



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO E BIOTECNOLÓGICO DE UM GEL EM
ORABASE COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO DA GOMA DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) EM MODELO
DE PERIODONTITE**

MANOEL DIAS DE SOUZA FILHO

TERESINA – PI

2017

MANOEL DIAS DE SOUZA FILHO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO E BIOTECNOLÓGICO DE UM GEL EM
ORABASE COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO DA GOMA DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) EM MODELO
DE PERIODONTITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto

TERESINA – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
SETORIAL PROF. CÂNDIDO ATHAYDE – CAMPUS DE PARNAÍBA

5S719pp Souza Filho, Manoel Dias de.

Potencial terapêutico e biotecnológico de um gel em orabase composto por polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em modelo de periodontite. / Manoel Dias de Souza Filho. – Teresina: 2017.

111f.

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia/RENORBIO - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto.

1. Biotecnologia. 2. *Anacardium occidentale*. 3. Perda Óssea. 4. Anti-inflamatório. 5. Expressão Gênica. I. Título.

CDD: 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: MANOEL DIAS DE SOUZA FILHO

TÍTULO DO PROJETO: "POTENCIAL TERAPÊUTICO E BIOTECNOLÓGICO DE UM GEL EM ORABASE COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) EM MODELO DE PERIODONTITE".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Giovanni Reboucas Pinto

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Giovanni Reboucas Pinto - UFPI (Presidente)	<u>Aprovado</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa - UFPI (Examinador)	<u>Aprovado</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos - UFPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros – UFPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Jilson Ramos de Jesus - UFBA (Examinador)	<u>APROVADO</u>	<u>[Assinatura]</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 29 de novembro de 2017.

HORÁRIO: 09:00h

LOCAL: Campus Ministro Reis Veloso - Parnaíba.

Dedico essa tese à minha família que sempre foi meu refúgio, minha força e o motivo maior da minha caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Nesse momento, olhando o tempo pretérito, além da sensação de dever cumprido, o sentimento mais presente em mim é o de gratidão, pois a cada passo dado sempre encontrei pessoas generosas dispostas a me ajudar. Assim, agradeço verdadeiramente:

A Deus, fonte de sabedoria e amor, por cada segundo da minha existência e a Nossa Senhora de Fátima que desde o primeiro dia de minha vida me protege com seu manto sagrado!

Ao Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto pela orientação, incentivo e conhecimento compartilhado!

Aos professores doutores Jand Venes Rolim Medeiros e Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, à professora doutora Durcilene Alves da Silva e aos ex-alunos, agora parceiros de pesquisa, Hygor Ferreira Fernandes, Felipe Rodolfo Pereira da Silva, Luiz Felipe de Carvalho França, David Di Lenardo pela colaboração, parceria, tempo dedicado e por acreditarem neste projeto desde o primeiro momento!

Aos professores doutores André Luiz dos Reis Barbosa, Joílson Ramos de Jesus e Silmar Silva Teixeira por participarem da banca de defesa da tese, e por colaborarem com a construção deste trabalho!

Às Professoras Doutoradas France Keiko Nascimento Yoshioka, Lucia de Fátima Almeida de Deus Moura, Marcoeli Silva de Moura, Maria do Carmo de Carvalho e Martins, e Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araújo pelo incentivo e apoio desde as minhas primeiras tentativas de realização do doutorado!

A todos os professores que fazem o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal Piauí, pela troca de conhecimentos e esforço diário para desenvolver a pesquisa científica em nosso estado!

Ao colegiado do curso de Bacharelado em Biomedicina da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, em Parnaíba-PI, e à Universidade Federal do Piauí pelo apoio e incentivo durante todo o período do doutorado.

À farmacêutica Simone Seligmann Soares de Aguiar pelo conhecimento compartilhado!

Aos meus colegas de turma pela parceira!

Aos meus pais pelo exemplo de força, esperança e dignidade que sempre levo comigo!

À minha irmã e ao meu cunhado por terem se tornado pais incríveis e dedicados. Isso me enche de orgulho e alegria!

Aos meus sobrinhos, Dante Emanuel Souza, Isabel Leódido e Aurora Leódido, por terem me dado a alegria necessária à construção dessa tese!

À Ana Carolina Machado Leódido por seu amor, por me fazer feliz, pelo seu companheirismo, por ter compartilhado seu valioso conhecimento científico e, principalmente, pelo incentivo que me fez seguir em frente mesmo diante das adversidades!

Aos meus avôs (*in memoriam*) que me mostraram o caminho da dignidade e a fé que move a vida!

Finalmente, a todos que contribuíram com minha formação e por ventura não foram citados!

Muito obrigado por tudo!

“As batalhas da vida são, de um modo geral, as mesmas para todos nós. Enfrentamos dificuldades semelhantes: desavenças, conflitos, compromissos, envelhecimento e enfermidades são experiências comuns. Felicidade não significa ausência destes elementos. São felizes, aqueles que reconhecem estes acontecimentos como parte da condição humana e não se deixam abater por eles”.

Maria Luiza Silveira Teles, 1996.

RESUMO

Introdução: O Polissacarídeo da Goma do Cajueiro (P-GC) é um polímero complexo extraído do exsudado do tronco da árvore do caju (*Anacardium occidentale* L.), que possui atividade anti-inflamatória. A periodontite caracteriza-se como uma inflamação que promove a perda dos tecidos de suporte dos dentes e pode causar perda dentária. **Objetivo:** Avaliar o potencial terapêutico de um gel orabase com P-GC na perda óssea alveolar e na expressão de RNAm dos genes que codificam a Interleucina-1 β (IL-1 β), o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), o Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK), o Ligante RANK (RANKL) e a Osteoprotegerina (OPG) em tecido periodontal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) submetidos à periodontite induzida por ligadura. **Materiais e métodos:** Os ratos (fêmeas) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de seis animais cada: Salina 0,9% (Grupo Sal); Gel orabase (Grupo Gel); 50 mg P-GC/1 g de gel orabase (Grupo P-GC50) e 150 mg P-GC/1 g de gel orabase (Grupo P-GC150). Todos os animais foram submetidos à periodontite induzida por ligadura e tratados com uma aplicação tópica diária do composto durante 20 dias. A perda óssea alveolar foi avaliada por morfometria. Os efeitos sistêmicos das aplicações tópicas foram investigados por meio do estudo do peso corporal dos animais, peso relativo dos órgãos, histopatologia do fígado, contagem global de leucócitos e dosagem de parâmetros bioquímicos, tais como transaminase glutâmica oxalacética, transaminase glutâmica pirúvica, creatinina e ureia. A inflamação do tecido periodontal foi investigada por meio da dosagem da mieloperoxidase e expressão relativa do RNAm por RT-PCR. **Resultados:** O tratamento com P-GC150 reduziu significativamente a perda óssea alveolar, diminuiu os níveis da expressão de RNAm de *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANKL* e da proporção *RANKL/OPG*, e causou uma diminuição na atividade da mieloperoxidase no tecido gengival ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com P-GC150 não provocou danos sistêmicos significativos aos animais. **Conclusões:** A administração tópica do gel orabase com P-GC mostrou ser um potencial tratamento contra danos teciduais causados pela periodontite e uma possível fonte de novas descobertas biotecnológicas.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; perda óssea; anti-inflamatório; expressão gênica.

ABSTRACT

Introduction: Cashew Gum Polysaccharide (CG-P) is a complex polymer extracted from exudate of cashew tree trunk (*Anacardium occidentale* L.), which exerts anti-inflammatory effects. Periodontitis is a inflammation that promotes the loss of tissues that support the teeth and can cause tooth loss. **Aim:** This study aimed to evaluate the potential therapeutic of an orabase gel with CG-P on alveolar bone loss, and mRNA expression of the genes encoding Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK), RANK Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) in the periodontal tissue of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) subjected to ligature-induced periodontitis. **Materials and methods:** Female rats were randomly divided into four groups of six animals each: Saline 0.9% (Sal Group); Orabase Gel (Gel Group); 50 mg CG-P/1 g orabase gel (CG-P50 Group) and 150 mg CG-P/1 g orabase gel (CG-P150 Group). Periodontitis was induced in the animals; they were treated for 20 days with one daily topical application. Alveolar bone loss was evaluated by morphometry. Systemic effects of the topical applications were investigated using the body weight of the animals, relative weight of organs, liver histopathology, global leukocyte count and by the measurement of biochemical parameters such as transaminase glutamic oxaloacetic, glutamic pyruvic transaminase, creatinine and urea. Periodontal tissue inflammation was investigated by analysis of myeloperoxidase activity and the mRNA relative expression by RT-PCR. **Results:** Treatment with CG-P150 resulted in a significant reduction of alveolar bone loss, decreased in the mRNA expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , and *RANKL*, and the *RANKL/OPG* ratio, and caused a significant decrease in myeloperoxidase activity in the gingiva tissue ($p < 0.05$). In addition, this treatment with GC-P150 caused no significant systemic damage to animals. **Conclusions:** CG-P in orabase represents a potential treatment of tissue damage caused by periodontitis and possible source of new biotechnological findings.

Keywords: *Anacardium occidentale*; bone loss; anti-inflammatory; gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág.
REVISÃO DE LITERATURA		
Figura 1	Anatomia do periodonto.....	19
Figura 2	Gengiva normal.....	20
Figura 3	Anatomia da gengiva.....	20
Figura 4	Ligamento periodontal.....	21
Figura 5	Desenho representativo do periodonto saudável, gengivite e periotontite.....	22
Figura 6	Esquema mostrando a via RANK/RANKL/OPG.....	29
Figura 7	Espécie <i>Anacardium occidentale</i> L.....	36
Figura 8	Dados de georeferência da espécie <i>Anacardium occidentale</i> L.....	37
Figura 9	Polissacarídeo da Goma do Cajueiro.....	40
Figura 10	Esquema simplificado do processo de isolamento do Polissacarídeo da Goma do Cajueiro segundo o método de Rinaudo e Milas.....	42
Figura 11	Estrutura do Polissacarídeo da Goma do Cajueiro.....	43
CAPÍTULO I		
Figura 1	Ilustração esquemática da preparação do gel em orabase com P-GC e sua administração tópica no tecido gengival dos animais.....	55
Figura 2	Efeito do P-GC em orabase na perda óssea alveolar associada à periodontite experimental em ratos.....	59
Figura 3	Efeito do P-GC em orabase sobre a perda óssea alveolar associada à periodontite experimental em ratos.....	60
Figura 4	Expressão relativa do RNAm de <i>TNF-α</i> (a), <i>IL-1β</i> (b), <i>RANK</i> (c), <i>OPG</i> (d), <i>RANKL</i> (e) e da proporção <i>RANKL/OPG</i> (f), normalizada com um <i>housekeeping gene</i> (<i>GAPDH</i>), no tecido gengival dos molares inferiores de animais submetidos à periodontite experimental e tratados com aplicação tópica de P-GC.....	61
Figura 5	Efeito da aplicação tópica do P-GC nos níveis de MPO em tecido gengival de ratos submetidos à periodontite experimental.....	62
Figura 6	Efeito da aplicação tópica do P-GC sobre o peso corporal, contagem global de leucócitos, TGO, TGP, creatinina e ureia em ratos submetidos à periodontite experimental.....	63
APÊNDICE		
Apêndice A	Aspecto clínico dos 1º molares inferiores ao final do tratamento com P-GC em orabase.....	102
Apêndice B	Secções histológicas do fígado dos animais após o tratamento com P-GC em orabase.....	103
Apêndice C	<i>Real time PCR amplification plot</i> da expressão de RNAm do gene <i>TNF-α</i>	104
Apêndice D	<i>Real time PCR amplification plot</i> da expressão de RNAm do gene <i>IL-1β</i>	105

Apêndice E	<i>Real time PCR amplification plot</i> da expressão de RNAm do gene <i>RANK</i>	106
Apêndice F	<i>Real time PCR amplification plot</i> da expressão de RNAm do gene <i>RANKL</i>	107
Apêndice G	<i>Real time PCR amplification plot</i> da expressão de RNAm do gene <i>OPG</i>	108
Apêndice H	<i>Real time PCR amplification plot</i> da expressão de RNAm do gene <i>GAPDH</i>	109

ANEXO

Anexo 1	Comprovante de publicação do artigo intitulado “Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis”.....	110
Anexo 2	Comprovante de aprovação do comitê de ética em experimentação animal.....	111

LISTA DE TABELAS

	Pág.
REVISÃO DE LITERATURA	
Tabela 1 Principais micro-organismos associados aos danos causados na periodontite.....	23
Tabela 2 Prevalência padronizada e incidência de periodontite grave em 1990 e 2010, por regiões mundiais.....	25
Tabela 3 Fármacos associados ao tratamento da periodontite e suas atividades biológicas.....	31
Tabela 4 Parte da planta, compostos extraídos e atividade biológica da espécie <i>Anacardium occidentale</i> L.....	38
Tabela 5 Composição do P-GC segundo a origem do composto e o método de análise.....	43
CAPÍTULO I	
Tabela 1 Peso relativo dos órgãos de ratos após a periodontite induzida por ligadura e tratamento com aplicação tópica de P-GC.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P-GC	Polissacarídeo da goma do cajueiro
Ara	Aramnose
Com	Comércio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Gal	Galactose
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLC	Cromatografia a gás e líquido
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
Ind	Indústria
Ltda	Limitada
MPO	Mieloperoxidade
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
S.A.	Sociedade anônima
EPM	Erro padrão da média

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Anatomia do periodonto.....	19
3.2 Periodontite.....	22
3.2.1 Micro-organismos associados à periodontite	23
3.2.2 Epidemiologia.....	24
3.2.3 Periodontite e comorbidades.....	25
3.2.4 Relação entre expressão de genes moduladores de processos inflamatórios e periodontite.....	27
3.2.4.1 Relação entre IL-1 β , TNF- α e periodontite.....	27
3.2.4.2 Relação entre a via RANK/RANKL/OPG e a periodontite.....	28
3.2.5 Tratamento da periodontite.....	29
3.2.6 Produtos naturais associados à prevenção, tratamento e controle da periodontite.....	32
3.3 <i>Anacardium occidentale</i> L.....	36
3.3.1 Taxonomia e características da espécie <i>Anacardium occidentale</i> L.....	36
3.3.2 Atividades biológicas da espécie <i>Anacardium occidentale</i> L.....	38
3.4 Polissacarídeo da Goma do Cajueiro (P-GC).....	39
3.4.1 Método de Purificação do P-GC.....	41
3.4.2 Estrutura e composição do P-GC.....	42
3.4.3 Características do P-GC.....	44
3.4.4 P-GC na composição e desenvolvimento de fármacos.....	45
3.4.5 Atividade farmacológica do P-GC	46
3.4.6 Outras aplicações e toxicidade do P-GC.....	47
4. CAPÍTULO I.....	50
FORMULAÇÃO EM ORABASE COM POLISSACARÍDEO DA GOMA DO CAJUEIRO DIMINUI MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA PERDA ÓSSEA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL.....	51
Resumo.....	51
4. 1. Introdução.....	52
4. 2. Materiais e métodos.....	53
4. 2.1 Extração e purificação do P-GC.....	53
4. 2.2 Animais.....	53
4. 2.3 Protocolo Experimental de indução da Periodontite.....	54
4. 2.4 Composição dos géis.....	54
4. 2.5 Aplicação tópica das composições.....	55
4. 2.6 Avaliação do peso corporal dos animais e do peso relativo dos órgãos.....	56

4. 2.7 Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	56
4. 2.7.1 Avaliação da lesão hepática e da função renal.....	56
4. 2.7.2 Contagem global de leucócitos.....	56
4.2.8 Dissecção e armazenamento do tecido gengival.....	57
4. 2.9 Dosagem da MPO.....	57
4. 2.10 Medida da perda óssea alveolar.....	57
4. 2.11 Avaliação histopatológica do fígado.....	58
4. 2.12 Análise da expressão gênica por Real Time-PCR.....	58
4. 2.13 Análise estatística.....	58
4. 3. Resultados.....	59
4. 3.1 Rendimento do processo de purificação do P-GC.....	59
4. 3.2 Efeito do P-GC em orabase na perda óssea alveolar, sobre as citocinas pró-inflamatórias e a via RANK/RANKL/OPG.....	59
4. 3.3 Níveis de MPO.....	62
4. 3.4 Efeito sistêmico e toxicidade dos tratamentos com P-GC em orabase.....	62
4. 4. Discussão.....	64
4. 5. Conclusões.....	68
Conflitos de interesse.....	68
Reconhecimentos.....	68
Referências.....	69
5. CONCLUSÃO.....	77
6. REFERÊNCIAS.....	78
Apêndice A.....	102
Apêndice B.....	103
Apêndice C.....	104
Apêndice D.....	105
Apêndice E.....	106
Apêndice F.....	107
Apêndice G.....	108
Apêndice H.....	109
Anexo I.....	110
Anexo II.....	111

1. INTRODUÇÃO

A *Anacardium occidentale* L. é um vegetal perene que pertence à família Anacardiaceae, popularmente conhecida como cajueiro ou “pé de caju” (RICO; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2015). Nativa do nordeste brasileiro, essa árvore se desenvolveu em regiões a partir do nível do mar até uma altitude de 1.000 m, expandiu-se em países sul-americanos, foi introduzida na Índia e África pelos portugueses e se espalhou por todo sudeste da Ásia (ASOGWA; HAMMED; NDUBUAKU, 2008; RICO; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2015).

Além de impulsionar a indústria de alimentos ao fornecer matéria-prima para o comércio de sucos e produtos derivados da castanha do caju (ROCHA *et al.*, 2014; RICO; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2015), com o advento de novas tecnologias, esse vegetal tem tido a possibilidade de se destacar como importante fonte para extração de fitoterápicos e outros compostos, possibilitando assim maiores oportunidades, progresso científico e desenvolvimento tecnológico à região e ao país. Compostos obtidos do cajueiro têm sido associados à atividade anti-inflamatória (OLAJIDE *et al.*, 2004; OLAJIDE; ADEROGBA; FIEBICH, 2013; PARK *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2015; VILAR *et al.*, 2016) antimicrobiana (TORQUATO *et al.*, 2004) e analgésica (PAWAR *et al.*, 2000).

Entre os produtos extraídos do cajueiro, merece destaque o exsudado do caule liberado após a poda da árvore, a goma do cajueiro (TORQUATO *et al.*, 2004), constituído principalmente por polissacarídeo de galactose, glicose, arabinose, ramnose, ácido glicurônico e manose (DE PAULA; HEALTHY; BUDD, 1998; MOTHÉ; SOUZA; CALAZANS, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2012). Esse polissacarídeo pode ser extraído dessa goma por meio de processos químicos de purificação e apresenta um significativo potencial biotecnológico (YAMASSAKI *et al.*, 2015), pois apresenta propriedades farmacológicas eficazes como antimicrobiano (CAMPOS *et al.*, 2012; QUELEMES *et al.*, 2013), inibidor da prostaglandina E2 (PGE2) (ARAÚJO *et al.*, 2015) e diminui marcadores inflamatórios, entre estes a mieloperoxidase, o malondialdeído, óxido nítrico (NO•) e interferon- γ (IFN- γ) (CARVALHO *et al.*, 2015; YAMASSAKI *et al.*, 2015).

Considerando isso, as propriedades terapêuticas do polissacarídeo da goma do cajueiro (P-GC) poderão trazer novas alternativas no tratamento de doenças odontológicas como a periodontite, uma inflamação que promove a perda dos tecidos que sustentam os dentes e pode provocar perda dental (SETE *et al.*, 2016). O fator etiológico primário da doença

periodontal é o biofilme bacteriano formado nas superfícies dos dentes (KAMBALYAL *et al.*, 2015). No entanto, outras variáveis biológicas interferem na prevalência e gravidade da doença periodontal, entre essas está a expressão de genes específicos relacionados à inflamação (SOBOKU *et al.*, 2014; MALCOLM *et al.*, 2015; MATSUDA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os estudos da expressão de genes que codificam a interleucina beta (IL- β) (KOBAYASHI *et al.*, 2016; BOSTANCI *et al.*, 2017), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (FIGUEREDO *et al.*, 2017; KESKINER *et al.*, 2017) e a via do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK)/ligante RANK (RANKL)/osteoprotegerina (OPG) – via RANK/RANKL/OPG mostraram que existe uma estreita relação dessas proteínas com a inflamação periodontal e a perda óssea alveolar (COCHRAN, 2008; SILVA; BRANCO *et al.*, 2011; DE ARAÚJO JUNIOR *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2013; GOES *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016).

Assim, diante dos relatos das diferentes ações farmacológicas do P-GC e das características da periodontite como doença inflamatória, a presente tese investigou o potencial terapêutico e biotecnológico de um gel orabase que contém P-GC no tratamento da periodontite induzida por ligadura em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o potencial terapêutico e biotecnológico de um gel que contém P-GC em modelo experimental de periodontite em ratos.

