

4.03.01 - Farmácia / Farmacotecnia.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÁRIE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO.

Jennifer Thayanne C. de Araújo^{1*}, Ramille A. Lima², Henrique Duarte da F. Filho³, Francisco J. Otero Espinar⁴, Francisco Fábio Oliveira de Sousa⁵

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAP
2. Docente do Curso de Odontologia do Centro Universitário Unichristus
3. Docente do Curso de Física da UFAM
4. Docente do Curso de Farmácia da Universidad de Santiago de Compostela
5. Docente do Curso de Farmácia da UNIFAP/ Orientador

Resumo:

O ácido anacárdico, obtido a partir das cascas da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L) apresenta comprovada atividade antibacteriana. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial e a funcionalidade de nanopartículas poliméricas carregadas com ácido anacárdico. Os nanocarreadores foram caracterizados em termos de tamanho, potencial zeta e pH, e submetidos a soluções simulando o entorno biológico da cavidade oral. Avaliou-se ainda a sua atividade antienzimática, antioxidante, Substantividade em esmalte dentário e atividade antimicrobiana frente à *Streptococcus mutans*. As nanopartículas desenvolvidas após uma única aplicação em blocos de esmalte dentário bovino apresentaram substantividade quando submetidas a um fluxo salivar simulado, além de inibir completamente a formação do biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans* durante 5 dias. Mantiveram-se estáveis e ativas em doses mínimas, representando um grande potencial na prevenção e tratamento da cárie dentária.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; Cárie; Nanotecnologia.

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq, UNIFAP

Introdução:

O ácido anacárdico é um composto isolado do líquido das cascas da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) que apresenta diferentes atividades biológicas já comprovadas, tais como anti-inflamatória (MAMIDYALA et al., 2013), larvicida (OLIVEIRA et al., 2011), antioxidante (OLIVEIRA et al., 2011) e antibacteriana (HAMAD; MUBOFU, 2015), apresentando melhores resultados frente às bactérias Gram-positivas, a exemplo do *Streptococcus mutans*, principal microrganismo relacionado a formação do biofilme cariogênico (LIMA et al., 2000; MELO JUNIOR et al., 2015).

Dentre as patologias de cavidade oral, a cárie é a mais comum, acometendo, crianças, jovens, adultos e idosos (ALLAKER; DOUGLAS, 2015). Está associada a uma higiene pessoal precária e a hábitos alimentares inadequados (GARBIN et al., 2015). A presença de bactérias com propriedades acidogênicas e acidúricas, na superfície do esmalte dentário permite a formação de ácidos que diminuem o pH e provocam a sua desmineralização (SOUSA et al., 2014; YANG et al., 2016).

O uso de agentes antibacterianos *in situ* representa uma alternativa valiosa para aperfeiçoar o tratamento cariogênico. Nos últimos anos tem se buscado novos métodos de profilaxia e tratamento, mais custo-efetivos e com menos efeitos adversos do que os agentes utilizados atualmente frente às bactérias presentes na cárie e em suas derivações. Tais estratégias vêm sendo associadas aos mais modernos avanços tecnológicos, dentre os quais se destaca a nanotecnologia (LAKADE; SHAH; SHIROL, 2014; ALLAKER; DOUGLAS, 2015). O agente antisséptico padrão-ouro para uso Odontológico é o digluconato de clorexidina, que apesar da sua efetividade, apresenta algumas desvantagens, como o enfraquecimento ósseo, o manchamento das estruturas dentárias, desnaturação das papilas gustativas, tendo sido inclusive relacionado a alterações genotóxicas no epitélio bucal (LAKADE; SHAH; SHIROL, 2014; PEGORARO et al., 2014).

Em estudos anteriores realizados dentro do nosso grupo de pesquisa foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas carregadas com o ácido anacárdico, as quais apresentaram resultados bastante promissores. Neste sentido, buscou-se aprimorar estes achados, avaliando os aspectos biofarmacêuticos inerentes ao seu uso como agente profilático no tratamento da cárie dentária.

Metodologia:

As nanopartículas a base de zeína foram previamente desenvolvidas e caracterizadas, sendo denominadas: nanopartículas poliméricas carregadas com ácido anacárdico (NanoA_A) (9,375 µg/mL, nanopartículas brancas desprovidas de fármaco (NanoB₁), dispersão do polímero no veículo (NanoB₂). As

formulações foram imersas em saliva artificial (soluções desmineralizadora (pH 4,5) – simulando a saliva durante a alimentação, remineralizadora (pH 7,0) – simulando a saliva pós-prandial) e água (pH 5,4) (controle) na proporção 1:10 com o intuito de verificar a sua estabilidade frente as mudanças de pH próprias da cavidade oral, sendo analisadas as alterações no tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (Zetasizer® Nano-ZS, Malvern Instruments) e pH (pHmetro digital Bante930 Benchtop pH/ORP/Ion Meter).

O ácido anacárdico e as nanopartículas foram submetidos a testes *in vitro* com o intuito de se avaliar os seus efeitos biológicos. Primeiro avaliou-se a sua capacidade inibitória das enzimas colagenase e elastase, conforme a metodologia utilizada por Thring et al. (2009). Na determinação da atividade anti-colagenase ($\lambda=335$ nm) e elastase ($\lambda=381$ nm) foi utilizado o kit adquirido da Abcam® (EUA). A atividade antioxidante de ambos foi determinada através do monitoramento do consumo do radical livre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich). As amostras foram adicionadas ao DPPH (40 $\mu\text{g/mL}$) (CHAVES et al, 2010) na proporção de 1:10. A análise foi avaliada pelo decréscimo das absorvâncias medidas no comprimento de onda de $\lambda= 516$ nm em espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro - Modelo SP22).

A atividade antibacteriana da nanopartículas polimérica (NanoA_A, NanoB₁ e NanoB₂), digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX) e etanol a 35% como controles positivo e negativo, respectivamente, foi obtida através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) (NCCLS, 2006), e *a posteriori* através do modelo de formação do biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610) *in vitro*, baseado na metodologia de Duarte (2006). As UFC foram transformadas em \log_{10} UFC para reduzir a heterogeneidade de variância, conforme descrito por Lima (2014).

Por último, foi avaliada a substantividade das nanopartículas em blocos de esmalte dentário bovino (4x4x3 mm) com o auxílio de um microscópio de força atômica (AFM) (Nanosurf, modelo EasyScan 2 FlexAFM). Os blocos foram analisados superficialmente, antes e após o contato com as nanopartículas e em seguida após imersão em água e em saliva humana durante 7 dias, determinando a sua capacidade adsorviva em função do tempo.

Os dados referentes a cada ensaio foram expressos sob a forma de média aritmética \pm desvio padrão. Foram submetidos ao teste de normalidade e variância (ANOVA) e em seguida comparados aos pares através do teste de Tukey (com nível de significância de 5%). Foi utilizado o software Prism 5.0 para realização das análises.

Resultados e Discussão:

As nanopartículas poliméricas de zeína carregadas com ácido anacárdico íntegras apresentam pH 4,4 e após imersão nas soluções desmineralizante e remineralizante apresentaram pH 4,5 e 6,5, respectivamente.

A polidispersão das nanopartículas sofreu aumento considerável após o seu contato com a solução remineralizante, notado pela quebra ou aglomeração do sistema; sendo por outro lado pouco alterada no contato com a solução desmineralizante e água. Neste sentido, a partir da modificação programada do pH o sistema poderia ser desfeito e retirado da superfície dentária, o que aponta uma ligação reversível decorrente da sua aderência. O potencial zeta de todas as nanopartículas foi alterado, porém diferente dos seus pares, a NanoA_A não apresentou inversão de cargas, o que lhe confere uma maior estabilidade. Segundo Zhang et al. (2011), ao entrar em contato com o meio ácido a zeína tende a formar partículas maiores. Como pode ser observado, em meio ácido ocorreu uma pequena alteração no pH, o que acarretou poucas alterações nas nanopartículas, inclusive notado pela manutenção do potencial zeta negativo.

A estabilidade das NanoA_A em pH ácido, a exemplo da solução desmineralizante (pH 4,5) e água (pH 5,4) poderia fornecer proteção ao esmalte dentário sob o ponto de vista mecânico, considerando a adsorção das mesmas ao esmalte, (GREEN et al., 2008; SOUSA et al., 2014; YANG et al., 2016), associada ainda ao efeito antimicrobiano excepcional proveniente do ácido anacárdico.

Uma inibição moderada das enzimas colagenase e elastase pelo ácido anacárdico foi observada, comparativamente ao padrão utilizado (ácido elágico). Segundo Thring et al., (2009), valores de inibição entre 20 a 40 % são considerados moderados para ambas as enzimas. O efeito observado frente a estas enzimas é importante no que tange a preservação e/ou regeneração dos tecidos conjuntivos constituintes da mucosa oral e do tecido periodontal adjacente aos biofilmes bacterianos relacionados às cáries dentárias, reforçando o seu papel na terapêutica.

