

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

MANUELA ALMEIDA MONTENEGRO

**EFEITO DO EXTRATO DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DE CAJU (*Anacardium
occidentale L.*) CONTRA *Streptococcus mutans***

**SOBRAL – CE
2012**

MANUELA ALMEIDA MONTENEGRO

EFEITO DO EXTRATO DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*) CONTRA *Streptococcus mutans*

Dissertação submetida à Coordenação de Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos

SOBRAL – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – Campus de Sobral

F988e Furtado, Manuela Almeida Montenegro.

Efeito antimicrobiano do extrato do bagaço de pedúnculo de caju (*anacardium occidentale* L.) contra *streptococcus mutans*. / Manuela Almeida Montenegro Furtado. – 2012.

66 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.

Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientação: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos.

1. *Anacardium*. 2. Agentes antibacterianos I. Título.

CDD 615.1

MANUELA ALMEIDA MONTENEGRO

EFEITO DO EXTRATO DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*) CONTRA *Streptococcus mutans*

Dissertação submetida à Coordenação de Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos

Aprovada em ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda (Membro)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras (Membro)

Universidade Federal do Ceará - UFC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, Luís e Clara, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por encorajar-me, dando-me força para vencer esta caminhada.

A meu esposo, Luís, por fazer parte dos momentos mais importantes e felizes da minha vida. Obrigada por sua paciência, carinho e amor.

À minha filha Clara, por deixar os meus dias mais coloridos, alegres e doces. Aos meus pais, Raimilson e Elcia, por apoiarem-me em todas as minhas decisões e ensinarem-me a caminhar sempre pelo caminho do bem.

À minha irmã Daniella, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos, por acreditar no meu potencial e orientar-me de forma tão tranquila. Obrigada, também, pela enorme compreensão no momento mais feliz da minha vida, o nascimento da minha filha.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda, por receber-me tão bem no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS).

Ao Prof. Dr. Victor Carneiro, por ajudar-me em todos os momentos em que precisei, principalmente, durante os experimentos.

Aos Profs. Drs. Vassiliepe (Vavá) e Theodora Thays sempre dispostos a ajudar.

Aos meus colegas de turma e agora amigos, Gisvane, Anderson, Nairley, Ellen, Gleiciane, Luciana, Robério, Ronaldo, Julianne, Anderson, Daniel, Nágila e, em especial, Danielle e Flávio.

Aos amigos do Laboratório Integrado de Biomoléculas, Rafaela, Érika, Humberlândia, Wandy, Mari, Bruno e Victor Aragão.

À Francisca das Chagas, pela parceria durante os experimentos.

À minha amiga Aline Carvalho, pela companhia neste mundo da pesquisa.

Aos professores do Programa de Biotecnologia, em especial, aos Profs. Drs. Vicente Pinto e Mirna, meus amigos pessoais.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, campus de Sobral representado pelos docentes e funcionários pelo empenho na formação científica e acadêmica de seus pós-graduandos;

EPÍGRAFE

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza da Calcutá.

RESUMO

O *Anacardium occidentale L.*, conhecido popularmente como cajueiro, ocupa um lugar importante entre as plantas frutíferas devido à crescente comercialização dos seus principais produtos. No nordeste brasileiro, seu cultivo é uma das principais atividades agropecuárias da região. Concentrando-se nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, é utilizado na medicina tradicional para diversos fins terapêuticos, inclusive, como antimicrobiano. O bagaço do caju é obtido após a extração do suco, sendo uma importante fonte de resíduos da agroindústria. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme do extrato hidroalcoólico do bagaço do pedúnculo do caju (EBPC) frente a bactéria *Streptococcus mutans*. No presente estudo, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e avaliou-se a inibição da formação de biofilme através da quantificação da biomassa. Para isso, utilizou-se a cepa de *S. mutans*. Os resultados dos ensaios antimicrobianos mostraram que o EBPC teve ação bacteriostática (CIM = 250 µg.mL⁻¹) e bactericida (CBM = 1000 µg.mL⁻¹). Observou-se inibição da biomassa na concentração mínima de 250 µg.mL⁻¹. Deste modo, concluiu-se que o EBPC apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme frente ao *S. mutans*. Estes resultados demonstraram o potencial do EBPC como um possível produto biotecnológico na área da odontologia.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale Lin*; cajueiro; *Streptococcus mutans*; antimicrobiano; antibiofilme.

ABSTRACT

The *Anacardium occidentale L.*, popularly known as cashew tree, occupies an important place among the fruit trees due to the increasing commercialization of its main products. In northeastern Brazil, its cultivation is one of the main agricultural activities in the region. Concentrating in the states of Ceará, Piauí and Rio Grande do Norte, it is used in folk medicine for various therapeutic purposes, including as an antimicrobial. The cashew apple bagasse is obtained after extracting the juice, being a major source of waste of agribusiness. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm potential of the hydroalcoholic extract of the cashew apple pomace (ECAP) against the *Streptococcus mutans*. It was determined the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and the preventive assay for biofilm formation through biomass quantification. The *Streptococcus mutans* strain UA159 was used for this intention. The antimicrobial assay results showed that the ECAP was considered bactericidal (250 μ g.mL) and was considered bactericidal at the concentration of 1000 μ g.mL. Inhibition in the biomass was observed at the minimum concentration of 250 μ g.mL. Thus, it was concluded that the EPAC shows antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans*. These results demonstrate the potential of the ECAP as a possible biotechnological product in the field of dentistry.

Keywords: *Anacardium occidentale Lin*; cashew tree; *Streptococcus mutans*; antimicrobial; antibiofilm.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Anacardium occidentale</i> L	17
FIGURA 2 - Amostras de caju de pendúculovermelho.....	19
FIGURA 3 - Diagrama de NewBrum	23
FIGURA 4 - <i>S. mutans</i>	25
FIGURA 5 - Biofilme oral.....	27
FIGURA 6 - Formação do biofilme microbiano na superfície do esmalte dentário.	30
FIGURA 7 - Desenho esquemático do planejamento experimental para preparação do extrato (EBCP)	34
FIGURA 8 - Desenho esquemático do planejamento experimental para avaliação da concentração inibitória mínima do EBPC variando sua concentração de 1000 – 7,8 μ g/mL. Na placa de 96 poços fundo “U”, contém ainda o controle negativo e positivo, a clorexidina.....	36
FIGURA 9 - Desenho esquemático do planejamento experimental para avaliação da prevenção da formação do biofilme variando sua concentração de 500 – 15,62 μ g/mL. Na placa de 96 poços fundo “chato”, contém ainda o controle negativo e positivo, a clorexidina.....	38
FIGURA 10 - Atividade antimicrobiana da EBPC do cajueiro <i>A.occidentale</i> L frente à bactéria <i>S.mutans</i> após 24h de crescimento bacteriano. CN – Controle negativo (água) CP – Controle positivo (clorexidina). P < 0,01. O símbolo “+” indica existência de diferença estatisticamente significativa com relação ao CP, enquanto que “-” indica diferença com relação ao CN.....	40
FIGURA 11 - Fotografias de CBM obtidas pelo EBPC contra <i>S.mutans</i>	42
FIGURA 12 - Quantificação da biomassa da de biofilme de <i>S.mutans</i> submetido ao SBPC do cajueiro <i>A.occidentale</i> L após 24h de crescimento bacteriano. CN – Controle negativo (água) CP – Controle positivo (clorexidina). P < 0,01. O símbolo “+” indica existência de diferença estatisticamente significativa com relação ao CP, enquanto que “-” indica diferença com relação ao CN.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
EBPC	Extrato do Bagaço do Pedúnculo do Caju
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL₅₀	Concentração Letal Média
CPO-D	Dentes Cariados Perdidos e Obturados
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LCC	Líquido da casca da castanha do caju
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEC	Polissacarídeos Extracelulares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 PLANTAS MEDICINAS	13
1.2 EXTRATOS	15
1.3 <i>Anacardium occidentale L.</i>	17
1.4 TOXICIDADE	21
1.5 CÁRIE DENTÁRIA	22
1.6 <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	24
1.7 BIOFILMES	26
1.7.1 Formação do biofilme oral	27
1.7.2 Controle de biofilme oral.....	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	34
3.2 ENSAIOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	35
3.2.1 Análise estatística	36
3.3 ENSAIO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA.....	36
3.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	37
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA	38
3.5.1 Análise estatística	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	40
4.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	41
4.3 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME EM PLACAS DE POLIESTIRENO ..	42
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAS

As plantas são fontes naturais de substâncias químicas bioassintetizadoras com inúmeras finalidades, entre elas, protegê-las contra predadores (AGRA et. al., 2008). As vias metabólicas secundárias das plantas dão origem a compostos como taninos, cumarinas, flavanoides, isoflananoides, alcaloides glicosídeos e terpenos (FERREIRA, 2005). A grande variedade de princípios ativos em uma mesma planta é uma característica importante dos compostos obtidos de produtos naturais, sendo o efeito terapêutico proveniente da ação sinérgica entre eles. Os compostos secundários presentes nas plantas também desempenham o papel fundamental de aumentar a estabilidade da substância ativa, conferindo, assim, melhor efeito farmacológico (TUROLLA, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) – *World Health Organization* (WHO, 2000) –, medicamentos fitoterápicos são produtos medicinais que contêm como princípio ativo plantas ou partes de plantas em seu estado natural ou em estado processado, como extratos, óleos essenciais, tinturas, gomas, entre outros (TUROLLA, 2004). A fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal) é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura de doenças, surgiu na China por volta de 3.000 a.C., quando desenvolveram-se estudos sobre as propriedades da cânfora.

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações cedo perceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida através da fala às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada como um tesouro precioso (AGRA et al., 2008).

Foi a partir da revolução industrial no século XIX e do desenvolvimento da química orgânica que as plantas passaram a representar a primeira fonte de

substâncias para o desenvolvimento de novos fármacos. A possibilidade de obtenção de substâncias puras e de modificações químicas permitiu a síntese de compostos mais potentes e seguros (MOURA, 2006).

Após um período de desinteresse pela busca de novos fármacos, na década de 80, as pesquisas foram novamente impulsionadas pelas novas técnicas de isolamento de compostos ativos a partir de substâncias naturais. O desenvolvimento da química analítica, designadamente, através dos modernos métodos cromatográficos, espectrométricos e radioimunológicos, apoiado em aparelhos cada vez mais sofisticados, permitiu um melhor conhecimento da composição química dos fármacos vegetais e da estrutura dos seus componentes ativos. Consequentemente, um maior controle na qualidade, com uma intervenção mais precisa nos aspectos relacionados com obtenção, cultura, colheita, preparação e armazenagem dos fármacos e, também, sobre os processos industriais que envolvem o isolamento dos seus compostos ativos. A identificação de substâncias de amostras complexas, como os extratos, contribuiu para o fortalecimento da utilização dos fitofármacos frente aos fármacos sintéticos (CALIXTO, 2003).

As plantas medicinais representam uma importante fonte terapêutica para várias doenças. Cerca de 20.000 espécies de diversas famílias são utilizadas para este fim. Nos países desenvolvidos, até 80% da população depende dos medicamentos fitoterápicos, movimentando cerca de 5 bilhões de dólares por ano (AGRA et al., 2008). Nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende do uso de fitoterápicos aos cuidados básicos de saúde; sendo, por sua vez, até 80% da população da África, 71% no Chile e 40% na Colômbia, entre outros (ALVES, 2011).

No Brasil, com cerca de 10% de toda a flora mundial, já foram catalogadas mais de 56.000 espécies diferentes de plantas, fato este que justifica a utilização destas desde 1.500, como relataram os portugueses. O conhecimento popular da utilização das mesmas perpetuou-se por várias gerações e ainda é bastante difundido, representando uma alternativa de tratamento. Apesar de ter proporcionado à humanidade produtos com propriedades extraordinárias como os curares, a emetina, a pilocarpina, e outros, continua a ser um país com muitas potencialidades, também neste campo, considerando-se ser menos de 1% as espécies vegetais brasileiras que foram analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico. (TUROLLA, 2004; SILVA, 2012). Um exemplo é o Melxi® (Hebron

Laboratory), um produto medicinal obtido do extrato do abacaxi (*Ananas comosus*), indicado para o tratamento da bronquite e suas manifestações, contribuindo para a fluidificação das secreções mucosas (AGRA et al., 2008). No ano de 1995, passou a existir normatização oficial sobre os medicamentos fitoterápicos no Brasil. A Portaria n.^º 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 31/jan./95, foi revogada de acordo com o artigo 4.^º da Resolução da Diretoria Colegiada n.^º 17, de 24/fev./00 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. O artigo 1.^º da referida resolução aprovou o regulamento técnico visando a normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos no Sistema de Vigilância Sanitária (LIMA JÚNIOR et al., 2005 apud ALVES, 2011).

A utilização de novas técnicas, como genômica e proteômica, aliadas à biodiversidade da flora mundial, ampliou as perspectivas de descoberta de novas drogas contra diversas doenças (SÁ, 2011). Também, há já algum tempo, que a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem mostrado muito interesse no tocante aos sistemas terapêuticos indígenas, especialmente, aqueles que usam medicamentos vegetais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Em contrapartida, é sabido que os micro-organismos que causam prejuízos à saúde humana estão ficando cada vez mais resistentes à maioria dos antimicrobianos já conhecidos, fato este que contribui ao incentivo da procura por medicamentos de ocorrência natural.

1.2 EXTRATOS

Extratos são preparações líquidas, sólidas ou semissólidas obtidas pela extração de drogas animais ou vegetais, secos ou frescos, através de um líquido extrator apropriado, seguido de evaporação total ou parcial (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). O processo de extração das substâncias presentes nas plantas influencia diretamente na qualidade do medicamento. As diferentes polaridades dos solventes utilizados causam diferenças nas concentrações das substâncias no extrato, assim como a instabilidade de alguns constituintes também influencia na qualidade final do medicamento fitoterápico. Pode-se citar como exemplo a extração dos constituintes das flores da camomila, cujos extratos apresentam concentrações

diferentes de flavonoides dependendo do solvente utilizado (etanol, metanol ou isopropanol) (TUROLLA, 2004).

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos que consideramos ser o mais adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50 v/v). Este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas. Caso o extrato apresente efeitos biológicos de interesse, deve-se proceder a um método sistemático de estudo. Neste caso, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semipurificação das substâncias através de suas polaridades. Outros solventes de polaridades similares também podem ser utilizados. No sentido de localizar os princípios ativos, todos os extratos semipuros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos. Recomenda-se sempre utilizar grandes quantidades de planta, pois este fato possibilita determinar também os constituintes presentes em baixas concentrações (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Outra metodologia de semipurificação de extratos consiste na filtração de extratos alcoólicos (metanol ou etanol) brutos em sílica gel com solventes de polaridades crescentes, ocorrendo também uma separação das substâncias pela polaridade. Posteriormente, os extratos semipuros devem ser testados biologicamente e aqueles que apresentarem atividade de interesse deverão ser submetidos aos procedimentos cromatográficos visando ao isolamento e a elucidação estrutural dos princípios ativos. Os métodos mencionados podem ser geralmente usados quando não se conhece a natureza dos compostos químicos ativos presentes na planta em estudo; caso contrário, podem ser utilizados outros métodos específicos. Por exemplo, quando já são conhecidos alcaloides bioativos de outras espécies do gênero em estudo, deve-se proceder o isolamento pelo método específico e tradicional. Além destes, um método alternativo para obtenção

de extratos consiste em macerar a planta em estudo durante vários dias diretamente com solventes de polaridade crescente (MATOS, 1988; IKAN, 1991).