2.2 ESPECÍFICOS

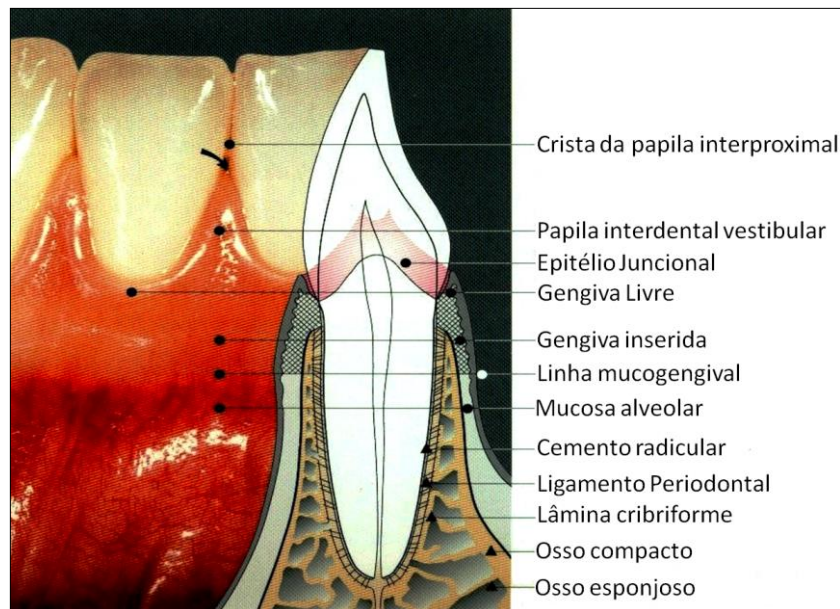
- Induzir a periodontite, com ligadura de fio de nylon, nos primeiros molares inferiores de ratos.
- Comparar as características morfométricas de osso alveolar entre os grupos de animais que sofreram indução da periodontite por ligadura, após tratamento com gel composto por P-GC.
- Investigar a expressão dos genes que codificam as proteínas TNF- α , IL-1 β , RANK, RANKL e OPG em tecido gengival de ratos, após indução da periodontite e tratamento com gel contendo P-GC.
- Medir os níveis de mieloperoxidase em tecido gengival de ratos, após a indução da periodontite e tratamento com gel composto por P-GC.
- Avaliar possíveis alterações no peso corporal, peso relativo dos órgãos, contagem de glóbulos brancos do sangue, histologia do fígado e nos níveis séricos de transaminase glutâmica-oxalacética, transaminase glutâmica-pirúvica, creatinina e ureia, em animais que sofreram indução da periodontite por meio de ligadura e que foram tratados com gel contendo P-GC.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia do periodonto

O periodonto, também chamado de tecido de suporte dos dentes, tem a função de inserir o dente no tecido ósseo da maxila e da mandíbula e manter a integridade da mucosa mastigatória da cavidade oral (LINDHE; LANG; KARRING, 2010). Anatomicamente, o periodonto é formado pela gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. Esse último é formado pelo osso alveolar propriamente dito e pelo processo alveolar (Figura 1) (CARRANZA, 1983; WOLF; EDITH; RATEITSCHAK, 2005).

Figura 1. Anatomia do periodonto.



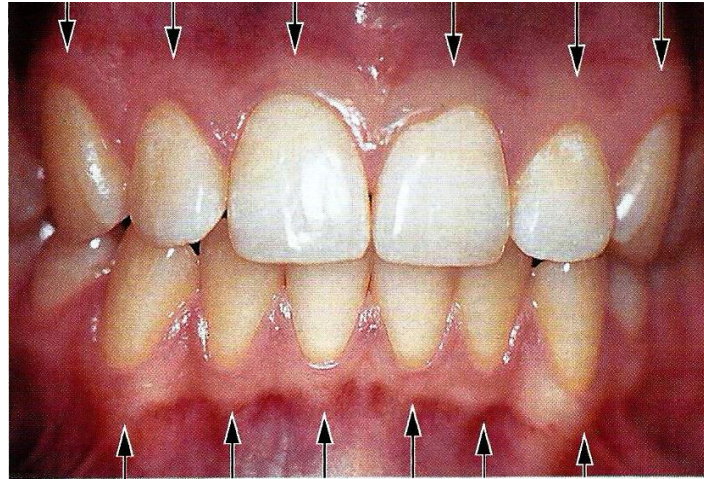
Fonte: WOLF; EDITH; RATEITSCHAK (2005).

A mucosa mastigatória é composta pela gengiva e pelo revestimento do palato duro. A gengiva, por sua vez, é a parte da mucosa mastigatória que envolve o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Próxima à coroa, a gengiva possui uma cor rósea que termina na margem gengival livre (CARRANZA, 1983; WOLF; EDITH; RATEITSCHAK, 2005). Essa coloração pode variar bastante com o acúmulo de melanina que se apresenta em maior quantidade no tecido gengival em pessoas da raça negra (HASSEL, 1993).

Na região apical dos dentes, a gengiva é contínua com a mucosa alveolar, que se apresenta mais frouxa e de cor vermelha mais escura. A gengiva consiste em uma camada de epitélio associado a um tecido conjuntivo subjacente conhecido como lâmina própria. A mucosa alveolar é separada por uma linha limitante facilmente reconhecida chamada de

junção mucogengival ou linha mucogengival (Figura 2) (CARRANZA, 1983; LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

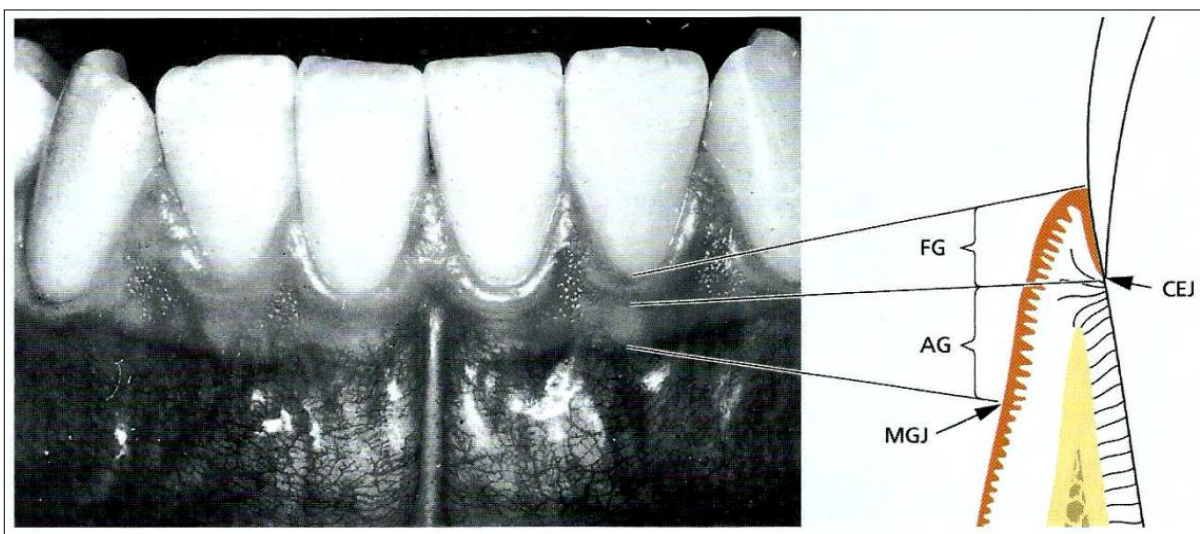
Figura 2. Gengiva normal.



As setas indicam a linha mucogengival. Fonte: LINDHE; LANG; KARRING (2010).

A gengiva pode ser facilmente diferenciada em gengiva livre e gengiva inserida. A gengiva livre tem uma superfície opaca e consistência firme, pode ser observada no tecido gengival das partes vestibular e lingual ou palatina dos dentes, além das papilas interdentais (Figura 3). Em direção apical, pelos lados vestibular e lingual dos dentes, a gengiva livre estende-se da margem gengival até junção cimento-esmalte, já a gengiva inserida é limitada pela junção mucogengival (CARRANZA, 1983; WOLF; EDITH; RATEITSCHAK, 2005).

Figura 3. Anatomia da gengiva.

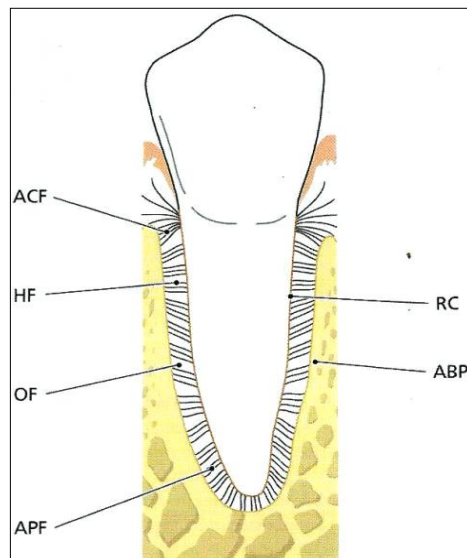


Gengiva marginal livre (FG), gengiva inserida (AG), junção cimento-esmalte (CEJ) e junção mucogengival (MGJ). Fonte: LINDHE; LANG; KARRING (2010).

O ligamento periodontal é uma rede fibrosa que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar propriamente dito, sendo formado por

tecido conjuntivo frouxo, e possui rica vascularização (Figura 4). Esse tecido é o principal responsável pela mobilidade dos dentes, e a presença desse tecido permite que forças produzidas durante a mastigação e outras formas oclusais entre os dentes sejam distribuídas e absorvidas pelo osso alveolar, pois fornece estabilidade mecânica atuando como amortecedor para proteger o dente e o osso alveolar (LINDHE; LANG; KARRING, 2010; JONG *et al.*, 2017), além de ser responsável por processos relacionados a proteção, formação, nutrição (LINDHE; LANG; KARRING, 2010) e sensibilidade dessa região (JONG *et al.*, 2017).

Figura 4. Ligamento periodontal.



Osso alveolar propriamente dito (ABP), cemento radicular (RC), fibras da crista alveolar (ACF), fibras horizontais (HF), fibras oblíquas (OF) e fibras apicais (APF). Fonte: LINDHE; LANG; KARRING (2010).

O cemento radicular é um tecido mineralizado formado principalmente por hidroxiapatita e uma matriz orgânica de fibras colágenas. Sua principal função é inserir o ligamento periodontal nas raízes dos dentes, mas também contribui com o processo de reparo de danos sofridos na superfície radicular. Esse tecido reveste as raízes dentárias e pode também estar presente em pequenas porções das coroas dentais (Figura 1). Apesar das semelhanças com o tecido ósseo, o cemento diferencia-se do osso por não apresentar vasos sanguíneos e linfáticos, não ter inervação e por não passar por processos de remodelação ou reabsorção fisiológica, porém apresenta uma formação constante como no tecido ósseo (CARRANZA, 1983; LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

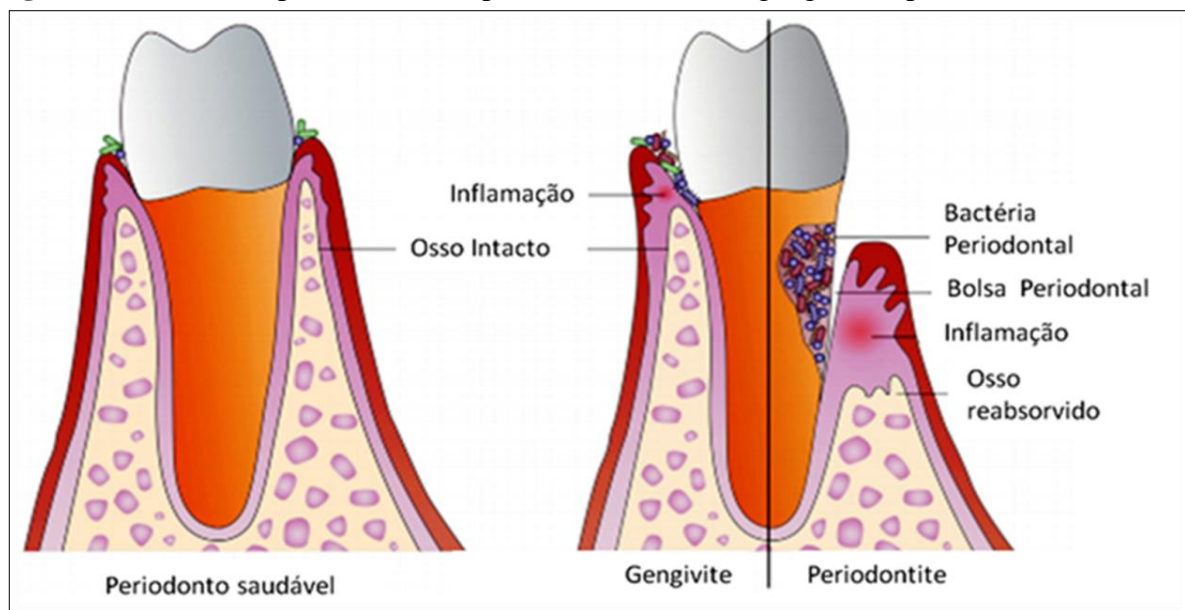
Já o processo alveolar é a parte dos maxilares que formam os alvéolos dentais, formado por células do osso alveolar propriamente dito (Figuras 1 e 4) e células que não estão envolvidas no processo de formação dos dentes. O processo alveolar junto com o cemento e o ligamento periodontal fornece o suporte necessário aos dentes ajudando-os a distribuir e

absorver as forças geradas pela mastigação e oclusão dentárias (Figura 1) (CARRANZA, 1983; WOLF; EDITH; RATEITSCHAK, 2005).

3.2 Periodontite

A doença periodontal acomete os tecidos de proteção e sustentação dos dentes, e inicialmente pode ser caracterizada pela gengivite com a presença de hiperemia, edema, recessão e sangramento gengival, podendo evoluir para a periodontite (ALVES *et al.*, 2007). A gengivite é um processo inflamatório reversível que não promove a perda de suporte dentário (ALBANDAR, 2005), já a periodontite é o resultado de um conjunto de respostas inflamatórias desencadeadas pelo biofilme bacteriano que se forma e acumula na margem gengival (ZUCCARELLO *et al.*, 2014) causando a destruição do ligamento periodontal, osso alveolar ao redor dos dentes e, eventualmente, pode promover a perda dentária (Figura 5) (ARMINGOHAR *et al.*, 2014).

Figura 5. Desenho representativo do periodonto saudável, gengivite e periodontite.



Fonte: REN; DU (2017).

Além disso, essa doença pode ser agravada por fatores de risco e variáveis comportamentais como estresse, depressão, ansiedade, níveis educacionais (GROSSI *et al.*, 1994; NG; KEUNG LEUNG, 2006; CORBET; LEUNG, 2011), tabagismo (ZENG *et al.*, 2014; EKE *et al.*, 2016; SUTTON; SALAS MARTINEZ; GERKOVICH, 2017), consumo de álcool (WANG *et al.*, 2016), horas de sono por dia (ROMANDINI *et al.*, 2017), dieta (HAN; HWANG; PARK, 2016; NIELSEN *et al.*, 2016), doenças como *Diabetes Mellitus* (TEEUW *et al.*, 2017; ZUK *et al.*, 2017), distúrbios metabólicos (GOMES-FILHO *et al.*, 2016; KAYE

et al., 2016), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (McKAIG *et al.*, 2000; CORBET; LEUNG, 2011), sialolitíase (HUNG *et al.*, 2016a), Síndrome de Sjögren (LUGONJA *et al.*, 2016), além de fatores como gênero (HEATON *et al.*, 2017), idade (EKE *et al.*, 2016; LÓPEZ *et al.*, 2017) e por variações genéticas (PAGE *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2017; SANDERS *et al.*, 2017; SANTOSH *et al.*, 2017), evidenciando-se, assim, seu aspecto multifatorial.

3.2.1 Micro-organismos associados à periodontite

Apesar das diversas causas da periodontite, cujo hospedeiro é um componente importante, em geral, a doença se manifesta efetivamente com o desequilíbrio entre a agressão provocada por micro-organismos e a resposta do hospedeiro (JEPSEN *et al.*, 2017; SANZ *et al.*, 2017).

Dezenas de micro-organismos estão associados à periodontite, entre os principais estão bactérias gram-positivas e gram-negativas, organismos facultativos e anaeróbios (MAHENDRA, J. *et al.*, 2013). Alguns desses micro-organismos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Principais micro-organismos associados aos danos causados na periodontite

Micro-organismo	Referências
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	KÖNÖNEN; MÜLLER, 2014; AKRIVOPOULOU <i>et al.</i> , 2017; BURGESS <i>et al.</i> , 2017.
<i>Cryptobacterium curtum</i>	MAVROMMATIS <i>et al.</i> , 2009; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Dialister pneumosintes</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2016; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Eubacterium nodatum</i>	BOOTH <i>et al.</i> , 2004; HAAS <i>et al.</i> , 2012; MIRANDA <i>et al.</i> , 2017.
<i>Filifactor alocis</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2016; BELSTRØM <i>et al.</i> , 2017; DENG <i>et al.</i> , 2017; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Mitsuokella dentalis</i>	FLYNN; LI; SLOTS, 1994; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	BODET; CHANDAD; GRENIER, 2007; SEYMOUR <i>et al.</i> , 2007; KÖNÖNEN; MÜLLER, 2014, WONG <i>et al.</i> , 2016; BELSTRØM <i>et al.</i> , 2017.
<i>Prevotella intermedia</i>	BOCHNIAK; SADLAK-NOWICKA, 2004; BELSTRØM <i>et al.</i> , 2017; ZHANG <i>et al.</i> , 2017.
<i>Prevotella nigrescens</i>	SZAFRAŃSKI <i>et al.</i> , 2015; ZHANG <i>et al.</i> , 2017.
<i>Selenomonas sputigena</i>	NAGPAL <i>et al.</i> , 2016; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Slackia exigua</i>	BOOTH <i>et al.</i> , 2004; WONG <i>et al.</i> , 2016; VHIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Solobacterium moorei</i>	WONG <i>et al.</i> , 2016; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Tannerella forsythia</i>	BODET; CHANDAD; GRENIER, 2007; SCAPOLI <i>et al.</i> , 2015; WONG <i>et al.</i> , 2016; BELSTRØM <i>et al.</i> , 2017; HASHIM <i>et al.</i> , 2017.
<i>Treponema denticola</i>	BODET; CHANDAD; GRENIER, 2007; SCAPOLI <i>et al.</i> , 2015; BELSTRØM <i>et al.</i> , 2017; LISTYARIFAH <i>et al.</i> , 2017.
<i>Treponema lecithinolyticum</i>	MOTER <i>et al.</i> , 2006; SCAPOLI <i>et al.</i> , 2015; HIRANMAYI <i>et al.</i> , 2017.

3.2.2 Epidemiologia

A periodontite é uma das infecções mais comuns e representa um importante problema de saúde pública mundial (VAN DYKE; SHEILESH, 2005; BOEH; SCANNAPIECO, 2007; FRANCO *et al.*, 2014). No entanto, deve-se considerar que as estimativas de prevalência são influenciadas pela metodologia utilizada, incluindo técnicas de medição, protocolos de exames periodontais, diferenças no estado de saúde bucal (HOLTFRETER *et al.*, 2015), bem como definições de casos (KONGSTAD *et al.*, 2017).

O *Workshop* Mundial para a Classificação de Doenças e Condições Periodontais, em 1999, definiu a periodontite em crônica, agressiva e como uma manifestação de doença sistêmica (KASSEBAUM *et al.*, 2014). No entanto, essa nomenclatura ainda varia muito e não é raro em alguns estudos a periodontite ser classificada em grave (severa), moderada e leve (DYE, 2012; PETERSEN; OGAWA, 2012; WHO, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a periodontite grave é encontrada em 15% a 20% dos adultos de 35 a 44 anos de idade e pode resultar em perda dentária em 5% a 15% dos casos em todo o mundo (WHO, 2016; SANTOSH *et al.*, 2017). Ainda nessa perspectiva, Kassebaum *et al.* (2014) realizaram uma ampla revisão sistemática de 72 estudos, incluindo 291.170 indivíduos, de ambos os sexos, com 15 anos ou mais, sobre a prevalência e incidência dessa doença em 37 países, nos anos de 1990 e 2010 e observaram que essa alteração era a sexta condição mais prevalente no mundo. Porém, entre esses dez anos, sua prevalência, 11,2%, e incidência, 701 casos/100.000 pessoas/ano, permaneceram estatisticamente inalteradas (Tabela 2).

Além disso, a periodontite agressiva juvenil ou de início precoce deve ser considerada. É uma condição periodontal grave que afeta os indivíduos durante a puberdade, que leva à perda prematura de dentes e afeta cerca de 2% dos jovens (WHO, 2016; SANTOSH *et al.*, 2017) e entre 1 a 5% da população africana (SUSIN; HAAS; ALBANDAR, 2014).