As nanopartículas de ácido anacárdico (NanoA_A) apresentaram concentração de inibição 50% (IC₅₀) de $18,78 \pm 2,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pelo menos 3 vezes inferior ao ácido anacárdico isolado ($50 \pm 0,88 \mu\text{g.mL}^{-1}$), demonstrando que a incorporação deste bioativo ao nanocarreador melhorou sobremaneira a sua atividade antioxidante ($p < 0,001$). Morais et al. (2017) avaliaram a atividade antioxidante dos ácidos anacárdicos (C_{15:3}, C_{15:2}, C_{15:1}) nas concentrações de 10 a 1 ppm e demonstraram que há diferença nos valores de IC₅₀ de acordo com as insaturações da cadeia acíclica, sendo o ácido anacárdico C_{15:3} o que possui melhor atividade antioxidante IC₅₀ $810 \pm 130 \mu\text{g/mL}$, resultado este inferior ao que foi obtido no presente estudo.

Foi verificado ainda que a própria dispersão da proteína zeína no veículo das nanoformulações (NanoB₂) apresentou uma elevada atividade antioxidante, o que certamente potencializou o efeito do ácido anacárdico após a sua encapsulação no nanocarreador.

Na avaliação da atividade antimicrobiana frente à *Streptococcus mutans* a NanoA_A apresentou tanto CIM e CBM de $0,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$, NanoB₁ com CIM de $89,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM de $178,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a CHX com CIM e CBM de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, as NanoA_A nas condições ensaiadas demonstrou ser ao menos 100 vezes mais potente frente ao *S. mutans* que o digluconato de clorexidina, agente antisséptico mais utilizado nos

tratamentos odontológicos (PINHEIRO, 2012). No ensaio de formação do biofilme de *S. mutans in vitro* constatou-se que as NanoA_A foram capazes de inibir a formação inicial do biofilme bacteriano de modo semelhante ao grupo tratado com a CHX a 0,12%. As nanopartículas controles (NanoB₁ e NanoB₂) não foram capazes de inibir o crescimento do biofilme bacteriano, não apresentando ainda qualquer diferença estatística entre elas, NanoB₂ (6,39±0,13) e NanoB₁ (6,72±0,11) (p>0,05).

A formulação NanoA_A apresentou resultados promissores quanto a sua adsorção na superfície de esmalte dentário bovino. Após um contato de apenas 30 segundos com a formulação foi possível observar o aumento da rugosidade na superfície do bloco. A avaliação da aderência das nanopartículas poliméricas carregadas com ácido anacárdico em função do tempo, evidenciou que as mesmas foram liberadas de modo gradativo, quando mantidas em contato com saliva humana sob agitação ao longo de 7 dias. Ao se comparar a última leitura (168h) e o esmalte dentário bovino antes do contato com a formulação, observou-se a similaridade em termos de rugosidade e topografia (p>0,05) indicando que as nanopartículas teriam sido quase totalmente liberadas da superfície do bloco ao longo do período de avaliação, demonstrando a sua substantividade reversível neste substrato, o que respaldaria o não comprometimento estético do esmalte dentário. De modo contrário, as nanopartículas controle (NanoB₁ e NanoB₂) foram rapidamente desassociadas, não permanecendo aderidas ao substrato dentário, reforçando o papel do ácido anacárdico na substantividade das nanopartículas.

Conclusões:

O ácido anacárdico apresentou resultados satisfatórios quanto à inibição enzimática (anticolagenase e antielastase) e ainda mais expressivos quanto a sua atividade antioxidante, sendo notório o incremento desta após a sua incorporação às nanopartículas poliméricas. As nanopartículas carregadas com ácido anacárdico apresentaram substantividade apropriada e reversível na superfície do esmalte dentário, permitindo a sua permanência por até 7 dias, atividade bactericida e bacteriostática em concentrações extremamente baixas e potência ao menos 100 vezes superior ao digluconato de clorexidina a 0,12%, além da capacidade de impedir a formação do biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans* em um modelo *in situ*, de modo semelhante ao digluconato de clorexidina, padrão ouro para a antisepsia da cavidade oral. As nanopartículas desenvolvidas resistiram ainda à condição ácida, semelhante ao encontrado na cavidade oral após a ingestão de alimentos, quando a proliferação e o metabolismo bacterianos encontram-se mais ativos, e momento mais oportuno para o seu controle. Portanto, agiram mecânica e biologicamente frente à desmineralização decorrente do metabolismo bacteriano, preservando ainda o elemento estético e o conteúdo mineral do esmalte, uma vez que a sua associação com a hidroxiapatita não é permanente, o que, por conseguinte levaria ao enfraquecimento dentário, contrariamente ao que ocorre com a clorexidina. O ácido anacárdico a partir do seu beneficiamento nanotecnológico logrou prevenir a deposição, aderência e proliferação bacteriana, mecanismos primordiais na casuística da cárie dentária, podendo ser ensaiadas como potencial alternativa na profilaxia e tratamento da cárie dentária.

