

Isabela Monici Silva

Manutenção da viabilidade e dos fatores de virulência de
Streptococcus mutans após o uso de agente anticólicasenase

Brasília
2021

Isabela Monici Silva

Manutenção da viabilidade e dos fatores de virulência de
Streptococcus mutans após o uso de agente anticolagenase

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Odontologia da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para a conclusão do curso
de Graduação em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Nailê Damé-Teixeira

Brasília

Dedicatória (opcional)

Aos meus pais, Janaina e Washington.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, por todo suporte não só financeiro como emocional nessa jornada e por sempre terem fé em mim.

Aos meus amigos: Jéssica Jacovetti, Jéssica Presmic e Lucas Breno, por tornarem esses anos mais leves e felizes, por estarem presentes nos momentos bons e ruins e serem minha segunda família.

À minha orientadora Nailê, por todos os ensinamentos, pela dedicação, por ser um exemplo de pesquisadora e inspiração e por ter se mantido sempre presente, mesmo à distância.

À Cecília, minha companheira de laboratório, por toda a paciência, carinho e dedicação. Por ter estado presente nos perrengues e também nas comemorações quando o experimento dava certo. Muito obrigada! Esse trabalho é nosso!

RESUMO

Silva, Isabela. Manutenção da viabilidade e dos fatores de virulência de *Streptococcus mutans* após o uso de agente anticlagenase. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

O *Streptococcus mutans* tem sido fortemente relacionado à cárie radicular e, em estudo prévio, observou-se alta expressão de seus genes que codificam colagenases em lesões clínicas de cárie radicular. Dessa forma, a atividade colagenolítica também pode ser um importante fator de virulência de *S. mutans* em cárie radicular. Esse estudo teve como objetivo testar a viabilidade em células planctônicas e a manutenção de fatores de virulência de cepas de *S. mutans* tratadas com um agente anticlagenolítico (ácido anacárdico saturado). Metodologia: a cepa *S. mutans* UA159 foi testada quanto a curva dose-resposta da substância, para determinar as concentrações com manutenção do crescimento celular. Testes de cariogenicidade foram aplicados para as concentrações de 1, 3 e 5 µg/mL. Um controle positivo e controles de etanol foram usados em todos os testes. Para acidogênese, os grupos testes e controle positivo, acrescidos de glicose 5% e a respectiva concentração de AA, tiveram seu pH registrado durante 180 minutos. Os dados de curva de pH e pH final foram plotados padronizadamente e a área sob a curva (AUC) foi calculada utilizando o software UTHSCSA ImageTool®. A proporção de adesão entre os grupos foi mensurada pela proporção de células aderidas e a tolerância ácida avaliada pelo número de UFC em pH 4 e 7 em 0 e após 30 minutos. Os dados foram comparados (ANOVA + Bonferroni e Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). Resultados: o teste de acidogênese resultou em similaridade entre os grupos teste (AUC 395.1-416.1 mm²; $p >$

0,05) e o controle negativo foi menos acidogênico do que os demais grupos ($p < 0,0001$), não houve diferença entre controles e grupos teste com relação a adesão e aciduricidade microbiana ($p > 0,05$). Conclusão: O ácido anacárdico saturado (LDT11) reduziu a viabilidade do *S. mutans* em concentrações acima de 5 $\mu\text{g/mL}$, mas não apresentou efeito sobre o potencial acidogênico, capacidade de adesão e aciduricidade em baixas concentrações. Por isso, sua aplicação em baixas concentrações para interromper função colagenolítica-alvo poderá ser posteriormente testada de forma isolada (na ausência de outros efeitos na cariogenicidade).

ABSTRACT

SILVA, Isabela. Maintenance of *Streptococcus mutans* viability and virulence factors in the presence of an anticollagenase agent. 2021. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Streptococcus mutans has been strongly related to root caries. In a previous study, its genes encoding collagenases had a high and significant differential expression in root caries-associated biofilms when compared to biofilms associated with sound surfaces. Thus, collagenolytic activity can also be an important factor of *S. mutans* virulence in root caries. This study aimed to test the viability and maintenance of virulence factors of *S. mutans* treated with an anti-collagenolytic agent (saturated anacardic acid). Methodology: The A dose-response curve was performed to determine concentrations with maintenance of cell growth. Cariogenicity tests were applied at concentrations of 1, 3 and 5 µg/mL. A positive control and ethanol controls were used in all tests. For measuring the acidogenesis, the pH in media supplemented with 5% of glucose was recorded for 180 minutes. The pH and final pH curve data were plotted and the area under the curve (AUC) was calculated using the UTHSCSA ImageTool®. The proportion of adherence between the groups was measured by the proportion of adhered cells and the acid tolerance was assessed after CFU counting at pH 4 and 7 at 0 and after 30 minutes. The data were compared by ANOVA and Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Results: The acidogenesis test resulted in similarity between the test groups (AUC 395.1-416.1 mm²; $p > 0.05$) and the negative control was less acidogenic than the other groups ($p < 0.0001$). There was no difference between controls and test groups regarding adherence and microbial aciduricity ($p >$

0.05). Conclusion: Saturated anacardic acid (LDT11) reduced the viability of *S. mutans* in concentrations above 5 µg/mL but had no effect on the acidogenic potential, adherence capacity and acidity of *S. mutans* at low concentrations. For this reason, its application at low concentrations to interrupt target collagenolytic function may later be tested in isolation (in the absence of other effects on cariogenicity).

SUMÁRIO

Artigo Científico	17
Folha de Título	19
Resumo	20
Abstract	22
Introdução	24
Metodologia	27
Resultados	31
Discussão	37
Conclusão.....	42
Referências	43
Anexos.....	49
Normas da Revista.....	51

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

SILVA, Isabela Monici; BARBOSA, Cecília de Brito Barbosa; HOLANDA, Cleonice Andrade; SALLES, Loise Pedrosa; TORRES, Fernando Araripe Gonçalves; GOMES, Mirna Barbosa; ROMEIRO, Luiz Antônio Soares; DAME-TEIXEIRA, Naile. Manutenção da viabilidade e dos fatores de virulência de *Streptococcus mutans* após o uso de agente anticolagenase.

Apresentado sob as normas de publicação da Revista *Caries Research*

FOLHA DE TÍTULO

Manutenção da viabilidade e dos fatores de virulência de *Streptococcus mutans* após uso de agente anticollagenase.

Maintenance of Streptococcus mutans viability and virulence factors in the presence of an anticollagenase agent.

Isabela Monici Silva¹
Cecília de Brito Barbosa¹
Cleonice Andrade Holanda²
Loise Pedrosa Salles¹
Fernando Araripe Gonçalves Torres³
Mirna Barbosa Gomes³
Luiz Antônio Soares Romeiro²
Naile Dame-Teixeira¹

¹ Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília.

² Departamento de Farmácia da Universidade de Brasília.

³ Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

Correspondência: Profa. Dra. Nailê Damé-Teixeira
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de
Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 -
Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: nailedame@hotmail.com / Telefone: (61) 31071849

RESUMO

Manutenção da viabilidade e dos fatores de virulência de *Streptococcus mutans* após uso de agente anticolagenase.

