indian Journal of Dental Research**, v. 27, p. 364-369, 2016.

GREEN, I. R.; TOCOLI, F. E.; LEE, S. H.; NIHEI, K. I.; KUBO, I. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6236–6241, 2007.

GREEN, I. R.; TOCOLI, F. E.; LEE, S. H.; NIHEI, K. I.; KUBO, I. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1315-1320, 2008.

HAMAD, F.B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based Anacardic Acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, p. 8569-8590, 2015.

HAMBLIN M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, p. 436–450, 2004.

HARLITA, N. H.; SATUTI, N. H. N.; SAGI, M.; ASTUTI, P. Acute toxicity of cashew nut shell extract (*Anacardium occidentale* L.) in albino rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 89-94, 2016.

HAYACIBARA, M. F.; ROSA, O. P.; KOO, H.; TORRES, S. A.; COSTA, B.; CURY, J. A. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 82, p. 267–271, 2003.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 418-421, 1991.

KAVOOSI, F.; MODARESI, F.; SANAEI, M.; REZAEI, Z. Medical and dental applications of nanomedicines. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, v. 126, p.795-803, 2018.

- KLEIN, M.I.; HWANG, G.; SANTOS, P. H. S.; CAMPANELLA, O. H.; KOO, H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Cellular and infection microbiology**. v. 5, 10, 2015.
- KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annual Review of Microbiology**.; v.54, p. 413-437, 2000.
- KONAN, N.A; BACCHI, E.M.; LINCOPAN, N.; VARELA, S.D.; VARANDA, E.A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 30-38, 2007.
- KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 12, p. 1065-1073, 2013.
- KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, n. 99, p. 555-562, 2006.
- LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v.50, n. 4, p. 353-380, 1986.
- MARCENES, W., KASSEBAUM, N.J., BERNABÉ, E., FLAXMAN, A., NAGHAVI, M., LOPEZ, A., MURRAY, C.J.L. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. **Journal of Dental Research**, 92(7):592-597, 2013.
- MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Advances in Dental Research**., v.8, n. 2, p. 263-271, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – resultados principais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- MUROI, H.; KUBO, I. Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, n. 41, p. 1780-1783, 1993.
- NUNES, D.A.; ARAÚJO-FILHO, R.; LIMA, R. S. N.; CORREIA, A. C. C. A utilização de agentes fitoterápicos em Odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA, Salvador**, v. 18, p. 11-14, 1999.
- OKONKWO, T. J. N.; OKORIE, O.; OKONTA, J. M.; OKONKWO, C. J. Sub-chronic hepatotoxicity of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) inner stem bark extract in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 72, n.3. p. 353-357, 2010.
- PAES LEME, A. F.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; CURY, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 878–887, 2006.
- PENG, C.; ZHU, J.; SUN, H.; HUANG, X.; ZHAO, W.; ZHENG, M.; LIU, L.; TIAN, J. Inhibition of histone H3K9 acetylation by Anacardic Acid can correct the over-expression of Gata4 in the hearts of fetal mice exposed to alcohol during pregnancy. **Plos one**, v.9, n. 8, p. 104-135, 2014.

PENG, C.; ZHANG, W.; ZHAO, W.; ZHU, J.; HUANG, X.; TIAN, J. Alcohol-induced histone H3K9 hyperacetylation and cardiac hypertrophy are reversed by a histone acetylases inhibitor anacardic acid in developing murine hearts. **Biochimie**, v. 113, p. 1-9, 2015.

PENG, C.; LUO, X.; LI, S.; SUN, H. Phenylephrine-induced cardiac hypertrophy is attenuated by a histone acetylase inhibitor anacardic acid in mice. **Molecular BioSystems**, v.133, p. 714-724, 2017.

PERAZZO, F. F.; SILVA, R. S.; CARVALHO, J. C. T.; GROPPA, F. C. Utilização de substâncias naturais em Odontologia. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 2, n. 1-4, p. 9-15, 2004.

RIVERO-CRUZ, B. E.; ESTURAU, N.; SANCHEZ-NIETO, S.; ROMERO, I.; CASTILLO-JUAREZ, I.; RIVERO-CRUZ, J. F. Isolation of the new anacardic acid 6-[16'Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 13, p. 1282-1287, 2011.

ROCHELLE, S. L. A. Evaluation of the antimicrobial activity of agroindustrial residues on oral and systemic pathogens. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia – Unicamp. Campinas, 2016.

SOUZA, M.Q., TEOTONIO, I.M.S.N., ALMEIDA, F.C., HEYN, G.S., ALVES, P.S., ROMEIRO, L.A.S., PRATESI, R., NOBREGA, Y.K.M., PRATESI, C.B. Molecular evaluation of anti-inflammatory activity of phenolic lipid extracted from cashew nut shell liquid (CNSL). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 18(181), 2018.

TÉODONG, L.; DZEUFUET, P.D.D.; DIMO, T.; ASONGALEM, E.A.; SOKENG, S.N.; FLEJOU, J.; CALLARD, P.; KAMTCHOUING, P. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* linn (anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 2, p. 140-147, 2007.

TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 188-197, 2006.

YAMASHITA, Y.; BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; KURAMITSU, H. K. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 3811–3817, 1993.

ANEXO

OFÍCIO DE APROVAÇÃO COMITÉ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Unichristus
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Of. No. 020/18

Protocolo da CEUA: 020/18

Pesquisador Responsável: Profa. SMYRNA LUIZA XIMENES DE SOUZA

Título do Projeto: AÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO ANACÁRDICO EM BIOFILMES DE STREPTOCOCCUS MUTANS: ANÁLISE DA VIABILIDADE BACTERIANA IN VITRO E ANÁLISE DE TOXICIDADE IN VIVO.

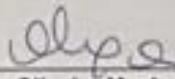
Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 23 (vinte e três) de maio de 2018.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Camundongo C57bl/6j	Número Amostral:	40
----------	---------------------	------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 23/05/2019.

Fortaleza, 23 de maio de 2018.



Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora
CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE