

Efeito antibacteriano do cardol sobre bactérias orais associadas à cárie dentária e à periodontite apical crônica

Antibacterial effect of cardol against oral bacteria associated with dental caries and chronic apical periodontitis

DOI:10.34119/bjhrv6n3-269

Recebimento dos originais: 02/05/2023

Aceitação para publicação: 05/06/2023

Susana Joice Mendes Maia

Pós-graduanda pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - Ceará, CEP: 60430-160

E-mail: susanajoicem@gmail.com

Nayara de Oliveira Souza

Mestranda em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - Ceará, CEP: 60430-160

E-mail: nayaraoliv.d@gmail.com

Diana Araújo Cunha

Doutora em Odontologia

Instituição: Centro Universitário Christus

Endereço: Rua João Cordeiro, 688, Centro, Fortaleza - Ceará, CEP: 60110-300

E-mail: araujo.diana@gmail.com

Monique Marques Ribeiro

Mestranda em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - Ceará, CEP: 60430-160

E-mail: moniquemarques@live.com

Nara Sousa Rodrigues

Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia

Instituição: Universidade de Fortaleza

Endereço: Rua Homero Castelo Branco, 940, Cambéa, Fortaleza - Ceará, CEP: 60822-280

E-mail: nara.sousa.rodrigues@gmail.com

Diego Lomonaco Vasconcelos de Oliveira

Doutor em Química

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Bloco 933, Pici, Fortaleza - Ceará, CEP: 60440-900

E-mail: lomanaco@ufc.br

Edson Holanda Teixeira

Doutor em Bioquímica

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - Ceará, CEP: 60430-160

E-mail: edson@ufc.br

Vicente de Paulo Aragão Saboia

Doutor em Clínica Odontológica

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - Ceará, CEP: 60430-160

E-mail: vpsaboia@yahoo.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, o potencial antibacteriano do cardol, um derivado do LCC, sobre bactérias orais associadas a cárie dentária e a periodontite apical crônica. Para isso, os ensaios foram realizados em cultura de células planctônicas e em biofilme, utilizando as cepas *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus parasanguinis* ATCC903 e *Enterococcus faecalis* ATCC19433, ajustadas na concentração de 2×10^6 µg/mL. Inicialmente, as cepas foram submetidas à técnica de microdiluição seriada na presença de cardol em diferentes concentrações (0.78 a 50 µg/mL) para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A avaliação da atividade antibiofilme do cardol foi realizada através dos testes de quantificação de biomassa (teste colorimétrico com cristal violeta 1%) e enumeração de células viáveis do biofilme (contagem de unidades formadoras de colônias). Os resultados foram analisados por one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Em relação ao efeito sobre células planctônicas, o cardol mostrou forte atividade inibitória e bactericida contra todas as cepas analisadas no estudo, com valores de CIM em 12,5 a 25 µg/mL e CBM em 25 a 50 µg/mL, respectivamente. No ensaio em biofilme, o cardol reduziu a biomassa bacteriana em todas as concentrações testadas, sendo responsável por uma redução de 96% da biomassa de *E. faecalis* na concentração de 1,56 µg/mL. Ademais, o número de células viáveis do biofilme reduziu 100% nas maiores concentrações testadas (3,12 - 50 µg/mL) contra todas as cepas. Portanto, o cardol possui potencial terapêutico contra bactérias associadas as patologias orais.

Palavras-chave: biofilme, cárie dentária, periodontite apical, *Anacardium occidentale*, agente antimicrobiano.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the antibacterial potential of cardol, a derivative of LCC, on oral bacteria associated with dental caries and chronic apical periodontitis. To this end, assays were performed in planktonic cell culture and in biofilm, using the strains *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus parasanguinis* ATCC903 and *Enterococcus faecalis* ATCC19433, adjusted at a concentration of 2×10^6 µg/mL. Initially, the strains were subjected to serial microdilution technique in the presence of cardol at different concentrations (0.78 to 50 µg/mL) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The evaluation of the antibiofilm activity of cardol was performed through the biomass quantification tests (colorimetric test with crystal violet 1%) and enumeration of viable biofilm cells (count of colony forming units). The results were analyzed by one-way ANOVA and Bonferroni post-test ($p < 0.05$). Regarding the effect on planktonic cells, cardol showed strong inhibitory and bactericidal activity against all strains analyzed in the study, with MIC values in 12.5 to 25 µg/mL and CBM values in 25 to 50 µg/mL,

respectively. In the biofilm assay, cardol reduced bacterial biomass at all concentrations tested, accounting for a 96% reduction in *E. faecalis* biomass at the concentration of 1.56 µg/mL. Furthermore, the number of viable cells in the biofilm reduced 100% at the highest concentrations tested (3.12 - 50 µg/mL) against all strains. Therefore, cardol has therapeutic potential against bacteria associated with oral pathologies.