1.3 *Anacardium occidentale L.*

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) pertence ao gênero *Anacardium* da família *Anacardiaceae* e pode ser chamado, também, de cajueiro comum. Há cerca de 600 espécies descritas, com dois centros vegetativos: um na Malásia e outro na América Andina. Estendem-se da zona quente até ambas as zonas temperadas. No Brasil, foram catalogados aproximadamente 40 espécies (SHULTZ, 1963 *apud* ALVES, 2011). É uma planta tropical e desenvolve-se em regiões de alta temperatura e elevadas precipitações (Figura 1). Em baixas temperaturas, há a redução da floração e frutificação. Pode medir cerca de 20 metros de altura em solo favorável; porém, em solos arenosos e secos, geralmente cresce pouco, tornando-se quase rasteiro, muito espalhado e produz frutos pequenos. Suas folhas são ovais, pecioladas, onduladas, alternas e de cor rósea quando novas (ARAÚJO *et. al.*, 2009). As flores são pequenas, de cor amarelo-rosada, pálidas e dispostas em espigas. A produtividade normal do cajueiro comum é de 900kg/ha de castanha e 9Mg/ha de frutos após a estabilização da produção. O início da produção é do 3º ao 5º ano (SANTOS, 2007).

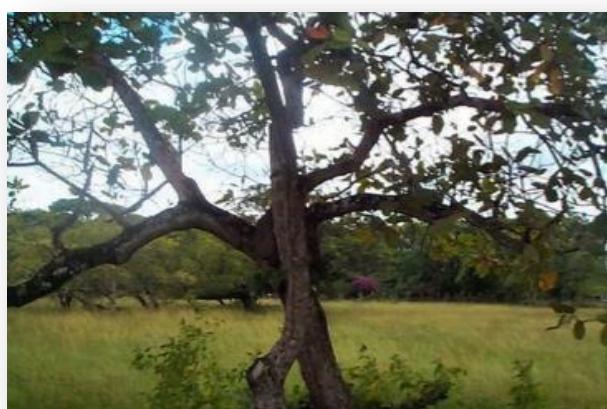


FIGURA 1 - *Anacardium occidentale L.*
Fonte: Santos (2007, p.107)

O cajueiro ocupa um lugar importante entre as plantas frutíferas devido à crescente comercialização dos seus principais produtos: a amêndoia, considerada uma das nozes mais apreciadas do mercado, e o líquido contido no mesocarpo da castanha, o líquido da casca da castanha do caju (LCC), utilizado na fabricação de resinas fenólicas e pós de fricção para a indústria automotiva, além de apresentar propriedades medicinais, vermífugas, antissépticas e vesicantes. O verdadeiro fruto do cajueiro é a castanha de onde é extraída a amêndoia com 2,5 a 3,0cm de comprimento, 2,5cm de largura e coloração marrom-acinzentado. Após o desenvolvimento da amêndoia, o pedúnculo alongado intumesce para formar um pseudofruto chamado “maçã de caju”, de formato piriforme e romboide com 5 a 10cm de comprimento, 4 a 8cm de largura, possui uma casca fina e cerosa de cor vermelho, amarelo ou vermelho e amarelo. A polpa é amarelo pálido, macia, fibrosa, suculenta, adstringente e ácida a subácida, apresenta aroma característico (SEBRAE, 2012). O pedúnculo floral hipertrofiado, pedicelo, hipocarpo ou pseudofruto do cajueiro é a parte polposa, corresponde a cerca de dez vezes o peso da castanha. Apresenta alto valor nutritivo, é um dos frutos mais ricos em vitamina C, com cerca 156 a 387mg/100g, é rico ainda em minerais como cálcio, ferro e fósforo, entretanto, o aproveitamento é insignificante em relação à quantidade de matéria-prima potencialmente disponível (OLSON, 2003, AGOSTINI-COSTA et. al., 2004). Além desses dois principais componentes, as outras partes também podem ser aproveitadas: a sombra da árvore, a casca é adstringente e antidiabética, as flores tóxicas, a raiz purgativa e as sementes nutritivas são empregadas em rações animais (JORGE et al., 1996).

Atualmente a Índia é disparada o maior produtor mundial de castanha de caju e do óleo de castanha, com 90% da produção. O Brasil está em segundo lugar, seguido por Moçambique, Tanzânia e Quênia. No Brasil, a produção está concentrada na região nordeste, nos estados do Ceará, Piauí e Rio de Grande do Norte. Os maiores consumidores de castanha de caju do mundo são os Estados Unidos (SEBRAE, 2012).

Um dado interessante é que o desperdício chega a 94% da produção, valores que chegam a quase 1,5 milhões de toneladas. Entre os fatores que influenciam o elevado desperdício, estão o curto período de pós-colheita associado à pequena capacidade de aproveitamento pela indústria, curto período de safra e a inexistência

de métodos econômicos de preservação da matéria-prima. Além disso, a alta perecibilidade ocasionada pela sua riqueza nutricional exige cuidados especiais para transporte, limpeza e processamento. A indústria de processamento possui segmentos na produção de bebidas, doces, geleias, néctares, farinhas, fermentados e rações. No entanto, o principal produto do pedúnculo continua sendo o suco, embora sua aceitação, no mercado exterior, seja reduzida por causa da adstringência ocasionada pelos taninos (SANTOS, 2007; SEBRAE, 2012).



FIGURA 2 - Amostras de caju de pendúculovermelho
Fonte: Santos (2012, p. 108)

O subproduto do pedúnculo, após a extração do suco, é chamado de bagaço do caju e representa aproximadamente 20% em peso total do pedúnculo. É uma das grandes fontes de resíduos produzidos pela agroindústria. O aproveitamento do bagaço do caju – produto com maior porcentagem de fibras do que seus similares – envolve a fabricação de biscoitos, pães e bolos com alto teor de fibras. Outra alternativa para o aproveitamento é a utilização na composição da ração para o gado e aves. O bagaço do caju pode ser utilizado, também, diretamente na alimentação animal ou ser desidratado para uso posterior. No entanto, é necessário cuidado na formulação para evitar prejuízos ao animal. Conforme estudos, a formulação da ração de ruminantes pode conter até 45% de bagaço de caju. Testes realizados com galinha caipira mostram que o uso de até 30% de bagaço na ração não compromete a produção de carne (SANTOS, 2007; SEBRAE, 2012).

O *Anacardium occidentale L.* é uma fonte de compostos fenólicos. Nos frutos são encontrados lipídios fenólico; e nas folhas, dois grupos químicos principais: flavonoides e taninos. Os flavonoides são pigmentos encontrados frequentemente na natureza e conferem a cor amarelada a alguns vegetais. Estudos demonstraram que esses compostos estão relacionados com a diminuição de doenças cardiovasculares e possuem ação anticarcinogênica, anti-inflamatória e antivirais (BOBBIO; BOBBIO, 2003). O caju apresenta alta concentração de flavonoides por ser rico em quecertina, kaempferol e miricetina (HUBER; AMAYA, 2008). Taninos, por sua vez, são grupos de compostos químicos de origem vegetal que provocam, na pele íntegra, a sensação de adstringência ou “aperto”. Na literatura, são citados teores de tanino de 0,22, 0,28 e 0,58g/100ml, respectivamente, para sucos doce, ácido e adstringente. A cajuína é uma bebida não alcoólica preparada com caju, típica do nordeste do Brasil. Em grande parte é produzida de forma artesanal a partir do suco do caju. O suco é filtrado e misturado à gelatina, que separa o tanino, e, posteriormente, sofre clarificação (SEBRAE, 2012). As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna, exercem efeito antidiarreico e antisséptico; por via externa, impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (AKINPELU, 2001). Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcaloides, pode servir de antídoto em casos de intoxicações. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MONTEIRO et. al., 2005).

Os principais compostos bioativos presentes no caju são os ácidos anacárdicos, biossintetizados a partir de ácidos graxos e constituem cerca de 90% do LCC, em tais concentrações, apresentam propriedades cáusticas e irritantes (TREVISAN, 2006). Quimicamente, o ácido anacárdico é uma mistura de vários compostos orgânicos intimamente relacionados. Cada um consiste de um ácido salicílico substituído com uma cadeia alquílica que tem 15 ou 17 átomos de carbono. O grupo alquila pode ser saturado ou insaturado (ROSEN; FORDICE, 1994).

Uma série de atividades biológicas para os ácidos anacárdicos já foram descritas na literatura, como atividade antitumoral, habilidade em inibir as enzimas

tirosinase, prostaglandina sintase e lipo-oxigenase, bem como são conhecidos por suas atividades antiacne, antibacteriana, moluscicida e antifúngica (ARAÚJO, 2009; ELIAKIM-IKECHUKWU *et. al.*, 2010).

1.4 TOXICIDADE

Anacardium occidentale é utilizada como planta medicinal na América do Sul, bem como na África Ocidental, entretanto estudos de toxicidade desta planta são raros (KONAN *et al.*, 2010).

Ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. O teste de letalidade com *Artemia salina* L. possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo*. O procedimento determina valores de concentração letal média (CL50), em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste. Pesquisas com o extrato metanoico do pedúnculo dos clones CP 06, CP 76 e BRS 189 do caju, demonstraram ausência de toxicidade em *Artemia salina* nas concentrações avaliadas 1 – 10000ppm (SILVA *et. al.*, 2009).

Testes de toxicidade da infusão da folha do cajueiro comum em *Artemia salina*, foram consideradas atóxicas nos valores de concentração inibitória mínima de 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes de citotoxicidade também demonstraram ausência de toxicidade das infusões nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ALVES, 2011).

A literatura refere toxicidade moderada do extrato hidroalcoólico das folhas do cajueiro em ratos e maior toxicidade do extrato etanolico quando comparado ao extrato aquoso (KONAN *et. al.*, 2007).

Na medicina popular, os extratos são utilizados indiscriminadamente, não levando-se em consideração os possíveis efeitos da toxicidade. Ensaios *in vitro* são fundamentais para compreender os mecanismos de uma ação tóxica e constituem um pré-requisito para uma abordagem mais racional pertinente à avaliação de risco toxicológico (GIULIANO *et. al.*, 2009 *apud* ALVES, 2011).

1.5 CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária e a doença periodontal são os principais indicativos que determinam o estado fisiopatológico da cavidade bucal de um ser humano. Ainda é um desafio complexo e árduo para a odontologia o conhecimento das condições necessárias e suficientes para o aparecimento da cárie e também o seu comportamento em indivíduos e populações, pois a doença cárie é conceituada atualmente como uma patologia de origem multifatorial. A cárie remonta aos tempos bíblicos. Foi detectada em todos os povos, em todas as raças e em todas as épocas. É a doença infecto contagiosa de maior incidência na espécie humana. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003), na maioria dos países desenvolvidos, a prevalência da cárie apresentou uma tendência de declínio nas três últimas décadas do século XX e no início do século XXI. No Brasil, a redução nos valores do índice de Dentes Cariados Perdidos e Obturados (CPO-D) mostra uma tendência consistente de queda ao longo do período. Todavia, em odontologia, a cárie dentária continua sendo a doença mais prevalente e a principal razão para perda dos dentes (BRASIL, 2010).. Assim, a cárie dental constitui, inegavelmente, sério problema social (TEIXEIRA, 2005).

É aceito e estabelecido universalmente que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta dependente que produz uma desmineralização das estruturas dentárias. Esse conceito de cárie é embasado na interação de fatores como dente suscetível, micro-organismo e dieta determinando a doença cárie, que foi ilustrada pelo Diagrama de Keyes (1969). Newbrum (1983) descreveu a cárie como resultado de um processo crônico que aparece após algum tempo da presença e da interação desses três fatores, julgou-se conveniente incluir o tempo como outro fator etiológico (Figura 03).



FIGURA 3 - Diagrama de NewBrum
Fonte: Lima (2007)

Em relação à suscetibilidade à cárie, deve-se diferenciar a suscetibilidade do dente e a do indivíduo como um todo. A suscetibilidade do dente à cárie é determinada pelo grau de mineralização do esmalte, proporcionando maior ou menor resistência à dissolução ácida. A mineralização também é influenciada por fatores que ocorrem durante a formação do dente, bem como por fatores ambientais e locais. A suscetibilidade do indivíduo, por sua vez, é determinada por fatores extrínsecos (condição sociocultural) e intrínsecos (como capacidade tampão, fluxo, composição da saliva) (LIMA, 2007).

O *Streptococcus mutans* é considerado como o principal patógeno associado ao início da cárie dentária. Apresentam vantagens ecológicas na presença de sacarose no meio bucal que permitem a sua aderência e colonização da superfície lisa do esmalte, favorecendo seu posterior acúmulo e formação do biofilme oral. (TAUBMAN, NASH, 2006; ALVES, 2011; KUNZI, 2010).

Entre os fatores relacionados à etiologia da cárie dentária, os carboidratos presentes na dieta desempenham um papel fundamental no seu desenvolvimento (MOYNIHAN, 2005), podendo-se destacar a sacarose — o açúcar mais comum presente na dieta moderna — cujo papel no desenvolvimento da cárie tem sido demonstrado na literatura (NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002; AIRES *et al.*, 2006). A sacarose, além de ser fermentável como seus monossacarídeos constituintes — glicose e frutose —, é substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares

(PEC); já os demais carboidratos são apenas fermentáveis pelas bactérias, resultando em produção de ácidos. Tão importante quanto o tipo de carboidrato utilizado na dieta é, também, a frequência de ingestão, a qual possui relação com o desenvolvimento de cárie, fato assinalado por estudos em animais e *in vivo* (ARCELLA *et al.*, 2002 *apud* ARTHUR, 2006).

A cavitação é o estágio final da cárie do esmalte. Ela é precedida por uma pequena “mancha branca” clinicamente detectável e, antes disso, por uma desmineralização microscópica, detectada apenas por técnicas histológicas. Nem todas as manchas brancas evoluem para a cavitação. Elas podem estacionar e até sofrer um processo de remineralização, que é potencializado pelo flúor (MARSH; MARTIN, 2005).