Resumo

O *Streptococcus mutans* tem sido fortemente relacionado à cárie radicular e, em estudo prévio, observou-se alta expressão de seus genes que codificam colagenases em lesões clínicas de cárie radicular. Dessa forma, a atividade colagenolítica também pode ser um importante fator de virulência de *S. mutans* em cárie radicular. Esse estudo teve como objetivo testar a viabilidade em células planctônicas e a manutenção de fatores de virulência de cepas de *S. mutans* tratadas com um agente anticolagenolítico (ácido anacárdico saturado). Metodologia: a cepa *S. mutans* UA159 foi testada quanto a curva dose-resposta da substância, para determinar as concentrações com manutenção do crescimento celular. Testes de cariogenicidade foram aplicados para as concentrações de 1, 3 e 5 µg/mL. Um controle positivo e controles de etanol foram usados em todos os testes. Para acidogênese, os grupos testes e controle positivo, acrescidos de glicose 5% e a respectiva concentração de AA, tiveram seu pH registrado durante 180 minutos. Os dados de curva de pH e pH final foram plotados padronizadamente e a área sob a curva (AUC) foi calculada utilizando o software UTHSCSA ImageTool®. A proporção de adesão entre os grupos foi mensurada pela proporção de células aderidas e a tolerância ácida avaliada pelo número de UFC em pH 4 e 7 em 0 e após 30 minutos. Os dados foram comparados (ANOVA + Bonferroni e Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). Resultados: o teste de acidogênese resultou em similaridade entre os grupos teste (AUC 395.1-416.1 mm²; $p > 0,05$) e o controle negativo foi menos acidogênico do que os demais grupos ($p < 0,0001$), não houve diferença entre controles

e grupos teste com relação a adesão e aciduricidade microbiana ($p>0,05$). Conclusão: O ácido anacárdico saturado (LDT11) reduziu a viabilidade do *S. mutans* em concentrações acima de 5 $\mu\text{g/mL}$, mas não apresentou efeito sobre o potencial acidogênico, capacidade de adesão e aciduricidade em baixas concentrações. Por isso, sua aplicação em baixas concentrações para interromper função colagenolítica-alvo poderá ser posteriormente testada de forma isolada (na ausência de outros efeitos na cariogenicidade).

Palavras-chave: Cárie radicular; Doença cárie; *Streptococcus mutans*; colagenase; Ácido anacárdico saturado; LDT11.

ABSTRACT

Maintenance of Streptococcus mutans viability and virulence factors factors in the presence of an anticollagenase agent.

Abstract

Streptococcus mutans has been strongly related to root caries. In a previous study, its genes encoding collagenases had a high and significant differential expression in root caries-associated biofilms when compared to biofilms associated with sound surfaces. Thus, collagenolytic activity can also be an important factor of *S. mutans* virulence in root caries. This study aimed to test the viability and maintenance of virulence factors of *S. mutans* treated with an anti-collagenolytic agent (saturated anacardic acid), an important step before starting the tests for applicability of the substance as a possible anti-root caries drug. Methodology: The A dose-response curve was performed to determine concentrations with maintenance of cell growth. Cariogenicity tests were applied at concentrations of 1, 3 and 5 µg/mL. A positive control and ethanol controls were used in all tests. For measuring the acidogenesis, the pH in media supplemented with 5% of glucose was recorded for 180 minutes. The pH and final pH curve data were plotted and the area under the curve (AUC) was calculated using the UTHSCSA ImageTool®. The proportion of adherence between the groups was measured by the proportion of adhered cells and the acid tolerance was assessed after CFU counting at pH 4 and 7 at 0 and after 30 minutes. The data were compared by ANOVA and Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Results: The acidogenesis test resulted in similarity between the test groups (AUC 395.1-416.1 mm²; $p > 0.05$) and the negative control was less acidogenic than the other groups ($p < 0.0001$). There was no difference between controls

and test groups regarding adherence and microbial aciduricity ($p > 0.05$). Conclusion: Saturated anacardic acid (LDT11) reduced the viability of *S. mutans* in concentrations above 5 $\mu\text{g/mL}$ but had no effect on the acidogenic potential, adherence capacity and acidity of *S. mutans* at low concentrations. For this reason, its application at low concentrations to interrupt target collagenolytic function may later be tested in isolation (in the absence of other effects on cariogenicity).

Keywords: Root caries; Dental Caries; *Streptococcus mutans*; collagenase; Anacardic acids; LDT11

INTRODUÇÃO

A grande quantidade de material orgânico em cimento e dentina radicular sugere que uma degradação proteica deve estar envolvida na formação de lesões cáries radiculares. Nesse sentido, sugere-se que o desenvolvimento da cárie radicular é um processo de dois estágios, sendo o primeiro caracterizado por dissolução mineral, similar ao do esmalte, e o segundo por um estágio proteolítico de degradação da matriz orgânica [Takahashi, e Nyvad, 2016]. Sabe-se que colagenases da dentina do hospedeiro estão relacionadas a essa fase de degradação da matriz colágena durante o processo cáries [Tjäderhane et al., 2015].

Enquanto isso, apesar da função das bactérias no estágio de desmineralização do desenvolvimento de cárie ser bem conhecida [Marsh,1994], sabe-se muito pouco sobre sua função na fase de degradação da matriz orgânica. Essa matriz exposta em decorrência da desmineralização dentinária favorece a colonização por espécies proteolíticas. Apesar de não ter sido espécie predominante, van Strijp et al. [1994] mostraram em um estudo *in situ* a presença de *S. mutans* em espécimes de dentina desmineralizada, representando parte importante da microbiota do sítio e presença concomitante com as espécies proteolíticas. Além disso, a atividade colagenolítica do *S. mutans* já foi demonstrada *in vitro* previamente [Jackson et al., 1994; Jackson et al., 1996]. Contudo, pouca informação foi produzida sobre o tema após esses estudos e ainda não há o entendimento da virulência dessa ação colagenolítica em cárie radicular. Recentemente, a descoberta de uma superexpressão de genes relacionados a atividade proteolítica e colagenases bacterianas em cárie dentinária sugere que a atividade proteolítica microbiana possa contribuir para a degradação proteica dentinária [Simón-Soro A, et al., 2013]. Além disso, outro estudo demonstrou uma significativa superexpressão de genes

codificadores de colagenases microbianas em cárie radicular quando comparadas com superfícies radiculares hígidas [Damé-Teixeira et al., 2018]. Ainda, uma correlação da presença de genes que codificam proteínas de alta ligação com o colágeno do tipo I, principal componente da matriz dentinária, foi descrita em isolados orais de *S. mutans* [Sato et al., 2004; Nomura et al., 2009; Nakano et al., 2010; Lapirattanakul et al., 2011]. Apesar de algumas evidências apontarem para o envolvimento microbiano na degradação do colágeno, ainda não se sabe ao certo se há uma real contribuição desses micro-organismos na degradação da matriz orgânica da dentina radicular. Esse conhecimento poderia encaminhar estudos com objetivo de desenvolver novos tratamentos baseados em agentes anti-colagenolíticos para redução da progressão das lesões radiculares.

Existem agentes naturais conhecidos por sua capacidade anticolagenolítica, sendo assim potenciais substâncias terapêuticas a serem exploradas. Um exemplo disso é o ácido anacárdico, extraído do líquido da casca da castanha de caju [Tyman, 1979]. Os ácidos anacárdicos (AA) são derivados com núcleo salicílico que apresentam cadeia lateral alquílica com 15 carbonos. Dentre suas diversas atividades biológicas e terapêuticas como efeito antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatório, antimicrobiano, antiobesidade e inseticida [Hemshkhar, 2011], esse agente também tem sido caracterizado como inibidor da atividade de metaloproteinases da matriz (MMP's), especialmente MMP's 2, 9 e 14 [Nagase, e Woessner, 1999; Vu, e Werb, 2000; Omanakuttan et al., 2012; Nambiar et al., 2016]. A inibição dessa atividade catalítica relacionada com a degradação da matriz orgânica dentinária foi demonstrada previamente após desafios erosivos in vitro [Silveira et al., 2014]. Além disso, observou-se que os AA apresentam forte atividade antibacteriana contra organismos gram-positivos, como o *Streptococcus mutans* [Himejima, e Kubo, 1991; Green et al., 2008]. O mecanismo de ação antibacteriano dos AA está

relacionado a sua atuação como agente tensoativo, alterando fisicamente a membrana lipídica microbiana [Muroi, e Kubo, 1996; Kubo et al., 2003], sem, contudo, descartar mecanismos bioquímicos [Kubo et al., 2003]. Entretanto, esse mecanismo permanece desconhecido e precisa ser melhor elucidado.