Referências bibliográficas

- ALLAKER, R. P; DOUGLAS, C. W. I. Non-conventional therapeutics for oral infections Non-conventional therapeutics for oral infections. **Virulence**, v.6, n.3, p.196-207, 2015.
- CHAVES, M. H; CITÓ, A. M. G. L; LOPES, J. A. D; COSTA, D. A da; OLIVEIRA, C. A. A. de; COSTA, A. F; BRITO JUNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.1, p.106-112, 2010.
- DUARTE, S; GREGOIRE, S; SINGH, A. P; VORSA, N; SCHAICH, K; BOWEN, W. H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 257, n.1, p. 50-56, 2006.
- GARBIN, C. A. S; SOARES, G. B; DÓCUSSE, F. R. M; GARBIN, A. J. Í; ARCIERI, R. M. Oral health education in school: parents' attitudes and prevalence of caries in children. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.44, n.5, p.285-291, 2015.
- GREEN, I. R; TOCOLI, F. E; LEE, S. H; NIHEI, K; 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 Sciences**, v.16, p.8569-8590, 2015.
- LAKADE, L; SHAH, P; SHIROL, D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the *Streptococcus mutans* count in plaque. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.32, n.2, p.91-96, 2014.
- 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. **Food Science and Technology**, v.20, n.3, p.358-362, 2000.
- LIMA, R. A. **Estudos da ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes de *Streptococcus mutans* – efeito**

- na viabilidade bacteriana e na matriz de polissacarídeos.** Tese de doutorado em Odontologia, UFC, Fortaleza, 2014.
- MAMIDYALA, S. K; RAMU, S; HUANG, J. X; ROBERTSON, A. A. B; COOPER, M. A. Efficient synthesis of anacardic acid analogues and their antibacterial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, p.1667–1670, 2013.
- MELO JÚNIOR, P. M. R. de; SOBRAL, A. P. V; SAMPAIO, G. C; PINTO, I. M. A; SHINOHARA, N. K. S. Evolution of cariogenic antibacterial activity of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.63, n.2, p.181-186, 2015.
- MORAIS, S. M; SILVA, K. A; ARAUJO, H; VIEIRA, I. G. P; ALVES, D. R; FONTENELLE, R. O. S; SILVA, A. M. S. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, v.10, p.1-10, 2017.
- NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** 7th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA); 2006.
- OLIVEIRA, M. S. C; MORAIS, S. M. de; MAGALHÃES, D. V; BATISTA, W. P; VIEIRA, Í. G. P; CRAVEIRO, A. A; MANEZES, J. E. S. A. de; CARVALHO, A. F. U; LIMA, G. P. G. de. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut Shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v. 117, p.165-170, 2011.
- PEGORARO, J; SILVESTRI, L; CARA, G; STEFENON, L; MOZZINI, C. B. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. **Journal Oral Investigations**, v.3, n.1, p.33-37, 2014.
- PINHEIRO, M. A. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. **Revista Brasileira Promoção de Saúde**, v.25, n.2, p.197-201, 2012.
- SOUSA, F. F. O; FERRAZ, C; RODRIGUES, L. K. A; NOJOSA, J. S; YAMAUTI, M. Nanotechnology in dentistry: drug delivery systems for the control of biofilm-dependent oral diseases. **Current Drug Delivery**, v.11, p.719-728, 2014.
- THRING, T. S. A; HILI, P; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC complementary and Alternative Medicine**, v.9, n.27, p.1-11, 2009.
- ZHANG, B; LUO, Y; WANG, Q. Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidante properties of alfa-zeína. **Food chemistry**, v.124, p.210-220, 2011.
- YANG, H; BI, Y; SHANG, X; WANG, M; LINDEN, S. B; LI, Y; LI, Y; NELSON, D. C; WEI, H. Antibiofilm activities of a novel chimeolysin against *Streptococcus mutans* under physiological and cariogenic conditions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.12, p.7436-7443, 2016.