O caráter infectocontagioso da cárie começou a ser demonstrado experimentalmente com KEYES (1960). Nesta pesquisa, o autor verificou que filhotes de hamsters, cujas mães haviam recebido antibiótico (penicilina ou eritromicina) durante o período de gestação e lactação, não desenvolviam cárries, mesmo com dieta potencialmente cariogênica. Porém, quando estes hamsters eram engaiolados com hamsters infectados sob coprofagia, desenvolviam cárries. Há evidências de que as mães são a fonte de infecção primária nas crianças, e que o nível de infecção da mãe é um preditor do grau de infecção e do desenvolvimento das lesões de cárie da criança. Este caráter de contágio que acontece entre mães e filhos também ocorre entre pais e filhos e entre irmãos (LEITES *et al.*, 2006).

1.6 STREPTOCOCCUS MUTANS

Foram identificados, pela primeira vez, na Inglaterra, por Clarke (1924) a partir de material colhido da boca de crianças que apresentavam cárie. Foi denominado de *mutans* porque observou-se um aspecto mutante da bactéria, uma vez que apresentava morfologia de bacilo. Pouca atenção foi dada a esta espécie até 1960, quando foi demonstrado que a cárie poderia ser experimentalmente induzida e transmitida em animais artificialmente infectados com cepas de *S. mutans*. (MARSH; MARTIN, 2005). Atualmente, existem sete espécies distintas e todas estão envolvidas no desenvolvimento da cárie: *Streptococcus mutans*,

Streptococcus sobrinus, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* e *Streptococcus downei*. As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* foram isoladas exclusivamente de humanos, sendo a primeira a mais comumente encontrada na placa dentária (ARTHUR, 2006).

Os *S. mutans* (Figura 4) são bactérias Gram positivas, apresentam diâmetro médio de 0,5µm a 0,2µm, formato esférico ou ovóide e estão dispostos em pares ou cadeias. Possuem parede celular com antígenos de carboidratos, ácido lipoteicóico, lipoproteínas e proteínas de parede celulares ou associadas com parede celular. O antígeno I/II pode estar associado à aderência inicial da bactéria à superfície dentária pela interação com componentes da película salivar (MITCHELL, 2003).

É considerado um dos principais micro-organismos relacionados à patogenia da cárie dental. São capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis (glucanos e frutanos) em água a partir da sacarose, que medeiam a sua adesão nas superfícies dentárias, além da produção de amilopectina, um polímero intracelular para reserva nutricional. Na polimerização desses açúcares participam as exzimas denominadas glicosiltransferase. Por possuírem alguns fatores de virulência (acidogênicas e acidoúricas), essas bactérias são capazes de manter a produção de ácidos a partir da glicólise em ambientes com pH menor que 5,0. Essa resistência torna essas bactérias mais competitivas frente aos demais micro-organismos do biofilme dental durante períodos de acidificação do meio (ARTHUR, 2006; KUNZI, 2010).



FIGURA 4 - *S. mutans*
Fonte: Wordpress (2012)

1.7 BIOFILMES

Biofilmes são comunidades microbianas complexas, formadas por várias espécies que se desenvolvem como um consórcio funcional, incorporado em uma matriz de polímeros extracelulares que os próprios micro-organismos produzem, dessa forma, estabelecendo um mutualismo entre os membros. Forma-se em diversas superfícies como tecidos vivos, dispositivos industriais, sistemas de tubulação de água e ambientes marinhos. Dispositivos médicos como catéteres, válvulas cardíacas e lentes de contato podem ser fortemente colonizados. A organização dos micro-organismos em biofilmes ocorre de forma natural, pois as probabilidades de sobrevivência destes aumentam vivendo em comunidade (CARNEIRO, 2010).

O biofilme oral (Figura 5), também chamado de placa dentária, apresenta uma matriz extracelular produzida pelos próprios micro-organismos que interagem com componentes da saliva. Essa substância pode ser responsável por 50% a 90% do carbono orgânico total do biofilme. A parte orgânica dessa matriz é formada por exopolissacarídeos bacterianos (glucanos, frutano e heteropolissacarídeos) e, em menor proporção, por proteínas, glicoproteínas, lipídios e sais derivados da dieta do hospedeiro. Pelo menos 700 espécies já foram identificadas em um biofilme oral maduro, formando complexas comunidades microbianas (KOO, 2003; FURLAN, 2006; KAWADA-MATSUO *et al*, 2012). A composição e a quantidade de matriz extracelular variarão dependendo do tipo de microrganismos, da idade do biofilme e das diferentes condições ambientais em que os biofilmes são formados. Estes incluem diferentes níveis de oxigênio e de nitrogênio, de pH, de temperatura e de disponibilidade de nutrientes. Assim como a hidrofobicidade celular e a presença de fimbrias e de flagelos, o grau de produção desta matriz é um dos principais fatores que influencia a taxa e o grau de adesão de células microbianas em diferentes superfícies, além de proteger contra o estresse ambiental e desidratação (CARNEIRO, 2010).

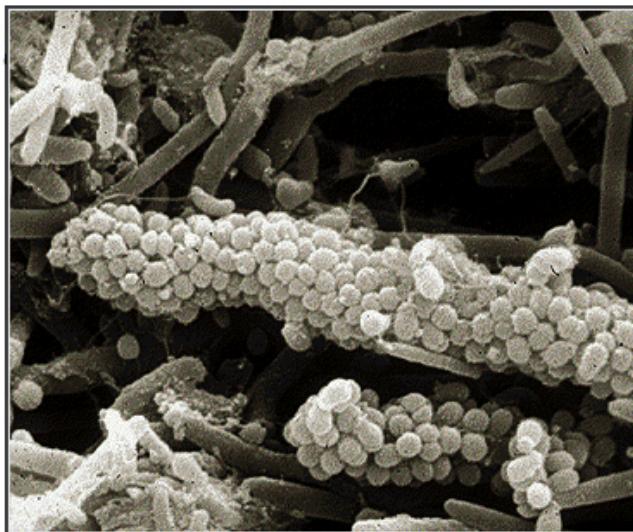


FIGURA 5 - Biofilme oral
Fonte: Overman (2000)

Evidências científicas sugerem que o biofilme oral é um importante causador de pneumonias nosocomiais em pacientes com ventilação mecânica em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). É considerado um reservatório contínuo de micro-organismos patogênicos que, além de causar doenças locais, como as periodontopatias, está relacionado às doenças sistêmicas como as infecções respiratórias (SOUZA, 2009).

As bactérias apresentam diversas vantagens quando residem dentro de um biofilme: (a) elas têm certo grau de proteção contra biocidas, antibióticos, anticorpos, surfactantes, bacteriófagos e organismos predadores; (b) este microambiente permite o fornecimento de nutrientes do meio para algumas cepas; e (c) troca de elementos genéticos das diferentes espécies bacterianas envolvidas no biofilme pelo contato direto entre estas bactérias (STOODLEY *et al.*, 2002).

1.7.1 Formação do biofilme oral

Os primeiros micro-organismos a colonizar a boca são chamados de espécies pioneiras, e coletivamente formam uma comunidade microbiana pioneira. Estes aderem, inicialmente, através de interações fracas, como forças de van der Waals. Constituem uma parte selecionada da microbiota oral, principalmente os

Estreptococos do grupo *mitis*, que incluem, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*. Espécies pioneiras se multiplicam formando microcolônias, as quais ficam mergulhadas em muco bacteriano extracelular, polissacarídeos e proteínas salivares adsorvidas, resultando em um filme confluente de micro-organismos (TAUBMAN, NASH, 2006).

Se não retirados da superfície dos dentes, podem fixar-se de forma mais permanente através de moléculas de adesão celular, tais como pili e flagelo. Eventualmente, uma situação estável é alcançada com uma grande diversidade de espécies e uma comunidade dinâmica chamada de clímax estará formada (MARSH; MARTIN, 2005; KAWADA-MATSUO, 2012). As primeiras colônias facilitam a chegada de outras células através de sítios de adesão e começam a construir a matriz que formará o biofilme. Apenas algumas espécies são capazes de aderir a uma superfície por conta própria. Outras podem ancorar-se à matriz ou até mesmo diretamente às colônias já existentes. Uma vez que a colonização tenha iniciado, o biofilme cresce através de uma combinação de divisão celular e de recrutamento de outras células (CARNEIRO, 2010).

A transferência de informações genéticas de um organismo para outro foi demonstrada em diversos estudos *in vitro* com membros das espécies *Streptococcus* e também com outras espécies bacterianas. Esse meio de comunicação pode ocorrer em velocidades aceleradas entre os micro-organismos dentro do biofilme, resultando em sua rápida evolução. Isso cria um ambiente perfeito para o surgimento de novos patógenos, desenvolvimento de resistência a antibióticos e evolução de outras táticas de sobrevivência (KOLENBRANDER, 2000; KUNZI *et al.*, 2010). Vários estudos têm demonstrado que, durante o crescimento de bactérias em biofilmes, subpopulações da mesma espécie com pequenas variações genéticas podem surgir. Acontecem através de mutação, recombinação e transferência de genes. Estas variações foram detectadas principalmente como alterações na morfologia da colônia de subpopulações de células após o crescimento em biofilme (CARNEIRO, 2010).

O biofilme dentário pode ser formado diretamente sobre a superfície dos dentes, mas o mais comum, *in vivo*, é formar-se sobre a película adquirida (glicoproteína salivar ou mucina) depositada constantemente sobre os dentes. É uma estrutura firmemente aderida não somente à superfície dentária, mas também a

outras estruturas, como cálculo salivar, restaurações e coroas protéticas, artefatos ortodônticos, entre outros (KOO, 2003).

O desenvolvimento do biofilme (figura 6) ocorre inicialmente por uma redistribuição das células fixas na superfície através da motilidade celular. A colonização inicial caracteriza-se por interações bioquímicas específicas envolvendo adesinas (MITCHELL, 2003). Bactérias pioneiras como *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, entre outras. *S. mutans* e *S. sobrinus* podem se implantar se houver disponibilidade de sacarose. O predomínio dessas bactérias é explicado pelo seu alto grau de adesão ao dente e à proteína salivar que o recobre e pela facilidade com que suas células coagregam (STEINBERG *et al.*, 2003).

Em seguida, os colonizadores iniciais sofrem multiplicação decorrente de sua adaptação ambiental e da disponibilidade de nutrientes, bem como crescimento volumétrico. Na fase de maturação, aglomerados de células presas à superfície mais externa do biofilme são recrutados por ação do próprio ambiente para o desenvolvimento de outros biofilmes, desse modo, atingindo uma comunidade clímax (CARNEIRO, 2010).

Os mecanismos genéticos associados à dispersão não são ainda bem conhecidos. Existem três tipos de processos de dispersão: **expansiva**, quando parte das células de uma microcolônia sofre lise e outras retomam a motilidade, sendo então liberadas da estrutura. Outro tipo de dispersão envolve a **fragmentação** do biofilme, em que porções de matriz extracelular, associadas a micro-organismos, são liberadas. Finalmente, o terceiro tipo de dispersão, denominada superficial, ocorre pelo crescimento do próprio biofilme como um todo (O'TOOLE, 1998).

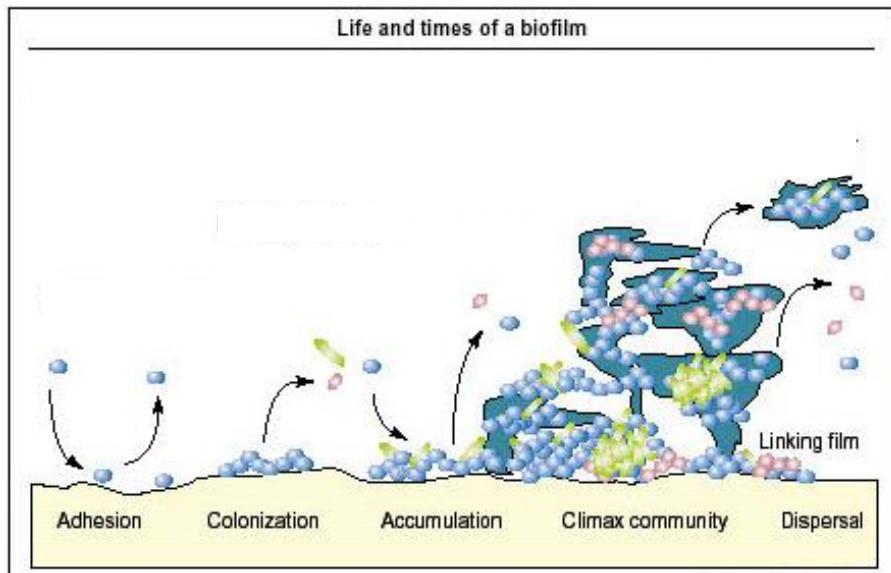


FIGURA 6 - Formação do biofilme microbiano na superfície do esmalte dentário.
Fonte: <http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html#genetica> (2012)

Com relação às alterações bioquímicas do biofilme, a concentração de íons é um fator relevante na determinação da saturação do biofilme e, consequentemente, no desenvolvimento de cárie. As concentrações de cálcio e fósforo são relevantes, pois há uma relação inversa entre as concentrações desses íons no biofilme dental e no fluido do biofilme e experiência de cárie. Recentemente, foi indicado que o aumento da concentração de sacarose também promove maior concentração de PEC, menor concentração inorgânica e maior perda mineral do esmalte. Essas evidências sugerem que a maior cariogenicidade do biofilme, além do PEC, também, está relacionada com a menor concentração inorgânica (AIRES *et al.*, 2006; KAVADA-MATSUO *et al.*, 2012).

1.7.2 Controle de biofilme oral

A sofisticação estrutural do biofilme sugere que essas comunidades são reguladas por sinais análogos aos hormônios e feromônios que controlam comunidades eucarióticas multicelulares. A maior resistência a antibióticos e agentes antimicrobianos das bactérias organizadas em biofilmes em relação às bactérias livres em fase planctônica deve-se à limitação da difusão destes dentro do biofilme e das alterações celulares próprias destas bactérias (COSTERTON *et al.*,

2003 *apud* FURLAN, 2006). Doses de antibióticos que matam bactérias presentes na superfície do biofilme teriam de ser aumentadas em 1.500 vezes para a eliminação das bactérias no interior deste (ELDER *et al.*, 1995; COGHLAN, 1996; SILVA, 2011).

O controle do biofilme bacteriano oral aponta tanto para a prevenção como para o tratamento da cárie. Para o controle da progressão da lesão cariosa é necessária a remoção da origem produtora de ácidos da doença, ou seja, o biofilme (SÁ, 2011). A remoção mecânica por procedimentos eficientes de higiene bucal pode prevenir, quase completamente, a cárie. Tais medidas são particularmente efetivas quando combinadas com a redução na quantidade e frequência da ingestão de açúcar (MARSH; MARTIN, 2005). A presença contínua de flúor pode reduzir em até 50% a incidência de cárie. Evidências apontam que o *S. mutans* tem o seu crescimento e metabolismo afetados, o que leva a crer que o flúor pode servir para estabilizar a composição da microflora do biofilme, como um mecanismo preventivo (MARSH; MARTIN, 2005).