Por outro lado, em caucasianos residentes no norte e no centro da Europa a prevalência chega a 0,1%, e nas populações do sul da Europa a 0,5%. Na América do Norte, essa doença afeta, aproximadamente, de 0,1 a 0,2% dos caucasianos, 0,5 a 1,0% dos hispânicos e 2,6% dos negros. Já sua prevalência na América do Sul está entre 0,3% e 2,0%, dependendo da composição da população, e no continente asiático está entre 0,2% e 1,0% (SUSIN; HAAS; ALBANDAR, 2014).

Tabela 2. Prevalência padronizada e incidência de periodontite grave em 1990 e 2010, por regiões mundiais

	Prevalência ^a				Incidência ^b			
	1990		2010		1990		2010	
Mundial	11,2	10,4-11,9	11,2	10,5-12,0	696	604-808	701	599-823
Ásia-Pacífico – Alta renda	7,9	6,8-9,7	8,0	6,6-10,4	515	325-777	521	330-793
Ásia								
Central	14,2	10,1-19,2	13,8	10,0-19,3	880	659-1171	856	635-1142
Leste	10,4	8,8-12,1	10,4	8,8-12,2	548	302-887	541	283-902
Sul	10,3	9,2-11,8	10,2	9,1-11,8	681	426-1075	682	420-1071
Sudeste	13,3	11,4-15,5	13,1	11,3-15,1	765	577-1010	751	560-1013
Australásia	14,6	13,1-16,1	14,9	13,3-16,5	909	519-1496	917	545-1484
Caribe	8,8	5,8-13,5	8,6	5,7-12,5	512	370-687	508	373-686
Europa								
Central	12,0	8,8-16,4	12,1	8,8-16,7	747	585-950	752	590-978
Oriental	13,7	8,0-23,9	14,0	8,0-24,0	856	555-1298	850	516-1306
Ocidental	9,8	8,9-10,7	9,4	8,6-10,3	653	521-831	628	512-792
América Latina								
Andina	15,1	8,7-24,9	15,2	9,2-22,7	937	611-1386	950	618-1408
Central	15,4	9,9-23,4	15,1	9,6-22,4	956	676-1358	934	638-1368
Sul	20,6	12,4-31,5	20,4	12,3-31,4	1431	916-2211	1427	922-2254
Tropical	18,0	17,0-19,1	18,5	17,5-19,6	1338	730-2294	1400	750-2422
Norte da África / Médio Oriente	10,5	8,4-13,2	10,4	8,4-13,0	593	472-740	586	472-730
América do Norte - alta renda	7,2	6,4-8,0	7,2	6,4-8,1	491	448-541	487	444-537
Oceania	4,1	2,5-7,1	4,2	2,4-7,2	244	152-385	253	160-393
África subsaariana								
Central	13,5	7,6-22,6	13,3	7,7-21,5	841	550-1271	814	513-1237
Leste	20,3	15,8-26,1	20,1	16,1-25,0	1390	1100-1726	1384	1099-1714
Sul	8,9	5,1-15,1	9,2	5,0-15,4	536	327-841	551	342-860
Oeste	9,2	6,3-14,1	9,3	6,6-14,0	556	419-765	554	413-753

^aPor 100 pessoas. ^bPor 100.000 pessoas/ano. Fonte: KASSEBAUM *et al.* (2014).

Assim, considerando a prevalência, incidência e gravidade da periodontite é razoável entender que existe uma forte associação dessa doença e o futuro aumento das despesas médicas, sugerindo que seu controle e tratamento possam ser fatores modificáveis para a redução do excesso de despesas médicas, principalmente em pessoas mais idosas (SATO *et al.*, 2016). Além do impacto econômico e social, a periodontite está associada a doenças que podem acarretar inúmeras alterações sistêmicas ao indivíduo, como pode ser visto no item a seguir.

3.2.3 Periodontite e comorbidades

A periodontite é um potencial foco de infecção bacteriana e tem sido associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares (BOKHARI *et al.*, 2015) como insuficiência cardíaca crônica (FRÖHLICH *et al.*, 2016), doenças cardiovasculares ateroscleróticas (AHN

et al., 2016; BEUKERS *et al.*, 2017), endocardite bacteriana (YUSOF, 1988; LIEBERMAN, 1992) e sintomas como *Angina Pectoris* (SÖDER; MEURMAN; SÖDER, 2016).

Evidências científicas têm demonstrado que existe uma associação entre saúde periodontal durante a gravidez e a incidência de parto prematuro ou de baixo peso ao nascer (PUERTAS *et al.*, 2017). A saúde periodontal de mulheres grávidas é mais frágil do que a saúde periodontal das mulheres não grávidas, e estima-se que seis milhões de mortes perinatais ocorrem anualmente em todo o mundo, sendo o parto prematuro a principal causa (GEEVARGHES; BASKARADOSS; SARMA, 2017).

Ainda neste contexto, a probabilidade de as crianças nascerem com baixo peso é seis vezes maior quando suas mães apresentam essa doença, comparado aos bebês nascidos de mães com periodonto saudável (GOMES-FILHO *et al.*, 2016). Dois mecanismos patogênicos têm sido propostos para explicar essa associação entre periodontite e parto prematuro ou de baixo peso ao nascer. O primeiro é por via direta que se baseia na presença de bactérias gram-negativas anaeróbias originárias do biofilme gengival, ao passo que o segundo é por via indireta onde envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias que entram na corrente sanguínea a partir da submucosa gengival. Em ambos, ocorre o desenvolvimento de uma resposta inflamatória imunológica e a supressão local de fatores de crescimento na unidade fetal-placentária desencadeando o parto (PUERTAS *et al.*, 2017).

Hung *et al.* (2016b) estudaram a associação da periodontite com rinite alérgica em mais de 142 mil pacientes, dentro de um conjunto de dados populacionais em Taiwan, e observaram uma associação direta entre essas doenças. Bertrand *et al.* (2017), em um estudo de coorte prospectivo de 51.529 homens nos Estados Unidos, entre 1986 e 2012, sugeriram que essa doença periodontal pode representar um novo fator de risco para o linfoma não-Hodgkin.

Já o estudo sobre a migração dentária patológica realizado por Khorshidi *et al.* (2016) mostrou que essa disfunção é relativamente comum entre os pacientes com periodontite, e sua prevalência aumenta com a gravidade da doença. Em geral, a migração dentária patológica tem sido definida como deslocamento dentário, que ocorre quando o equilíbrio entre os fatores que mantêm a posição fisiológica do dente é perturbado pela doença periodontal.

Além disso, estudos experimentais têm demonstrado que a periodontite pode causar aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica no fígado de ratos desencadeando, assim, esteatose hepática microvesicular (TOMOFUJI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2017).

3.2.4 Relação entre expressão de genes moduladores de processos inflamatórios e periodontite

A periodontite pode ser definida como um desequilíbrio entre a qualidade e a quantidade do biofilme bacteriano que coloniza a bolsa periodontal e o potencial imunológico do hospedeiro (KOWALSKI *et al.*, 2006; ZUCCARELLO *et al.*, 2014). Assim, embora fatores de risco como tabagismo, diabetes e obesidade possam alterar a gravidade e a progressão da doença, a periodontite possui um componente genético bastante complexo (KORNMAN *et al.*, 2008; ARMINGOHAR *et al.*, 2014). Entre os genes associados a essa alteração estão aqueles que codificam a IL-1 β , o TNF- α e a via RANK/RANKL/OPG.

3.2.4.1 Relação entre IL-1 β , TNF- α e periodontite

Em geral, a periodontite provoca aumento tanto de IL-1 β quanto de TNF- α . Níveis elevados dessas citocinas foram detectados em amostras de fluido crevicular gengival na periodontite (LAVU *et al.*, 2017). A formação local de osteoclastos e sua estimulação são necessárias para o desencadeamento da perda óssea alveolar e liberação de mediadores químicos da inflamação (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). Além disso, em um estudo sobre casos incomuns de doença periodontal destrutiva não inflamatória, verificou-se que nos locais com periodontite, níveis mais elevados dessas citocinas podem ser detectados, revelando também que o metabolismo ósseo local pode ser de fato modificado, mesmo quando as características sistêmicas do indivíduo não se alteram (REPEKE *et al.*, 2012).

A família IL-1 é um grupo de citocinas associadas a uma complexa rede de mediadores pró-inflamatórios, que regula respostas inflamatórias por meio da expressão de integrinas em leucócitos e células endoteliais (DINARELLO, 2011; LU *et al.*, 2015). Especificamente, a citocina pró-inflamatória IL-1 β é um mediador chave na resposta imunológica do hospedeiro contra infecções, uma vez que desempenha um grande papel no início e manutenção da resposta inflamatória provocada por agentes patogênicos. Essa proteína é sintetizada como um precursor inativo, pró-IL-1 β , no citosol de monócitos, macrófagos e células epiteliais (MORANDINI *et al.*, 2014), e representa a forma predominante de IL encontrada em lesões periapicais humanas e seus exsudados, sendo assim responsável por induzir a reabsorção do osso alveolar em pacientes com inflamação e infecção no periodonto (BARKHORDAR; HUSSAIN; HAYASHI, 1992; ATAOGU *et al.*, 2002; DINARELLO, 2011; LU *et al.*, 2015).

Já a proteína TNF- α , liberada pelos macrófagos, é uma das mais potentes citocinas pró-inflamatórias, sendo conhecida por seu papel substancial na lesão tecidual e na perda

óssea mediada pela periodontite (SINGH *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2016). Essa molécula pode ser detectada na saliva e fluido crevicular gengival, tanto em indivíduos saudáveis quanto em indivíduos com essa doença periodontal (ROSSOMANDO; WHITE, 1993; SINGH *et al.*, 2014). Porém, a concentração aumentada de TNF- α observada na periodontite está associada à destruição do tecido e à resposta imunológica do hospedeiro (TELES *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2014).

Pesquisas sobre os níveis de TNF- α no líquido crevicular gengival de indivíduos com periodontite mostrou que as concentrações gengivais dessa citocina foram significativamente maiores nesses pacientes, além da gravidade da periodontite está diretamente associada ao maior nível de TNF- α (ESCALONA; MASTROMATTEO-ALBERGA; CORRENTI, 2016). Relacionado a isso, pode ser observado que a expressão do gene *TNF- α* é significativamente maior em indivíduos com periodontite (RIBEIRO *et al.*, 2012).

3.2.4.2 Relação entre a via RANK/RANKL/OPG e a periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória osteolítica crônica e a falha das vias de resolução endógena parece levar à destruição dos tecidos, já o aumento desses mecanismos defensivos naturais pode ser uma abordagem eficaz para controlar essa doença (TRINDADE DA SILVA *et al.*, 2017).

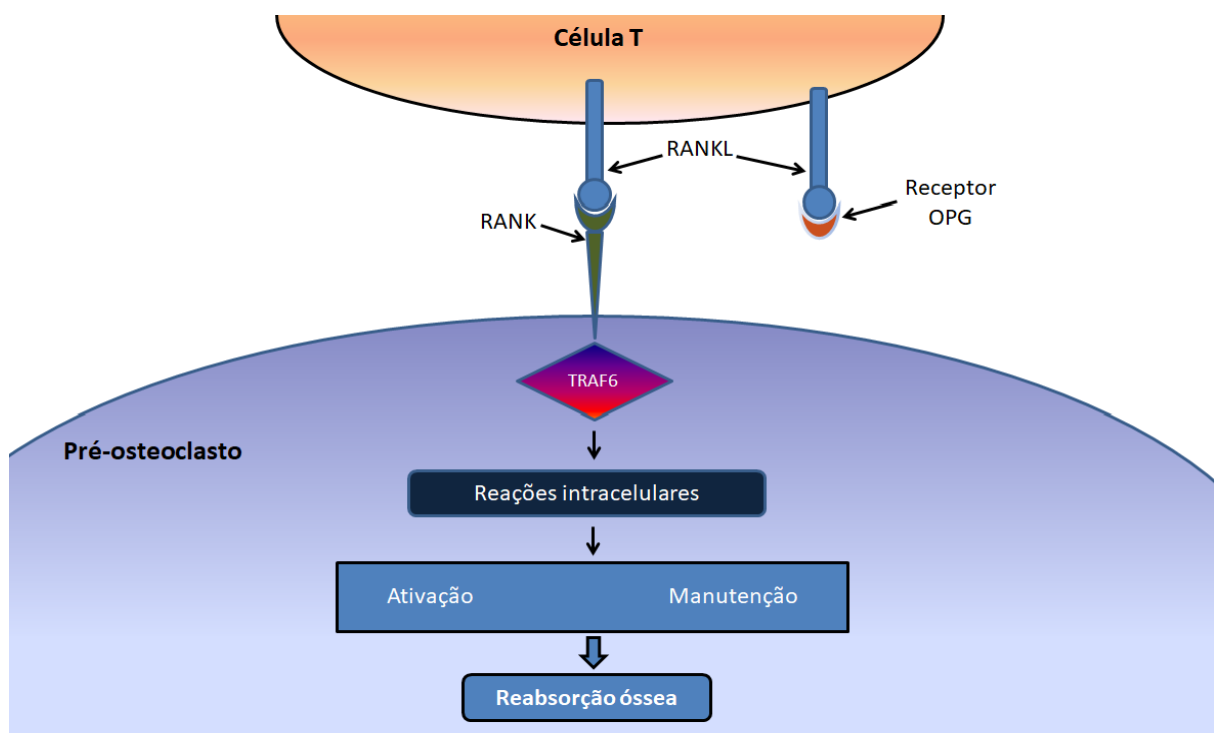
A sinalização autócrina e parácrina de citocinas, e quimiocinas é importante para a maturação e atividade dos osteoclastos (PAULA-SILVA *et al.*, 2016). A produção por células inflamatórias de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α , aumentam o recrutamento e a atividade das células reabsorventes dos ossos, os osteoclastos, por meio da produção aumentada de um fator osteoclastogênico crucial, o RANKL, e favorecem a destruição óssea (Figura 6) (LAPÉRINE *et al.*, 2016).

Por sua vez, a ativação e diferenciação de osteoclastos são moduladas por três membros: os indutores de osteoclastogênese RANKL, RANK e OPG (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). A RANKL é uma proteína ligada à membrana que pertence à superfamília do TNF (Figura 6) (SAĞLAM *et al.*, 2015), sintetizado por osteoblastos, linfócitos T e células endoteliais e liga-se ao RANK em células osteoclásticas para promover a expressão da fosfatase ácida resistente ao Tartarato (TRAF) (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; PAULA-SILVA *et al.*, 2016), integrinas β_3 , catepsina K e aos receptores de calcitonina em pré-osteoclastos (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). A ligação de RANKL ao RANK, presente na superfície dos pré-osteoclastos, induz a sua maturação e ativação, que, conseqüentemente,

conduz à reabsorção óssea (Figura 6) (JAKOVLJEVIC *et al.*, 2016; PAULA-SILVA *et al.*, 2016).

Sob estímulos anabólicos, a sinalização osteoclastogênica mediada por RANKL é bloqueada pela OPG produzida pelos osteoblastos (Figura 6) (PAULA-SILVA *et al.*, 2016). Essa proteína é uma molécula solúvel do tipo TNF (SAĞLAM *et al.*, 2015), onde atua competindo com o RANK, bloqueando a ligação de RANKL a RANK, e assim promovendo a recuperação dos ossos. Portanto, a razão RANKL/OPG reflete o equilíbrio entre reabsorção e aposição óssea (KOSTENUIK *et al.*, 2005; GRIMM *et al.*, 2015).

Figura 6. Esquema mostrando a via RANK/RANKL/OPG.



Fonte: Própria. Baseada nos estudos de SAĞLAM *et al.* (2015); PAULA-SILVA *et al.* (2016) e LAPÉRIE *et al.* (2016).

Em geral, os sítios com reabsorção óssea ativa apresentam um padrão diferencial de expressão de RANKL/OPG, quando comparados com locais onde a reabsorção óssea está ausente ou mínima. Os locais onde a expressão gênica de RANKL é maior que a de OPG as lesões ósseas são progressivas, enquanto que os locais onde a expressão de RANKL e OPG é semelhante, ou a expressão de RANKL menor que a de OPG, as lesões são mais estáveis (MENEZES *et al.*, 2008; SAĞLAM *et al.*, 2015).

3.2.5 Tratamento da periodontite

Ao se admitir a complexidade da etiologia da periodontite, é razoável pensar que o tratamento dessa doença também passa por procedimentos muitas vezes complexos. Além

disso, os métodos de tratamento atuais não são capazes de promover a recuperação do osso alveolar danificado pela periodontite, mas promovem a prevenção, controle e estagnação da doença. A intervenção terapêutica pode incluir métodos que buscam mudanças comportamentais do paciente como educação em saúde bucal, dieta e controle do tabagismo; mas também existe a necessidade do uso de procedimentos como a remoção do biofilme bacteriano, a retirada do cálculo dentário, farmacoterapia local e sistêmica, e diferentes técnicas cirúrgicas (GRAZIANI *et al.*, 2017).

A terapia periodontal não cirúrgica tenta controlar a infecção do periodonto por meio da remoção do biofilme bacteriano, cálculo e de toxinas produzidas pelo processo infeccioso das raízes comprometidas pela doença (AIMETTI, 2014). O método de raspagem e alisamento radicular é o tratamento periodontal mais comum, que provou eficácia clínica em termos de diminuição da profundidade da bolsa de sondagem e redução da inflamação (MARTINS, *et al.*, 2017). No entanto, esse tratamento apresenta limitações, como a manutenção de bolsas periodontais profundas, o risco de recorrência da doença e o nível de habilidade do operador (AIMETTI, 2014).

Pacientes com bolsa periodontal profunda tratados com desbridamento, feito manualmente ou por meio de ultrassom odontológicos, podem apresentar melhora nas condições periodontais e redução da infecção bacteriana. Os desbridamentos ultrassônicos e manuais são igualmente eficazes na terapia periodontal não cirúrgica tanto em relação aos efeitos clínicos, quanto aos parâmetros microbiológicos, apesar do tratamento com ultrassom ser mais rápido (TUNKEL; HEINECKE; FLEMMIG, 2002; D'ERCOLE *et al.*, 2006).

Os lasers são utilizados como ferramenta complementar à terapia mecânica de controle e tratamento da periodontite, pois possuem efeito bactericida e desintoxicante (ANNAJI *et al.*, 2016). No entanto, vale destacar que o uso de lasers na periodontite, como terapia única, ou como complemento da terapia cirúrgica e não cirúrgica, comprovadamente não apresenta resultados antimicrobianos e curativos superiores aos alcançados pela terapia tradicional (COBB, 2017).

Já a terapia fotodinâmica da periodontite é a associação de uma fonte de luz e um agente fotossensibilizante com o objetivo de promover a necrose celular e a morte microbiana (ISHIKAWA *et al.*, 2009). A atividade antimicrobiana da substância é obtida após a luz de baixa potência, que pode ser um laser ou LED, promover o surgimento de compostos que podem neutralizar ou matar a célula alvo no local específico onde a irradiação for direcionada (BALATA *et al.*, 2010).

A irrigação subgengival também é proposta como um complemento aos métodos de tratamento não cirúrgicos na periodontite (GUSTKE, 1999). Algumas técnicas têm mostrado eficácia ao combinar a irrigação subgengival com agentes quimioterápicos e os métodos de alisamento e polimento radicular tradicionais (ISSAC *et al.*, 2015; PERAYIL *et al.*, 2016). Porém, os benefícios dessa abordagem ainda trazem muitas controvérsias (NAGARAKANTI *et al.*, 2015).

Sendo assim, de forma geral, os métodos utilizados no tratamento e controle da periodontite não possuem eficácia suficiente para serem utilizados isoladamente, sem associação entre as metodologias de tratamento. Ademais, até hoje, os métodos mecânicos de tratamento periodontal são melhores se aplicados com a ajuda da quimioterapia antimicrobiana complementar (GRAZIANI *et al.*, 2017).

As estratégias de tratamento que visam primariamente a supressão ou eliminação de patógenos periodontais específicos incluem o uso adjunto de antibióticos locais e sistêmicos como parte da terapia periodontal não cirúrgica (WARAD *et al.*, 2013). No entanto, outros fármacos são utilizados no tratamento dos sinais e sintomas da periodontite. Na Tabela 3, estão listados alguns fármacos associados ao tratamento, prevenção e controle da periodontite.

Tabela 3. Fármacos associados ao tratamento da periodontite e suas atividades biológicas

Fármaco	Atividades Biológicas	Referências
Alendronato	Anti-inflamatório, inibidor da reabsorção óssea osteoclástica e osteostimulador	CHEN <i>et al.</i> , 2016; PRADEEP <i>et al.</i> , 2016b
Atorvastatina	Aumenta a diferenciação osteoblástica e a produção de osteoprotegerina	PRADEEP <i>et al.</i> , 2016a; PRADEEP <i>et al.</i> , 2016b; KUMARI; MARTANDE; PRADEEP, 2017
Azitromicina	Antibacteriano	RENATUS <i>et al.</i> , 2016
Cetoprofeno	Anti-inflamatório	SRIVASTAVA; KOHLI; ALI, 2016b
Clorexidina	Antibacteriano	KUMAR; RAMESH REDDY; CHAVA, 2014; MEDAIAH <i>et al.</i> , 2014; JOHN <i>et al.</i> , 2015; LECIC <i>et al.</i> , 2016;
Cloridrato de tetraciclina	Antibacteriano	SINHA <i>et al.</i> , 2014
Curcumina	Anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, imunoestimulante, anti-séptico e antimutagênico	BHATIA <i>et al.</i> , 2014; HOSADURGA <i>et al.</i> , 2014; NASRA <i>et al.</i> , 2017
Satranidazol	Antibacteriano	PRIYANKA <i>et al.</i> , 2015
Hialuronano	Inibidor da enzima elastase, anti-inflamatório e reparador tecidual	POLEPALLE <i>et al.</i> , 2015; MALLIKARJUN <i>et al.</i> , 2016

Continuação da Tabela 3:

Hiclato de doxiciclina	Antibacteriano	KOPYTYNSKA-KASPERCZYK <i>et al.</i> , 2015
Metformina	Promove a proliferação osteoblástica	PRADEEP <i>et al.</i> , 2016c
Metronidazol	Antibacteriano	DA SILVA <i>et al.</i> , 2016; PAUL <i>et al.</i> , 2015
Minociclina	Antibacteriano	YAO <i>et al.</i> , 2014; YAO <i>et al.</i> , 2015
Cetoprofeno	Anti-inflamatório	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2016 ^a
Minociclina	Antibacteriano	ABBAS; MAHENDRA; ARI <i>et al.</i> , 2016
Rosuvastatin	Inibe a reabsorção óssea osteoclástica e osteostimulador	PRADEEP <i>et al.</i> , 2015; PRADEEP <i>et al.</i> , 2016a
Sinvastatina	Inibidor competitivo específico da 3-hidroxi-2-metilglutaril coenzima A redutase	PRIYANKA <i>et al.</i> , 2017
Tenoxicam	Anti-inflamatório	OZGÖREN <i>et al.</i> , 2014
Tetraciclina	Anticolagenase	GOLUB <i>et al.</i> , 2016
Tetraciclina	Antibacteriano	MADHUMATHI; KUMAR; 2014
Tinidazol	Antibacteriano	TIAN; SHEN; JV, 2016

Além disso, em situações onde o tratamento não cirúrgico da periodontite não apresenta eficácia e os sinais da inflamação persistem, a terapia cirúrgica pode ser indicada. Assim, com o objetivo de facilitar o acesso e a higiene da superfície radicular, a gengivectomia e outros procedimentos cirúrgicos associados são utilizados na terapia periodontal. No entanto, o controle adequado do biofilme bacteriano no pós-operatório continua sendo o fator determinante para o sucesso da maioria das técnicas de tratamento cirúrgico a longo prazo (HEITZ-MAYFIELD; LANG, 2013).

3.2.6 Produtos naturais associados à prevenção, tratamento e controle da periodontite

Nos últimos anos, alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar o uso popular de plantas em odontologia, permitindo identificar espécies vegetais com esse potencial farmacêutico (VIEIRA *et al.*, 2014). Dada a incidência de periodontite, o aumento da resistência das bactérias orais a antibióticos e os efeitos adversos de alguns agentes antibacterianos atualmente utilizados na odontologia, há necessidade de produtos alternativos que auxiliem os métodos tradicionais de controle e tratamento da periodontite (LAKHDAR *et al.*, 2012).

Apesar da necessidade de mais estudos para confirmar as atividades benéficas e seu potencial terapêutico na prevenção, tratamento e controle de doenças periodontais, o uso de fitoterápicos tem sido aplicado com sucesso na odontologia como antisséptico, antioxidantes e

analgésicos (GUPTA *et al.*, 2015). Ervas com propriedades medicinais são uma fonte útil e eficaz de tratamento para vários processos dessas doenças, ajudam a cicatrização e o controle da placa microbiana, melhorando assim a imunidade do indivíduo (KUMAR *et al.*, 2013).

Os polifenóis são importantes fitoterápicos presentes em alimentos vegetais. Esses compostos possuem atividades biológicas e podem ser úteis na prevenção e manejo da periodontite. O estudo dos efeitos antibacterianos de polifenóis sobre patógenos comumente encontrados no periodonto, mostrou que, em geral, esses compostos possuem atividades antimicrobianas contra essas bactérias tanto no crescimento quanto no biofilme bacteriano (SHAHZAD *et al.*, 2015).

A baicalina é um composto flavonóide purificado da planta medicinal *Scutellaria baicalensis*. Estudos experimentais mostraram que grupos tratados com esse composto apresentaram menor perda óssea alveolar, maior área das fibras de colágeno e reduziram a expressão de Cicloxigenase-2 (*Cox-2*), Óxido Nítrico Sintase Indutível (*iNOS*) (CAI *et al.*, 2008) e *RANKL* por meio da supressão da expressão de *Cox-2* induzida por *IL-1 β* (WANG *et al.*, 2006), mostrando que a baicalina protege os tecidos periodontais (CAI *et al.*, 2008).

A *Hypericum perforatum* é uma planta medicinal que contém muitos compostos polifenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos. A avaliação do efeito de compostos obtidos dessa espécie em modelo animal obteve como resultado a diminuição do edema, menor infiltração de neutrófilos, de produção de citocinas, redução no recrutamento de outras células inflamatórias e da produção de mediadores inflamatórios como Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) e *iNOS*, além da diminuição da apoptose e do grau de lesão dos tecidos gengivais, eventos associados à periodontite (PATERNITI *et al.*, 2010).

Nesse contexto, extrato enriquecido com polifenóis, caracterizado em relação a flavan-3-ol e proantocianidinas oligoméricas de *Myrothamnus flabellifolia*, tradicionalmente utilizado na periodontite, reduziu a adesão ou invasão de *Porphyromonas gingivalis* e pode, assim, ser útil para a prevenção de doenças periodontais associadas a esse micro-organismo (LÖHR *et al.*, 2011).

Além dos polifenóis, outros compostos também têm sido estudados como agentes no tratamento dessa doença. Extratos de plantas que contêm quantidades significativas de taninos são frequentemente utilizados na prevenção e tratamento da periodontite, entre esses os elagitaninos. Esses compostos modulam a resposta inflamatória de neutrófilos humanos pela inibição da produção e libertação de citocinas e de enzimas pró-inflamatórias e diminuem a expressão superficial de *Toll-like Receptor-4* (*TLR-4*) em neutrófilos ativados (GRANICA; PIWOWARSKI; KISS, 2015).

Além disso, a investigação da associação de resveratrol e curcumina sobre a progressão da doença em ratos revelou menor perda óssea alveolar nos grupos tratados. O tecido gengival mostrou uma menor concentração de IL-1 β no grupo onde ocorreu a associação das substâncias e redução nos níveis de IFN- γ no grupo que recebeu apenas resveratrol. O resveratrol e a curcumina são substâncias derivadas de plantas que possuem propriedades biológicas imunomoduladoras (CORRÊA *et al.*, 2017).

Em estudo conduzido para avaliar a eficácia antibacteriana da bromelina em microorganismos periodontais aeróbios e anaeróbios constatou-se que a bromelina exerce um efeito antibacteriano contra potentes agentes patogênicos periodontais como *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* e, portanto, pode ser utilizado como um agente antibacteriano na prevenção e tratamento da periodontite (PRAVEEN *et al.*, 2014).

Além disso, diversos extratos de ervas medicinais têm sido estudados. A *Salvia sclarea* L. é uma planta aromática tradicionalmente utilizada na medicina popular no tratamento da gengivite, estomatite e aftas. Um estudo sobre o efeito do extrato etanoico de *Salvia sclarea* L. na periodontite induzida por lipopolissacarídeo em ratos mostrou que o uso desse extrato diminuiu o processo de inflamação, os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e as lesões do tecido gengival, preservando a reabsorção alveolar óssea, além de reduzir o número de células inflamatórias e aumentar o número de fibroblastos (KOSTIĆ *et al.*, 2017).

A *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecida como erva-príncipe ou capim-limão, é uma planta medicinal cujo óleo essencial inibe o crescimento de vários tipos de microorganismos incluindo patógenos periodontais, especialmente *Actinomyces naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis*, resistentes ao cloridrato de tetraciclina. Esse óleo essencial aplicado em forma de gel após o tratamento radicular na doença periodontal promove uma redução na profundidade de sondagem e índice gengival, oferecendo, assim, uma nova alternativa de tratamento na terapia periodontal (WARAD *et al.*, 2013).

Na África, pequenas varas de mascar de origem vegetal são comumente usadas como ferramenta de higiene bucal, mas seu papel como agente terapêutico na doença periodontal é pouco investigado. Extratos etanoicos foram feitos a partir de plantas comuns usadas para esse fim e testados como inibidores do crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Como resultado, foi observado que os extratos de *Psidium guajava* (Goiaba) neutralizam a morte celular e a resposta pró-inflamatória de leucócitos humanos induzida por toxinas (KWAMIN *et al.*, 2012).

Além disso, foram avaliados os efeitos do extrato de *Prunella vulgaris* L. e do ácido rosmarínico sobre os danos oxidativos induzidos por lipopolissacarídeos e a inflamação em

fibroblastos gengivais humanos e constatou-se que esses compostos promovem a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, aumentam os níveis intracelulares de glutatona, bem como reduzem a peroxidação lipídica em células tratadas com lipopolissacarídeos. Além disso, a administração desses compostos foi responsável pela regulação da IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da expressão de *iNOS* (ZDARILOVÁ *et al.*, 2009).

Um gel preparado com extrato fluido de folhas de manjeriço (*Ocimum sanctum*) foi testado por Hosadurga *et al.* (2015) e esses autores observaram uma diminuição da inflamação gengival e da profundidade da bolsa periodontal em modelos experimentais.

Já o extrato de própolis indígena administrado subgengivalmente como adjuvante no tratamento da inflamação no periodonto mostrou ser eficiente na melhoria dos parâmetros clínicos e microbiológicos nos sítios de raspagem e alisamento radicular no tratamento de pacientes com periodontite (SANGHANI; SHIVAPRASAD; SAVITA, 2014). Além disso, a suplementação de própolis em pacientes com essa doença crônica, e ainda com *Diabetes Mellitus* tipo 2, melhorou de forma significativa o resultado da terapia periodontal nesses indivíduos (EL-SHARKAWY; ANEES; VAN DYKE, 2016).

Outro fitoterápico importante é a Aloe vera (*Aloe barbadensis*), uma planta que pertence à família Liliaceae. Esse vegetal possui várias propriedades na natureza, tais como imunomodulador, antiviral e anti-inflamatório e pode desempenhar um papel significativo no tratamento do líquen plano, fibrose da submucosa oral, estomatite aftosa recorrente, osteíte alveolar e periodontite (MANGAIYARKARASI *et al.*, 2015).

Sobre os extratos de plantas, Oh *et al.* (2014) analisaram cinquenta e oito extratos de plantas coreanas quanto à atividade contra bactérias periodontopáticas tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. Entre as várias plantas medicinais, o extrato alcoólico de *Pittosporum tobira* apresentou efeito antibacteriano significativo para todas as cepas testadas.

Além disso, o estudo que avaliou o estado periodontal e a presença de microorganismos complexos como *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* em tecidos subgengivais de pacientes com periodontite antes e depois da aplicação de gel de mangostana a 4% (*Garcinia mangostana*) mostrou que os parâmetros clínicos, tais como a profundidade da bolsa de sondagem, nível de inserção clínica, índice de sangramento, índice de placa e presença de *T. denticola*, foram significativamente reduzidos no grupo tratado com a formulação (MAHENDRA *et al.*, 2017).

Já o estudo do efeito de gel de extrato de plantas medicinais (casca de *Mimusops elengi*, casca de Acacia arábica e sementes de *Punica granatum*) mostrou melhoras nos

parâmetros clínicos, tais como presença de biofilme bacteriano, índice gengival, profundidade de bolsa periodontal e nível de ligação clínica, podendo, assim, ser utilizado no tratamento da periodontite como um adjuvante à terapia periodontal mecânica (PHOGAT *et al.*, 2014).

Sendo assim, na busca por produtos com potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias, entre estas a periodontite, pode ser destacado a importância da espécie *Anacardium occidentale* L., principalmente devido a sua propriedade anti-inflamatória (VASCONCELOS *et al.*, 2015) e antimicrobiana (MADUREIRA *et al.*, 2012).

3.3 *Anacardium occidentale* L.

3.3.1 Taxonomia e características da espécie *Anacardium occidentale* L.

A espécie *Anacardium occidentale* L. pertence ao gênero *Anacardium*, da família Anacardiaceae, ordem Sapindales, que por sua vez pertence a classe Magnoliopsida, divisão Magnoliophyta, do filo Tracheophyta, constituinte do reino Plantae (SANTOS, 2011; SILVA, 2012; GBIF, 2016a).

A família Anacardiaceae compreende, aproximadamente, 70 gêneros de plantas com cerca de 875 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e o gênero *Anacardium* é distribuído em várias regiões do mundo, mostrando adaptação em muitos ecossistemas. No Brasil, os gêneros presentes são, principalmente, *Anacardium*, *Mangifera*, *Spondias* e *Schinusgenus* (MABBERLEY, 1997; RAMOS; COTTA; DA FONSECA FILHO, 2016). Entre essas diferentes espécies se destaca a *Anacardium occidentale* L., árvore do caju, ou cajueiro, como é popularmente conhecido (Figura 7) (RAMOS; COTTA; DA FONSECA FILHO, 2016). O nome “caju” vem da língua indígena Tupi, e significa “a castanha que se produz” (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003).

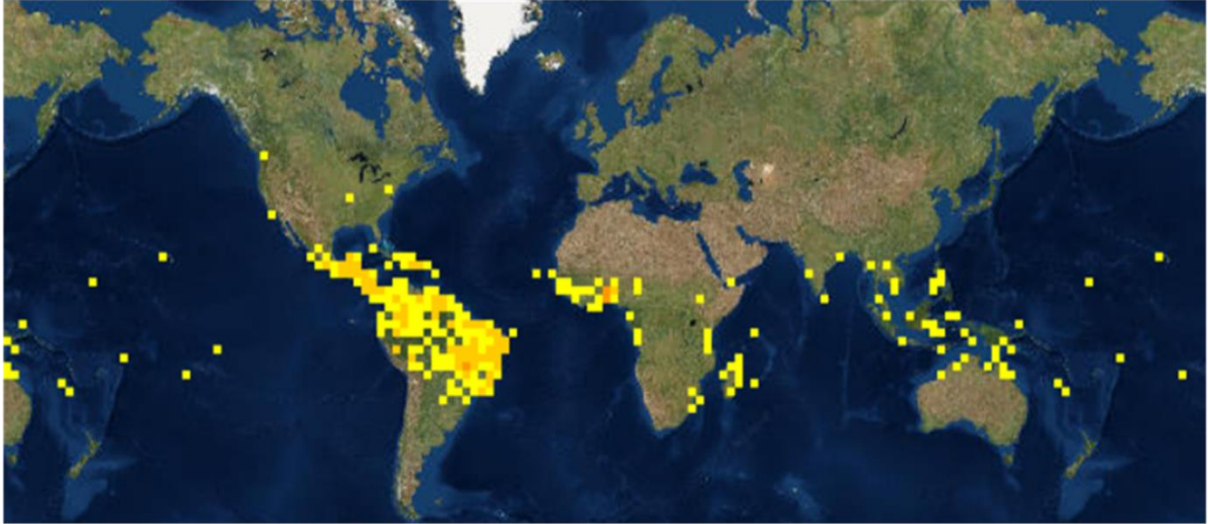
Figura 7. Espécie *Anacardium occidentale* L.



A - *Anacardium occidentale* L. B - Fruto do cajueiro ou castanha de caju (círculo amarelo), pseudofruto ou pedúnculo do cajueiro (seta) e folha do cajueiro (círculo branco). Fonte: Própria.

Atualmente, essa espécie está disseminada em diversos países como Índia, Moçambique, Tanzânia, Quênia e, mais recentemente, Vietnã, Indonésia e Tailândia (Figura 8) (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Figura 8. Dados de georeferência da espécie *Anacardium occidentale* L.



Os quadrados amarelos e laranjas representam os locais onde a espécie está presente, sendo os quadrados amarelos a representação de áreas com menor densidade, e os quadrados laranja, áreas de maior densidade. Fonte: *Global Biodiversity Information Facility, GBIF* (2016b).

O cajueiro adapta-se melhor às regiões costeiras do nordeste brasileiro, onde faz parte da vegetação de praias e dunas, além das formações de restingas, permitindo supor que a origem filogenética da espécie reside nos limites da mata amazônica ou cerrados com ecossistemas da região Nordeste, com base na maior diversidade e adaptação da planta nestas localidades (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). O clima tropical e o solo seco dessas regiões são ideais ao cultivo dessa árvore, e seu processo de amadurecimento ocorre de setembro a janeiro, e após 4 anos pode produzir de 100 até 150 kg de caju por ano (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003).

Árvore de troncos tortuosos, folhas glabras, flores masculinas e hermafroditas e fruto reniforme (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009), o cajueiro pode crescer até 12 m de altura (RIBEIRO *et al.*, 2016). Seu pedúnculo desenvolvido é fibroso e altamente succulento, com uma casca macia e, obviamente, não contém nozes ou sementes; pode ser consumido cru ou na forma de geleia, marmelada, suco, xaropes, refrigerantes ou outras bebidas (GARRUTI *et al.*, 2006), é frequentemente confundido com o fruto, quando na verdade se trata do pseudofruto, cientificamente denominado de pedúnculo floral (Figura 7B) (FERNANDES; MESQUITA, 1993; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; RAMOS; COTTA; DA FONSECA FILHO, 2016). Esse pedúnculo possui forma de pera, e é encontrada em três cores: amarelo, laranja e vermelho (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003).

A castanha de caju, o fruto do cajueiro, tem grande valor no mercado internacional de alimentos, além de numerosos usos na indústria de plásticos e resinas (Figura 7B) (RAMOS; COTTA; DA FONSECA FILHO, 2016), é um aquênio de comprimento e largura variável, casca coriácea lisa, mesocarpo alveolado, repleto de um líquido escuro quase preto, cáustico e inflamável, chamado de líquido da casca da castanha do caju. Na parte mais interna da castanha está localizada a amêndoa, constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, que compõem a parte comestível do fruto, revestida por uma película em tons avermelhados (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

3.3.2 Atividades biológicas da espécie *Anacardium occidentale* L.

A espécie *Anacardium occidentale* L. possui atividade biológica diretamente associada ao controle, prevenção e tratamento de doenças bucais, parte dessas descobertas podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4. Partes da planta, composto extraído e atividades biológicas da espécie *Anacardium occidentale* L.