Keywords: biofilm, dental caries, apical periodontitis, *Anacardium occidentale*, antimicrobial agent.

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro, *Anacardium occidentale* Linn, é uma espécie vegetal presente em diversos países asiáticos e amplamente cultivada no nordeste do Brasil (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). Esta planta tropical é relevante para o agronegócio regional, devido à exportação de suas nozes, a castanha do caju. Além disso, o cajueiro é considerado uma importante fonte medicinal (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2017) e o suco de caju apresenta propriedades antitumorais, antimicrobianas, antimutagênicas e antioxidante, evidenciado por sua capacidade de eliminar os radicais livres (KUBO et al., 1993; LIMA; PASTORE; LIMA, 2000; MELO-CAVALCANTE et al., 2003; TREVISAN et al., 2006; KAMATH; RAJINI, 2007; STASIUK; KOZUBEK, 2010).

A castanha de caju apresenta um mesocarpo esponjoso, do qual pode ser extraído o líquido da casca da castanha do caju (LCC) (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). O LCC é um fluido viscoso, castanho-escuro, cáustico e inflamável, correspondendo a aproximadamente 25% do peso da castanha. Sua composição varia de acordo com o processo de extração, diferenciando-se em LCC natural e técnico, que pode apresentar aproximadamente 3 a 18% de cardol. Por ser rico em constituintes fenólicos (ácido anacárdico, cardol, cardanol e 2-metilcardol), esse líquido é utilizado para fins industriais (resinas) e medicinais (antissépticos e larvicidas) (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; LOMONACO, MELE, MAZZETTO, 2017). O processo de extração do LCC pode ser realizado em altas ou baixas temperaturas. Quando é obtido por extração a frio é caracterizado como LCC natural, apresentando 13 a 20% de cardol em sua composição. Na extração por um processo térmico-mecânico, a elevada temperatura permite a descarboxilação dos ácidos anacárdicos originando o LCC técnico, o qual apresenta 3 a 18% de cardol (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). Além disso, o LCC apresenta ação antimicrobiana e antibiofilme contra diversas bactérias orais, tais como *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (SOUZA et al., 2022).

O biofilme corresponde a uma comunidade de células bacterianas que estão aderidas ao dente ou a outra superfície, na presença de uma matriz extracelular autoproduzida (FLEMMING et al., 2016). Sua formação ocorre a partir da adesão a uma superfície seguida de co-adesão por outras espécies e com a interação celular observa-se uma comunidade bacteriana favorável a maturação do biofilme (KOLENBRANDER et al., 2010). O desenvolvimento de um potencial biofilme cariogênico pode ocorrer durante o crescimento do biofilme dental devido a mudanças ambientais, distúrbios fisiológicos ou pressões seletivas (PARISOTTO et al., 2010). Esses eventos são capazes de estimular a proliferação de espécies acidogênicas e acidúricas em detrimento dos residentes saudáveis e menos acidúricas (PARISOTTO et al., 2010).

A cárie dentária é uma das doenças orais mais prevalentes, porém não é causada apenas por uma única espécie patogênica, mas também associada ao crescimento do biofilme na superfície dentária, sem interferências, em resposta a uma dieta rica em sacarose (ZERO et al., 2009; KASSEBAUM et al., 2015). Sendo assim, configura-se como uma doença dinâmica mediada por biofilme, modulada por dieta, multifatorial, não transmissível, resultando em perda líquida de minerais dos tecidos dentários duros, e é determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais. (FEJERSKOV, 1997; PITTS et al., 2017; MACHIULSKIENE et al., 2020). Para o seu desenvolvimento, inicialmente uma película adquirida é formada sobre o esmalte dental na qual bactérias gram-positivas como *S. parasanguinis* aderem-se. (KOLENBRANDER et al., 2010). Posteriormente, há uma desmineralização da estrutura dentária causada por bactérias acidogênicas e acidúricas capazes de colonizar o biofilme, no qual o *S. mutans* é principalmente encontrado associado a comunidades microbianas multiespécies (KOLENBRANDER et al., 2010; FUGOLIN; PFEIFER, 2017; WANG et al., 2019).