Alguns fatores devem ser levados em consideração para a escolha das substâncias antimicrobianas: retentividade toxicidade, baixa permeabilidade e capacidade de manutenção do equilíbrio da microbiota residente na cavidade bucal. Os enxaguatórios têm demonstrado ser veículo de sucesso para a liberação de agentes antiplaca, tais como agentes quaternários de amônio, bisbiguanidas, entre outros (SCHEIE, 2007).

A clorexidina é um dos agentes antimicrobianos mais estudados em pesquisas com biofilmes orais, sendo considerada superior a outras substâncias no controle quantitativo e qualitativo da formação do biofilme bacteriano em razão da sua alta substantividade. O efeito médio de inibição de cárie promovido pela clorexidina pode variar entre 35 e 75%, o que torna a utilização dessa substância relevante no controle da doença. Entretanto, vários protocolos de utilização vêm sendo recomendados, os quais incluem como principais variáveis o método e a frequência de aplicação (ZHANG *et al.*, 2006). Há de se salientar que existem efeitos colaterais como pigmentação dos dentes, interferência gustativa, descamação da mucosa e resistência bacteriana quando do uso diário e prolongado (ZHANG *et al.*, 2006).

Inúmeras substâncias químicas vêm sendo pesquisadas com o objetivo de inibir a formação e a progressão do biofilme dentário, nesse sentido, destacando-se,

atualmente, os produtos de origem vegetal, como o própolis, a camomila, o alecrim e o caju. Estes mostram-se potencialmente eficazes no que se refere à atividade antimicrobiana sobre bactérias cariogênicas, podendo atuar seletivamente sobre estas bactérias, além de inibir a síntese de glucanos, (ALVES *et al.*, 2008). Devido à sua ação terapêutica, baixo custo e efeitos tóxicos reduzidos, esses produtos têm sido usados pela população em várias partes do mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato do bagaço do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) (EBPC) sobre a bactéria *Streptococcus mutans* a partir da cepa UA159.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar um extrato a partir do bagaço do pedúnculo do caju.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) através do método de microdiluição em placa de poliestireno sobre a *S. mutans*.
- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) em presença da *S. mutans*.
- Avaliar o efeito do EBPC na formação de biomassa no biofilme monoespecífico de *S. mutans*, através do método do cristal violeta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Foram obtidas amostras de caju vermelho em plantações do estado do Ceará, Brasil, entre setembro de 2003 e janeiro de 2004. Foi feita a extração da castanha e o pedúnculo foi prensado para a retirada do suco e obtenção do “bagaço do caju”. Este foi seco em estufa a 36°C, por 48 horas, e triturado em moinho analítico (SANTOS, 2007).

Foram pesados 2g do pó seco do bagaço em copo descartável e, posteriormente, este foi misturado a 40ml de álcool, a 70%. A mistura foi transferida para um recipiente de vidro limpo e seco e o mesmo foi embalado com papel alumínio, identificado e guardado em temperatura ambiente por sete dias. O extrato foi filtrado e colocado em evaporador rotoativo a 65°C para evaporação do álcool. Posteriormente, foi deixado em banho-maria, por 48 horas, a 60°C para evaporação da água. Para a obtenção do extrato bruto seco foi necessária a liofilização por 24 horas (Figura 7).

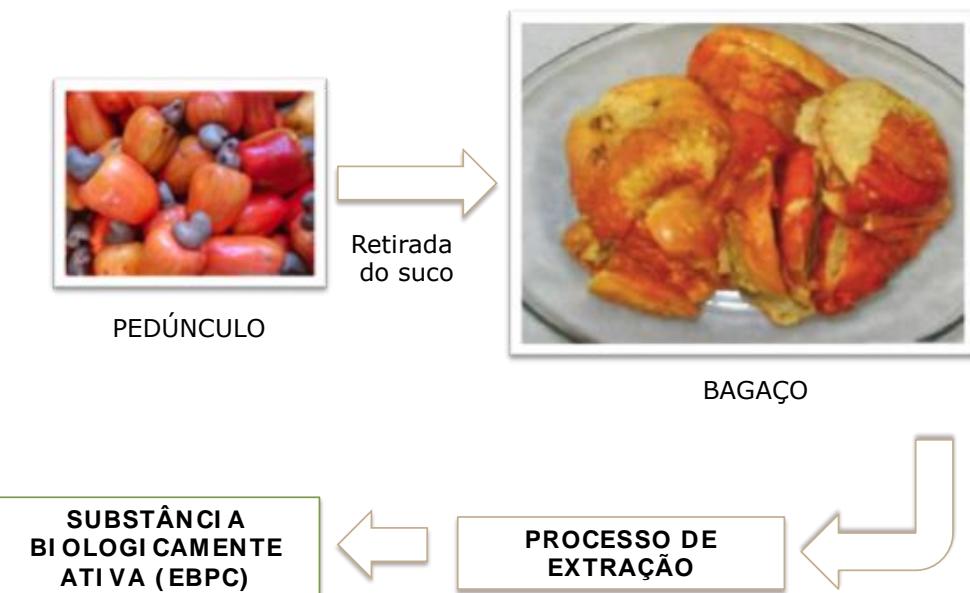


FIGURA 7 - Desenho esquemático do planejamento experimental para preparação do extrato (EBCP)
Fonte: Adaptado de Melo et al. (2006).

3.2 ENSAIOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Andrews (2001) define a CIM como sendo a menor concentração de uma droga que inibe o crescimento visível de um organismo após um período de incubação. O mesmo autor ainda considera a CIM como o padrão ouro para determinar a sensibilidade de micro-organismos a agentes antimicrobianos.

A cepa de *Streptococcus mutans* foi a UA159, gentilmente cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro - Brasil. Esta foi retirada do freezer a -80°C e, em uma câmara de fluxo previamente limpa com álcool 70% e descontaminada por luz ultravioleta, 50µL da bactéria foi inoculada em 5mL de meio BHI caldo fresco e incubado por 24h, a 37°C com CO₂, 10%. Após este período, o mesmo procedimento foi realizado, sendo a incubação realizada por 18 horas.

Para o ajuste da absorbância, a cultura foi transferida para tubos eppendorf e os mesmos centrifugados (5000gr, 4°C, por 5 min). Executou-se, então, a ressuspenção em novo meio BHI caldo estéril duas vezes concentrado e, posteriormente, reunida em tubos falcons de 50mL. Com o auxílio do espectrofotômetro (Sunrise-tecam) a 620nm, a cultura teve sua densidade celular ajustada a 2x10⁷CFU/mL.

A próxima etapa consistiu na inoculação das amostras em meio de cultura. Para isso foi utilizada uma placa estéril de microtitulação contendo 96 poços fundo "U" padronizada segundo a diretriz M7-A 6^a edição (metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico). Com o auxílio de pipetador multicanal (Eppendorf®), a placa foi preenchida com 100µL da suspensão bacteriana em BHI caldo (2 x 10⁷) e adicionou-se mais 100µL do EBPC em concentrações obtidas através de diluições seriadas na base dois (1000µg./ml, 500µg./ml, 250µg./ml, 125µg./ml, 62,5µg./ml, 31,25µg./ml, 15,62µg./ml e 7,8µg./ml), obtendo-se um volume final de 200µL (Figura 6). Como controles foram utilizados: clorexidina (controle positivo) nas concentrações decrescentes de 125 a 1,9µg × mL⁻¹ e água estéril (controle negativo). Após a montagem da placa (Figura 8), foi realizada uma leitura inicial e outra final a 640nm, em leitor de ELISA (BioTrak II Plate Reader - Amersham Biosciences), após 24 horas de incubação, a 37°C, com 10% de CO₂.

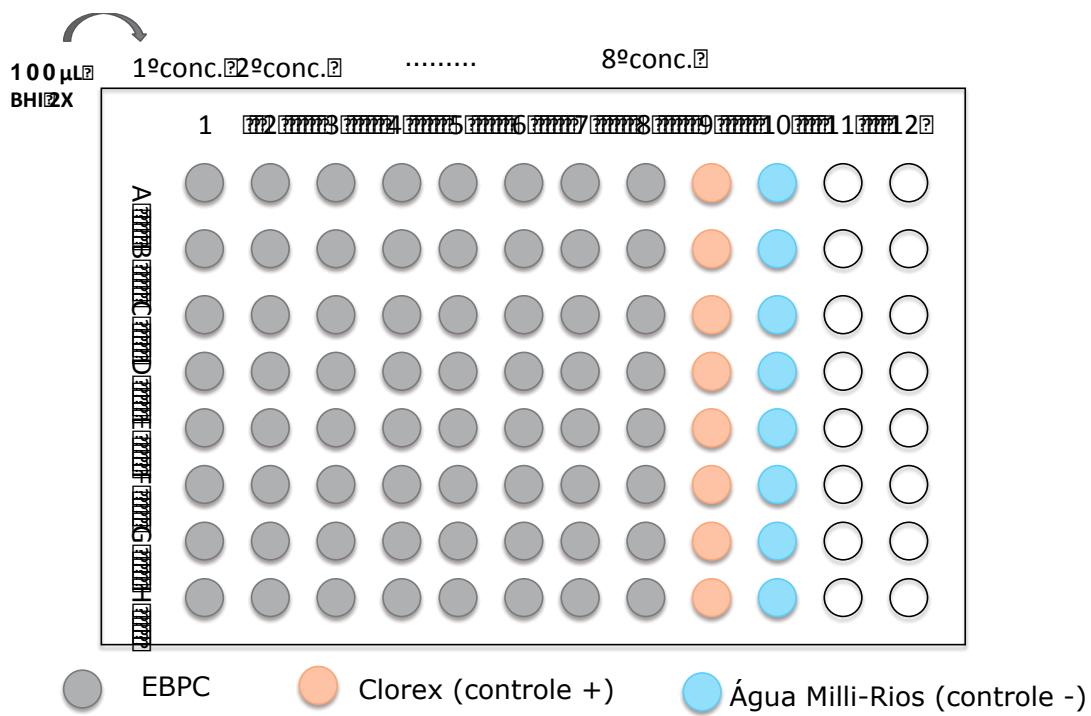


FIGURA 8 - Desenho esquemático do planejamento experimental para avaliação da concentração inibitória mínima do EBPC variando sua concentração de 1000 μ g/mL a 7,8 μ g/mL. Na placa de 96 poços fundo “U”, contém ainda o controle negativo e positivo, a clorexidina.

Fonte: Dados da pesquisa

3.2.1 Análise estatística

O efeito das diferentes concentrações do EBPC, juntamente com o controle positivo (clorexidina), foram comparadas com o controle negativo (água). Todos os ensaios foram realizados em oito repetições em triplicata e os resultados das medidas de absorbância foram expressos através de seu valor médio \pm desvio padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para determinar a existência ou não de diferenças estatísticas significativas entre dois grupos (ENPC e clorexidina *versus* água). O nível de significância utilizado foi de 0,01 ($P \leq 0,01$).

3.3 ENSAIO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana. É a menor concentração que mata 99.9% do inóculo original em um determinado tempo. Quando os valores da CBM são comparados com o CIM, pode-se avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático (NADER, 2010).

Para verificação da concentração bactericida mínima foram retiradas alíquotas das respectivas concentrações após a leitura de 24h, inoculando-as em tubos de vidro contendo 5ml de BHI caldo, incubados com CO₂ (10%), a 37°C, e observado o crescimento bacteriano por 24 h.

3.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

O ensaio de inibição de biofilme microbiano foi realizado em placas de poliestireno de fundo “chato”, segundo a metodologia descrita por Otoole e Kolter (1998). As placas foram preparadas da mesma forma do ensaio de atividade antimicrobiana (Figura 9), adicionando-se 1% de sacarose à suspensão bacteriana em BHI caldo. As concentrações obtidas, através da diluição seriada de base dois, foram: 500µg./ml, 250µg./ml, 125µg./ml, 62,5µg./ml, 31,25µg./ml e 15,62µg./ml.

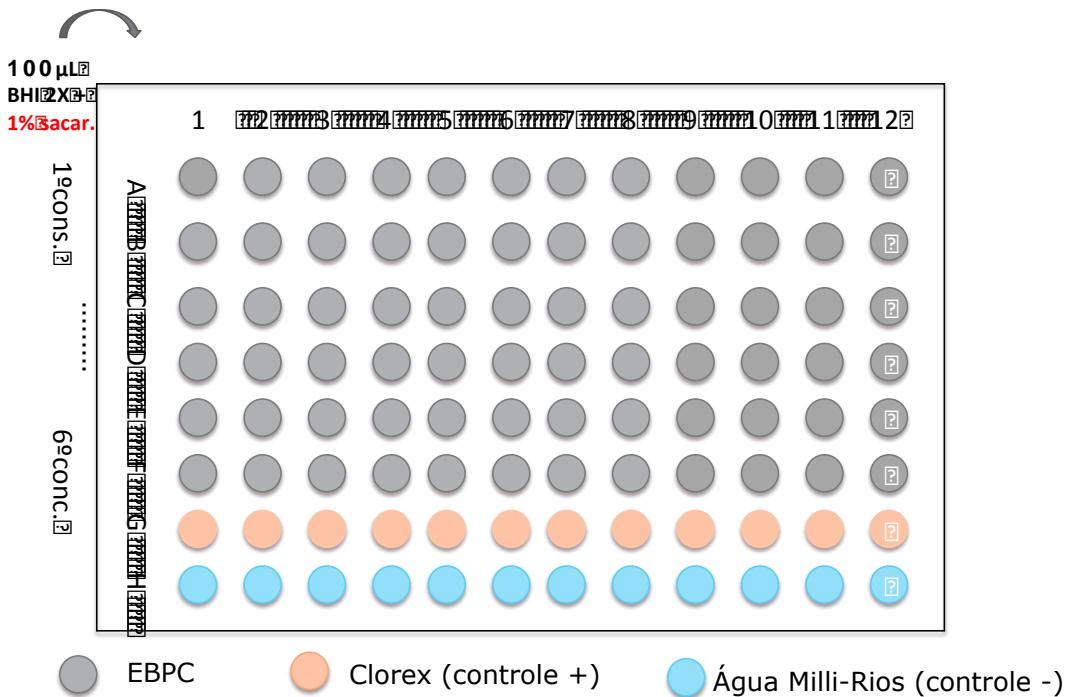


FIGURA 9 - Desenho esquemático do planejamento experimental para avaliação da prevenção da formação do biofilme variando sua concentração de 500 μ g/mL a 15,62 μ g/mL. Na placa de 96 poços fundo “chato”, contém ainda o controle negativo e positivo, a clorexidina.

Fonte: Dados da pesquisa

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Após 24h de incubação a 37 °C, com 10% de CO₂, os poços foram lavados três vezes para a retirada das células fracamente aderidas e adicionados 200 μ L de metanol, 95%, por 15 minutos, para fixação das células em biofilme. Em seguida, acrescentou-se 200 μ L de cristal de violeta, 0,1%, por mais 15 minutos, em temperatura ambiente para corá-lo. Após duas lavagens com água destilada, o corante remanescente foi removido com ácido acético, 33%, e, então, a biomassa foi quantificada através da medição da densidade óptica a 570nm, pelo leitor de placas ELISA (BioTrak II Plate Reader-Amersham Biosciences).