Apesar de sua ação já descrita para inibição de MMP's, não há informação sobre a ação dos AA em collagenases microbianas. Nosso grupo de pesquisa está estudando a ação das collagenases de *S. mutans* SMU_759 e 761 na formação de lesões de cárie radicular, que são duas proteinases do grupo U32 [Ajdić et al., 2002]. Esse grupo compreende a protease PrtC descoberta em *P. gingivalis*, uma das proteases colagenolíticas microbianas de bactérias orais mais relatadas por sua capacidade de degradação do colágeno tipo I [Kato et al., 1992]. Assim, os AA podem ser promissoras drogas para inibição dessas proteinases e controle da degradação do colágeno em cárie radicular. Porém, devido sua ação antimicrobiana, para iniciar os testes desse agente, foi necessário otimizar doses que possibilitassem obter uma concentração para isolar a ação colagenolítica em futuros testes. O objetivo desse estudo foi descrever se há influência do AA na viabilidade em células planctônicas de *S. mutans* e em seus outros fatores de virulência já conhecidos: acidogenicidade, aciduricidade e adesão.

METODOLOGIA

Cepa de origem e substância teste

A cepa bacteriana utilizada no estudo foi a de *Streptococcus mutans* UA159. Esta cepa ATCC foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) da Faculdade de Odontologia da UFRGS, Porto Alegre (grupo do prof. Rodrigo Arthur).

A substância testada nesse estudo trata-se do ácido anacárdico saturado LDT11 (aqui denominado AA), que apresenta melhor perfil inibitório para as collagenases I e II. A substância foi sintetizada a partir da mistura de ácidos anacárdicos extraída da casca da castanha de caju, no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília pela equipe do professor Luiz Romeiro (FS/FAR).

Curva de crescimento de células planctônicas de *S. mutans* com diferentes concentrações de ácido anacárdico

Para determinar uma curva de dose-resposta para a cepa (células planctônicas) com a presença do AA, foi utilizada uma adaptação do protocolo de Damé-Teixeira et al. [2019]. Quatro UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de células planctônicas de *S. mutans* foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas em microaerofilia (95 % N e 2,5 % de CO₂), a 37° C, por 18 horas. Em seguida, o inóculo foi centrifugado a 3.200 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de BHI e ajustado para a densidade óptica (OD) 600 nm = 1 (*Amersham Biosciences Ultrospec 10, Little Chalfont, UK*). Foram inoculados *S. mutans* + BHI com as diferentes concentrações de AA (variando de 1 - 100 µg/mL) e glicose a 10 mM, obtendo um

volume final de 10 mL para cada tubo. O controle positivo constituiu-se de *S. mutans* em caldo BHI. Para as amostras de maior e menor concentração de AA, foi feito um controle de etanol com o inóculo e a quantidade de álcool correspondente a cada grupo, para investigar o efeito do álcool sobre as células, visto que o AA foi reconstituído em etanol 95%. Por fim, a OD600 foi registrada durante um período de 6 horas por meio de alíquotas de 1 mL e a curva de crescimento foi gerada. O experimento foi realizado em duplicata.

Após obter a curva dose-resposta, determinou-se as concentrações de AA a serem usadas para os testes da manutenção dos fatores de virulência da cepa com células viáveis. Para esses testes de cariogenicidade os grupos utilizados estão descritos abaixo:

Controle positivo: somente *Streptococcus mutans* UA159

Controle etanol: *Streptococcus mutans* UA159 + respectiva concentração de etanol 95%.

Controle negativo: água ultrapura

Grupos teste: 1 µg/mL + *Streptococcus mutans* UA159

3 µg/mL + *Streptococcus mutans* UA159

5 µg/mL + *Streptococcus mutans* UA159

Experimentos para confirmação da manutenção da virulência

Análise do potencial acidogênico

O protocolo utilizado para determinar o potencial acidogênico foi descrito previamente [Damé-Teixeira et al., 2014]. Aproximadamente 10^8 UFC/mL (duas alçadas de 1 µL) de alíquotas de cultura de *S. mutans* foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI suplementado com glicose a 1% e cultivadas em microaerofilia, a 37° C durante 18 h. As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, e os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de substância tampão (KCl a 50 mM /

MgCl₂ a 1 mM). Em seguida, as amostras foram misturadas e transferidas para microtubos onde foram centrifugadas a 12000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado em 2 ml de tampão fosfato (20 mM). As alíquotas foram cultivadas em microaerofilia, a 37° C, por 1 h. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas novamente a 3000 rpm por 10 minutos e após a remoção do sobrenadante iniciaram-se as lavagens com KCl a 50 mM / MgCl₂ a 1 mM. O pH da solução (KCl/MgCl₂) foi ajustado a 7.0, foram adicionadas as respectivas concentrações do AA para cada grupo, bem como glicose a uma concentração final de 5 %. A redução do pH foi avaliada durante 180 minutos utilizando um eletrodo de vidro previamente calibrado (pH-metro Micronal B474, São Paulo, Brasil).

Os valores dos dados de pH em cada momento e para cada grupo foram tabulados, plotados de maneira padronizada (mesmo comprimento e largura) no software Excel e em seguida importados como um único arquivo PNG no software UTHSCSA ImageTool®, versão 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>). A área sob a curva (AUC) foi delimitada manualmente por ferramentas de desenho. As medidas espaciais foram calibradas no programa previamente à delimitação da AUC. Para isso, inicialmente, os gráficos de linha padronizados foram impressos e medidos com o auxílio de uma régua milimetrada para garantir que o programa fizesse uma leitura fidedigna do tamanho da área. Ao final, foi obtida a AUC de cada gráfico em mm². A AUC foi calculada considerando o pH 7.0 como ponto de corte a partir de um controle negativo contendo água ultrapura. A mesma examinadora (IMS) realizou todas as medidas, a fim de evitar divergências. Todo o experimento foi em duplicata, assim como as análises. O potencial acidogênico foi expresso como a AUC (mm²).

Análise da adesão microbiana

A adesão microbiana foi analisada como descrito por Ma et al. [2013]. Previamente a realização do experimento, foi feito um pré-inóculo com duas alças de crescimento das colônias (aproximadamente 10^8 alíquotas de UFC/mL) de *S. mutans* UA159 em meio BHI suplementado com 0,5% de sacarose, incubado por 18 h. Em seguida, alíquotas de 1 mL deste pré-inóculo foram transferidas para tubo de ensaio estéril (tubo A), contendo 2 mL de BHI suplementado com 0,5 % de sacarose. As culturas foram incubadas durante 18 h a um ângulo de 30°, em uma atmosfera de microaerofilia a 37° C. Após a incubação, o tubo (A) foi rotacionado duas vezes ao redor do seu longo eixo, e as células bacterianas destacadas foram transferidas para um segundo tubo estéril (B) em um único movimento. Após a adição de 3 mL de um tampão (PBS 0,05 M, pH 6.8) ao tubo A, este tubo foi rotacionado novamente. As células bacterianas não aderidas foram então transferidas para um terceiro tubo (C). Os tubos B e C foram centrifugados a 3000 rpm por 15 min e os sobrenadantes foram descartados. Foi adicionada solução tampão PBS (3 mL) a todos os tubos e as células foram dispersas com auxílio de *vortex*. A OD a 600 nm foi determinada por espectrofotometria (*Amersham Biosciences Ultrospec 10, Little Chalfont, UK*). As porcentagens de aderência microbiana com diferentes grupos foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula: proporção de aderência = $ODA / (ODA + ODB + ODC) * 100$. O experimento foi realizado em duplicata.