O gram-positivo e anaeróbio facultativo *E. Faecalis* é um microrganismo encontrado no trato gastrointestinal que pode causar endocardite, bacteremias, infecções no trato urinário, meningite e está fortemente associado a presença de periodontites apicais crônicas. (KHALIFA et al., 2015; WANG et al., 2012). Esta é uma infecção intrarradicular decorrente, principalmente, da falha em tratamentos endodônticos nas quais o *E. Faecalis* é o microrganismo mais prevalente. (WANG et al., 2012; ZHANG; DU; PENG, 2015).

Pesquisas recentes estão sendo desenvolvidas utilizando novos agentes terapêuticos obtidos de várias fontes vegetais, a fim de se tornarem uma opção viável em relação aos agentes terapêuticos. Estas estratégias foram utilizadas para resolver alguns problemas como o aumento

da resistência bacteriana e o elevado custo associado ao procedimento terapêutico padrão (DAGLI et al., 2015; AZIZAN et al., 2017).

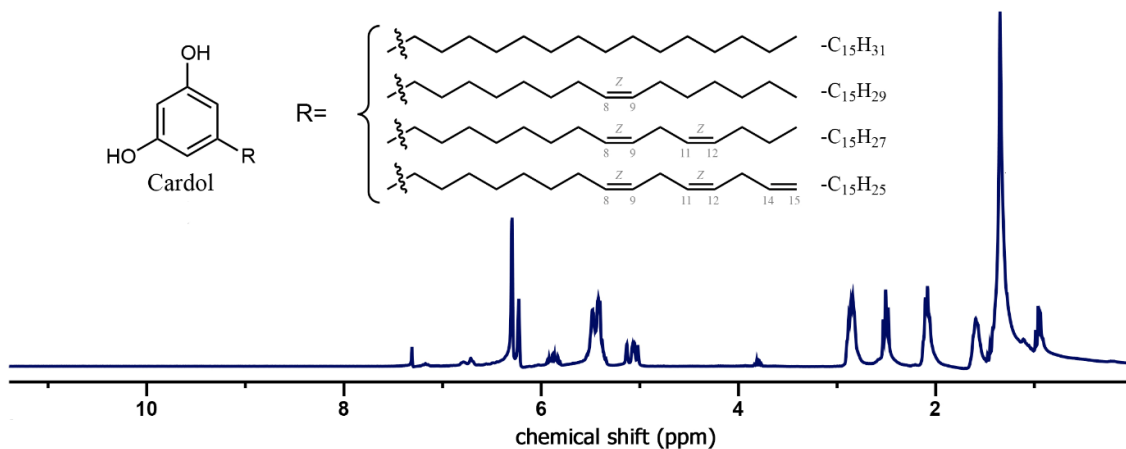
Portanto, o estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e o efeito em biofilme do cardol contra *Streptococcus mutans* UA 159, *Streptococcus parasanguinis* UA 903 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO CARDOL

O líquido da casca da castanha de caju foi fornecido pela indústria Amêndoas do Brasil LTDA (Fortaleza, Brasil). Foi escolhido o método de extração térmico, no qual as cascas da castanha de caju foram aquecidas a 180 °C para a liberação do líquido. O cardol foi separado do LCC seguindo metodologia descrita por Lomonaco et al. (2013). Em seguida, os produtos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H para garantir sua pureza (Figura 1).

Figura 1- Estrutura química e gráfico de RMN do cardol purificado.



2.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

Cepas de *Streptococcus mutans* UA 159, *Streptococcus parasanguinis* UA 903 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, foram incubadas estriadas em placa de petri contendo meio de ágar de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Himedia, Mumbai, Índia) e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o crescimento, colônias isoladas foram removidas e inoculadas em 5mL de meio BHI com 1% de sacarose e cresceram sob as mesmas condições por 18h. Então, as culturas foram transferidas para um tubo falcon e centrifugadas a uma frequência de 8.604G por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, as culturas foram suspensas

em novo meio de caldo BHI com 1% de sacarose para ensaios envolvendo formação de biofilme. Imediatamente antes dos ensaios, a concentração celular da suspensão bacteriana foi ajustada para 2×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} por um espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) através de turbidimetria e curvas de calibração pré-determinadas para cada bactéria. Os testes foram realizados em triplicata (DA SILVA et al., 2017).

2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

O potencial antibacteriano do cardol foi avaliado pelo método de microdiluição de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015), com modificações. Inicialmente, o cardol foi solubilizado em água destilada estéril contendo 4% de dimetilsulfóxido na concentração final de $125 \mu\text{g/mL}$. Placas de poliestireno de 96 poços foram preenchidas com caldo BHI contendo o cardol em concentrações decrescentes (0.78 a $50 \mu\text{g/mL}$) obtendo um volume inicial de $100 \mu\text{L}$. Posteriormente, $100 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana ajustada ($2 \times 10^6 \text{ CFU/mL}^{-1}$) foram adicionados aos poços e incubados por 24 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, a absorbância dos poços foi determinada com o leitor de microplacas (SpectraMaxR I3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 620nm . Meio de BHI contendo suspensão bacteriana foi usada como controle negativo. A CIM foi definida como a menor concentração de cardol capaz de inibir o crescimento bacteriano visível.

A CBM foi determinada pela remoção de $10\mu\text{L}$ de BHI do conteúdo dos poços que não mostraram crescimento visível após incubação e inoculadas em placa de petri contendo BHI ágar. A CBM foi definida como a menor concentração de cardol capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano em BHI (DA SILVA et al., 2017).

2.4 EFEITO DO CARDOL NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

O ensaio de inibição da formação do biofilme foi realizado em placas de poliestireno com 96 poços com fundo plano, de acordo com Da Silva et al. (2017). A preparação das placas foi como a usada no ensaio de CIM. Duas placas foram preparadas com o cardol, a primeira para quantificação de biomassa utilizando o cristal de violeta 1% e outra para enumeração de células viáveis do biofilme.

2.4.1 Quantificação de biomassa

O efeito do cardol (0,78 a 50 $\mu\text{g/mL}$) na formação do biofilme foi avaliado após incubação e crescimento bacteriano por 24 h a 37 °C com 5% de CO_2 . As placas de poliestireno com 96 poços foram lavadas três vezes com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Posteriormente, 200 μL de metanol 99,8% foi adicionado por 15 minutos para fixação das células aderidas ao biofilme. Após a remoção do metanol, 200 μL de cristal violeta 1% foi adicionado a cada poço para interação com a biomassa por 5 min a 25 °C. As placas foram lavadas e mantidas em temperatura ambiente até secar. A remoção do excesso de corante aderido à massa do biofilme foi realizada com 200 μL de ácido acético 33% adicionado aos poços. A biomassa foi mensurada usando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3, Molecular Devices) no comprimento de onda de 590 nm (DA SILVA et al., 2017).

2.4.2 Enumeração de células viáveis do biofilme

A viabilidade celular dos biofilmes foi avaliada por análise de UFC, enumerando as células viáveis do biofilme. O número de células foi expresso como \log_{10} UFC mL^{-1} . Após a formação e crescimento do biofilme, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril para remoção das células não aderidas. Em seguida, 200 μL de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril foi adicionado em cada poço e submetido a banho ultrassônico (Sonicor / SC-52) por 8 minutos para liberação de células aderidas ao biofilme. O conteúdo de 5 poços foi coletado e transferido para um tubo estéril com um volume final de 1 mL. Posteriormente, foram realizadas 10 diluições em série e inoculados em placas de petri contendo meio de BHI ágar. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C com 5% de CO_2 . O número de unidades que formam colônias foi determinado e o resultado expressado em \log_{10} UFC mL^{-1} (DA SILVA et al., 2017).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados experimentais foram analisados por one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni usando o software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O cardol mostrou efeito inibitório e bactericida contra todas as cepas testadas no estudo (Tabela 1), cujos valores de CIM e CBM variaram de 12,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$. O cardol apresentou os menores valores de CIM (12,5 $\mu\text{g/mL}$) e CBM (25 $\mu\text{g/mL}$) contra as cepas *S. parasanguinis* e

S. mutans. Os efeitos de CIM e CBM contra *E. faecalis* foram observados em concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente.