3.5.1 Análise estatística

O efeito das diferentes concentrações do EBPC, juntamente com o controle positivo (clorexidina), foi comparado com o controle negativo (água). Todos os ensaios foram realizados em doze repetições em triplicata e os resultados das medidas de absorbância foram expressos através de seu valor médio \pm desvio padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para determinar a existência ou não de diferenças estatísticas significativas entre dois grupos (EBPC e clorexidina *versus* água). O nível de significância utilizado foi de 0,01 ($P \leq 0,01$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A figura 10, a seguir, mostra a ação do EBPC no crescimento de bactérias planctônicas. A solução de clorexidina (controle positivo) inibiu o crescimento bacteriano quando comparado com o controle negativo ($P < 0.01$). Este resultado era esperado, pois a clorexidina é um potente agente antimicrobiano utilizado em odontologia. A solução do EBPC nas concentrações iguais ou superiores a 250 $\mu\text{g/mL}$ (CIM) mostrou ação bacteriostática. No CIM, o EBPC causou redução de 96% do crescimento das bactérias planctônicas. Na concentração acima 250 $\mu\text{g/mL}$, apresentou ação igual ao da clorexidina ($P > 0.01$), com um decréscimo de 99% no crescimento das bactérias.

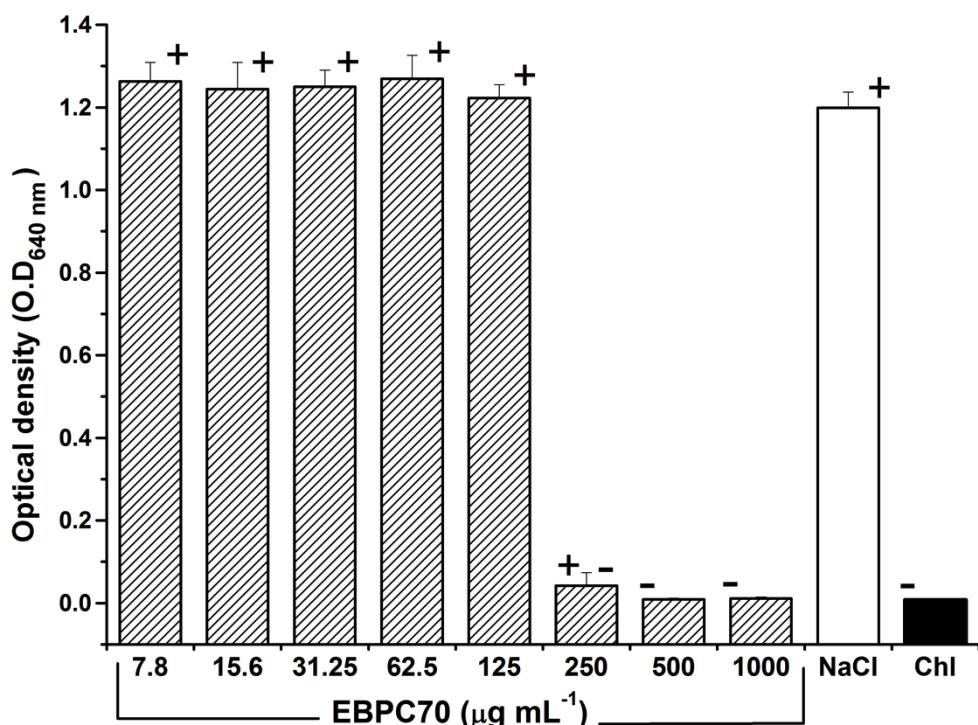


FIGURA 10 - Atividade antimicrobiana da EBPC do cajueiro *A.occidentale L* frente à bactéria *S.mutans* após 24h de crescimento bacteriano. CN – Controle negativo (água) CP – Controle positivo (clorexidina). $P < 0,01$. O símbolo “+” indica existência de diferença estatisticamente significativa com relação ao CP, enquanto que “−” indica diferença com relação ao CN.

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao extrato do *A. occidentale* L. são atribuídas diversas propriedades farmacológicas, tais como antidiabético, antimicrobiano, anti-inflamatório, antitussígeno, antissifilítico, diurético e cicatrizante (BARBOSA- FILHO et. al., 2005). Estudos sobre o efeito anti-inflamatório do extrato da casca do cajueiro foram atribuídos a presença de taninos, que apontaram atividade em ambos os modelos de inflamação aguda e crônica (MOTA, 1982). O screening para atividade antibacteriana de várias plantas medicinais foi realizado na Nigéria, e o extrato da folha e casca do *Anacardium occidentale* L mostrou boa atividade sobre *E. coli* e *P. aeruginosa* (KUDI et al., 1999). Houve inibição do crescimento de cepas de *E. coli* e *S. Aureus* frente ao extrato hidroalcoólico 80% v/v da casca do caule do *Anacardium occidentale* L (SILVA et al., 2007). Em outro estudo, mostrou-se bactericida frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus sobrinus*, e *Lactobacillus casei* em suas formas planctônicas, com resultados análogos aos da clorexidina (ARAÚJO et al., 2009).

4.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A avaliação do efeito bactericida ou bacteriostático é observada pela turbidez causada pelo crescimento bacteriano. A figura 11 mostra o ensaio microbicida. Os tubos representam concentrações diferentes do extrato na presença do *S. mutans* UA159 em BHI caldo, depois de 24 horas. As concentrações do EBPC mostradas são: **(a)** 1000, **(b)** 500, **(c)** 250 e **(d)** 125 μ g/mL. Na concentração de 1000 μ g/mL, não houve crescimento bacteriano visível (turbidez similar ao do controle positivo) quando comparada a outras com maior turbidez.

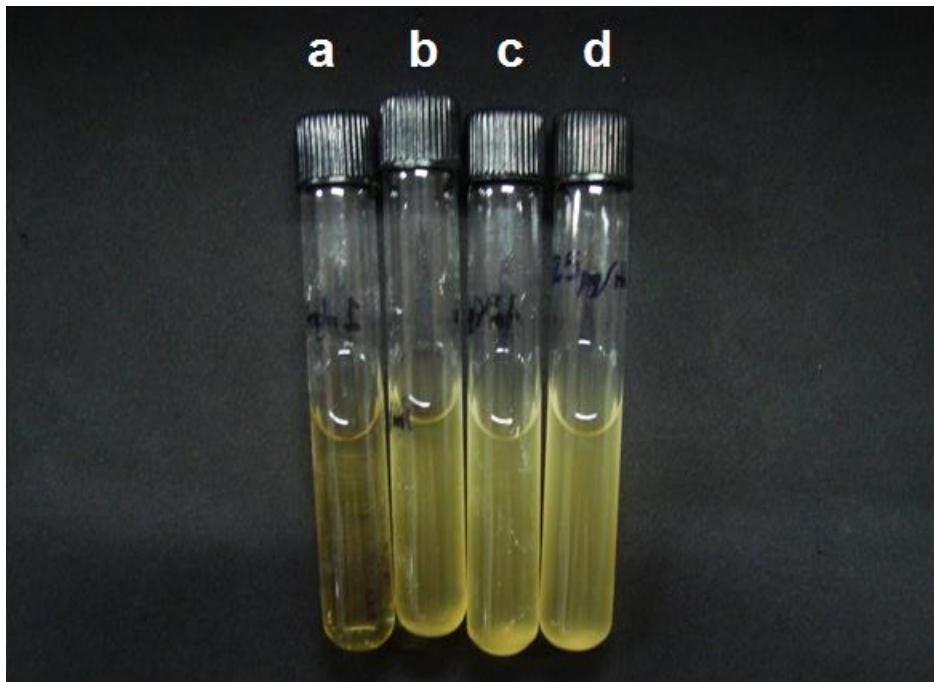


FIGURA 11 - Fotografias de CBM obtidas pelo EBPC contra *S.mutans*.
Fonte: Dados da pesquisa

Araújo *et al.* (2009) obtiveram CBM frente a diversas espécies bacterianas, incluindo o *S. mutans* com o extrato hidroalcoólico 70% v/v da casca do caule do *Anacardium occidentale L.*

Os resultados supracitados estão relacionados à forma planctônica de vida bacteriana, no entanto sabe-se que para o desenvolvimento da doença cárie as bactérias organizam- se em biofilmes na cavidade oral (MARSH; MARTIN, 2005).

4.3 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME EM PLACAS DE POLIESTIRENO

A figura 12 mostra o efeito do EBPC no crescimento do biofilme monoespécie de *S. mutans* UA159. Observa-se que a clorexidina inibiu o crescimento do biofilme, quando comparado com o controle negativo ($P < 0.01$), como esperado. As soluções de EBPC com concentrações iguais ou maiores do que 250 μ g/mL (CIM) também mostraram ação inibitória do biofilme, com ação igual ao da clorexidina ($P > 0.01$). Nesta concentração, a solução de EBPC causou redução de 96% do crescimento do biofilme.

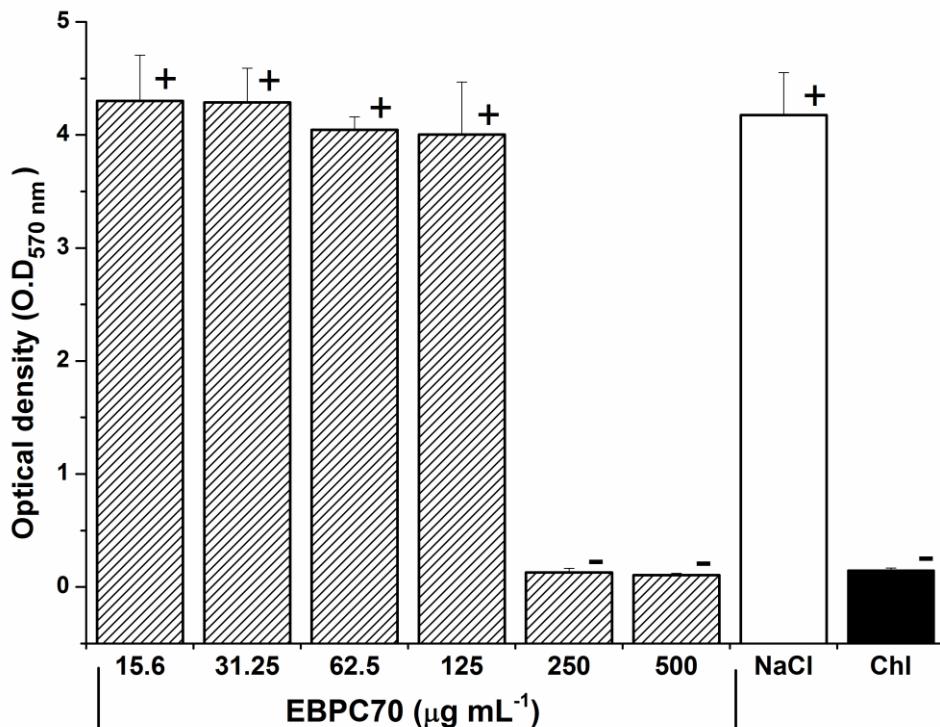


FIGURA 12 - Quantificação da biomassa da de biofilme de *S. mutans* submetido ao SBPC do cajueiro *A. occidentale L* após 24h de crescimento bacteriano. CN – Controle negativo (água) CP – Controle positivo (clorexidina). P < 0,01. O símbolo “+” indica existência de diferença estatisticamente significativa com relação ao CP, enquanto que “-” indica diferença com relação ao CN.

Fonte: Dados da pesquisa

A origem do efeito antimicrobiano do EBPC ainda precisa ser investigada. Sua composição (em fase de determinação) é essencial para o entendimento deste efeito. Devido à extração hidroalcoólica, vários compostos do pedúnculo devem estar presentes no EBPC (principalmente taninos, flavonoides e ácidos anacárdicos). Um ou mais destes compostos (juntos ou separados) podem ser responsáveis pelo alto efeito do extrato no crescimento de bactérias planctônicas e biofilme. Taninos são responsáveis pela ação inibitória de vários extratos de plantas (DJIPA *et al.*, 2000). As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e documentadas. Moléculas de taninos estão sendo testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente contra o HIV. Alguns resultados já demonstraram que a atividade anti-HIV é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral (MONTEIRO *et al.*, 2005). A presença de taninos no EBPC pode complexar macromoléculas como proteínas e carboidratos, mudando a estrutura da membrana celular bacteriana. Um outro mecanismo de toxicidade deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo micro-organismos, necessitam de íons metálicos como

cofatores enzimático (SIMÕES *et al.*, 2001).

Segundo diversas pesquisas, os ácidos anacárdicos e flavonoides possuem ação bactericida. Ribani (2006), estudando a presença de flavonoides em frutas nativas do Brasil, quantificou uma média de 36mg/kg de flavonoides totais no pedúnculo do caju, sendo que 9% desse valor continuam presentes no extrato do bagaço. Estudos revelam que as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis à ação biológica de extratos de plantas que apresentam em sua constituição química flavonoides. Estes são capazes de atuar no comprometimento da membrana plasmática, resultando na lise celular (RÍOS; RECIO, 2005 *apud* EVARISTO, 2012).

A atividade antimicrobiana dos derivados do *Anacardium occidentale* vem sendo comprovada na literatura. Kubo *et al.* (1999) demonstraram que a concentração de ácidos anacárdicos, encontrados no suco do pseudofruto do caju, foi de 0,00006%. Na concentração de 200 μ g/mL destes fenois, os autores evidenciaram efetividade contra o *H. pylori*. Green *et al.* (2008) observaram ação antimicrobiana frente à *S. mutans* na concentração de 800 μ g/ml. Kubo *et al.* (2006) descreveram CBM de 6,25 μ g/ml dos ácidos anacárdicos frente a *S. mutans*. Estudos com suco de caju comercializado indicaram potencial antitumor, sugerindo que o consumo contínuo do pedúnculo, assim como de seus subprodutos, durante períodos prolongados, pode ser vantajoso no controle de tumores. Lima *et al.* (2000) relataram atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha do *Anacardium occidentale L.* sobre micro-organismos da cavidade bucal – *S. mutans*, *S. aureus*, *Candida albicans* e *Candida utilis*. Neste estudo, apresentaram atividade antibacteriana sobre todos os micro-organismos, porém a maior atividade inibitória ocorreu sobre o *Streptococcus mutans*. A literatura relata que os ácidos anacárdicos provocam a desestruturação da membrana celular, assim, ocasionando sua ruptura. Entretanto mecanismos bioquímicos desconhecidos também podem estar envolvidos nesse processo (GRENN *et al.*, 2007).

Extratos do cajueiro têm demonstrado atividade antibacteriana em altas concentrações em bactérias gram-negativas *Proteus morgani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* (SILVA *et al.*, 2007) e inibição na aderência de biofilmes multiespécie de *Streptococcus* (MELO *et al.*, 2006). Santos *et al.* (2011) observaram ação fungicida das cinzas do bagaço do caju na presença de espécies do gênero *Fusarium*.