Partes da Planta	Composto	Atividades Biológicas	Referências
Caju (Pedúnculo)	Suco	Antioxidante, anti-inflamatório, cicatrizante	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2015
	Suco	Antioxidante	LIMA <i>et al.</i> , 2014
	Néctar de caju	Antioxidante	SILVA <i>et al.</i> , 2013
	Suco	Antigenotóxica e anticlastogênica	MELO-CAVALCANTE <i>et al.</i> , 2011
Casca de Caju (Pedúnculo)	Casca liofilizada	Antioxidante	MOO-HUCHIN <i>et al.</i> , 2015
Casca de castanha	-	Prebióticas	DUARTE <i>et al.</i> , 2017
	Óleo	Clastogênica	OWUMI <i>et al.</i> , 2015
	Extratos etanólico	Larvicida	TORRES; GARBO; WALDE, 2015
Casca de caule	Cardanol	Antifúngica	MAHATA <i>et al.</i> , 2014
	Lipídios fenólicos	Moduladora sobre a acetilcolinesterase	STASIUK; JANISZEWSKA; KOZUBEK, 2014
	Ácidos anacárdico	Mutagênica	CARVALHO <i>et al.</i> , 2011 ^a
	Compostos fenólicos	Anti-inflamatória	VILAR <i>et al.</i> , 2016
Castanha	Extrato	Hipotensora e cardio-inibitória	TCHIKAYA <i>et al.</i> , 2011
	Ácido Anacárdico	Contra os radicais livres	MORAIS <i>et al.</i> , 2017
	Ácido Anacárdico	Antifúngica	MORAIS <i>et al.</i> , 2017
	Alquilfenóis	Antiparasitária	ALVARENGA <i>et al.</i> , 2016
	Cardol	Antibacteriana	MURATA <i>et al.</i> , 2013
	Extrato metanólico	Trombolíticas	KHAN <i>et al.</i> , 2011
	Cardol	Anti-tirosinase	ZHUANG <i>et al.</i> , 2010
	Isobenfuranonas	Citotóxica ou antitumoral	LOGRADO <i>et al.</i> , 2010

Continuação da Tabela 4:

Folhas	Zoapatanolida A, agatisflavona, 1,2-bis (2,6-dimetoxi-4-metoxicarbonilfenil) etano e galato de metil	Citotóxica (anticancerígeno)	TAIWO <i>et al.</i> , 2017
	Ácido anacárdico	Anti-metastática	SHILPA; KAVERI; SALIMATH, 2015
	Extrato etanólico	Antimicrobiana	ANAND <i>et al.</i> , 2015
	Extrato	Ativador da superóxido dismutase	OKPASHI; BAYIM; OBI-ABANG, 2014
	Extrato metanólico	Antibacteriana	MADUREIRA <i>et al.</i> , 2012
	Extrato metanólico	Larvicida	TRIPATHY <i>et al.</i> , 2011
	Extrato cetônico	Antimicoplasmática	MURAINA <i>et al.</i> , 2010
	Infusões	Estimulante de oviposição	SANTOS <i>et al.</i> , 2010
	Extrato metanólico	Hipoglicêmica	FAGBOHUN, ODUFUWA, 2010
Folhas e casca do caule	Alcalóides e taninos	Antimicrobiana	AYEPOLA, ISHOLA, 2009

3.4 Polissacarídeo da Goma do Cajueiro (P-GC)

As gomas podem ser definidas como substâncias poliméricas capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas, ou mesmo géis (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). São produzidas naturalmente por um processo denominado gomose que consiste na secreção de exsudato gelatinoso, liberado pelos galhos e troncos das árvores, que ao se solidificar com a exposição ao ar, forma um composto translúcido e amorfo (MUÑOZ *et al.*, 2007; OLORUNSOLA *et al.*, 2016).

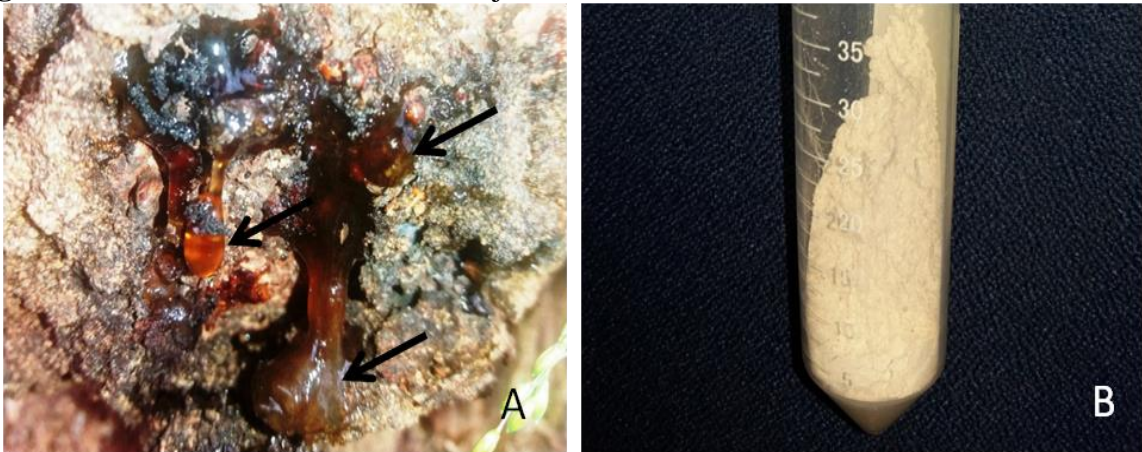
Nesse contexto, a espécie *Anacardium occidentale* L. produz um exsudato resinoso conhecido como goma do cajueiro que pode ser explorada por incisões na casca. Essa secreção é produzida como defesa da planta às agressões externas e pode ser estimulada diretamente por insetos ou micro-organismos como bactérias e fungos, ou induzida quimicamente por substâncias como óxido de etileno e derivados do ácido benzoico em contato direto com a casca da árvore (INTINI, 1987; ARAÚJO, 1991; TORQUATO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2016).

A análise das propriedades físico-químicas dessa goma mostrou que esta resina apresenta um pH ácido (3,8-4,2) e os seguintes componentes: cinzas totais (0,5-1,2%), proteína (1,27-1,8%), açúcares totais (0,96 -2,10 mg/g), fenóis totais (0,21-2,26%), umidade (9,8-13,2%), matéria insolúvel (1,9-4,8%); além de minerais como Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e Fe^{3+} (GYEDU-AKOTO *et al.*, 2008).

A goma do cajueiro *in natura* é matéria-prima para extração de um complexo polissacarídeo ácido, o P-GC (LIMA *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2015). Porém, no processo de isolamento do P-GC é necessário a remoção dos sais inorgânicos, materiais de baixo peso molecular, proteínas, além de ligninas e ácidos nucleicos para garantir a qualidade desse polímero (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). Assim, a utilização desse P-GC tem aumentado, principalmente, em decorrência das suas possibilidades de uso na indústria (LIMA *et al.*, 2002).

As investigações sobre as propriedades reológicas, mucoadesivas e como agente de suspensão do P-GC tornaram este composto um agente promissor capaz de melhorar a farmacocinética de inúmeras drogas (KUMAR *et al.*, 2009; DAS *et al.*, 2014; HANI; KRISHNA; SHIVAKUMAR, 2015).

Figura 9. Polissacarídeo da Goma do Cajueiro.



A - Exsudato resinoso no caule do cajueiro (Goma do cajueiro *in natura* - setas); B - Polissacarídeo extraído da goma do cajueiro. Fonte: Própria.

Sobre esse assunto, a propriedade mucoadesiva do P-GC em comprimidos (GOWTHAMARAJAN *et al.*, 2012; HANI; KRISHNA; SHIVAKUMAR, 2015), como adjuvante farmacêutico (KUMAR *et al.*, 2009), em géis tópicos (DAS; NAYAK; NANDA, 2013) e sistemas de entrega de drogas (DAS *et al.*, 2014), proporcionam uma biodisponibilidade fitoquímica melhorada em alguns compostos (DAS; NAYAK; NANDA, 2013; DAS *et al.*, 2014).

O P-GC já mostrou atividade biológica significativa em modelos de diarreia aguda (ARAÚJO *et al.*, 2015), como agente anti-inflamatório (ARAGÃO-NETO *et al.*, 2017; YAMASSAKI *et al.*, 2015), antitumoral (MOTHÉ; SOUZA; CALAZANS, 2008) e efeito gastroprotetor (CARVALHO *et al.*, 2015), trazendo novas abordagens terapêuticas. Ademais, com o avanço de novas técnicas em nanotecnologia e a combinação do P-GC com outros

componentes bioativos, esse polímero tem sido amplamente estudado (QUELEMES *et al.*, 2013; OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014).

A estrutura química, os processos de purificação e fitoquímicos da goma do cajueiro são estudados desde meados da década de 1970 (ANDERSON; BELL; MILLAR, 1974; ANDERSON; BELL, 1975; RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). No entanto, novos aspectos químicos desse composto ainda estão surgindo com os avanços de novas tecnologias.

As próximas páginas trazem algumas características da goma do cajueiro *in natura* e as principais propriedades do P-GC, além das descobertas mais recentes sobre esse assunto e a importância desses compostos.

3.4.1 Método de Purificação do P-GC

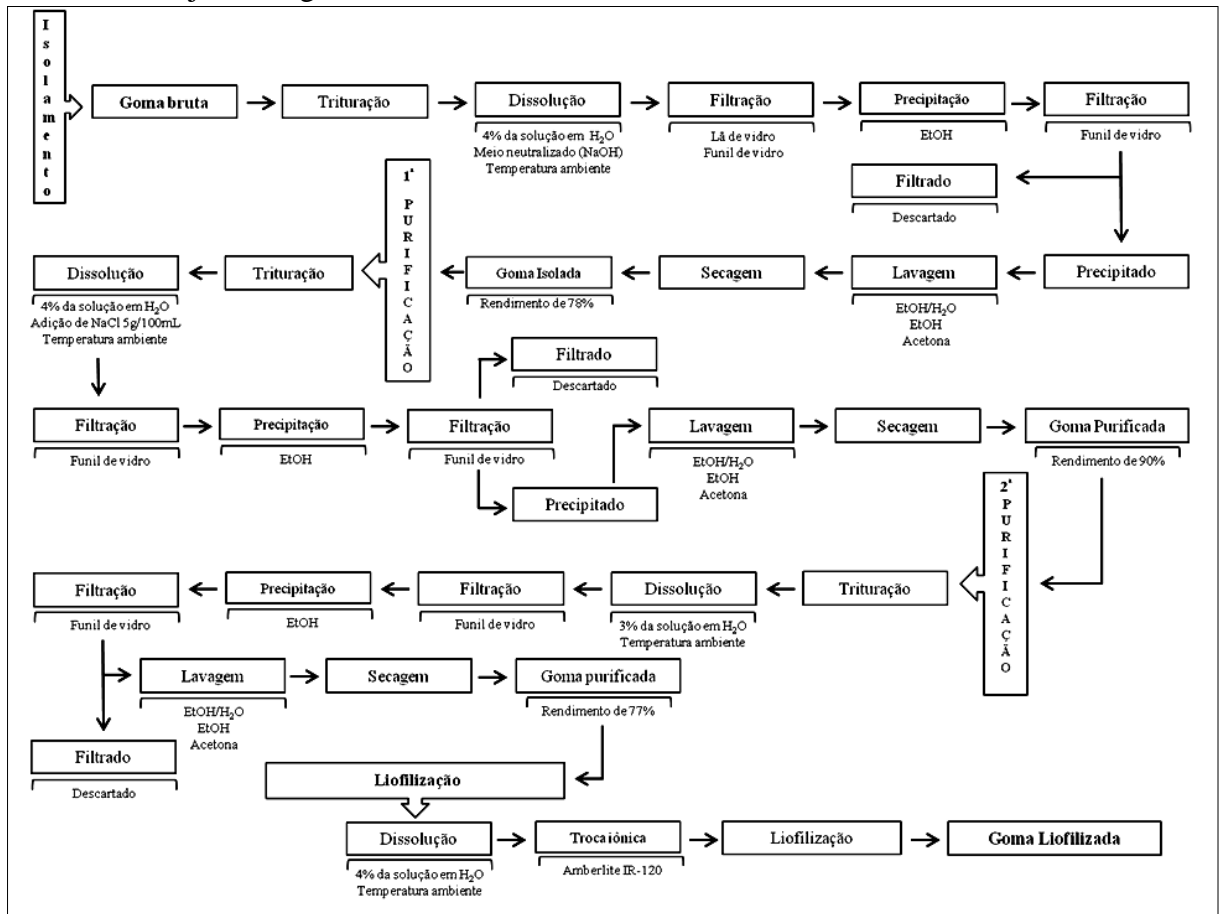
Basicamente, dois métodos são utilizados para o isolamento da goma do cajueiro, o método de Anderson, e o de Rinaudo e Milas (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993; COSTA; RODRIGUES; PAULA, 1996). O método de Anderson preconiza a trituração, dissolução em água fria, filtrações, diálise e liofilização da goma. Já o método de Rinaudo e Milas é realizado por meio da trituração, dissolução em água com ajuste de pH à temperatura ambiente, filtração e precipitação com etanol (COSTA; RODRIGUES; PAULA, 1996).

Segundo Rodrigues *et al.* (1993), o método Rinaudo e Milas é o mais adequado para o isolamento de gomas. Porém, esse método está limitado aos estudos acadêmicos, pois, para fins industriais, deve-se levar em conta fatores como a viabilidade econômica e a disponibilidade de equipamentos. Ainda segundo os autores, boas características foram observadas tanto na goma obtida pelo método Anderson quanto pelo método de Rinaudo e Milas como brancura do sólido, boa solubilidade em água e transparência da solução, porém, além dessas características, o método Rinaudo e Milas apresentou menor contaminação, maior rendimento, homogeneidade e rapidez no processo.

Vale destacar que o processo de purificação da goma do cajueiro desencadeia alguns efeitos nas suas propriedades físico-químicas (OFORI-KWAKYE; ASANTEWAA; KIPO, 2010) incluindo a substituição gradual dos cátions Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+ por Na^+ , reduz drasticamente a quantidade de proteína, mantém o ácido urônico, reduz a viscosidade intrínseca, preserva os polissacarídeos, fragmenta a amostra como um todo e desencadeia uma pequena diminuição na massa molar média, como resultado é obtido um sal de sódio de alta pureza, boa solubilidade e excelente rentabilidade (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993; COSTA; RODRIGUES; PAULA, 1996; DE PAULA; HEALTHY; BUDD, 1998).

Abaixo está representado um esquema do processo de isolamento do P-GC preconizado pelo método de Rinaudo e Milas:

Figura 10. Esquema simplificado do processo de isolamento do Polissacarídeo da Goma do Cajueiro segundo o método de Rinaudo e Milas.

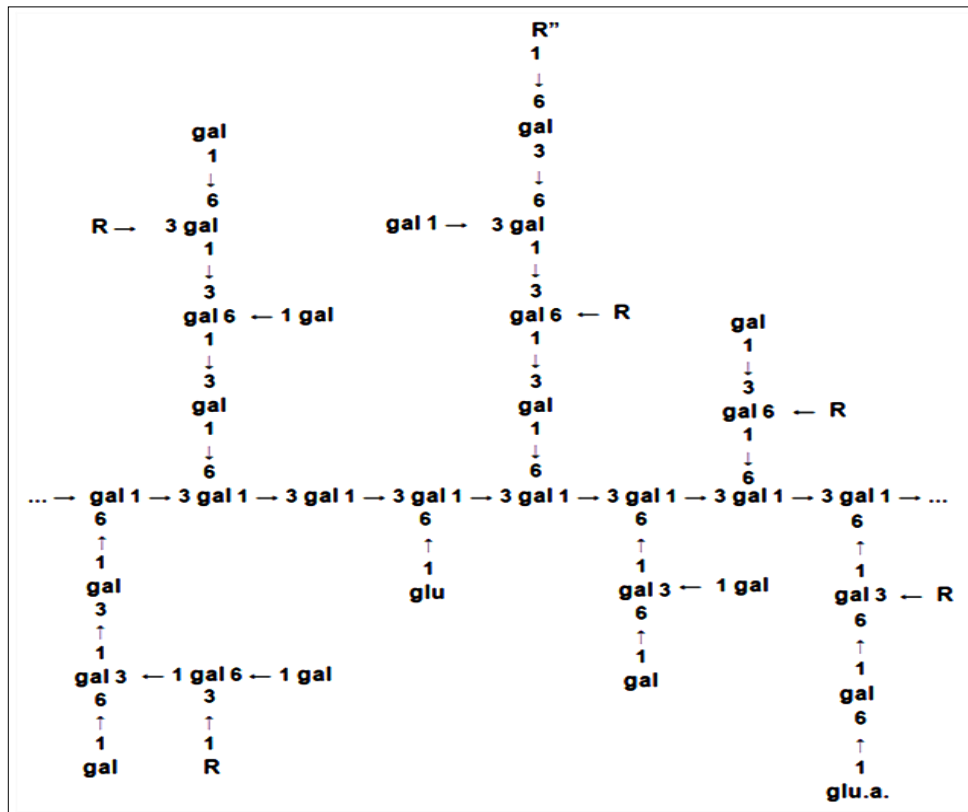


Fonte: COSTA; RODRIGUES; PAULA (1996).

3.4.2 Estrutura e composição do P-GC

Por meio do método de degradação sequencial de Smith, das análises por metilação e dos produtos de degradação do P-GC foi observado que esse composto possui uma estrutura constituída principalmente por cadeias ramificadas de D-galactose ligadas por ligações β -(1-3) e intercaladas por ligações β -(1-6) (ANDERSON; BELL; MILLAR, 1974; ANDERSON; BELL, 1975).

Foram indicados três tipos de unidade dentro do núcleo ramificado do P-GC, as ligadas em C-1 e C-3; C-1 e C-6; e C-1, C-3 e C-6 (DE PAULA; HEALTHY; BUDD, 1998); e outras estruturas de cadeia lateral foram caracterizadas, principalmente, a α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp- e a α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-D-Galp- (MENESTRINA *et al.*, 1998). Além disso, a L-arabinose está presente em grupos terminais ou em pequenas cadeias de até cinco unidades constituídas de D-glicose, L-ramnose, D-manose, D-xilose e o Ácido 4-O-metil-D-glicurônico, presentes nos grupos terminais da molécula (Figura 11) (ANDERSON; BELL; MILLAR, 1974; ANDERSON; BELL, 1975; DE PAULA; RODRIGUES, 1995; PINTO *et al.*, 1995; DE PAULA; HEALTHY; BUDD, 1998).

Figura 11. Estrutura do Polissacarídeo da Goma do Cajueiro.

R - representa cadeias ligadas de D-manose, D-xilose, L-ramnose, L-arabinose ou cadeias de 1,2-arabinose. R'' - representa D-glicose ou ácido D-glicurônico. Fonte: ANDERSON; BELL (1975).

Vale destacar, no entanto, que a composição do P-GC pode variar de acordo com o local de origem do composto (GYEDU-AKOTO *et al.*, 2008) e com o método de análise escolhido (Tabela 5) (DE PAULA; HEALTHY; BUDD, 1998).

Tabela 5. Composição do P-GC segundo a origem do composto e o método de análise

Monossacarídeo	Composição do P-GC por origem (Peso Total%)				
	Índia ^a	Papua ^a	Brasil ^b	Brasil ^c	Venezuela ^d
Galactose	61,0	63,0	73,0	72,0	49,0
Arabinose	14,0	15,0	5,0	4,6	31,0
Glicose	8,0	9,0	11,0	14,0	-
Ramnose	7,0	7,0	4,0	3,2	7,0
Ácido glicurônico	4,3	4,5	6,3	4,5	-
Manose	2,0	1,0	1,0	-	4,0
Xilose	2,0	-	-	-	1,0
Ácido 4-O-metil glicurônico	1,9	1,2	-	-	-

^a 0,5 M H₂SO₄ por 7,5 h a 100 °C, analisado por Cromatografia em Papel (ANDERSON; BELL; MILLAR, 1974);

^b 4 M Ácido trifluoroacético por 5 h a 100 °C, analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (DE PAULA; RODRIGUES, 1995);

^c 4 M TFA por 5 h a 100 °C, analisado por Cromatografia de Gás-Líquido (GLC) (DE PAULA; HEALTHY; BUDD, 1998);

^d Determinação colorimétrica pelo método Fenol/Ácido Sulfúrico (PINTO *et al.*, 1995).

3.4.3 Características do P-GC

O P-GC apresenta baixa viscosidade e uma energia de ativação de fluxo para uma solução a 2 ou 3% de $\sim 16 \text{ kJ mol}^{-1}$, com poucas interações intra e intermoleculares (DE PAULA; RODRIGUES, 1995). Essas interações químicas que ocorrem na solução aquosa com P-GC podem modificar sua conformação e dimensão molecular desempenhando um importante papel na solubilidade e viscosidade desse composto (ZAKARIA; RAHMAN, 1996).

As diferenças de viscosidade das frações aquosas do P-GC podem ser atribuídas aos diferentes graus de acilação e ao conteúdo dos cátions divalentes presentes nessa solução. As frações com graus elevados de acilação formam um gel, quando parcialmente desaciladas dispersam na água para formar um gel mais estável. Ademais, a maior viscosidade exibida pelas frações solúveis é atribuída ao maior teor de cátions divalentes (ZAKARIA; RAHMAN; MAHMOOD, 1997), experiências sobre os efeitos de NaCl, CaCl₂ e AlCl₃ na viscosidade do P-GC, bem como o efeito da concentração de sal na viscosidade específica, indicaram que a afinidade entre esse polímero e os íons metálicos segue a presente ordem: $\text{Al}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^{+}$ (DE PAULA; RODRIGUES, 1995).

Outros fatores influenciam a viscosidade das frações aquosas do P-GC. Em pH acima de 5,5 a viscosidade da solução diminui drasticamente (ZAKARIA; RAHMAN, 1996). Além disso, a temperatura influencia no grau de acilação do polianion (ZAKARIA; RAHMAN; MAHMOOD, 1997). Em um estudo sobre a solubilidade do P-GC, verificou-se que 64,2% de uma fração do polissacarídeo foi dissolvida em água a 30°C e apenas 13,4% após o aquecimento da suspensão restante, sugerindo que a maior viscosidade do polímero é encontrada a 30°C (ZAKARIA; RAHMAN, 1996).