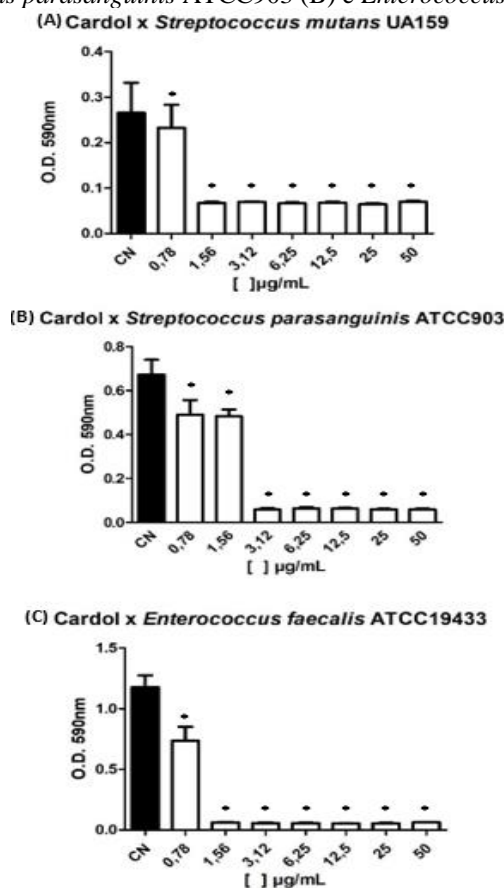
Tabela 1 - Atividade antibacteriana do cardol contra o *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis* e *Enterococcus faecalis*. Os valores de CIM e CBM foram expressos em µg/mL.

Microrganismos	Cardol	
	CIM Cardol (µg/mL)	CBM Cardol (µg/mL)
<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC903	12,5	25
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	12,5	25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	25	50

3.2 EFEITO DO CARDOL NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

O uso do cardol foi capaz de reduzir a formação de biomassa contra as cepas *S. mutans*, *S. parasanguinis* e *E. Faecalis*, em todas as concentrações testadas (Figura 2). A maior redução de biomassa ocorreu para a cepa *E. faecalis*, reduzindo aproximadamente 96% da biomassa formada na concentração de 1,56 µg/mL (Figura 2C), enquanto a cepa *S. parasanguinis* apresentou redução de aproximadamente 90%, nas concentrações a partir de 3,12 µg/mL (Figura 2B) e *S. mutans* com redução a partir de 1,56 µg/mL (Figura 2A).

Figura 2 – Quantificação de biomassa. Efeito do cardol na formação do biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 (A), *Streptococcus parasanguinis* ATCC903 (B) e *Enterococcus faecalis* ATCC19433 (C).

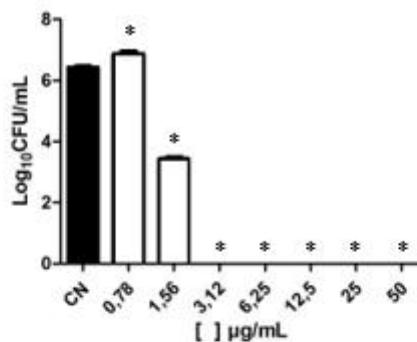


Cardol (branco) e controle negativo (preto). As barras de erro indicam o desvio padrão calculado a partir de três repetições. * $p < 0,05$ indica diferença significativa (One Way Anova seguido de pós-teste de Bonferroni) em comparação com o grupo não tratado (grupo controle).

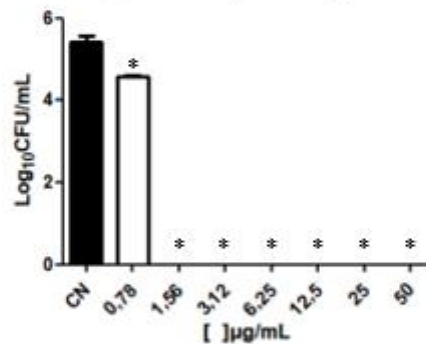
O cardol reduziu a viabilidade das células do biofilme para todas as cepas testadas, exceto contra o *S. mutans* na contração de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3A), na qual houve aumento do número de UFC. As cepas *S. parasanguinis* e *E. Faecalis* mostraram redução similar nas concentrações a partir de 0,78 $\mu\text{g/mL}$, com ausência de crescimento bacteriano a partir da concentração de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3B e 3C).

Figura 3 – Viabilidade das células no biofilme. Análise do efeito do cardol na inibição do biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 (A), *Streptococcus parasanguinis* ATCC903 (B) e *Enterococcus faecalis* ATCC19433 (C).