A resistência e os efeitos colaterais são problemas encontrados na terapia antimicrobiana em odontologia. Novas fontes terapêuticas mais eficientes para o tratamento de infecções vêm sendo estudadas e relatadas na literatura. Uma alternativa são as plantas medicinais, por serem fornecedoras de princípios ativos, além de mais econômicas (SILVA *et al.*, 2007). A pesquisa com plantas medicinais é estratégica para o Brasil uma vez que no país, o registro de um fitomedicamento necessita de estudos científicos para a comprovação da qualidade e eficácia (CALIXTO, 2003). Nas últimas décadas, assiste-se a um crescente interesse pelo uso das plantas medicinais e dos respectivos extratos na terapêutica, constituindo, em certas circunstâncias, uma ajuda nos cuidados primários de saúde e um excelente complemento terapêutico, compatível com a medicina clássica. Para isso, para além da qualidade, terá de haver garantia de segurança em relação a efeitos tóxicos e conhecimentos sobre efeitos secundários, interações, contraindicações, mutagenidade, etc. E também a existência de ensaios farmacológicos e experimentação clínica que apontem eficácia para este tipo de medicamentos.

Há diversas possibilidades de aproveitamento industrial do pedúnculo do caju, tais como produção de sucos, doces, cajuína, bebidas alcoólicas, sorvetes e outros produtos alimentícios, além de usos medicinais, no entanto, a elaboração de produtos tradicionais ainda é uma área pouco explorada. Para utilizar o potencial do fruto ao máximo, é necessário oferecer formas alternativas de consumo. O processamento do suco integral é o mais representativo e gera como resíduo a película e a fibra ou bagaço do pedúnculo. Os resíduos industriais são muitas vezes utilizados como ração animal ou na forma de fertilizantes. O custo da secagem, armazenagem e transporte de subprodutos são fatores que economicamente limitam o seu aproveitamento. O presente estudo demonstrou que o extrato hidroalcoólico do bagaço do pedúnculo do caju, um resíduo da agroindústria, apresenta atividade bactericida e bacteriostática em presença da bactéria *S. mutans* na sua forma planctônica e contra biofilme monoespécie de *S. mutans*.

Os resultados apresentados mostram-se promissores para a produção de futuros produtos biotecnológicos. Experimentos com unidades formadoras de colônia e ensaios desestruturando o biofilme formado são necessários para ratificar os resultados obtidos neste estudo. Sabe-se, ainda, que os biofilmes são multiespécies e novos estudos com outros tipos de bactérias são necessários. Além disso, testes de toxicidade e citotoxicidade são indispensáveis para comprovar a segurança do uso.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, demonstrou-se que o extrato do pedúnculo do bagaço do caju promoveu a inibição do crescimento bacteriano da *S. mutans* tanto na forma planctônica, apresentando efeito bactericida, como inibindo a formação de biofilme monoespecífico. Deste modo, verificou-se que este composto possui ação antimicrobiana e antibiofilme, tendo um potencial para futuras aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n. 04, jul/ag. 2004.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AIRES, C. P. et al. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 40, n.1, p. 28-32, 2006.

AKINPELU, D. A. Short report Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286-287, 2001.

ALVES, F. C. S. **Avaliação do potencial antimicrobiano da infusão da folha do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) frente a *S. mutans*.** 2011. 61p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Campus Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral.

ALVES, P. M. et al. Antimicrobial and antiadherent activity, *in vitro*, of *rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) extract tested on cariogenic microrganisms. **Arquivos em Odontologia**, v.44, n. 2, ab./jun. 2008.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.

ARAÚJO, R. F. et al. Concentração Mínima Bactericida do Extrato do Cajueiro sobre Bactérias do Biofilme Dental. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 9, n. 2, p. 187-191, maio-ago. 2009.

ARTHUR, R.A. **Influência da sacarose na diversidade genotípica do *S. mutans* no biofilme dental.** 2006. 94p. Dissertação (Mestrado em Odontologia).Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

BARBOSA-FILHO, J.M et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev Bras Farmacogn.** v. 15, p. 392-413, 2005.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à Química de Alimentos.** 3. ed. São Paulo: Varela, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil: **Condições de Saúde Bucal da População Brasileira.** Brasília, 2010.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.** v. 55, n. 3, jul/sep. 2003.

CARNEIRO, V. A. **Efeitos de lectinas e diterpeno sobre biofilmes microbianos de interesse médico.** 2010. 149f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CHELIKANI, R; KIM, Y. H.; YOON, D. Y.; KIM, D. S. Enzymatic polymerization of natural anacardic acid and antibiofouling effects of polyanacardic acid coatings. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 157, n. 2, p. 263-77, maio 2009.

CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the a etiology of dental caries. **Br J Exp Pathol** , 985v. 5, p. 141-147, 1924

COGHLAN, A. Slime City. **New Scientist**, v. 2045, p.32-36, 1996.

DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **J Ethnopharmacol**, v.71, p.307-313, 2000.

ELDER, M. J. et al. Biofilm-related infections. **Ophthalmology eye**, v. 9, n. 1, p.102-109, 1995.

ELIAKIM-IKECHUKWU, C. F.; OBRI, A. I.; AKPA, O. A. Phytochemical and Micronutrient Composition of *Anacardium Occidentale* Linn (cashew) stem-bark hydroethanolic extract and its effect on the fasting blood glucose levels and body weight of diabetic wistar rats. **The Internet Journal of Nutrition and Wellness**, v. 10, n. 1, 2010.

EVARISTO, F. F. V. Avaliação Antimicrobiana do extrato etanoico e do composto isolado obtido das folhas de *Combretum leprosum*. 2012. 72p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Campus Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed, 1988.

FAZANARO, F. Avaliação *in vitro* da interferência de lectinas vegetais e do diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius* sobre o crescimento de formas planctônicas e biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Campus Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2010.

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

FERREIRA, A. L. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. 2005. Dissertação (Mestrado Farmacologia) - UNICAMP, Campinas-SP, 2005.

GREEN, I. R. et al. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. **Eur J Med Chem**, v. 43, p. 1315-1320, 2008.

GRENN, I. R. et al. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Biorganic and Medicinal Chemistry**. v. 15, p. 6236-6241, 2007.

GUGGENHEIM, B.; GIERTSEN, W.; SCHUPBACH, P.; SHAPIRO, S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. **Journal of Dental Research**, v. 80,

p. 363 - 370, 2000.

HUBER ,L.S.; RODRIGUEZ –AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimen. Nut.** Araraquara, n.1, v.19, 2008. p.97-108.

IKAN, R. **Natural Products:** a Laboratory Guide. London: Academic Press, 1991.

JORGE, L.I.F. Diagnose Laboratorial dos frutos e folhas de *anacardium occidentale L* (*CAJU*). **Revista brasileira de farmacologia.** v. 1, 1996.

KAWADA-MATSUO, M. et al. GlmS and NagB Regulate Amino Sugar Metabolism in Opposing Directions and Affect *Streptococcus mutans* Virulence. **PLoS One**, v. 3, n.7, p. 333 382, 2012.

KEYES, P. H. Recent advances in dental research: bacteriology. **Int. Dent. J.**, v. 12, n. 4, p. 443-464, 1964.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. **Ann Rev Microbiol.**, v. 54, p. 423-437, 2000.

KONAN, A. N. et al. Acute ,subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of cashew (*Anacardium occidentale*,L). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p.30-38, 2007.

KONAN, A. N. et al. Citotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2010.

KOO, H et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n. 5, p.782-789, 2003.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I. Extracellular Polysaccharides matrix- An often forgotten virulence factor in oral biofilm research. **Int J Oral Sci**, Chengdu, v. 1, n. 4, p. 229-234, dez. 2009

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-Helicobacter pylori Agents from the Cashew Apple. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 533-537, 1999.

KUBO I.; MASUOKA N.; HA,T J Tsujimoto. K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**. 99 555–562, 2006

KUDI A. C. et al. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 67, p. 225-228, 1999.

KUNZI, B. et al. Damage of *Streptococcus mutans* biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. **BMC Microbiology**. v.10, n.199, p. 01-13, 2010.

FURLAN M. F. et al. **Biofilmes Dentários: Aspectos Microbiológicos**. 2006. 55f. Monografia de final de curso. Curso de odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. S. Aspectos microbiológicos da cárie dental microbiological. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 135-148, 2006.

LIMA, C. A. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. 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. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 3, n. 20, p.1-10, 2000.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNE, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.479.

LIMA, J. E. O. **Cárie dentária**: um novo conceito. 2007. 103 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

LIMA JÚNIOR, J. F. **Perspectivas dos cirurgiões dentistas sobre a inserção da fitoterapia na atenção básica de saúde**. 2005. 108 f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Dissertação (mestrado em odontologia preventiva e social), Natal, 2005.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. **Biofilms**. Cold Spring Harb Perspect Biol., doi: 10.1101/cshperspect.a000398, 2010.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral**. 4. ed. São Paulo: Santos, 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Ed. da UFC, 1988.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4586-4592, 2004.

MBOSSO, E. J. T. et al. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 476-481, 2010.

MELO, M. F. A. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de *Anacardium occidentale L.* sobre espécies de *Streptococcus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p.202-205, 2006.

MITCHELL, T. J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. **Nature Reviews**, v. 3, n. 1, p.219-230, 2003

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quím. Nova**, v.28, n.5, Sept./Oct. 2005.

MOURA, L. C.; **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubinosa* e *Pfaffia glomerata* Em microrganismos da cavidade bucal**. 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca, 2006.

MOYNIHAN, P. J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bull WHO**, v. 83, n. 9, p. 694-99, 2005.

NADER, T. T. **Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. 2010. 68f. Dissertação

(Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal - SP, 2010.

NEWBRUN, E. **Cariology**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983.

NOBRE DOS SANTOS M, et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Res.** v. 36, n. 5, p 347-52, 2002.

OLSON, J. A. **Efeitos biológicos dos carotenóides**. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9. ed. São Paulo: Manole, 2003. v. 1. cap. 33. p. 561-578.

O’TOOLE, G.A., and KOLTER, R. (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* bio-film development. **Mol Microbiol.** v. 30, p. 295–304.

O’TOOLE, G.A., and KOLTER, R. (1998b) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol Microbiol.** v. 28, p. 449–461.

O’TOOLE, G; KAPLAN, H.B; HOLTER, R. Biofilm formation as a microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49 - 79, 2000.

OVERMAN, P.R. Biofilm: a new view of plaque. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 1, p.1-8, 2000.

PERES, D. H. D. F.; RIBEIRO, G. L. U. Avaliação da eficácia do verniz de clorexidina na supressão dos estreptococos do grupo mutans na dentição decídua: estudo in vivo. **RPG**, v. 1, n. 11, p. 49-56, 2004.

PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

REIS, M. O. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana “In Vitro” do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea Gratissima* Gaertn – Abacateiro –**

(Lauraceae). 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca, Franca, 2006.

RIBANI, R. H. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas.** 2006. 138f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

ROSEN, T.; FORDICE, D. B. Cashew Nut Dermatitis. **Southern Medical Journal**, v. 87, n. 4, p. 543-546, 1994.

SÁ, N.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do diterpeno casbano, extraído de *Croton nepetaefolius* Baill, frente a bactérias orais.** Dissertação (mestrado em biotecnologia). 2011. 82p. Campus Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral.

SANTOS, M. N. et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Res.**, v.36, n. 5, p. 347-52, 2002.

SANTOS, P.R. **Aproveitamento de resíduos e microscopia de força atômica em materiais biológicos.** 2007. 309f.Tese (Doutorado em Física) - Centro de Ciências e Tecnologia Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SANTOS, R.P.; MARINHO M.M.; SÁ, R.A.; MARTINS, J.L. et al. Compositional analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ash and its in vitro antifungal activity against *Fusarium* species. **R. bras. Bioci.** v.2, p. 200–205, 2011.

SEBRAE. Disponível em <<http://sebrae.com.br>> Último acesso em 10 de Outubro de 2012.

SILVA, J. A. et al. **Determinação da Atividade Antioxidante e Toxicidade do Pendúnculo de Caju (*Anacardium Occidentale* L.) de clones comerciais.** Disponível em: <<http://www.annq.org/congresso2011/arquivos/1300404281.pdf>>. Acesso em: 10/08/2012.

SILVA, J. G. S. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(4), p. 572-577, 2007.

SILVA, L. L. et al. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Santa Maria-RS, 2009.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, A. N. et al. Caracterização química de pedúnculos de caju CCP-76 em diferentes estádios de desenvolvimento. **Caatinga**, v. 14, p. 75-78, 2001.

SOUZA, P. R. **Análise microbiológica e genético-molecular da biota orotraqueal de paciente crítico**: subsídios na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica. 2009. 184f. Tese (Doutorado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2009.

STEINBERG, D. et al. Formation of streptococcus mutans biofilm following toothbrushing with regular and whitening toothpastes. **Am J Dent**, v. 16, n. 1, p. 58-60, 2003.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TAUBMAN M. A; NASH, N. T. D. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Natury Reviews. Immunology.** v.7, p. 555- 563, 2006.

TEIXEIRA, H. E. **Avaliação do potencial anticárie de lectinas vegetais**. 2005.106f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

TREVISAN, M.T.; 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.** 44, 188–197, 2006.

TUROLLA, M. S. R. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo.** 2004. 145p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade de São Paulo

ZHANG, Q. et al. Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review. **Eur J Oral Sci.**, v.114, n.6, p. 449-455, 2006.

ANEXO

Molecules **2012**, *17*, 1-x manuscripts; doi:10.3390/molecules170x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Effect of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Peduncle Bagasse Extract Against *Streptococcus mutans*

Manuela Almeida Montenegro Furtado¹, Francisca das Chagas de Sousa Alves¹, Jorge Luis Martins², Edson Holanda Teixeira^{3,†}, Mayron Alves de Vasconcelos⁴, Vanessa Sabrine Correia Ramos¹, Giselly Soares de Sousa¹, André Luis Coelho da Silva⁴, Wladimir Ronald Lobo Farias⁵, Benildo Sousa Cavada^{4,†}, Ricardo Pires dos Santos^{1,†,*}

¹ Laboratory of Materials Engineering and Computation of Sobral (LEMCS), Federal University of Ceará, Campus do Derby, Sobral, CE, 62042-280, Brazil. E-mails: manu.almeida2009@gmail.com (M. A. M.); fcsalves2008@gmail.com (F. C. S. A.); vanessa13eng@gmail.com (G. S. S.), giselly.eng@gmail.com (G. S. S); rpsantos2007@gmail.com (R.P.S.).

² Institute of Chemical and Geosciences, Federal University of Pelotas, Campus do Capão do Leão, Pelotas, RS, 96160-000, Brazil. E-mail: jmartins.martins@gmail.com

³ Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS), Federal University of Ceará, Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Fortaleza, CE, 60430-160, Brazil. E-mail: edsonlec@gmail.com (E.H.T.)