Outra importante característica do P-GC é sua capacidade emulsificante. Um hidrocolóide apresenta uma capacidade de emulsificação relevante quando tem uma atividade de superfície na interface água-óleo capaz de facilitar a formação de gotículas finas e estáveis (DICKINSON, 2003; PORTO; CRISTIANINI, 2014). O P-GC possui boas propriedades emulsionantes em emulsões líquidas, sendo um ingrediente promissor no uso em emulsões de bebidas, assim como ocorre com a goma arábica (PORTO; CRISTIANINI, 2014). Além disso, as emulsões formuladas com P-GC podem ser estabilizadas pela incorporação de pequenas quantidades de Tween 80, um surfactante e emulsionante usado em alimentos e cosméticos, melhorando suas propriedades emulsificantes (ASANTEWAA *et al.*, 2011).

O P-GC também é um potencial agente de suspensão em formulações farmacêuticas (ASANTEWAA *et al.*, 2011). As suspensões são usadas em aplicações externas e produtos parenterais, mas principalmente na administração oral de fármacos (IBEZIM; KHANNA; SINGH, 2000), e representam sistemas compostos por duas fases nos quais partículas sólidas são dispersas em uma fase fluida.

O P-GC em concentrações de 0,1-2,0% p/v, produz suspensões floculadas com sobrenadante claro, sedimentação rápida, baixo volume de sedimento e maior facilidade para se dispersar. No entanto, a capacidade de suspensão desse polissacarídeo é inferior aos polímeros obtidos a partir da goma de xantana (ASANTEWAA *et al.*, 2011) e veegum (IBEZIM; KHANNA; SINGH, 2000), agentes de suspensão usados como referência.

Além disso, as dispersões compostas com P-GC exibem um comportamento de fluxo não-newtoniano de cisalhamento em concentrações de 4 a 50% p/v, podendo ser utilizadas como agente espessante (MOTHÉ; RAO, 1999) com propriedades semelhantes ao polissacarídeo obtido da goma arábica utilizado na indústria de alimentos (MOTHÉ; RAO, 2000).

3.4.4 P-GC na composição e desenvolvimento de fármacos

Os sistemas tópicos de administração de drogas são importantes na ação local e sustentada de muitos princípios ativos (DUA; PABREJA; RAMANA, 2010; NAYAK; NANDA, 2013). Em um estudo que investigou a ação de novos géis de cloridrato de lidocaína a 4% usando P-GC e Carbopol 940 foi observado que estes compostos eram fisicamente estáveis sem a ocorrência de sinéresis (DAS; NAYAK; NANDA, 2013).

O P-GC tem sido aplicado na liberação gradativa de substâncias específicas (OLORUNSOLA *et al.*, 2016). Este polissacarídeo foi utilizado para o aprisionamento da tripsina usando celulose como suporte, esta formulação foi administrada em feridas cutâneas de camundongos e promoveu uma aceleração da proliferação de fibroblastos, neovascularização do tecido de granulação e provocou um efeito estimulante na formação do epitélio, sugerindo que a preparação que associou tripsina, P-GC e celulose pode ser útil em aplicações tópicas de curativo cutâneo para cicatrização de feridas (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Géis preparados com P-GC apresentaram características semelhantes a uma preparação comercial, não produzindo reações dermatológicas ou outras reações adversas importantes. Além disso, estes géis apresentaram boa estabilidade em parâmetros com viscosidade, conteúdo do fármaco e aparência física em todas as condições de temperatura,

sugerindo que o P-GC pode ser considerado um agente gelificante em potencial (KUMAR *et al.*, 2009).

Filmes à base de P-GC utilizando o paracetamol como princípio ativo têm propriedades necessárias para o revestimento bem-sucedido de comprimidos. O P-GC plastificado com glicerol, quando aplicado como filme em comprimidos de paracetamol atua como revestimento não funcional, pois não é capaz de modificar a liberação e outras propriedades biofarmacêuticas do fármaco. Assim, esses filmes podem ser úteis no revestimento de formas de dosagem sólidas de liberação imediata ou convencional para mascarar o sabor e odor desagradáveis do fármaco e facilitar a deglutição, melhorar as propriedades mecânicas e proteger o princípio ativo contra condições ambientais extremas (OFORI-KWAKYE *et al.*, 2012).

Comprimidos constituídos por P-GC, curcumina e etilcelulose, como camada de revestimento impermeável, mostraram-se de fácil formulação e aplicação, com baixo custo, apresentando remoção conveniente da superfície mucosa e uma melhor entrega de substâncias, sugerindo que esses comprimidos com P-GC são suficientemente mucoadesivos para aplicação clínica (GOWTHAMARAJAN *et al.*, 2012). Além disso, comprimidos de paracetamol com P-GC apresentaram baixa desintegração, rápida dissolução e boas propriedades físico-mecânicas, em comparação com aglutinantes já utilizadas, como a acácia e a polivinilpirrolidona (PVP K-30) (GOWTHAMARAJANB *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que o P-GC foi empregada com sucesso como aglutinante na preparação de comprimidos de metronidazol. Os comprimidos produzidos demonstraram as propriedades físico-químicas necessárias da uniformidade de peso, dureza, friabilidade, desintegração e dissolução (OFORI-KWAKYE; ASANTEWAA; KIPO, 2010).

Em um estudo comparativo das propriedades do P-GC e do polissacarídeo extraído a partir da goma arábica, foi sugerido que o P-GC pode servir como excipiente na formulação de fármacos suscetíveis à oxidação (OLORUNSOLA *et al.*, 2016).

De forma complementar, nanopartículas de prata reduzidas e estabilizadas pelo P-GC apresentaram atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias gram-negativas, em concentrações em que não se observou citotoxicidade significativa (QUELEMES *et al.*, 2013).

3.4.5 Atividade farmacológica do P-GC

Os polissacarídeos com alto teor de arabinose e galactose exibem atividades moduladoras, a goma do cajueiro mostrou ter capacidade de diminuir as concentrações de IL-

6, os níveis de NO· e IFN- γ em macrófagos (YAMASSAKI *et al.*, 2015). Os efeitos anti-inflamatórios do P-GC podem ser evidenciados no estudo sobre sua atividade gastroprotetora contra os danos induzidos por naproxeno em ratos. Neste estudo, o pré-tratamento dos animais com P-GC reduziu as lesões causadas por naproxeno, atenuou os níveis de mieloperoxidase e malondialdeído (CARVALHO *et al.*, 2015).

O P-GC possui também atividade antidiarreica em modelos de diarreia inflamatória. A atividade antidiarreica pode ser explicada pela capacidade do P-GC de inibir a motilidade gastrointestinal e pela diminuição do volume de secreção de fluido intestinal induzido por PGE2 (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Além disso, a avaliação do efeito do hidrogel à base de P-GC e quitosana, associada à terapia a laser de baixo nível, na cicatrização de feridas em ratos, demonstrou que esta formulação contribuiu para processos de cicatrização mais eficientes, diminuição da inflamação, maior contração da ferida, maior quantidade de colágeno, baixa necrose focal, exsudato neutrofílico baixo e regressão ou modulação da neoformação vascular (ARAGÃO-NETO *et al.*, 2017).

O P-GC foi testado também quanto à sua atividade antimicrobiana e apresentou uma atividade baixa contra *Saccharomyces cerevisiae* e não promoveu crescimento como fonte de carbono às espécies *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* após cinco dias de incubação (TORQUATO *et al.*, 2004). No entanto, outro estudo sobre o potencial antimicrobiano da goma do cajueiro *in natura* evidenciou significativas propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium* (CAMPOS *et al.*, 2012).

Além disso, o P-GC combinado com β -galactose ramificada (1 \rightarrow 3) solúvel em água, com outros oligossacarídeos e proteínas, apresentou alta atividade inibitória contra sarcoma induzido em camundongos, caracterizando uma atividade antitumoral significativa (MOTHÉ *et al.*, 2008).

3.4.6 Outras aplicações e toxicidade do P-GC

O P-GC, um biomaterial ativo, em conjunto com ftalocianinas, se destaca como um excelente material formador de filme com potencial aplicação em dispositivos nanobiomédicos como sensores eletroquímicos (ARAÚJO *et al.*, 2012). Além disso, a adsorção do P-GC à Concanavalina A, uma lectina que se liga especificamente a manose e glicose, mostrou aumento das reações e da concentração dessa proteína, indicando interação

específica entre esses compostos, o que pode ser utilizada no desenvolvimento de biossensores e kits para imunoenaios (MACIEL *et al.*, 2007).

O P-GC pode ser utilizado como polieletrólitos aniônicos na formação de nanocompósitos eletroativos preparados por técnica camada por camada, aumentando a estabilidade eletroquímica, a reprodutibilidade e a sensibilidade do filme para este analito, protegendo o polímero condutor da degradação ácida (BARROS *et al.*, 2012).

Ademais, o P-GC mostrou ser uma alternativa viável para o encapsulamento de compostos bioativos alimentares. Quando comparado com a goma arábica, material comumente usado no encapsulamento de alimentos, o P-GC apresentou menor viscosidade, maior eficiência, retardou a oxidação e a alta absorção de umidade (BOTREL *et al.*, 2017).

Outro exemplo que mostra o potencial desse biopolímero é o encapsulamento do óleo de echium, com P-GC, como materiais de parede, e ácido sinápico, como um agente de ligação cruzada. As experiências mostraram que o P-GC protegeu o óleo e os tratamentos proporcionaram maior estabilidade oxidativa (COMUNIAN *et al.*, 2016). Além disso, as partículas de P-GC e inulina como material encapsulante também mostraram ser uma alternativa potencial no processo de encapsulamento de óleos essenciais (FERNANDES *et al.*, 2016).

Novas tecnologias também estão sendo empregadas para melhorar o processo de encapsulamento de óleos e outros alimentos. A associação de um alginato específico com o P-GC provou ser capaz de maximizar o caráter hidrofílico das matrizes do polímero, permitindo uma liberação mais rápida com uma carga de óleo satisfatória (OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014).

Além disso, meios de cultura com P-GC foram capazes de estimular a embriogênese de cenoura e aumentar a conversão de embriões em plântulas em meios de cultura, mostrando que esse composto pode ser usado como uma ferramenta potencial para a melhoria das taxas de conversão em sistemas nos quais baixas taxas de conversão são um problema para programas de reprodução (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007). Ademais, nanogéis produzidos a partir do P-GC e quitosana apresentaram eficácia contra as larvas de *Stegomyia aegypti*, onde a taxa de mortalidade estava relacionada às proporções de P-GC e quitosana, atingindo mais de 90% da mortalidade após 72 h (ABREU *et al.*, 2012).

Sobre os danos causados pelo uso desse polímero pode-se dizer que o P-GC possui em sua composição moléculas de baixa toxicidade, frequentemente, presentes na dieta. Um estudo de toxicidade desse polímero, usando o método de Knudsen e Curtis (KNUDSEN; CURTIS, 1947), mostrou que ratos albinos machos da variedade Wistar, pesando de 160-200

g, receberam doses de 500 a 4.000 mg/kg de suspensão com P-GC em solução salina por via oral e não foram observadas manifestações tóxicas. Além disso, o padrão comportamental também não foi afetado após 48 h de teste. Nesse mesmo experimento, foram administrados 250 mg/kg de suspensão com P-GC em solução salina por via oral, diariamente por 30 dias, e os animais permaneceram saudáveis (KUMAR *et al.*, 2009).

Diante das principais características desse polissacarídeo, o capítulo I mostra os efeitos de uma formulação em orabase composta por P-GC sobre marcadores inflamatórios e da perda óssea na periodontite experimental em ratos.

4. CAPÍTULO I

ARTIGO PUBLICADO PELA REVISTA
“INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES”

Fator de Impacto: 3,671

Qualis Periódicos: A2

FORMULAÇÃO EM ORABASE COM POLISSACARÍDEO DA GOMA DO CAJUEIRO DIMINUI MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA PERDA ÓSSEA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL

Manoel D. Souza Filho^{a*}; Jand V. R. Medeiros^a; Daniel F. P. Vasconcelos^a; Durcilene A. Silva^a; Ana C. M. Leócido^a; Hygor F. Fernandes^a; Felipe R. P. Silva^b; Luiz F. C. França^b; David Lenardo^b e Giovanni R. Pinto^b

^aRede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 64049-550, Brasil

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, 64202-020, Brasil

*Autor Correspondente: Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí. Av. São Sebastião, nº 2819, CEP 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil. E-mail: manoeldias@ufpi.edu.br; Tel.: +55-86-994619724. Fax: +55-86-33234750.

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de uma formulação em orabase com Polissacarídeo da Goma do Cajueiro (P-GC) extraído de *Anacardium occidentale* L. sobre a perda óssea alveolar e a expressão relativa do RNAm de *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANK*, *RANKL*, e *OPG* no tecido periodontal de ratos da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*) submetidos à periodontite induzida por ligadura. A goma do cajueiro *in natura* foi coletada e purificada por processos químicos e o P-GC misturado com gel orabase. Os ratos (fêmeas) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de seis animais cada: salina a 0,9% (Grupo Sal); Gel orabase (Grupo Gel); 50 mg P-GC/1 g gel orabase (Grupo P-GC50) e 150 mg P-GC/1 g gel orabase (Grupo P-GC150). A periodontite foi induzida nos animais, e estes foram tratados por 20 dias com uma aplicação tópica diária dos compostos. O processo de purificação do P-GC apresentou alto rendimento e resultou em um produto livre de proteínas. O tratamento com P-GC150 (150 mg P-GC/1 g de gel orabase) reduziu significativamente a perda óssea alveolar, diminuiu a expressão relativa do RNAm de *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANKL* e da proporção *RANKL/OPG*, e causou uma redução significativa na atividade da mieloperoxidase do tecido gengival. Assim, o P-GC em orabase representa um potencial agente terapêutico para o tratamento da periodontite e possível fonte de novas descobertas biotecnológicas.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*; anti-inflamatório; expressão gênica.

4.1. Introdução

Desde a pré-história, as plantas são usadas para o tratamento de diversas doenças [1] e uma grande quantidade de fitoterápicos têm sido isolados nas últimas décadas [2, 3]. A *Anacardium occidentale* L. é uma planta com importante valor medicinal [2], comumente conhecido como cajueiro.

A goma do cajueiro *in natura*, um polissacarídeo complexo, pode ser extraída da casca do caule do cajueiro [4]. As análises de metilação, as degradações sequenciais de Smith e os produtos de degradação dessa goma mostraram uma estrutura de galactana altamente ramificada constituída por cadeias de resíduos ramificados de D-galactose unidos por ligações β -(1-3) e intercaladas por ligações β -(1-6); a arabinose está presente como grupos terminais ou em cadeias menores unidas por ligações (1-2) com até cinco unidades. Os monossacarídeos glicose, ramnose, manose, xilose e o ácido urônico também estavam presentes como grupos terminais. O principal ácido aldobiurônico presente era o 6-O- β -D-ácido glicopiranosilurônico-D-galactose junto com o análogo 4-O-methyl, em menor quantidade. A hidrólise do ácido leve revelou duas galactobioses, 3-O- β -D-galactopiranosil-D-galactose e 6-O- β -D-galactopiranosil-D-galactose [5].

O polissacarídeo purificado, ou seja, o Polissacarídeo da Goma do Cajueiro (P-GC), composto principalmente por galactose (59,4%), glicose (6,4%), arabinose (5,3%), ramnose (2,4%), manose (1%), e ácido glicurônico (13,5%) [6, 7, 8] tem sido obtido da goma do cajueiro *in natura* [9]. Este processo de purificação passa por estágios sequenciais de trituração, dissolução em água com ajuste de pH, filtração, precipitação com EtOH e liofilização [10].

Estudos experimentais com P-GC mostraram que esse polímero possui atividade anti-inflamatória capaz de reduzir o edema e os processos de hiperemia [11]; inibir a prostaglandina E2 [2]; e reduzir os marcadores inflamatórios como mieloperoxidase e malondialdeído [12]. Ademais, o P-GC possui uma influência significativa nos níveis de óxido nítrico (NO \cdot), IFN- γ e na modulação de macrófagos [13]. No entanto, pouco se sabe em relação aos efeitos desses biopolímeros sobre as doenças periodontais.

A periodontite é o resultado de respostas inflamatórias ativadas pela placa bacteriana que se acumula na margem gengival [14] e provoca a destruição do tecido conjuntivo ao redor dos dentes [15]. Neste processo, células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos [16] liberam citocinas e outros fatores inflamatórios resultando em perda óssea alveolar e subsequente perda dentária [17].

A reabsorção e formação dos ossos são reguladas pela via do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK)/Ligante RANK (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) [16, 17]. As alterações na estrutura óssea alveolar ocorrem devido às citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1 β , o aumento do recrutamento e da atividade dos osteoclastos causando perda óssea, e através da produção aumentada de RANKL, um importante fator osteoclastogênico [18, 19].

Assim, considerando as propriedades anti-inflamatórias do P-GC e a busca constante por produtos naturais obtidos de fontes renováveis e com atividade biológica, este estudo teve como objetivo investigar as características químicas e os efeitos de uma formulação em orabase com P-GC sobre a perda de osso alveolar e a expressão relativa do RNAm de *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANK*, *RANKL* e *OPG* no tecido periodontal de ratos submetidos à periodontite induzida por ligadura.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1 Extração e purificação do P-GC

Amostras de goma do cajueiro *in natura* foram coletadas da casca do tronco de cajueiros cultivados na cidade de Ilha Grande, Piauí, Brasil (Latitude, graus decimais S - 2.8242; Longitude, graus decimais W -41.7331). Um exemplar de Voucher do cajueiro mencionado neste estudo (número 52) foi depositado no herbário da Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil. O P-GC foi isolado a partir do exsudato das árvores usando um método anteriormente descrito por De Paula *et al.* [7].

O exsudato foi triturado, dissolvido em água destilada a 26 °C até ser obtido uma solução a 10% (p/v). Hidróxido de sódio aquoso diluído foi adicionado à solução para ajustar o pH para, aproximadamente, 7,0. A solução clara foi sucessivamente filtrada através de vidro sintético e o polissacarídeo precipitado com etanol na proporção de 1:3 (v/v) (Solução de goma:etanol). Essa goma isolada foi seca em um forno de ar forçado a 60 °C/8 h e pesado. O peso molecular foi estimado por meio da dispersão de luz em um *Malvern Zetasizer Nano ZS Model 3600* usando um laser de 633 nm em um ângulo de dispersão fixo de 173 ° e a análise elementar foi realizada utilizando o *Elementary Analyzer - Perkin Elmer 2400 series ii*.

4.2.2 Animais

Vinte e quatro ratos (fêmeas) da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidos na Universidade Federal do Piauí, pesando de 200 a 260 g, com três meses de idade, foram

utilizados no estudo. Os ratos foram aclimatados, antes do ensaio, durante uma semana, e alojados em ambientes com temperatura controlada, a 24 ± 2 °C, sob ciclos de claro-escuro de 12 h e acesso à água e comida *ad libitum*.

Os protocolos experimentais e métodos de tratamentos dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (Número de registro: 229/16) e foram realizadas de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Ao longo da pesquisa, todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.2.3 Protocolo Experimental de indução da Periodontite

Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite. Essa doença foi induzida como descrito anteriormente [20]. Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg; *i.p.* - Francotar, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, Brasil) e xilazina (20 mg/kg *i.p.* - Kensol, Konig S.A., Brasil) [21]. Uma ligadura de fio de nylon 3.0 esterilizada (Shallon®, Brasil) foi colocada ao redor do colo dos primeiros molares inferiores. O nó da ligadura foi fixado no lado mesial dos dentes e o fio permaneceu no espaço subgengival nos outros lados. A ligadura foi mantida até o final do experimento. Então, os animais foram observados durante 20 dias após a colocação de ligadura e eutanasiados com uma dose elevada de cetamina (300 mg/kg; *i.p.* - Francotar, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, Brasil) e xilazina (30 mg/kg; *i.p.* - Kensol, Konig S.A., Brasil).

4.2.4 Composição dos géis

No presente estudo, um veículo e dois géis foram preparados como segue abaixo:

1. Gel orabase: Um composto inerte, foi utilizado como veículo na preparação dos outros géis. Este gel foi composto de carbopol 934P (2%), *p*-hidroxibenzoato de metilo (0,1%), etanol a 98% (0,6%), propilenoglicol (1%), trietanolamina (1%) e água pura. O Carbopol 934P é um polímero com propriedades mucoadesivas. Atua como adjuvante em sistemas de administração de medicamentos bioadesivos e é seguro no uso em mucosa oral [22]. Funcionalmente, o gel orabase continha um agente mucoadesivo e gelificante (carbopol 934P), um conservante (*p*-hidroxibenzoato de metilo), um umectante (propilenoglicol), um solvente (etanol a 98%), e água pura como

veículo. Além disso, a trietanolamina, uma base fraca, foi gradualmente adicionada para ajustar o pH deste gel orabase para 6,5.