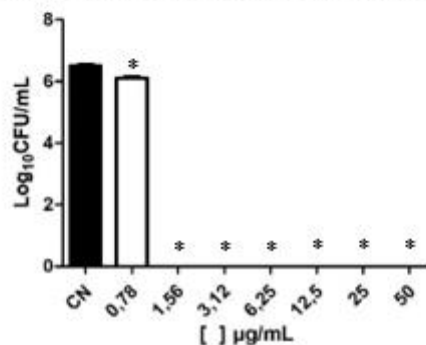
(A) Cardol x *Streptococcus mutans* UA159



(B) Cardol x *Streptococcus parasanguinis* ATCC903



(C) Cardol x *Enterococcus faecalis* ATCC19433



Cardol (branco) e controle negativo (preto). * $p < 0,05$ indica diferença significativa (One Way Anova seguido de pós-teste de Bonferroni) em comparação com o grupo não tratado (grupo controle).

4 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana a antibióticos impulsiona a busca por novas substâncias antimicrobianas (DAGLI et al., 2015). Pesquisas mostram que os extratos vegetais podem ser promissores para o desenvolvimento de novos compostos antibacterianos (FREIRES et al., 2015). No presente estudo, o cardol, um composto isolado do líquido da casca da castanha de caju, foi eficaz contra *S. parasanguinis*, *S. mutans* e *E. faecalis*, bactérias orais relacionadas ao desenvolvimento da cárie dentária e periodontite apical crônica.

As plantas são capazes de sintetizar moléculas orgânicas a partir do seu metabolismo secundário que auxiliam no mecanismo de defesa contra microrganismos, tais substâncias são caracterizadas pela presença de um ou mais substituintes associados ao anel aromático (VIZZOTTO et al., 2010; LI et al., 2014). O cardol é um extrato fenólico, apresentando um núcleo aromático com duas hidroxilas, além de uma cadeia lateral acíclica contendo múltiplas instabilidades na cadeia alifática, resultando em comportamento anfipático (Figura 1) (ALBAYRAK, 2011; ALVES et al., 2013; LI et al., 2014; OH et al., 2017). Sua porção hidrofóbica é capaz de penetrar na membrana celular bacteriana e ocasionar extravasamento de constituintes intracelulares essenciais com consequente morte celular (OH et al., 2017).

Estudos anteriores mostraram o potencial antimicrobiano de diversas partes do cajueiro, tais como casca da amêndoa, bagaço do pedúnculo do caju, folhas e cascas do caule, atuando contra microrganismos associados a infecções orais (KUBO et al., 1993; FURTADO et al., 2014; ANAND et al., 2015; ARAÚJO et al., 2018; SOUZA, et al., 2022). O extrato do bagaço do caju demonstrou inibição do crescimento bacteriano de *S. mutans*, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (FURTADO et al., 2014). Já o extrato etanólico extraído de folhas secas do caju pelo método de maceração, mostrou atividade bacteriostática e bactericida contra a mesma cepa, nas concentrações de 78,12 $\mu\text{g/mL}$ e 156,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ANAND et al., 2015).

No presente estudo, o cardol apresentou atividade inibitória contra cepas *S. parasanguinis* e *S. mutans* na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando sua capacidade antimicrobiana numa concentração até 20 vezes menor quando comparado ao extrato do bagaço do caju (FURTADO et al., 2014). Por outro lado, a avaliação antimicrobiana do LCC evidenciou resultados similares ao nosso estudo, ainda que o componente majoritário não seja

o cardol (SOUZA et al., 2022). Apesar do mecanismo antibacteriano do LCC e de seus derivados não ser totalmente esclarecido, estudos prévios sugerem que o efeito inibitório sobre as bactérias é devido à redução da atividade metabólica, interação com a membrana celular e inibição da síntese de ácido nucléico, ocasionando a supressão da divisão celular bacteriana (SMITH; ZOETENDAL; MACKIE, 2005; CUSHNIE et al., 2011; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018).