⁴ Laboratory of Biologically Active Molecules (BioMol-Lab), Federal University of Ceará, Campus of Pici, Fortaleza, CE, 60440-970, Brazil. E-mails: bscavada@gmail.com (B.S.C.); alcoelho.ufc@gmail.com (A.L.C.S.), mayronvasconcelos@gmail.com (M.A.V.)

⁵ Department of Fishing Engineering. Federal University of Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE, 60.440-970, Brazil. E-mail: wladimir@ufc.br

* Scholarship holder of the CNPq Program for Productivity in Research.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: rpsantos2007@gmail.com (R.P.S.); Tel.: +55-88-3614-1616 (R.P.S.).

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The antimicrobial activity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract was investigated in this study. We prepared a solution of cashew peduncle bagasse extract to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC), of the strain of *Streptococcus mutans* UA159 in planktonic culture and biofilm after 24 h. The extract of bagasse exhibited antimicrobial action similar to chlorhexidine, a commercial bactericidal agent utilized in dental clinics. The results of this study showed that cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse residue has biotechnological potential as an antimicrobial agent.

Keywords: *Anacardium occidentale* L.; biofilm; extract; peduncle; residue; *Streptococcus mutans*

1. Introduction

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) occupies an important position among tropical fruit trees due to the growing commercialization of its main products: the nut and the peduncle, also known as the cashew “apple”. Cashew is one of the major crops in the Northeast Region of Brazil (approximately ton/year), where it is grown mainly in the states of Ceará, Rio Grande do Norte and Piauí. The peduncle is processed and used for the production of drinks, sweets, jams, nectar, flour, fermented products and rations, but less than 6% of the peduncle produced is used [1]. The chemical composition of the peduncle is very complex and includes proteins, tannins, sugars, ascorbic acid, phosphorous, calcium, iron and vitamin A [2]. Its juice has been used to produce a film with healing, analgesic and anti-inflammatory properties [3]. Incineration of the peduncle produces ash with fungicidal properties against important species of the genus *Fusarium* as a result of the large amounts of KHCO_3 produced [4-6].

The cashew peduncle bagasse, the by-product of the juice extraction process, represents approximately 20% of the total weight of the peduncle [7]. It is one of the greatest sources of

residues (90–94%) produced by the cashew agronomic industry [8], and its exploitation is restricted to use as a nutritional supplement in animal food. This limited use is a result of its rapid degradation, making it impossible to store. Broinizi and colleagues [9] have shown that the alcoholic extract of peduncle bagasse possesses antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds.

Pathogenic bacteria rarely exist in the form of pure planktonic cultures [10]; instead, they persist adhered to surfaces within a highly complex ecosystem represented by a structured biofilm established inside the host. In the presence of a biofilm, bacteria are more resistant to the action of antibacterial agents [11]. Dental plaque is a type of biofilm that develops on the surfaces of teeth and is a precursor to tooth decay. Dental plaque consists of multiple species of bacteria that take part in the complex ecosystems of the mouth. One such species is *Streptococcus mutans*, a gram-positive bacterium that is the primary causative agent of dental caries [12]. Several products originating directly from plants (as extracts, infusions, etc.) have shown activity against microorganisms related to dental caries. Due to their therapeutic effects, low cost and reduced toxicity, these products have been used by populations in several areas of the world [13].

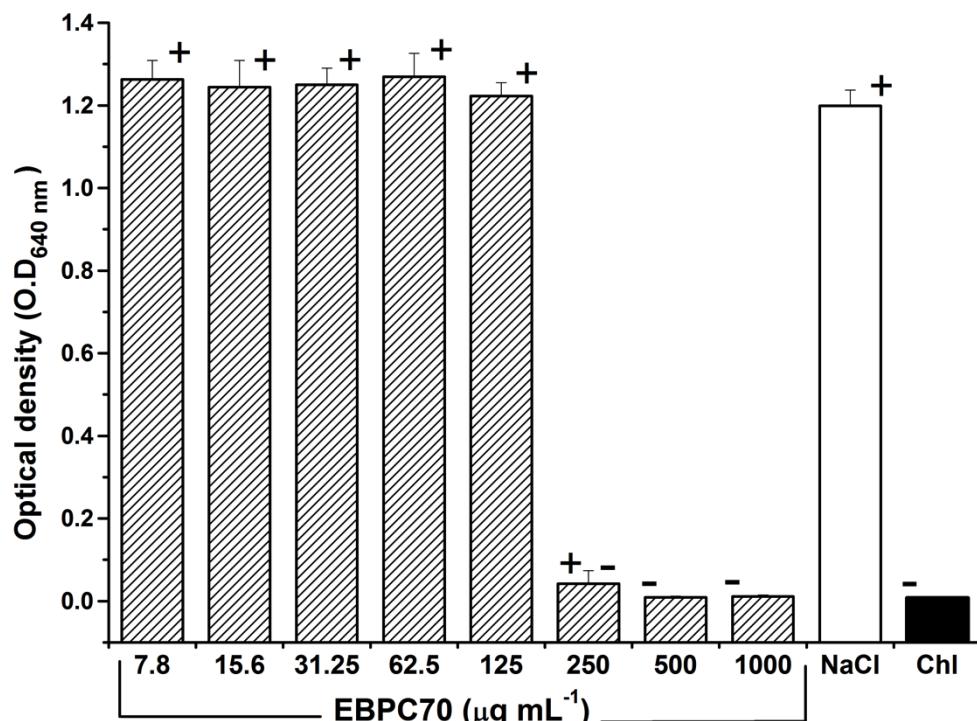
The aim of this work was to evaluate the antimicrobial action of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract (EBPC70) against planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. This work also explores alternatives for the use of the large excess of agro-industrial residues produced by cashew and juice extraction.

2. Results and Discussion

Figure 1 shows the effects of EBPC70 on bacterial growth. Chlorhexidine solution (positive control) inhibited bacterial growth compared to the negative control ($P < 0.01$). This result was expected because chlorhexidine is a powerful antimicrobial agent used in dentistry. EBPC70 solutions with concentrations greater than or equal to 250 $\mu\text{g/mL}$ (MIC) showed bacteriostatic action. At MIC, the EBPC70 caused a reduction of planktonic growth of approximately 96% relative to the absorbance of the negative control absorbance. Concentrations above 250 $\mu\text{g/mL}$ showed activity equal to chlorhexidine ($P > 0.01$), with a decrease of planktonic bacteria growth of approximately 99%.

Figure 1. Optical density (mean \pm SD) for the antibacterial activity assay against *Streptococcus mutans* UA159. Plus (+) and minus (-) symbols above the bars indicate statistically significant differences between the

means ($P < 0.01$) and the positive (Chl) and negative (NaCl) controls, respectively.



In bactericidal assays (Figure 2), EBPC70 solutions with concentrations equal to or greater than 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MMC) caused bacterial death.

Figure 2. Microbicidal assays of EBPC70 against *Streptococcus mutans* UA159. The tubes represent different concentrations of extract with bacteria planktonic cultures and BHI medium after 24 h. The concentrations of EBPC70 shown in the illustration are **(a)** 1000, **(b)** 500, **(c)** 250, and **(d)** 125 $\mu\text{g/mL}$. The cultures with concentrations of 1000 $\mu\text{g/mL}$ did not present visible microbial growth (turbidity similar to the positive control) compared to the other samples (greater turbidity).

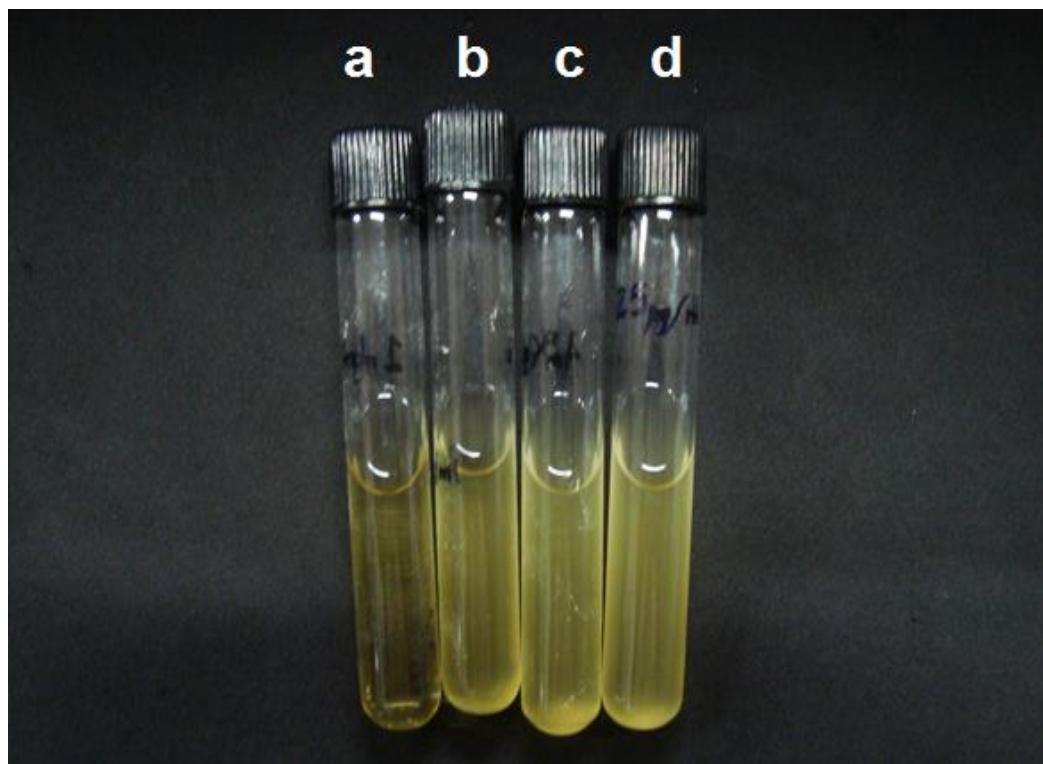
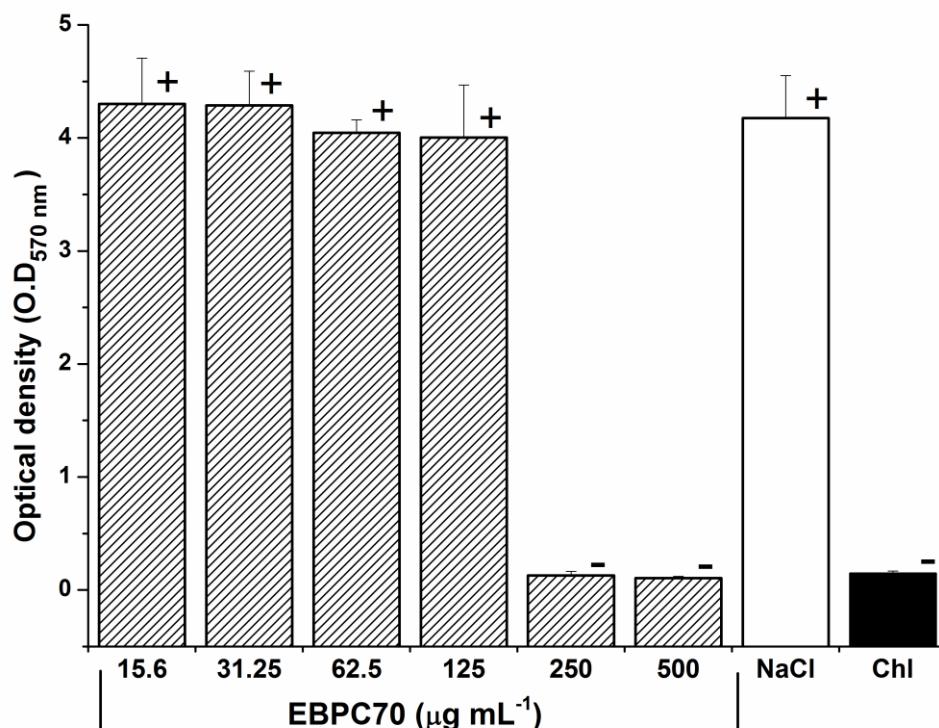


Figure 3 shows the effects of EBPC70 on biofilm growth. As expected, we observed that chlorhexidine inhibits the growth of biofilm compared to the negative control ($P < 0.01$). EBPC70 solutions with concentrations equal to or greater than 250 $\mu\text{g/mL}$ (MIC) also showed inhibitory activity on biofilm growth equal to chlorhexidine ($P > 0.01$). At these concentrations, the EBPC70 solution caused a reduction of approximately 96% in the biofilm growth compared to the absorbance of the negative control.

Figure 3. Optical densities (mean \pm SD) for the anti-biofilm activity assay against *Streptococcus mutans* UA159. Plus (+) and minus (-) symbols above the bars indicate statistically significant differences between the means ($P < 0.01$) and the positive (Chl) and negative (NaCl) controls, respectively.



The origin of the antimicrobial effect of EBPC70 requires additional investigation. The chemical composition (in the determination phase) is essential to understanding this effect. After hydroalcoholic extraction, several compounds of the peduncle should be present in EBPC70 (primarily tannins). One or more of these compounds, acting together or separately, may be responsible for the high efficacy of this extract on the growth of bacteria and biofilms. Tannins are responsible for the bacterial inhibitory activities displayed by several plant extracts [14]. The presence of tannins in the EBPC70 may be causing the complexation of macromolecules such as polysaccharides and proteins, and changing the structure of the bacterial cell membrane [15]. Kubo and colleagues [16] have shown that the ethanolic extract of the peduncle inhibits the growth of *Helicobacter pylori*. Grenn and colleagues [17] observed that anacardic acids extracted from peduncle juice exhibit antimicrobial activity against *S. mutans* at concentrations of 800 $\mu\text{g/mL}$. Thus, the effect of EBPC70 may be a result of the combined presence of tannins and anacardic acids in the extract. However, synergistic effects of other compounds should not be overlooked.

Medicinal plants represent an important therapeutic source for the treatment of many types of diseases. Approximately 20,000 species from several families of plants are used for this purpose. Brazil has more than 56,000 species of plants,

representing an enormous biodiversity [18]. This biodiversity, along with the popular traditions passed mainly by indigenous cultures, can be used to develop the crude materials in flora into novel drugs. Studies with the goal of obtaining drugs from plants have been increasing in recent years. Approximately 30% of the drugs produced by developed countries are derived from plants [19]. Due to their effectiveness and low cost, medications based on plant extracts are also commercially available herbal products. An example of this is Melxi® (Hebron laboratory), a herbal medicine produced from the extract of pineapple (*Ananas comosus*). Melxi® is utilized as an adjunctive for the treatment of tracheobronchitis and its manifestations and improves the fluidity of mucous secretions. Antimicrobial agents produced from medicinal plant extracts are proving to be effective for the treatment of infectious diseases and have few side effects compared with antimicrobial agents of synthetic origin [20]. For example, extracts of *Xanthosema violaceum* Schott (taro) and *Syzygium cuminii* L. (jambolan) are capable of significantly inhibiting the growth of several bacteria species [21]. Thus, the by-product of the cashew peduncle can also be an important source of antimicrobial drugs.