Análise da tolerância ácida

A tolerância ácida foi testada conforme o descrito por Penaud et al. [2006]. As colônias foram ressuspensas em 2 mL de caldo BHI e incubadas em microaerofilia à 37° C por 18 h. Alíquotas dessa cultura, para cada um dos grupos, foram ressuspensas em pH 7,0 e pH 4,0 em uma densidade óptica de 0,03 a 600 nm (OD600). Vinte e cinco microlitros das diluições de

10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueadas em BHI ágar no tempo 0 e após incubação por 30 minutos à 37° C. Todo o experimento foi realizado em duplicata. O método de contagem microbiana foi o de contagem em placas pela técnica de microgota. A taxa de crescimento foi calculada usando a fórmula UFC (log+1) em 30 min – em 0 min. Os dados foram comparados por pH e grupo.

Análises estatísticas

Os resultados foram testados no software SPSS, versão 25, para Macbook. O teste ANOVA com *post hoc* de Bonferroni ($\alpha = 0,05$) foi feito para a comparação das médias de pH final de cada grupo utilizando os valores de AUC obtidos. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar médias de número de UFC (log+1) no experimento de aciduricidade em cada pH para cada grupo e mediana de proporção de aderência.

RESULTADOS

As curvas de crescimento geradas a partir das diferentes concentrações de AA testadas estão representadas na Figura 1. Foram realizados controles de etanol para as concentrações de 1 e 100 $\mu\text{g/mL}$, representando as concentrações mais baixa e alta de etanol presentes nos grupos teste, respectivamente. Observou-se ação antimicrobiana consistente a partir de 1 hora de crescimento das células planctônicas a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Não foi constatada diferença significativa entre as concentrações mais iniciais de ácido (1 e 3 $\mu\text{g/ml}$) e controle positivo, constituído apenas por células e meio de cultura. O mesmo foi visto para os controles positivo e de etanol, não havendo, portanto, diferença na curva de crescimento entre esses.

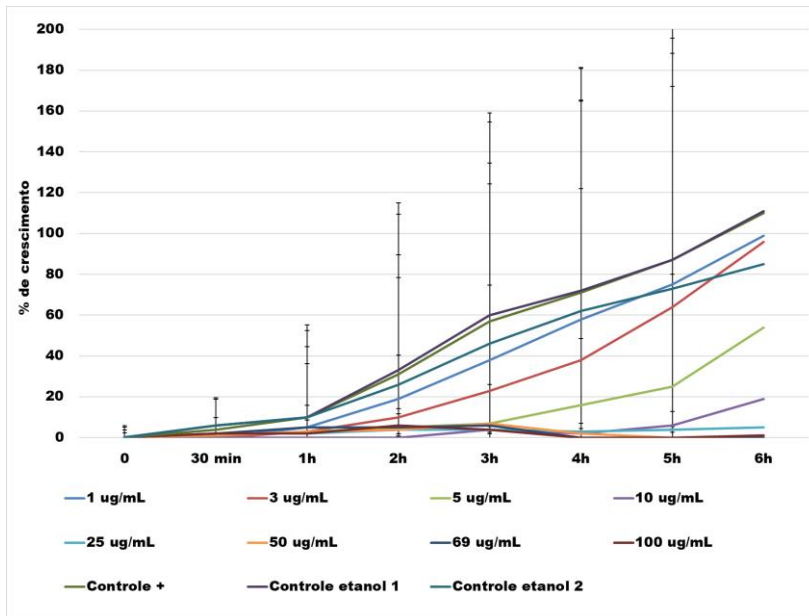


Figura 1. Médias e desvio padrão da curva de dose-resposta de *Streptococcus mutans* UA159, obtida para diferentes concentrações de ácido anacárdico, controle positivo (somente células) e de etanol (etanol 1 correspondente a concentração de 1 µg/mL; etanol 2 correspondente a concentração de 100 µg/mL).

Com relação ao potencial acidogênico, as curvas de pH para os 5 grupos testados, bem como a representação da AUC que foi calculada estão representados na Figura 2. O valor da AUC para o gráfico de cada amostra dos tubos 1 e 2 (controle positivo), 3 e 4 (replicatas em 5 µg/mL), 5 e 6 (replicatas em 3 µg/mL), e 7 e 8 (replicatas em 1 µg/mL) foi, em mm²: 423,96; 416,21; 398,45; 428,15; 410,67; 421,51; 398,51; 391,60; 566,15 e 566,15, respectivamente. O controle negativo não apresentou variação de pH, dessa forma, o gráfico final para os tubos 9 e 10 se apresentaram como uma reta, confirmando a qualidade do experimento.

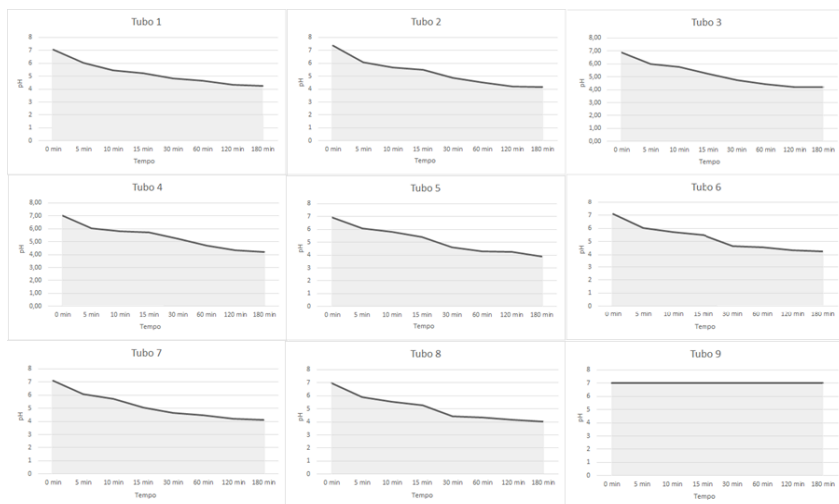


Figura 2. Curva de pH versus tempo até 180 min para *Streptococcus mutans* UA159 tratados com ácido anacárdico e controles. Tubos 1 e 2 (controle positivo); Tubos 3 e 4 (replicatas em 5 $\mu\text{g/mL}$); Tubos 5 e 6 (replicatas em 3 $\mu\text{g/mL}$); Tubos 7 e 8 (replicatas em 1 $\mu\text{g/mL}$) e tubos 9 e 10 (gráficos idênticos, replicatas controle negativo).

Ao plotar os grupos em conjunto, notou-se que curvas de pH entre os grupos 5; 3 e 1 $\mu\text{g/mL}$ e controle positivo se sobrepunham, significando comportamento semelhante ao longo do tempo (Figura 3).

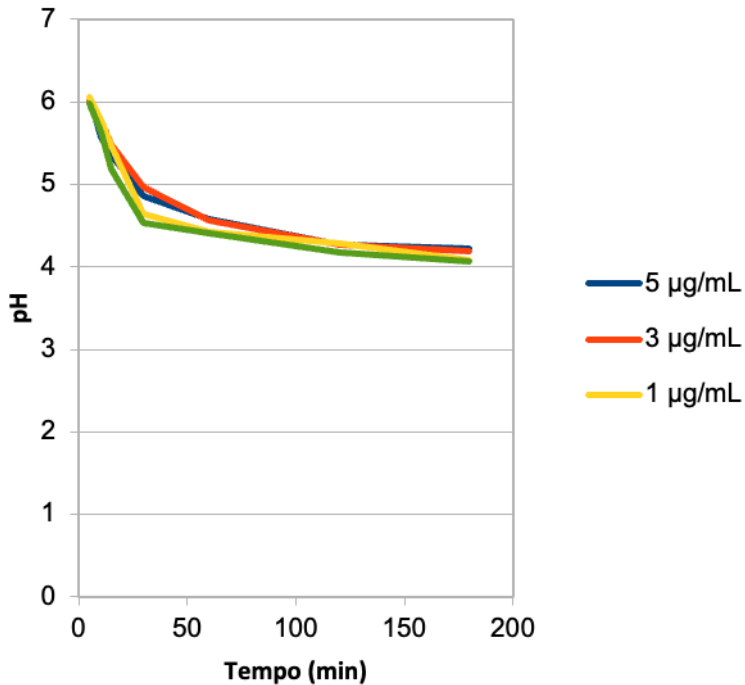


Figura 3. Comparação entre as curvas de pH *versus* tempo de *Streptococcus mutans* UA159 (valores médios das replicatas) dos grupos teste e controle positivo (controle +).