Em relação aos biofilmes orais, o *S. mutans* é considerado um importante patógeno relacionado a cárie dentária devido à sua capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares (EPS) a partir da sacarose (KLEIN et al., 2015). A matriz EPS tem sido relatada como fator de virulência para indução da cárie dental, uma vez que sua ligação à película adquirida permite o acúmulo de outro microrganismos e subsequente desenvolvimento do biofilme (GRÖNROOS; ALALUUSUA, 2000; KLEIN et al., 2015; LIMOLI et al., 2015). O ensaio de quantificação de biomassa pigmenta em violeta as bactérias e a matriz de biofilme circundante. Portanto, podemos sugerir que o cardol reduziu a produção de EPS de *S. mutans*.

O cardol inibiu a viabilidade celular nas concentrações mais elevadas (3,12 a 100 µg/mL). Contudo, na menor concentração analisada (0,78 µg/mL) houve aumento do número de UFC quando comparado ao controle negativo. Isso provavelmente ocorre devido a presença da substância que em baixa concentração não conseguiu desempenhar atividade antimicrobiana, mas que induziu as bactérias se multiplicarem, como forma de resistência ao composto presente no meio de cultura.

A presença de *E. faecalis* no sistema de canais radiculares está relacionada a etiologia da periodontite apical crônica (JHAJHARIA et al., 2015). Esta cepa possui fatores de virulência como a proteína de superfície (EPS), responsável pela colonização inicial e resistência bacteriana, e a produção de gelatinase (SEMEDO et al., 2003; RAHIMI et al., 2014; JHAJHARIA et al., 2015). Após o tratamento endodôntico, a persistência do *E. Faecalis*, principalmente na forma de biofilme, ocasiona infecções secundárias (JHAJHARIA et al., 2015). Além disso, estudos anteriores mostram que cepas de *E. faecalis* de infecções radiculares apresentam certa resistência frente aos principais fármacos prescritos por cirurgiões-dentistas e medicações intracanal, carecendo de novas estratégias antimicrobianas (RAHIMI et al., 2014; PINHEIRO & MAYER, 2014). Nesse estudo, o cardol reduziu 100% da viabilidade celular da cepa isolada de *E. faecalis* a partir da concentração de 1,56 µg/mL.

De acordo com Souza et al. (2022) e Moreira et al. (2017), o cardol não causou pigmentação dentinária quando aplicado sobre a dentina desmineralizada e sua incorporação em sistema adesivo não pigmentou significativamente o material. Esse resultado provavelmente

tem relação com o seu baixo peso molecular e baixa capacidade de formar estruturas poliméricas (MOREIRA et al., 2017). Por ser uma substância de baixo custo, biodisponível e com comprovada atividade antibacteriana, o cardol poderia ser adicionado a materiais odontológicos, tais como enxaguatórios bucais, cremes dentais, materiais restauradores e curativos intracanaís. No entanto, estudos devem ser realizados para análise do efeito sobre biofilmes pré-formados e em biofilmes multiespécies, bem como avaliação da citotoxicidade nas concentrações analisadas.

5 CONCLUSÃO

O cardol apresentou atividade antibacteriana contra *S. mutans*, *S. parasanguinis* e *E. faecalis*, com redução da biomassa do biofilme e redução da viabilidade celular. Portanto, o cardol é um agente antimicrobiano promissor contra bactérias associadas a cárie e a periodontite apical crônica.

REFERÊNCIAS

1. ALBAYRAK, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in turkey. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 547–554, 2012.
2. ALVES, M. J. et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.
3. ANAND, G. et al. 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.
4. AZIZAN, N. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *orthosiphon stamineus* benth and *ficus deltoidea* jack against pathogenic oral bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 12, 2017.
5. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition**. Disponível em: <www.clsi.org>. Acessado em: 28 de maio de 2022.
6. CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38 p. 99-107, 2011.
7. DA SILVA, B. R. et al. Antibacterial activity of a novel antimicrobial peptide [W7]KR12-KAEK derived from KR-12 against *Streptococcus mutans* planktonic cells and biofilms. **Biofouling**, v. 33, n. 10, p. 835–846, 2017.
8. DAGLI, N. et al. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 5, n. 5, p. 335-340, 2015.
9. DE ARAÚJO, J. S. C. et al. 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.
10. FEJERSKOV, O. Community Dentistry and Oral Epidemiology Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 25, p. 5–12, 1997.
11. FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. **Nature Publishing Group**, v. 14, p. 563-575, 2016.
12. FREIRES, I. A. et al. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, v. 20, p. 7329-7358, 2015.