3. Experimental Section

3.1. Production of extract

Samples of red cashew peduncles were obtained from plantations in the state of Ceará, Brazil during the months of September and October in 2008. After extraction from the nut, the peduncles were pressed to remove the juice, producing the cashew bagasse. The bagasse was then dried in an oven at 36°C for 48 h and ground in an analytical mill. For production of the extract, the bagasse powder was added to a hydroalcoholic solution (70%), stirred for 30 min, and stored at room temperature for 7 days. The solution was filtered and subjected to rotatory evaporation in a water bath at 60°C for 48 h. Finally, the extract was lyophilized for 24 h to form a powder referred to as EBPC70.

3.2 Microorganism

The bacterial strain *Streptococcus mutans* UA 159 used in this study was obtained from the Instituto Oswaldo Cruz–FIOCRUZ collection. The strains were kept in BHI (Brain Heart Infusion–Difco) and 20% glycerol at -80 °C. For the experimental procedures, 100 µL of bacteria was inoculated into 10 mL of fresh BHI broth and incubated for 18 h at 37 °C in 10% CO₂. After initial activation, the culture was renewed using 100 µL of inoculum in 10 mL of sterile BHI broth and grown under the same conditions as described above.

3.3. Effect of EBPC70 on bacterial growth

The effects of EBPC70 on bacterial growth (planktonic culture) were determined using the broth microdilution method in 96-well polystyrene plates, according to the procedure outlined by NCCLS [22]. After cell growth, the culture was centrifuged at 1,500 g for 20 min at 4°C, washed twice with 0.9% NaCl and then adjusted to a concentration of 10⁸–10⁹ colony forming units (CFU)/mL. The EBPC70 solutions were prepared by 2-fold serial dilution, with concentrations ranging from 7.8 to 1000 µg/mL. The assay in polystyrene plates was carried out by the addition of 200 µL of fresh BHI broth to each well and 4 µL of the EBPC70 solution at each concentration. The negative control used was 0.9% NaCl, which represents the normal growth of bacteria using the same procedure for bacteria/EBPC70. We also included 0.12% chlorhexidine, which represents the inhibitory action (positive control) of a commercially available bacterial agent. The optical density at 640 nm of the content of each well was recorded using an automated Elisa Reader (Synergy TM HT Multi-Detection Microtiter Reader) to measure microbial growth. When the plates were ready, an initial measurement was carried out to establish a baseline. Measurements were made after 24 h of incubation at 37 °C in 10% CO₂. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of EBPC70 that caused a statistically significant reduction in the optical density compared to the negative control (inhibition of growth of the bacteria).

3.4. Microbicidal action of EBPC70

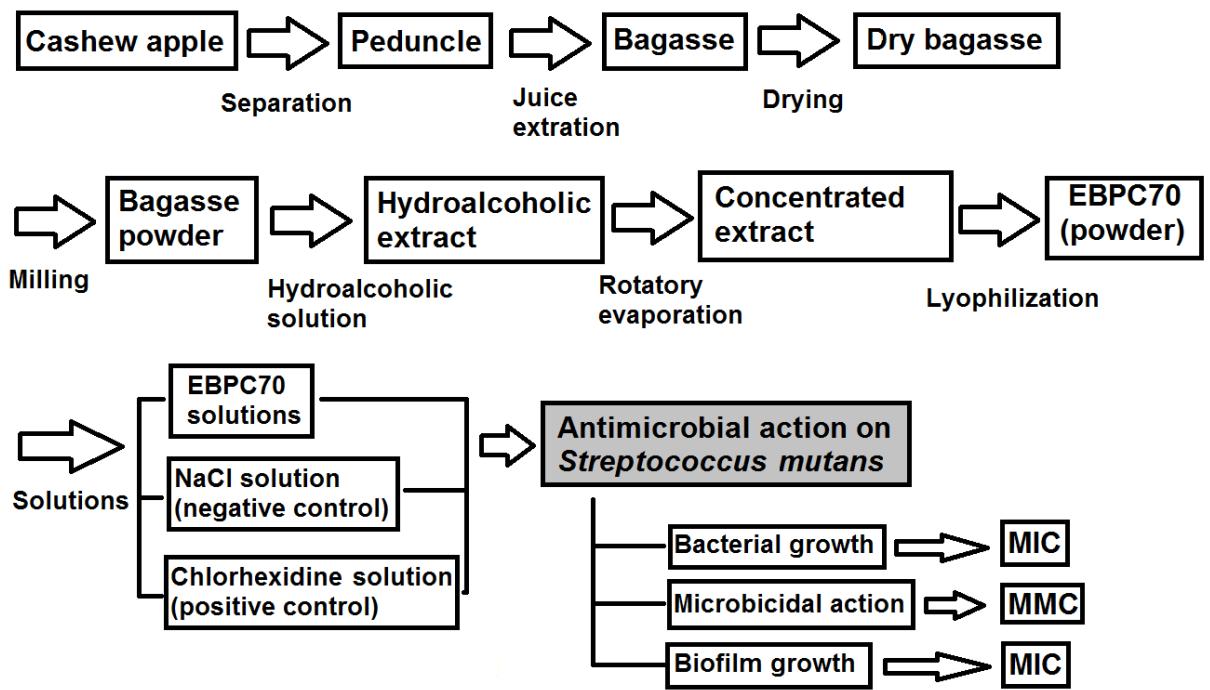
To determine the minimum microbicidal concentration (MMC), 10 µL of the contents of the wells from the experiments in section 3.3 were used to assess the

effect of EBPC70 on bacterial growth were inoculated in assay tubes with BHI medium and incubated for 24 h at 37 °C in 10% CO₂. MMC was considered as being the lowest concentration able to completely inhibit visible microbial growth (turbidity) in tubes compared to the positive control [23-24].

3.5. Effect of EBPC70 on biofilm growth

The methodology used to monitor biofilm growth was based on the microtiter plate test developed by Stepanovic and colleagues [25] with some modifications [23]. Sterile 96-well flat-bottom polypropylene tissue culture plates were prepared using a procedure similar to the one used to assay the effects on bacterial growth with the same initial concentration of cells. The plates were incubated aerobically on a horizontal shaker at 120 rpm/min at 37 °C for biofilm development. Biofilm growth was tested in the presence of EBPC70, (concentrations ranging from 15.6 to 500 µg/mL), 0.9 % NaCl, or 0.12% chlorhexidine for 24 h. Following incubation, the content of each well was removed and the biofilms were washed twice with 200 µL/well of sterilized water to remove weakly adhered cells. These cells were preserved for posterior analysis. The attached biofilm mass was quantified using crystal violet staining [26]. Briefly, the plates containing the biofilms were dried in air for 30 min, and 200 µL of absolute methanol was transferred to each well to fix the adhered cells. After 15 min, the methanol was removed, and 200 µL of 1% crystal violet (Gram color-staining set for microscopy; Merck; Darmstadt, Germany) per well was added. After 5 min, the washing process was repeated with sterile water, and the plates were allowed to stand at room temperature for 1 h. To re-solubilize the dye bound to biofilms, 200 µL of 33% (v/v) glacial acetic acid (Merck) was added to each well, and the plates were agitated for 15 min. The obtained solutions were transferred to a new sterile 96-well plate, and the optical densities at 570 nm for the contents of each well were recorded using an automated Elisa Reader (Synergy TM HT Multi-Detection Microtiter Reader). The minimum inhibitory concentration (MIC) to biofilm growth was determined according to the methodology used in the planktonic culture study. A schematic representation of all experimental procedures is shown in Figure 4.

Figure 4. Schematic representation of the preparation and antimicrobial activity of the cashew peduncle bagasse extract (EBPC70).



3.6. Statistical analysis

The results from nine repetitions ($n = 9$) of at least three separate experiments were obtained. Quantitative data are expressed as the means \pm standard deviation (SD). A Mann-Whitney non-parametric test was performed to determine the significant differences between two groups [27]. The significance level used was 0.01 ($P < 0.01$). All statistical analyses were performed using OriginPro 8.5 software (OriginLab Corporation).

4. Conclusions

In this study, we show that cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse, a residue of the Brazilian cashew agribusiness, has biotechnological potential as an antimicrobial agent. Its extract (EBPC70) showed inhibition of bacterial growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans* UA159 as well as

microbicidal activity. These activities were comparable to chlorhexidine, a powerful antimicrobial agent used in dental clinics. Because chlorhexidine is harmful at high concentrations, EPBC70 may be an alternative to the use of this substance. Toxicological studies will need to be performed to validate its applicability in this regard.

Acknowledgments

We would like to thank the professors, technicians and students of the Biotechnology Center of Sobral (NUBIS), and the Biologically Active Molecules Laboratory (BioMol-Lab) of the Federal University of Ceará, CE, Brazil for research facilities, technical support and important suggestions during this work. B. S. Cavada, E. H. Teixeira and R. P Santos, are investigators for the National Council of Research (CNPq). This work received partial financial support from CNPq - projects no. 501221/2009-3 and 473911/2010-8. AJE (American Journal Experts) helped with the English editing of the manuscript.

References and Notes

1. Moura, C.F.H. Qualidade de pedúnculos de clones de cajueiro-anão-precoce (*Anarcadium occidentale* L. var. *nanum*) irrigados. M.Sc Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza –Brazil, 1998.
2. FAO - Food and Agricultural Organization. *Food and fruitbearing forest species. 3. Examples from Latin America.* FAO-Forestry Paper 44/3; Rome, Italy, 1986, pp.19–23.
3. Silva, M.S.H. Acajumembrana no cuidado cultural em feridas. PhD Thesis. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza –Brazil, 2002.
4. Santos, R.P.; Marinho M.M.; Sá, R.A.; Martins, J.L.; Teixeira, E.H.; Alves, F.C.S.; Ramos, V.S.C.; Sousa, G.S.; Cavada, B.S.; Santos, R.P. Compositional

- analysis of cashew (*Anacardium occidentale L.*) peduncle bagasse ash and its in vitro antifungal activity against *Fusarium* species. *R. bras. Bioci* **2011**, *2*, 200–205.
5. Karabulut, O.A.; Arslan, U.; Ilhan, K.; Yagdi, K. The effect of sodium bicarbonate alone or in combination with a reduced rate of mancozeb on the control of leaf rust *Puccinia triticina* in wheat. *Can. J. Plant Pathol* **2006**, *28*, 484–488.
6. Diliopoulos, T.; Kettlewell, P.S; Martin, C.H. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection* **2010**, *29*, 1059–1075.
7. Agrianual – Anuário da Agricultura Brasileira. *FNP Consultoria & Comércio*. São Paulo, BR, 2000; p. 244–248.
8. Santos R.P.; Santiago, A.A.X.; Gadelha, C.A.A.; Cajazeiras, J.B.; Cavada, B.S.; Martins, J.L.; Oliveira, T.M.; Bezerra, G.A.; Santos, R.P.; Freire, V.N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale L.*) peduncle bagasse ashes. *J Food Eng* **2007**, *79*, 1432–1437.
9. Broinizi, P.R.B.; Andrade-Wartha, E.R.S.; Silva, A.M.O.; Novoa, A.J.V.; Torres, R.P.; Azeredo, H.M.C.; Alves, R.E.; Mancini-Filho, J. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds naturally contained in by-products of the cashew apple (*Anacardium occidentale L.*). *Ciênc. Tecnol. Aliment* **2007**, *27*(4), 902–908.
10. Santos, R.P.; Arruda, T.T.P.; Carvalho, C.B.M.; Carneiro, V.A.; Braga, L.Q.V.; Teixeira, E.H. Arruda, F.V.S.; Cavada, B.S.; Hapt, A.; de Oliveira, T.M. ; Bezerra, G.A.; Freire, V.N. Correlation between *Enterococcus faecalis* biofilms development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. *Microsc. Microanal* **2008**, *14*, 1–9.
11. Gilbert, P.J.; Das, J.; Foley, I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **1997**, *11*, 160–167.

12. Takada, K.; Hirasawa, M. A novel selective medium for isolation of *Streptococcus mutans*. *J Microbiol Methods* **2005**, *60*, 189–193.
13. Kuete, V.; Ngameni, B.; Fotso, S.C.C.; Kengap, T.R.; Tchaleu, N.B.; Meyer, J.J.M.; Lall, N.; Kuiate, J.R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *J Ethnopharmacol* **2008**, *120*, 17–24.
14. Djipa, C.D.; Delmee, M.; Quentin-Leclercq, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol* **2000**, *71*, 307–313.
15. Simões, A.N.; Menezes, J.B.; Andrade, J.C.; Freitas, D.F.; Costa, F.B.; Souza, P.A. Caracterização química de pedúnculos de caju CCP-76 em diferentes estádios de desenvolvimento. *Caatinga* **2001**, *14*, 75–78.
16. Kubo, J.; Lee, J.R.; Kubo, I. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *J Agric Food Chem* **1999**, *47*(2), 533–537.
17. Green, I.R.; Tocoli, F.E.; Lee, S.H.; Nihei, K.; Kubo, I. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *Eur J Med Chem* **2008**, *43*, 1315–1320.
18. Giulietti, A.M.; Harley, R.M.; Queiroz, L.P.; Wanderley, M.G.L.; Van den Berg, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conserv Biol* **2005**, *19*, 632–639.
19. Silveira, L.M.S.; Olea, R.S.G.; Mesquita, J.S.; Cruz, A.L.N.; Mendes, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Rev. Bras. Farm* **2009**, *90*(2), 124–128.

20. Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basílio, I.J.L.D.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. bras. Farmacogn* **2008**, *18*(3), 472–508.
21. Michelin, D.C.; Moreschi, P.E.; Lima, A.C.; Nascimento, G.G.F.; Paganelli, M.O.; Chaud, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev. bras. Farmacogn* **2005**, *15*(4), 316–320.
22. NCCLC - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*; Approved standard (M7-A63) Wayne, Pennsylvania, 2003.
23. Carneiro, V.A.; Santos, H.S.; Arruda, F.V.S.; Bandeira, P.N.; Albuquerque, M.R.J.R.; Pereira, M.O.; Henriques, M.; Cavada, B.S.; Teixeira, E. H. Casbane Diterpene as a Promising Natural Antimicrobial Agent against Biofilm-Associated Infections. *Molecules* **2011**, *16*, 190–201.
24. Cavalcante, T.T.A.; Rocha, B.A.M.; Carneiro, V.A.; Arruda, F.V.S.; Nascimento, A.S.F.; Sá, N.C.; Nascimento, K.S.; Cavada, B.S; Teixeira, E.H. Effect of Lectins from *Diocleinae* Subtribe against Oral *Streptococci*. *Molecules* **2011**, *16*, 3530–3543.
25. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* **2000**, *40*, 175–179.
26. Burton, E.; Yakandawala, N.; LoVetri, K.; Madhyastha, M.S. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* **2007**, *34*, 1–4.
27. Triola, M. F. *Elementary Statistical*; Addison Wesley Longman: England, 2008, p.896.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).