O controle negativo foi estatisticamente maior do que os demais grupos ($p < 0,0001$) e o AA não se mostrou diferente do controle positivo nas concentrações testadas, conforme o observado na comparação entre os grupos com o teste ANOVA + *post hoc* de Bonferroni (Tabela 1).

Tabela 1. Área abaixo da curva (mm²) para o *Streptococcus mutans* UA159 com diferentes concentrações de ácido anacárdico.

Grupos	Média	N	Desvio Padrão
1 µg/mL	395.1 ^A	2	4.9
3 µg/mL	416. 1 ^A	2	7.7
5 µg/mL	413.3 ^A	2	21.0
Controle -	566. 2 ^B	2	0.0
Controle +	420.1 ^A	2	5.5
Total	442.1	10	66.4

ANOVA + Bonferroni: Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos.

Ao analisar a proporção de adesão microbiana não houve diferença significativa entre os grupos teste e controles ($p > 0,05$) (Figura 4).

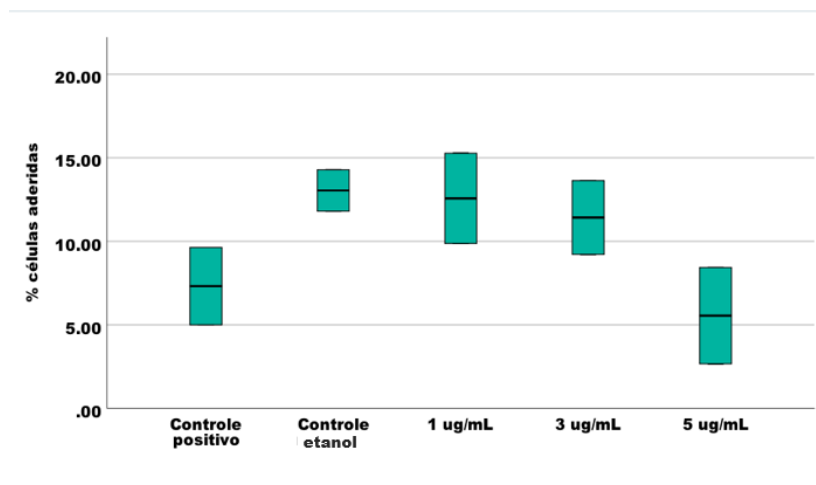


Figura 4. Mediana e quartis da porcentagem de adesão microbiana. Kruskal-Wallis: não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Eixo y variando de 0 a 20%. Boxplot: intervalo por

quartil de 25-75%. Controle etanol correspondente ao volume de etanol 95% presente o grupo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para a avaliação do efeito do ácido anacárdico na aciduricidade microbiana, a análise estatística demonstrou que não foi encontrada diferença significativa nas médias de $\log+1$ entre a taxa de crescimento dos grupos para 30 min - 0 min (Figura 5). Os grupos testes se comportaram similarmente aos grupos controle, sugerindo que o AA não altera a aciduricidade da cepa.

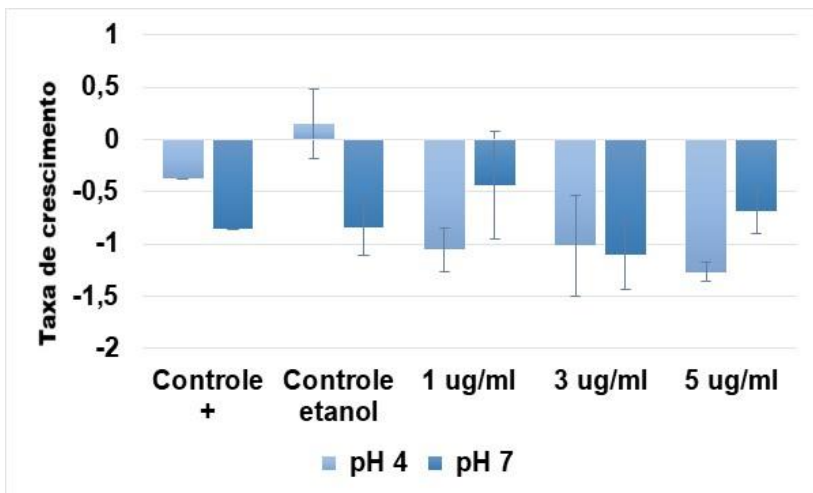


Figura 5. Média e desvio padrão da taxa de crescimento de *Streptococcus mutans* UA159 (UFC (Log+1) em 30 min – em 0 min) para o pH 4 e 7 na presença de diferentes concentrações de ácido anacárdico (0 (controle positivo) a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e controle etanol (volume de etanol 95% correspondente ao volume presente no grupo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Kruskal-Wallis: não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos.

DISCUSSÃO

O *S. mutans* é conhecido como um dos microrganismos envolvidos com o processo cariioso, devido a sua participação na formação de biofilme, sua aciduricidade e acidogenicidade. Além disso, a maioria dos estudos baseados em cultivo microbiano mostrou uma forte relação entre cárie radicular e essa espécie, mostrando frequências de isolamento mais altas e em maiores proporções do que em biofilmes de superfícies radiculares hígidas [Beighton, e Lynch, 1995; Bowden et al., 1990; Ellen et al., 1985; Nyvad, e Kilian, 1990]. Esse trabalho teve como objetivo testar a viabilidade de células planctônicas e a manutenção de fatores de virulência de cepas de *S. mutans* tratadas com o agente anticolagenolítico (ácido anacárdico saturado), visando buscar estratégias futuras de tratamento para cárie radicular a partir da inibição de proteases bacterianas, como colagenases de *S. mutans*, que podem influenciar na degradação da matriz dentinária durante o desenvolvimento de lesões cariosas radiculares.

Apesar de ter sido relatado que as colagenases de *S. mutans* não estariam associadas à degradação da matriz colágena em lesões cavitadas de cárie [Argimon, e Caufield, 2011], uma detecção prévia de alta expressão para os genes SMU_761 e SMU_759 (*S. mutans* UA159), que codificam colagenases, em lesões clínicas de cárie radicular [Damé-Teixeira, 2018] sugeriram que a atividade colagenolítica também pode ser um importante fator de virulência de *S. mutans* em cárie radicular. Estudos *in situ* e *in vitro* já haviam demonstrado que o *S. mutans* tem potencial para degradar colágeno [van Strip et al., 1994; Jackson et al., 1994; Jackson et al., 1997].