2. P-GC50: Este gel continha 50 mg de P-GC/1 g de gel orabase.

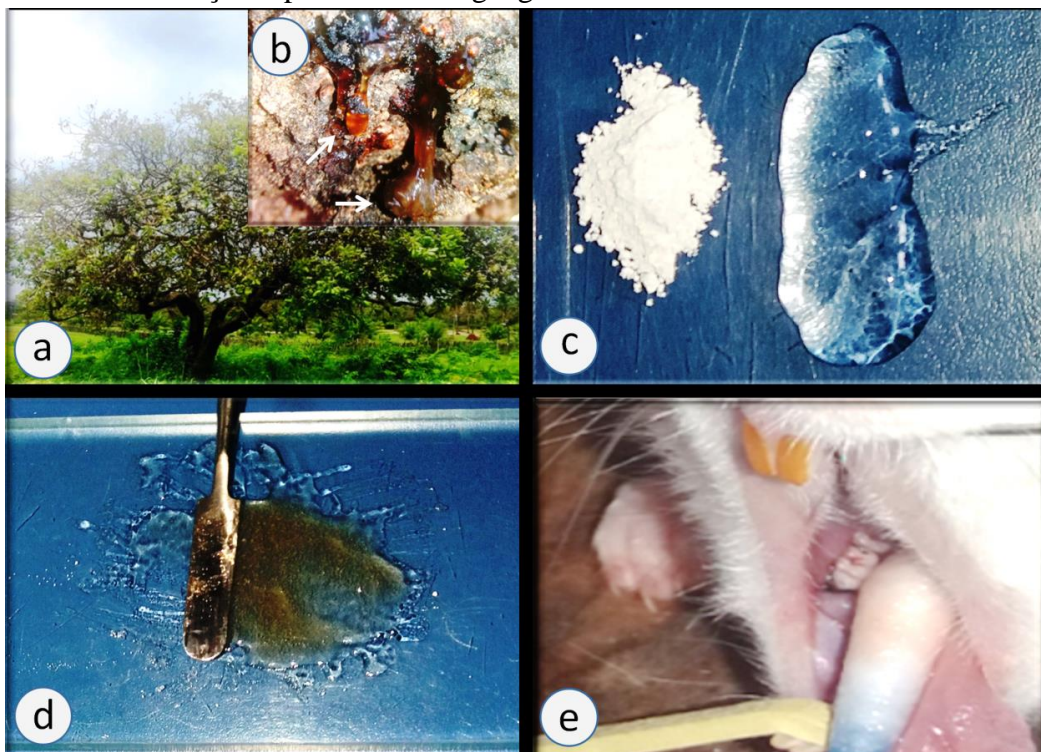
3. P-GC150: Este gel continha 150 mg de P-GC/1 g de gel orabase.

Os componentes de cada gel foram colocados sobre uma placa de vidro e misturados com uma espátula de metal. Após a formação de uma mistura homogênea, os géis foram armazenados em tubos de plástico de 50 g com tampa tipo *flip-top* e armazenados na geladeira a 6-8 °C.

4.2.5 Aplicação tópica das composições

Os compostos foram administrados por via tópica, com cotonete, na região lingual e vestibular da gengiva dos primeiros molares inferiores (Figura 1), imediatamente após a colocação da ligadura e, posteriormente, uma vez por dia, durante 20 dias.

Figura 1. Ilustração esquemática da preparação do gel em orabase com P-GC e sua administração tópica no tecido gengival dos animais.



(a) Fotografia da espécie *Anacardium occidentale* L., a árvore da qual a goma do cajueiro *in natura* é extraída; (b) Goma do cajueiro *in natura*, setas brancas; (c) P-GC, pó branco (à esquerda) e gel orabase ou veículo (direita); (d) P-GC na formulação em orabase, gel marrom; e (e) administração tópica da formulação sobre o tecido gengival do primeiro molar inferior do animal com cotonete.

Todos os animais foram submetidos à periodontite experimental e distribuídos aleatoriamente em grupos de seis animais. Cada grupo recebeu uma única formulação farmacêutica, solução ou veículo, conforme especificado abaixo:

- Grupo Sal: Os animais receberam apenas aplicações tópicas de solução salina a 0,9% (Eurofarma Laboratórios Ltda, Brasil);
- Grupo Gel: Os ratos receberam aplicações tópicas de gel orabase (veículo);
- Grupo P-GC50: Os ratos receberam aplicações tópicas de P-GC50;
- Grupo P-GC150: Os animais receberam aplicações tópicas de P-GC150.

4.2.6 Avaliação do peso corporal dos animais e do peso relativo dos órgãos

O peso corporal dos animais foi medido em dois momentos durante o experimento - imediatamente antes da indução da periodontite, no primeiro dia, e antes da eutanásia dos animais, no 20º dia. Após a eutanásia dos animais, o fígado, o coração, o baço e os rins foram removidos e o peso relativo desses órgãos foi determinado.

4.2.7 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

No último dia do experimento, após anestesia geral e pesagem de cada animal, amostras de 1 mL de sangue total foram coletadas do plexo retro-orbital por meio de tubo capilar com heparina para microhematócrito [23] e conservados em tubos de vidro contendo anticoagulante (Ácido etilenodiaminotetracético - EDTA) para avaliação da contagem global de leucócitos e dosagens bioquímicas.

4.2.7.1 Avaliação da lesão hepática e da função renal

Os níveis séricos de transaminase glutâmica-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica-pirúvica (TGP) foram utilizados para investigar a presença de lesões hepáticas. Para avaliar a função renal, os níveis de creatinina e ureia foram quantificados. Estes parâmetros foram investigados 20 dias após a indução da periodontite nos animais. Para isso, kits específicos foram utilizados, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, Brasil).

4.2.7.2 Contagem global de leucócitos

No 20º dia após a indução da periodontite, 20 µL de sangue total, previamente coletados, foram armazenados em tubos contendo EDTA, e adicionados a 380 µL de solução

de Turk. Depois disso, a contagem global de leucócitos, em triplicata, foi realizada usando uma câmara de Neubauer e o resultado obtido pela média das três contagens [24].

4.2.8 Dissecção e armazenamento do tecido gengival

Após a eutanásia dos animais, o tecido gengival de cada primeiro molar inferior foi dissecado com lâmina de bisturi estéril. Esta gengiva foi armazenada em microtubos estéreis (1,5 mL) para posterior dosagem da mieloperoxidase (MPO) e em microtubos estéreis e livres de RNase e DNase (1,5 mL), com *RNAlater*® *Solution* (Sigma-Aldrich Co., USA), para realização da *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram armazenadas em um freezer (-70 °C) até o processamento.

4.2.9 Dosagem da MPO

O acúmulo de neutrófilos foi avaliada em amostras de tecido gengival a partir dos primeiros molares inferiores por meio do ensaio que mediu os níveis de MPO. Resumidamente, 50 mg de tecido gengival foram homogeneizados a 50 mg/mL em tampão de potássio contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). O homogeneizado foi centrifugado em 4.000 x g por 7 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuspensão e os níveis de MPO foram medidos em leitor de ELISA pela alteração na absorvância a 450 nm, usando *o*-dihidrocloridrato de dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. Os níveis de MPO foram relatados como unidade/mg de tecido e a unidade da atividade da MPO foi definida como a conversão de 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água, a 22 °C, em 1 min [25].

4.2.10 Medida da perda óssea alveolar

Os animais foram eutanasiados 20 dias após a indução da periodontite por ligadura e as mandíbulas foram dissecadas e fixadas em tampão de formalina a 10%. As arcadas dentárias foram imersas em peróxido de hidrogênio (30 V) durante 7 h para facilitar a remoção mecânica do tecido mole, separadas em hemi-arcadas direita e esquerda e coradas com azul de metileno a 1% (Dinâmica, Brasil) para diferenciar o osso dos dentes [21, 26], finalmente, foram colocadas em lupa estereoscópica e fotografadas usando uma câmera digital.

As imagens digitais foram submetidas à análise da perda óssea alveolar usando o *software ImageJ*, versão 1.47 (N.I.H., Bethesda, MD, USA) [27]. Neste procedimento, a área (mm²) correspondente às raízes expostas dos primeiros molares inferiores foi medida

conforme descrito anteriormente [16]. Todas as imagens adquiridas foram comparadas com uma área conhecida de 1,0 mm².

4.2.11 Avaliação histopatológica do fígado

Depois que os animais foram submetidos à eutanásia, o fígado de cada animal foi removido, pesado, cortado e fixado em tampão de formalina a 10%. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e imersas em xilol, envolvidas em parafina, cortadas em fragmentos de 5 mm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina, e avaliadas por meio do microscópio óptico. O fígado foi avaliado histologicamente quanto à presença de esteatose, inflamação e necrose, conforme descrito por Carvalho *et al.* [20], para investigar os efeitos hepáticos da periodontite induzida por ligadura, bem como a ação do P-GC.

4.2.12 Análise da expressão gênica por RT-PCR

O RNA total foi extraído de 50 mg de tecido gengival com *TRIzol® Reagent* (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA total usando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante e armazenado a -30 °C.

A expressão dos genes alvo foi investigada por *RT-PCR*, com o instrumento *7500 fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems, USA), usando alíquotas de cDNA e utilizando *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, USA), *primers* e sondas específicas para a espécie escolhida: *TNF-α* (LOC103694380, Rn00562055_m1); *IL-1β* (Il1b, Rn00580432_m1); *RANK* (Tnfrsf11a, Rn04340164_m1); *RANKL* (Tnfsf11, Rn00589289_m1), *OPG* (Tnfrsf11b, Rn00563499_11) ou *Gliceraldeído-3-fostato dehidrogenase (GAPDH)* (Gapdh, Rn01775763_g1) (Símbolo do gene e *Assay ID*, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante.

Todas as amostras foram executadas em triplicada, e a expressão relativa de RNAm foi determinada após a normalização de todos os valores aos do *GAPDH* [16]. Os resultados foram analisados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [28] com o *GAPDH* como um *housekeeping gene* [16] e controle não tratado como calibrador (Grupo Sal) [28].

4.2.13 Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). O teste *t* de student e a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* Bonferroni, foram

usados para comparar as médias e $p < 0,05$ foi considerado para indicar diferenças estatisticamente significativas. Todos os cálculos foram realizados usando o *software GraphPad Prism 6.0* (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

4.3. Resultados

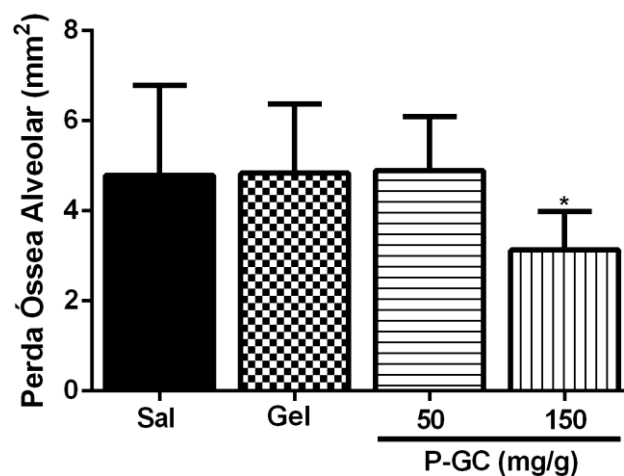
4.3.1 Rendimento do processo de purificação do P-GC

Em nosso estudo, a purificação do exsudato a P-GC resultou em um processo com rendimento de $80\% \pm 2,45\%$, e em um polímero com peso molecular estimado em $1,4 \times 10^4$ kDa. O resultado da análise elementar não mostrou a presença de proteína na constituição do polissacarídeo obtido.

4.3.2 Efeito do P-GC em orabase na perda óssea alveolar, sobre as citocinas pró-inflamatórias e a via RANK/RANKL/OPG

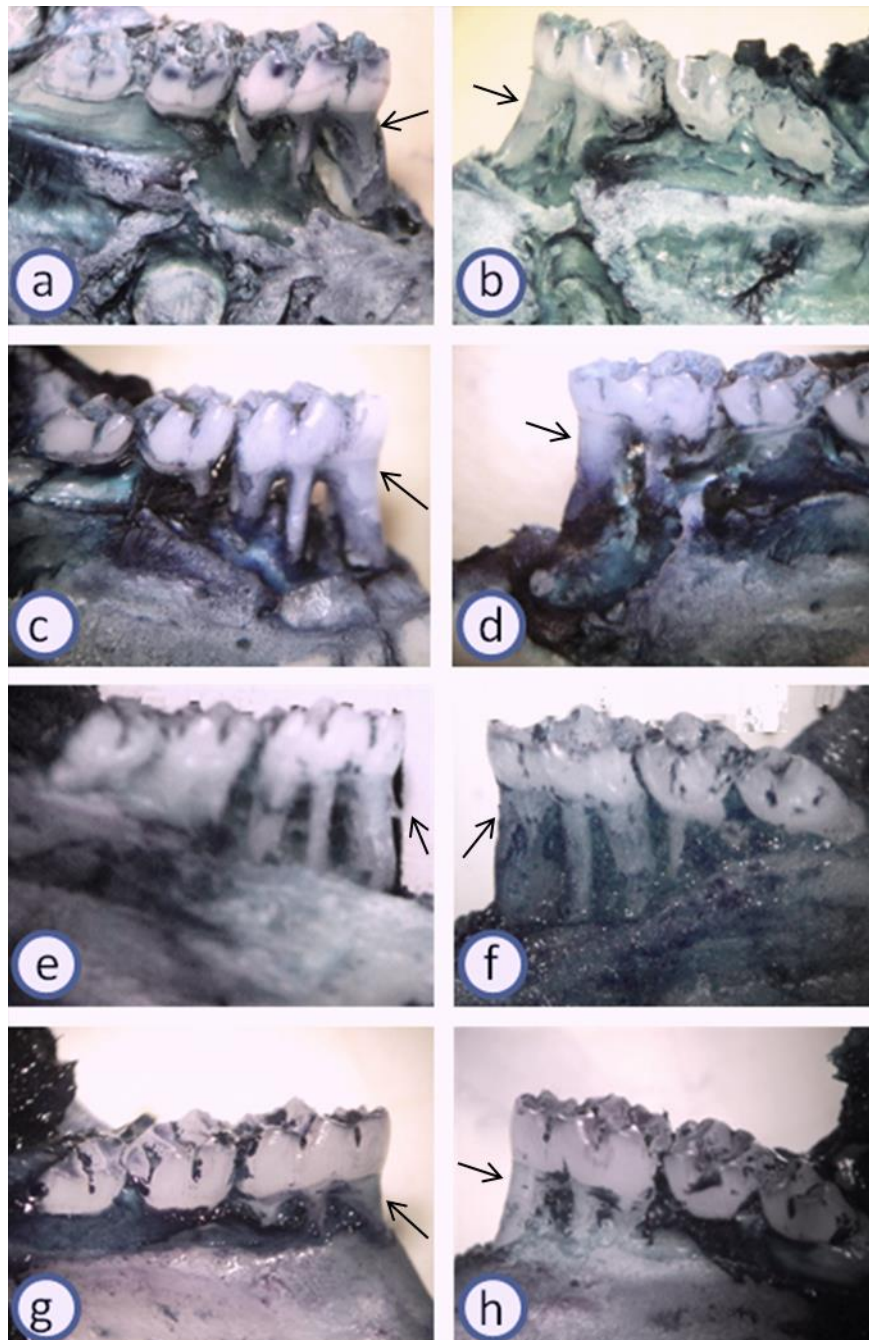
A aplicação tópica de P-GC150 resultou em inibição significativa da perda óssea alveolar ($3,12 \pm 0,85 \text{ mm}^2$) comparado aos animais que receberam tratamento com P-GC50 ($4,89 \pm 1,20 \text{ mm}^2$), gel orabase ($4,83 \pm 1,53 \text{ mm}^2$) ou solução salina a 0,9% ($4,79 \pm 1,99 \text{ mm}^2$) ($p < 0,05$) (Figuras 2 e 3). No entanto, as aplicações tópicas de P-GC50 não mostraram nenhum efeito protetor no osso alveolar dos animais após a indução de periodontite (Figuras 2; 3e e 3f).

Figura 2. Efeito do P-GC em orabase na perda óssea alveolar associada à periodontite experimental em ratos.



Os dados representam a média \pm EPM da área de perda óssea alveolar dos molares inferiores de seis animais em cada grupo. Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite. * $p < 0,05$. Determinado com ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 3. Efeito do P-GC em orabase sobre a perda óssea alveolar associada à periodontite experimental em ratos.

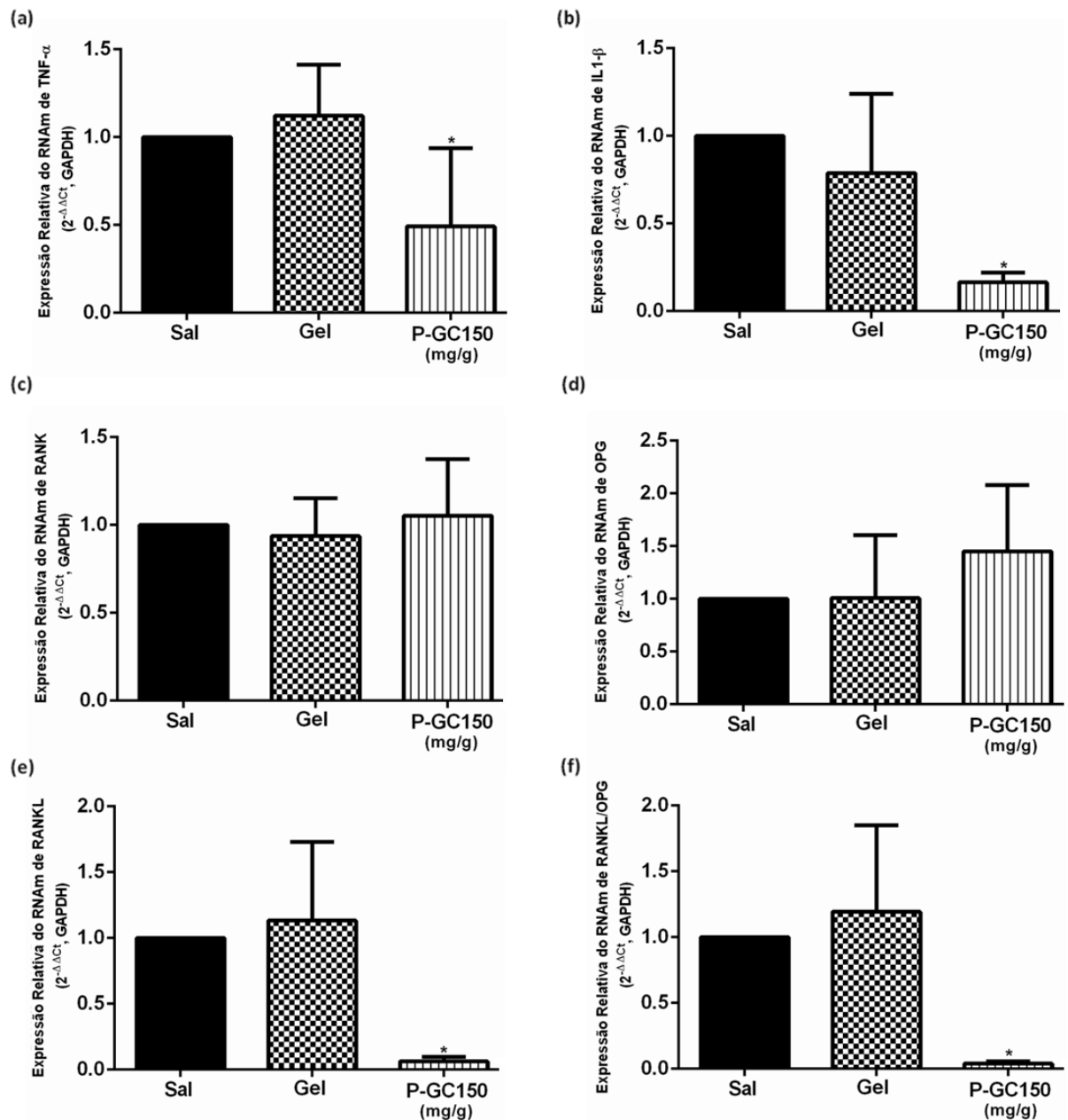


Aspectos macroscópicos das faces vestibular (esquerda) e lingual (direita) do primeiro molar inferior direito. Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite. Grupo Sal (a e b); Grupo Gel (c e d) e Grupo P-GC50 (e e f) mostrando a reabsorção óssea alveolar grave com exposição radicular. Grupo P-GC150 (g e h) mostrando menor reabsorção óssea alveolar. As imagens foram obtidas com uma ampliação da imagem original de x40.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, os animais tratados com P-GC150 mostraram uma diminuição significativa na expressão relativa do RNAm de *TNF- α* e *IL-1 β*

em comparação aqueles tratados com gel orabase ou solução salina a 0,9% ($p < 0,05$) (Figuras 4a; 4b).