- 13.FUGOLIN, A. P. P.; PFEIFER, C. S. New Resins for Dental Composites. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 10, p. 85-91, 2017.
- 14.FURTADO, M. A. M. et al. Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. **R. bras. Bioci**, v. 12, n. 1, p. 9-13, 2014.
- 15.GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-Specific Oral Colonization of Mutans Streptococci Detected by Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting. **Caries Research**, v. 34, p. 474-480, 2000.
- 16.JHAJHARIA, K. et al. Biofilm in endodontics: A review. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.
- 17.KAMATH, V.; RAJINI, P. S. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 428–433, 2007.
- 18.KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of untreated caries: A systematic review and meta-regression. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 5, p. 650–658, 2015.
- 19.KHALIFA, L. et al. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2696–2705, 2015.
- 20.KLEIN, M. I. et al. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1-8, 2015.
- 21.KOLENBRANDER, P. E. et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 471-480, 2010.
- 22.KUBO, I. et al. Structure-Antibacterial Activity Relationships of Anacardic Acids. **J. Agric. Food Chem**, v.41, n.6, p.1016-1019, 1993.
- 26.LI, A. N. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020-6047, 2014.
- 24.LIMA, C. A. DE A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. DE A. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 358–362, 2000.
- 25.LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–30, 2015.
- 26.LOMONACO, D.; MAIA, F.J.N.; MAZZETO, S.E. Thermal evaluation of cashew nutshell liquid as new bioadditives for poly(methyl methacrylate). **J. Therm Anal Calorim.** v. 111, p. 619–626, 2013.
- 27.LOMONACO, D.; MELE, G.; MAZZETTO, S. E. **Cashew nutshell liquid (CNSL): From an agro-industrial waste to a sustainable alternative to petrochemical resources.** Cashew Nut Shell Liquid: A Goldfield for Functional Materials (p. 19-38). Online. Springer

International Publishing, 2017. *E-book*. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/978-3-319-47455-7_2>. Acessado em: 28 de maio de 2022.

28.MACHIULSKIENE, V. et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. **Caries Research**, v.54, p. 7-14, 2020.

29.MAZZETTO, S. E; LOMONACO, D.; MELE, G. Oleo Da Castanha De Caju: Oportunidades E Desafios No Contexto Do Desenvolvimento E Sustentabilidade Industrial. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 732–741. 2009.

30.MELO CAVALCANTE, A. A. et al. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 5, p. 360–369, 2003.

31.MOREIRA, M. A. et al. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linkings. **Dental Materials**, v. 33, n. 10, p. 1103-1109, 2017.

32.OH, S. et al. Potency of cashew nut shell liquid in rumen modulation under different dietary conditions and indication of its surfactant action against rumen bacteria. **Journal of Animal Science and Technology**. v. 59, n. 1, p. 1-7, 2017.

33.PARISOTTO, T. M. et al. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 5, p. 365–373, 2010.

34.PINHEIRO, E. T.; MAYER, M. P. A. *Enterococcus faecalis* in Oral Infections. **J Interdiscipl Med Dent Sci**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2014

35.PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17030, p. 1-16, 2017.

36.RAHIMI, S. et al. A Review of Antibacterial Agents in Endodontic Treatment. **Iranian Endodontic Journal**, v. 9, n. 3, p. 161-168, 2014.

37.SEMEDO, T. et al. Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates To Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. **J. Clin. Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 2569-2576, 2003.

38.SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 1717, p. 1-15, 2016.

39.SMITH, A. H.; ZOETENDAL, E.; MACKIE, R. I. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. **Microbial Ecology**, v. 50, p. 197-205, 2005.

40.SOUZA, N. O. et al. Cashew nut shell liquids: Antimicrobial compounds in prevention and control of the oral biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 133, p. 1-10, 2022.

41. STASIUK, M.; KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 841-860, 2010.
42. TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188–197, 2006.
43. VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G.E.B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p. – Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316. 2010. ISSN 1516-8840.
44. WANG, H. et al. Novel dental composite with capability to suppress cariogenic species and promote non-cariogenic species in oral biofilms. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, p. 587–596, 2019.
45. WANG, Q. Q. et al. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Journal of Oral Science**, v. 4, n. 1, p. 19–23, 2012.
46. ZERO, D. T. et al. The Biology, Prevention, Diagnosis and Treatment of Dental Caries. **The Journal of the American Dental Association**, v. 140, p. 25-34, 2009.
47. ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1207-1213, 2015.