Ao observar a curva de crescimento para a cepa testada com o objetivo de verificar o efeito antimicrobiano do AA, determinamos aqui as concentrações ideais para os próximos testes, mantendo a viabilidade celular e reduzindo a influência da

redução do número celular nos testes anticolagenase futuros. Os estudos sobre a inibição de colagenases do hospedeiro pelo AA demonstraram uma inibição da atividade enzimática de forma dose-dependente, com diversas variações de concentração relatadas [Omanakuttan et al.,2012; Nambiar et al.,2016], não havendo, portanto, um padrão na escolha dos valores das concentrações utilizadas em estudos prévios. Assim, a escolha das concentrações testadas na curva dose-resposta foi feita com base no descrito por Omanakuttan et al. [2012] para a inibição de MMPs. A determinação da mínima concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (MIC) foi feita através de inspeção visual caracterizando ausência de turbidez e por meio da leitura de absorbância. A partir de 5 µg/mL notou-se um efeito inibitório. Green et al. [2008] e Kubo et al. [2003] relataram uma Mínima Concentração Bactericida (MBC) de 6.25 µg/ml e uma MIC de 1.56 µg/mL para o *S. mutans*. Outros estudos relataram uma MIC variando entre 3.13 – 7 µg/mL [Kubo et al., 1993; Rivero-Cruz et al., 2011], corroborando com o observado (Figura 1). Apesar dos valores citados anteriormente terem sido descritos para ácidos anacárdicos insaturados, o AA saturado (LDT11) utilizado no presente estudo apresentou comportamento semelhante para a cepa testada, embora tenham sido relatados valores de MIC > 800 µg/mL. Isso sugeriu que essa mínima concentração aumentaria com o decréscimo das duplas ligações na cadeia lateral [Kubo et al, 1993]. Por outro lado, estudo prévio discutiu sobre a possibilidade de um efeito antimicrobiano insuficiente dos ácidos anacárdicos insaturados contra o *S. mutans* na prática clínica, sugerindo, então, uma abordagem sintética como solução, de forma a reduzir a resistência antimicrobiana e a instabilidade das cadeias insaturadas [Green et al., 2008], como é o caso do LDT11. Obviamente, isso estaria relacionado com a organização de biofilmes complexos clinicamente, o que de fato é protetor para a viabilidade celular. Novos testes devem ser realizados em biofilmes uniespécies e

complexos a fim de tentar aumentar a concentração teste de AA com manutenção da viabilidade celular. Lembramos que a busca da viabilidade também está relacionada com a falta de interesse clínico em eliminar os micro-organismos e, além disso, não se sabe se concentrações antimicrobianas poderiam gerar resistência antimicrobiana. Até o momento, um único estudo piloto realizado previamente testou o AA em células de *S. mutans* organizadas em biofilmes [Lima et al., 2020]. Em células planctônicas, testamos algumas concentrações inferiores à MBC e MIC relatadas na literatura [Kubo et al., 1993; Kubo et al., 2003; Green et al., 2008; Rivero-Cruz et al., 2011]. Isso resultou na decisão de utilizar as concentrações de 1, 3 e 5 µg/mL para os testes realizados no presente estudo. É importante ressaltar que a ausência de diferença entre controles positivo e de etanol, confirmou que a variável AA foi responsável pela morte celular nas concentrações mais altas.

A atuação bacteriana no processo de desmineralização, etapa anterior a proteólise [Takahashi, e Nyvad, 2016], por meio da acidogênese, já foi bem estabelecida. Essa capacidade microbiana de produzir ácidos a partir da fermentação de carboidratos resulta em uma redução do pH abaixo de 4, o que contribui para o desenvolvimento e progressão de uma lesão cáries [Loesche, 1986; Nishimura, 2012]. Dada a importância desse fator de virulência na patogenicidade bacteriana e no processo cáries, a influência do AA sobre o potencial acidogênico e acidúrico de cepas de *S. mutans* UA159 foi analisada. Previamente, testamos o pH do meio para verificar possível alteração na presença do ácido anacárdico. Descartada essa hipótese, testamos a acidogenicidade. Demonstramos não haver influência do agente anticólicas nesse fator de virulência. O comportamento semelhante das curvas de pH (Figura 3) sugere que não houve, portanto, interferência no metabolismo celular fermentativo. Nas duplicatas testadas, constatou-se um controle negativo estatisticamente maior

(Tabela 1), corroborando com a correta execução dos experimentos.

Além da acidogênese, a aciduricidade e a adesão são outros fatores de virulência principais associados a característica de patobionte e de sobrevivência do *S. mutans* em biofilmes de lesões de cárie. Por meio desta última propriedade se torna possível o envolvimento na formação do biofilme, uma estrutura tridimensional de bactérias embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos [Zijngel et al., 2010], que em situação de disbiose possibilita a transição de estado de saúde para doença cárie. Para o teste de proporção de adesão microbiana, nas concentrações testadas não houve diferença entre os grupos teste e controle (Figura 4), rejeitando a hipótese de efeito do AA sobre a adesão microbiana. Em contrapartida, Lima et al. [2020] demonstraram um efeito preventivo na formação de biofilme de *S. mutans* (UA159) *in vitro* com a utilização de nanopartículas contendo AA a uma concentração de 9.375 µg/mL, com resultados indicando um forte efeito antibiofilme. Entretanto, não apresentou efeito em biofilmes maduros. Olhando para os resultados apresentados aqui, pode-se sugerir que o efeito antibiofilme observado por Lima et al. [2020] possa estar relacionado a uma redução do número de células, e não há um efeito antibiofilme em si. Dessa forma, a despeito de uma alta atividade inibitória e bactericida em células planctônicas na concentração relatada [Lima et al., 2020], se faz necessária a realização de mais estudos testando o efeito do AA sobre biofilmes multiespécies antes de sugerir seu potencial para uso clínico. Na cárie radicular, além da produção de polissacarídeos extracelulares por bactérias como o *S. mutans* - através da sacarose - a colonização e adesão ao tecido dentário são facilitadas por canais formados pelo sistema de fibras de Sharpey existentes naquela região previamente a exposição da superfície radicular [Consolaro, 1996]. Procedimentos inapropriados para o controle do biofilme podem também expor o

tecido dentinário subjacente e permitir a penetração microbiana pelos túbulos dentinários. Switalski et al. [1993] demonstraram que o colágeno dentinário pode servir como substrato para adesão e conseqüente formação de biofilme de *S. mutans*, que conseguem identificar e se ligar ao colágeno do tipo I, podendo ser importante na patogênese da cárie radicular. Novos testes são necessários para constatar se há efeito do AA na adesão do *S. mutans* ao colágeno.

A redução do pH do meio bucal ocasionada pela acidogenicidade bacteriana promove uma seleção de microrganismos capazes de sobreviver e se proliferar em um meio ácido, característica do *S. mutans* conhecida como aciduricidade, que também é essencial para a progressão da lesão. Assim, o cultivo microbiano foi realizado em um pH ácido (pH 4) e em um pH neutro para comparação. Nas concentrações testadas, o AA parece não ter efeito na aciduricidade microbiana, pois, apesar de haver uma redução da taxa de crescimento nos grupos teste, essa não foi estatisticamente diferente do visto nos grupos controle (Figura 5), essa taxa também foi similar comparando os pHs 4 e 7, confirmando o potencial acidúrico da bactéria. Por apresentar essa característica de resistir ao baixo pH, é possível que somente com um tempo de incubação maior do que 30 minutos pudesse ser percebida diferença. Os resultados apresentados nesse estudo sugerem, portanto, que não houve interferência do ácido na virulência da cepa em questão.

Pela não influência nos fatores de virulência, hipotizamos que há uma possibilidade de testar isoladamente a função colagenolítica da substância nas concentrações mais baixas. Soma-se a isso alguns resultados de estudos que demonstraram a não genotoxicidade dessa substância, considerando-a segura para tratamentos de curto prazo, sugerindo um potencial uso do mesmo em colutórios bucais [Araújo et al., 2020]. Além disso, outro estudo feito com o LDT11,

demonstrou que esse, em concentração mais alta do que as testadas aqui, além de não ser citotóxico, mantendo uma viabilidade celular de 100%, apresentou atividades imunoprotetora e anti-inflamatória superiores a drogas comerciais [de Souza et al., 2018]. Esses achados reforçam o potencial e segurança do AA para ser usado na prevenção e controle da cárie em baixas concentrações, porém também acreditamos que mais evidências são necessárias para testar sua toxicidade.

Ainda que tenha sido observada ausência de influência sobre fatores de virulência da cepa testada, isso não significa que o LDT11 não exerça efeito sobre as collagenases de *S. mutans* ou que as collagenases desse não tenham efeitos sobre a virulência bacteriana. Logo, se faz necessária a realização de um protocolo de zimograma para analisar o efeito desse agente sobre as proteínas de interesse (SMU_761 e 759). Alterações nos genes relacionados a fatores de virulência microbiana podem modificar o modo como bactérias patobiontes atuam no desenvolvimento de uma doença ou até mesmo em sua resposta a terapias antimicrobianas. Assim, pelo pobre prognóstico de tratamentos de lesões de cárie radicular, a análise da importância de collagenases bacterianas na virulência de microorganismos como o *S. mutans* pode possibilitar o desenvolvimento de terapêuticas futuras.

CONCLUSÃO

Em baixas concentrações, o ácido anacárdico saturado (LDT11) não apresentou efeito sobre a viabilidade celular planctônica, no potencial acidogênico, de adesão e aciduricidade do *S. mutans* e, por isso, pode ser uma alternativa para testes que objetivam avaliar isoladamente sua função anticlagenolítica-alvo. Nos próximos passos, será realizada

análise de zimografia das colagenases estudadas na presença do produto em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

1. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, et al.: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14434–14439.
2. Araújo JTC de, Lima LA, Vale EP, Martin-Pastor M, Lima RA, Silva PG de B, et al.: Toxicological and genotoxic evaluation of anacardic acid loaded-zein nanoparticles in mice. *Toxicology Reports* 2020;7:1207–1215.
3. Argimon S, Caufield PW: Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:984–992.
4. Beighton D, Lynch E: Comparison of selected microflora of plaque and underlying carious dentine associated with primary root caries lesions. *Caries Res* 1995;29:154–158.
5. Bowden GH, Ekstrand J, McNaughton B, Challacombe SJ: Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:346–351.
6. Consolaro A: [Carie Dentaria: Histopatologia e Correlacoes Clínico-Radiograficas] [in Portuguese]. Sao Paulo, FOB, 1996.
7. Dame-Teixeira N, Arthur RA, Parolo CCF, Maltz M: Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* isolated from carious dentin after partial caries removal and sealing. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:165201.
8. Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M, Rup AG, Devine DA, Do T: Gene expression of bacterial collagenolytic proteases in root caries. *J Oral Microbiol* 2018;10:1424475.

9. Damé-Teixeira N, Deng D, Do T: Streptococcus mutans transcriptome in the presence of sodium fluoride and sucrose. Archives of Oral Biology 2019;102:186–192.
10. Ellen RP, Banting DW, Fillery ED: Streptococcus mutans and Lactobacillus detection in the assessment of dental root surface caries risk. J Dent Res 1985;64:1245–1249.
11. Green IR, Tocoli FE, Lee SH, Nihei K, Kubo I: Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. Eur J Med Chem 2008;43:1315–1320.
12. Hemshekhar M, Sebastin Santhosh M, Kemparaju K GKS: Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. [Internet]. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2012;110:122–132.
13. Himejima M, Kubo I: Antibacterial agents from the cashew Anacardium occidentale (Anacardiaceae) nut shell oil. J Agric Food Chem 1991;39:418–421.
14. Jackson RJ, Dao ML, Lim D v: Cell-associated collagenolytic activity by group B streptococci. Infection and Immunity 1994;62:5647 LP – 5651.
15. Jackson RJ, Lim D V, Dao ML: Identification and analysis of a collagenolytic activity in Streptococcus mutans. Curr Microbiol 1997;34:49–54.
16. Kato T, Takahashi N, Kuramitsu HK: Sequence analysis and characterization of the Porphyromonas gingivalis prtC gene, which expresses a novel collagenase activity. Journal of bacteriology 1992;174:3889–3895.
17. Kubo Isao, Muroi Hisae, Himejima Masaki, Yamagiwa Yoshiro, Mera Hiroyuki, Tokushima Kimihiro, et al.: Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1993;41:1016–1019.
18. Kubo I, Nihei K-I, Tsujimoto K: Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). J Agric Food Chem 2003;51:7624–7628.

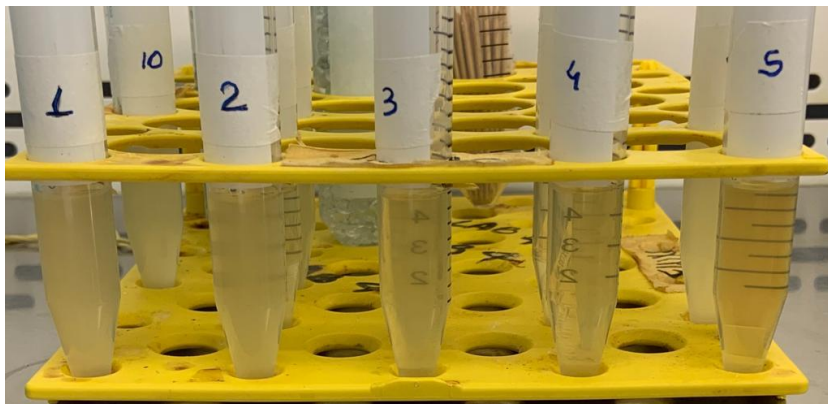
19. Lapidrattanukul J, Nakano K, Nomura R, Leelataweewud P, Chalermarp N, Klaophimai A, et al.: Multilocus sequence typing analysis of *Streptococcus mutans* strains with the *cnm* gene encoding collagen-binding adhesin. *J Med Microbiol* 2011;60:1677–1684.
20. Lima RA, de Souza SLX, Lima LA, Batista ALX, de Araújo JTC, Sousa FFO, et al.: Antimicrobial effect of anacardic acid-loaded zein nanoparticles loaded on *Streptococcus mutans* biofilms. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 2020;51:1623—1630.
21. Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews* 1986;50:353–380.
22. Ma R, Sun M, Wang S, Kang Q, Huang L, Li T, et al.: Effect of high-fructose corn syrup on the acidogenicity, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2013;58:213–218.
23. Marsh PD: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263–271.
24. Muroi H, Kubo I: Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 1996;80:387–394.
25. Nagase H, Woessner JFJ: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–21494.
26. Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Lapidrattanukul J, Kojima A, Naka S, et al.: Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *Arch Oral Biol* 2010;55:34–39.
27. Nambiar J, Bose C, Venugopal M, Banerji A, Patel TB, Kumar GB, et al.: Anacardic acid inhibits gelatinases through the regulation of Spry2, MMP-14, EMMPRIN and RECK. *Exp Cell Res* 2016;349:139–151.
28. Nishimura J: Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* and

Related Bacteria. *Adv Microbiol* 2012;02:208–215.

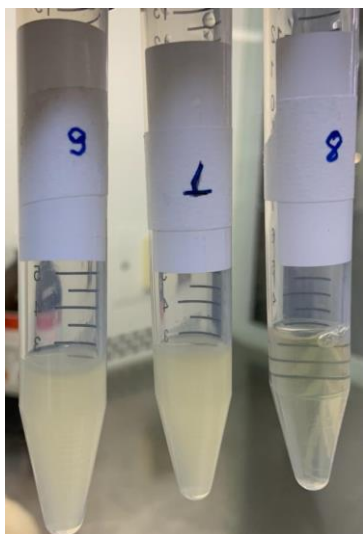
29. Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidattanakul J, Nemoto H, Gronroos L, et al.: Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol* 2009;58:469–475.
30. Nyvad B, Kilian M: Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect Immun* 1990;58:1628–1633.
31. Omanakuttan A, Nambiar J, Harris RM, Bose C, Pandurangan N, Varghese RK, et al.: Anacardic acid inhibits the catalytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Mol Pharmacol* 2012;82:614–622.
32. Penaud S, Fernandez A, Boudebouze S, Ehrlich SD, Maguin E, van de Guchte M: Induction of Heavy-Metal-Transporting CPX-Type ATPases during Acid Adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:7445 LP – 7454.
33. Rivero-Cruz BE, Esturau N, Sánchez-Nieto S, Romero I, Castillo-Juárez I, Rivero-Cruz JF: Isolation of the new anacardic acid 6-[16'-Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Natural product research* 2011;25:1282–1287.
34. Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Igarashi T, Kizaki H: *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J Dent Res* 2004;83:534–539.
35. Silveira C, Oliveira F, Dos Santos ML, de Freitas T, Imparato JC, Magalhaes AC: Anacardic acid from brazilian cashew nut trees reduces dentine erosion. *Caries Res* 2014;48:549–556.
36. Simon-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A: A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res* 2013;47:591–600.
37. de Souza MQ, Teotônio IMSN, de Almeida FC, Heyn GS, Alves PS, Romeiro LAS, et al.: Molecular evaluation of anti-

inflammatory activity of phenolic lipid extracted from cashew nut shell liquid (CNSL). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2018;18:181.

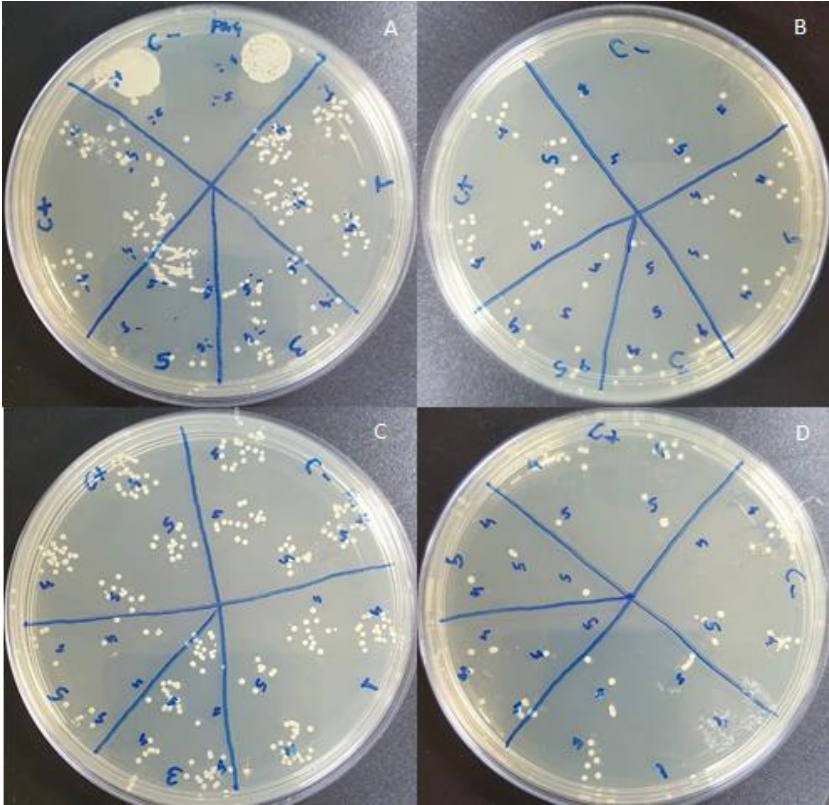
38. van Strijp AJP, van Steenberghe TJM, de Graaff J, ten Cate JM: Bacterial Colonization and Degradation of Demineralized Dentin Matrix in situ. *Caries Res* 1994;28:21–27.
39. Switalski LM, Butcher WG, Caufield PC, Lantz MS: Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect Immun* 1993;61:4119–4125.
40. Takahashi N, Nyvad B: Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res* 2016;50:422–431.
41. Tjaderhane L, Buzalaf MAR, Carrilho M, Chaussain C: Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of “dentin degradomics”. *Caries Res* 2015;49:193–208.
42. Tyman JHP: Non-isoprenoid long chain phenols. *Chem Soc Rev* 1979;8:499–537.
43. Vu TH, Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14:2123–2133.
44. Zijngge V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al.: Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS one* 2010;5:e9321.

ANEXOS

Anexo 1. Experimento de dose-resposta. Tubos falcon contendo inóculo e diferentes concentrações de AA. Notar que a turbidez dos inóculos decresce com o aumento da concentração do ácido (tubos 1 ao 5 representam concentrações de 1; 3; 5; 10; e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).



Anexo 2. Experimento de dose-resposta. Controle positivo (9); 1 $\mu\text{g/mL}$ de AA (1) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de AA (8).



Anexo 3. Experimento de tolerância ácida. Diluição seriada em pH 4 em 0 min (A) e em 30 min (B) e em pH 7 em 0 min (C) e após 30 min (D). O grupo descrito como C (-) nas placas corresponde ao controle etanol para a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

NORMAS DA REVISTA

CARIES RESEARCH

ARTICLE PREPARATION

Formatting

The preferred word processing program for manuscripts is Microsoft Word. Page and line numbering should be activated, and the level of subheadings should be indicated clearly.

Footnotes should be avoided. When essential, they should be numbered consecutively and appear at the foot of the appropriate page.

Abbreviations (with the exception of those clearly well established in the field) should be explained when they are first used both in the abstract and in the main text.

Units of measurement should be expressed in SI units wherever possible.

Generic names of drugs (first letter: lowercase) should be used whenever possible. Registered trade names (first letter: uppercase) should be marked with the superscript registration symbol ® or ™ when they are first mentioned.

The manuscript, tables, figures, and Submission Statement must be submitted in separate files.

For further technical specifications, including those regarding tables, figures, and illustrations, please refer to the [Karger website](#).

Manuscript Arrangement

Title Page

The first page should contain a short and concise title plus a running head of no more than 80 characters. Abbreviations should be avoided.

Below the title, list all the authors' names as outlined in the article sample, which can be downloaded under Article Types. Each listed author must have an affiliation, which comprises the department, university, or organization and its location, city, state/province (if applicable), and country.

Place the full postal address of the corresponding author at the bottom of the first page, including at least one telephone number and e-mail address.

Keywords relevant to the article should be listed below the corresponding author information.

Body

Please refer to the Article Types section of the Guidelines for Authors for information on the relevant article structure, including maximum word counts and downloadable samples.

Online Supplementary Material

Online Supplementary Material may be used to enhance a publication and increase its visibility on the Web. Supplementary files (directly relevant but not essential to the conclusions of the paper) will undergo editorial review and should be submitted in a separate file with the original manuscript and with all subsequent submissions. The Editor(s) reserve(s) the right to limit the scope and length of supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing and should not exceed 10 Mb in size. Figures and tables must have titles and legends, and all

files must be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are Word or PDF files, Excel spreadsheets (if the data cannot be converted properly into a PDF file), and multimedia files (MPEG, AVI, or QuickTime formats). All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material, and it will be hosted online at <https://karger.figshare.com> under a [CC BY license](#). Supplementary material may incur a charge. See Cost of Publication for more information.

References

In-Text Citation

References in the text should be made up of the author(s)'s name(s) (up to 2 authors) followed by the year of publication. When there are more than 2 authors, the first author's name and 'et al.' should be used. When references are made to more than 1 paper by the same author, published in the same year, they should be designated as a, b, c, etc. In-text citations should always be ordered chronologically, e.g., [Rendulic et al., 2004; Jurkevitch, 2006].

The reference list should be arranged alphabetically, then chronologically. Material submitted for publication but not yet accepted should be labelled as 'unpublished' and may not be included in the reference list. Other pre-published or related materials with a DOI, e.g. preprint manuscripts, datasets, and code, may be included.

Further information and examples can be found in the downloadable article samples in Article Types. If you are using reference management software, we recommend using

the Vancouver Referencing StyleReference Management Software

THE USE OF ENDNOTE IS RECOMMENDED TO FACILITATE FORMATTING OF CITATIONS AND REFERENCE LISTS. THE JOURNAL OUTPUT STYLE CAN BE DOWNLOADED FROM [HTTP://ENDNOTE.COM/DOWNLOADS/STYLES](http://endnote.com/downloads/styles).