Figura 4. Expressão relativa do RNAm de *TNF- α* (a), *IL-1 β* (b), *RANK* (c), *OPG* (d), *RANKL* (e) e da proporção *RANKL/OPG* (f), normalizada com um *housekeeping gene* (*GAPDH*), no tecido gengival dos molares inferiores de animais submetidos à periodontite experimental e tratados com aplicação tópica de P-GC.



Os dados representam a média \pm EPM das mudanças na expressão relativa do RNAm. Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite, considerando seis animais em cada grupo. As barras representam os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculado por meio do método $\Delta\Delta Ct$. * $p < 0,05$. Determinado com ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

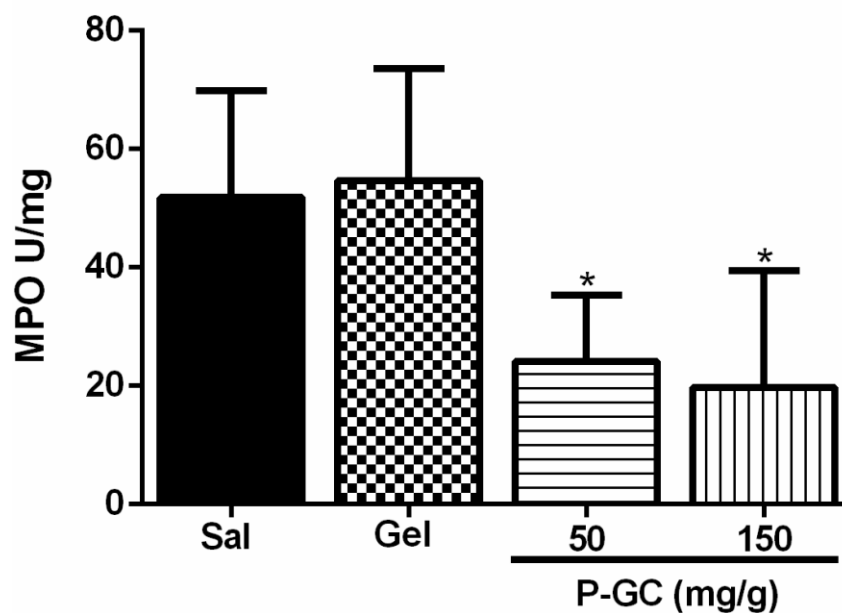
Observou-se uma diminuição significativa da expressão relativa do RNAm de *RANKL* (Figura 4e) ($p < 0,05$), e uma redução significativa na expressão relativa do RNAm

da proporção RANKL/OPG nos tecidos periodontais de ratos submetidos ao tratamento com P-GC150 ($p < 0,05$) (Figura 4f). Ademais, a análise sobre a via RANK/RANKL/OPG não revelou diferença estatisticamente significativa na expressão relativa do RNAm de *RANK* e *OPG* entre os grupos (Figuras 4c e 4d, respectivamente).

4.3.3 Níveis de MPO

Animais tratados com P-GC50 ($24,17 \pm 11,16$ U/mg) ou P-GC150 ($19,78 \pm 19,64$ U/mg) apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de MPO no tecido gengival quando comparados aos ratos tratados com gel orabase ou salina a 0,9% ($51,86 \pm 17,98$ U/mg) ($p < 0,05$) (Figura 5). Além disso, os níveis de MPO nos animais tratados com gel orabase ($54,73 \pm 18,92$ U/mg) não diferiu estatisticamente do grupo Sal (Figura 5).

Figura 5. Efeito da aplicação tópica do P-GC nos níveis de MPO em tecido gengival de ratos submetidos à periodontite experimental.



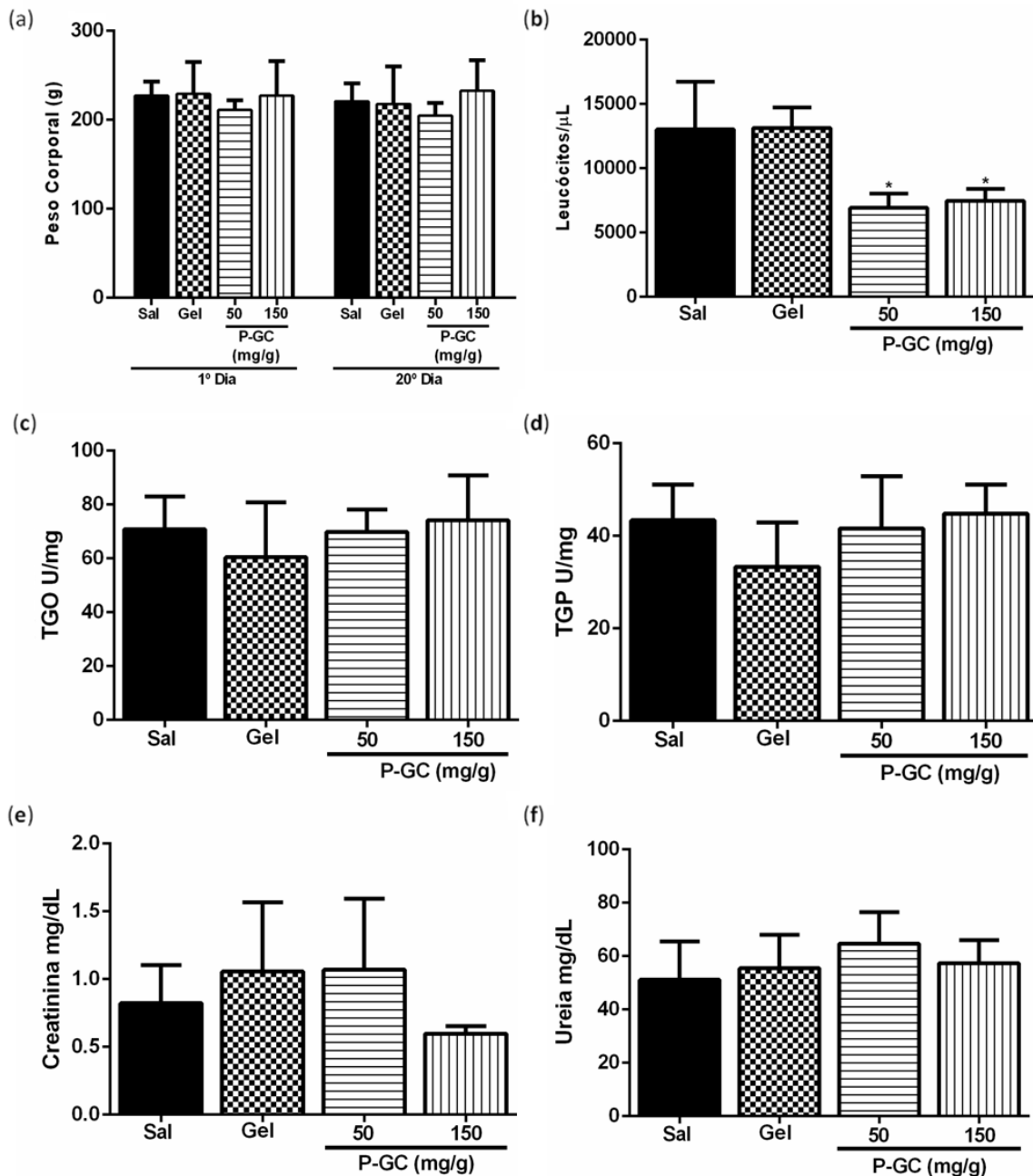
Os dados representam a média \pm EPM dos níveis de MPO no tecido gengival dos molares inferiores dos animais (seis animais em cada grupo). Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite. * $p < 0,05$. Determinado com ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.3.4 Efeito sistêmico e toxicidade dos tratamentos com P-GC em orabase

Em relação aos efeitos da formulação com P-GC aplicada no tratamento da periodontite induzida neste estudo sobre o peso corporal dos animais, nenhuma mudança significativa foi observada (Figura 6a). Quanto aos efeitos da aplicação tópica de P-GC em orabase sobre a contagem global de leucócitos, os animais pertencentes aos grupos P-GC50 ($6928,57 \pm 1112,37/\mu\text{L}$) e P-GC150 ($7481,12 \pm 917,01/\mu\text{L}$) tiveram uma contagem global de

leucócitos significativamente menor do que a observada nos grupos Sal ($13028,33 \pm 3717,74/\mu\text{L}$) ou Gel ($12862,28 \pm 1603,11/\mu\text{L}$) ($p < 0,05$) (Figura 6b).

Figura 6. Efeito da aplicação tópica do P-GC sobre o peso corporal, contagem global de leucócitos, TGO, TGP, creatinina e ureia em ratos submetidos à periodontite experimental.



Os dados representam a média \pm EPM do peso corporal (a), contagem global de leucócitos (b) e níveis séricos de TGO (c); TGP (d); Creatinina (e) e Ureia (f), de seis animais em cada grupo. Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite. Determinado com ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O teste t de student foi utilizado para comparação do peso corporal dos animais antes e após o tratamento.

Além disso, todos os grupos apresentaram níveis séricos estatisticamente semelhantes de TGO (Figura 6c) e TGP (Figura 6d). Além disso, a análise histopatológica do fígado mostrou esteatose hepática microvesicular em todos os animais sem diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$) (Apêndice B). Além disso, a avaliação da função renal, com base nos níveis de creatinina e ureia (Figura 6e e 6f, respectivamente), não revelou diferenças significativas entre os grupos.

Observou-se também que não houve diferença estatisticamente significativa entre os pesos relativos do fígado, baço, coração e rins dos animais submetidos à periodontite experimental após o tratamento com P-GC em orabase (Tabela 1).

Tabela 1. Peso relativo dos órgãos de ratos após a periodontite induzida por ligadura e tratamento com aplicação tópica de P-GC

Órgãos	Peso Relativo (%)				p
	Sal	Gel	P-GC50	P-GC150	
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	
Fígado	3,01 ± 1,33	2,97 ± 0,42	3,46 ± 0,30	3,04 ± 0,24	0,40
Baço	0,40 ± 0,21	0,38 ± 0,04	0,50 ± 0,21	0,39 ± 0,09	0,65
Rins	0,72 ± 0,32	0,72 ± 0,11	0,74 ± 0,04	0,69 ± 0,04	0,26
Coração	0,35 ± 0,14	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,05	0,30

4.4. Discussão

O propósito do isolamento de qualquer substância é obter um material quimicamente puro e homogêneo com o rendimento mais alto possível [10]. O método de extração e purificação do P-GC, em geral, produz um rendimento próximo de 70% [7]. Em nosso estudo, o processo de purificação do exsudado a P-GC resultou em um alto rendimento e um polímero com peso molecular próximo do observado por De Paula *et al.* [7]. Além disso, a análise elementar mostrou que o polissacarídeo purificado e utilizado na formulação não continha proteínas residuais na sua composição, o que mostra o sucesso do processo de isolamento do composto.

Os polissacarídeos são macromoléculas amplamente distribuídas em animais, plantas e micro-organismos e atraíram muita atenção nos últimos anos devido às suas possíveis atividades biológicas [29, 30]. Neste estudo, a aplicação tópica de P-GC150 resultou em uma

inibição da perda óssea alveolar. No entanto, as aplicações tópicas do P-GC em concentração mais baixa, por exemplo, P-GC50, não mostraram nenhum efeito protetor sobre o osso alveolar dos animais após a indução de periodontite, sugerindo que, como em outros estudos em modelos experimentais com compostos obtidos a partir de plantas [31], os efeitos benéficos desse polímero no processo de perda óssea alveolar podem ser dose-dependentes. Assim, observou-se que entre os protocolos estudados o que apresentou melhores resultados em relação ao tratamento da periodontite foi aquele que utilizou a formulação composta por 150 mg de P-GC/1 g de gel orabase.

A periodontite é uma doença osteolítica inflamatória, cuja falha nas vias de resolução endógena leva à destruição de tecido, mas o controle desta doença passa pela ação de mecanismos naturais de defesa [32]. Considerando que este polissacarídeo ainda não foi utilizado no tratamento da periodontite, nossos resultados mostraram que o P-GC150 possui potencial terapêutico significativo contra processos inflamatórios, semelhante a polissacarídeos complexos extraídos de espécies vegetais como *Passiflora edulis* [33], e algas marinhas como *Gracilaria verrucosa* [34], *Gracilaria caudata* [25], e *Digenea simplex* [35].

Neste contexto, as citocinas, em particular a TNF- α e a IL-1 β , podem amplificar a resposta inflamatória causando destruição de tecido e perda óssea [16, 36]. A IL-1 β é um importante mediador da resposta inflamatória e está envolvido na proliferação, diferenciação e apoptose celular [37, 38]; enquanto a TNF- α é uma adipocitocina pró-inflamatória e imunomoduladora que contribui para o desenvolvimento de várias doenças inflamatórias [39, 40], por meio da regulação da osteoclastogênese e osteoblastogênese [41].

Nossos resultados mostraram que o tratamento com P-GC150 diminuiu as expressões relativas do RNAm de *TNF- α* e *IL-1 β* . Assim, a aplicação tópica do P-GC150 diminuiu a expressão de dois genes diretamente associados ao processo de inflamação gengival observado na periodontite. Estes resultados são concordantes com os de outros estudos, considerando que vários polissacarídeos obtidos a partir de plantas têm a capacidade de regular a liberação dessas citocinas [42, 43, 44], e a diminuição nos níveis de TNF- α e IL-1 β está associada à administração de compostos extraídos de *Anacardium occidentale* L. [45].

Ademais, a via RANK/RANKL/OPG tem um papel importante na diferenciação e função dos osteoclastos [46], diretamente associada a fatores inflamatórios que ativam a reabsorção óssea na periodontite [47]. A proteína RANKL é uma citocina pertencente à família TNF produzida por osteoblastos e células da medula óssea, e seu sinal é transduzido pelo receptor RANK específico, que se localiza na superfície celular dos progenitores de osteoclastos, essenciais para a indução da osteoclastogênese [46]. Já a OPG é uma citocina

que também pertence à família TNF [46,48]; no entanto, sua função é inibir a osteoclastogênese por meio da ligação ao receptor RANK, regulando assim o processo de reabsorção óssea [46]. Em resumo, a proteína RANKL ativa a reabsorção óssea enquanto a OPG possui funções inibitórias nesse processo [46, 47, 48].

Em nosso estudo, a análise da via RANK/RANKL/OPG mostrou uma redução significativa na expressão relativa do RNAm de *RANKL* e, assim, uma consequente diminuição na expressão relativa do RNAm da proporção *RANKL/OPG* no tecido periodontal de ratos tratados com P-GC150, ou seja, causada pela queda da expressão relativa do RNAm de *RANKL*.

Citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β podem induzir a via RANK/RANKL/OPG a promover a destruição óssea inflamatória [46, 49]. As citocinas TNF- α e IL-1 β promovem a indução da osteoclastogênese por aumentar a expressão de *RANKL* e reduzir a produção de OPG em osteoblastos e células da medula óssea, resultando em perda óssea [49, 50]. Assim, nossos resultados sugerem que o P-GC150 pode ser capaz de diminuir a expressão relativa do RNAm de *TNF- α* e *IL-1 β* , e, assim, influenciar a expressão gênica de fatores associados à via RANK/RANKL/OPG, como a expressão relativa do RNAm de *RANKL*. Portanto, o P-GC150 também pode reduzir o processo inflamatório desencadeado por essas proteínas e diminuir a perda óssea alveolar causada pelo aumento da osteoclastogênese.

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra a inflamação e as infecções, estas células têm à sua disposição vários mecanismos antimicrobianos e pró-inflamatórios que justificam sua função protetora [51, 52]. A MPO está intimamente associada a processos inflamatórios e é uma das proteínas mais abundantes em neutrófilos, podendo participar do início e progressão da doença periodontal [53], sendo assim um importante marcador de doenças periodontais [54, 55]. Além disso, a MPO promove estresse oxidativo em várias doenças inflamatórias [56] e juntamente com o peróxido de hidrogênio e um cofator, forma o sistema MPO, um importante mecanismo de defesa dos leucócitos [57].

Observamos que os animais tratados com P-GC apresentaram diminuição nos níveis de MPO no tecido gengival. Este resultado sugere que o P-GC contribui para a redução do estresse oxidativo causado pelo sistema MPO, semelhante aos resultados mostrados em um estudo sobre as propriedades gastroprotetoras do P-GC em ratos [12] e outros estudos com polissacarídeos obtidos de plantas e algas que também demonstraram uma estreita relação com a prevenção do estresse oxidativo e a redução de processos inflamatórios [58, 59].

Em relação ao efeito sistêmico do gel com P-GC aplicado no tratamento da periodontite induzida, não foram relatadas alterações no peso corporal ou peso relativo do fígado, coração, baço e dos rins. Os estudos de toxicidade sobre o P-GC mostraram que a administração oral de doses elevadas desse composto é segura, não levando a danos sistêmicos significativos [60]. Resultados semelhantes foram observados em polissacarídeos obtidos de *Gracilaria birdiae* [61] e *Gracilaria intermedia* [62]. Estudos realizados com *Anacardium occidentale* L. também mostraram que óleos e extratos obtidos a partir desta planta apresentaram baixa toxicidade em tratamentos experimentais [63].

No presente estudo, a análise histopatológica do fígado revelou que a periodontite induzida por ligadura provocou esteatose hepática microvesicular nos animais, conforme observado anteriormente por Carvalho *et al.* [20] e Tomofuji *et al.* [64] em seus estudos mostrando aumento do estresse oxidativo hepático e peroxidação lipídica por periodontite. Assim, esses achados mostraram que o tratamento tópico da periodontite com P-GC em orabase foi incapaz de reverter a esteatose hepática; no entanto, também não agravou o dano causado pela periodontite induzida por ligadura ($p > 0,05$). Enzimas como a TGO e a TGP são liberadas no sangue em resposta a lesões hepáticas [65]. No entanto, o modelo experimental utilizado aqui não mostrou nenhuma alteração significativa nos níveis de TGO e TGP entre os grupos, consistente com os resultados de outros estudos [66].

Ainda neste contexto, os rins são sensíveis à toxicidade induzida por xenobióticos e esta nefrotoxicidade tem sido tradicionalmente investigada pela dosagem de marcadores bioquímicos séricos como a ureia e a creatinina [67]. No presente estudo, não houve alteração significativa nos níveis de creatinina e ureia entre os grupos, sugerindo assim a segurança no uso desses polissacarídeos. Em geral, apenas doses muito elevadas de polissacarídeos têm efeitos tóxicos representativos nos rins e nos fígados em ratos [62, 68].

A contagem global de leucócitos é um importante biomarcador, onde um número maior que o normal dessas células está associado à piora da doença periodontal [69, 70]. Em resumo, nossos resultados sobre essa contagem fornecem evidências de que as aplicações tópicas de P-GC50 e P-GC150 na gengiva desses animais podem ter atuado no controle da inflamação causada pela periodontite. Além disso, a doença periodontal tem sido associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares [71] incluindo hipertrofia miocárdica [72], entre outras mudanças cardiovasculares [73]. No presente estudo, após a aplicação do P-GC, não foi encontrada nenhuma alteração no peso relativo do coração.

Os sistemas tópicos de administração de fármacos são importantes para a atividade biológica de muitos agentes terapêuticos, pois potencializam a entrega do medicamento

diretamente no local desejado e por um longo período de tempo [74, 75], além de oferecer uma maneira mais segura e eficaz de administrar as drogas e em doses mais baixas, em comparação com os sistemas de administração oral de fármacos [75, 76].

Observamos também que o veículo ou gel orabase utilizado na formulação comportou-se como um composto inerte, no entanto, todos os resultados apresentados acima provavelmente não teriam sido obtidos sem o uso correto deste veículo, uma vez que a orabase é capaz de manter os compostos bioativos em alta concentração dentro de uma área restrita por um período de tempo prolongado [77], que pode ajudar a liberar o fármaco na mucosa oral de forma mais eficiente [78].

4.5. Conclusões

Esses resultados mostraram que o processo de purificação do P-GC apresentou alto rendimento, obtendo-se um produto livre de proteínas. A aplicação tópica do P-GC150 reduziu a perda óssea alveolar, a expressão relativa do RNAm de *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANKL* e da proporção *RANKL/OPG*, e causou uma diminuição nos níveis de MPO no tecido periodontal dos ratos com periodontite, além de apresentar características não-tóxicas. Portanto, o P-GC em orabase representa um potencial agente terapêutico no tratamento da periodontite e uma possível fonte de novas descobertas biotecnológicas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Reconhecimentos

Os autores agradecem o apoio do governo municipal da cidade de Parnaíba, estado do Piauí, oferecido por meio do Edital Público n.01/2014 – MacDoubles Fernandes do Nascimento em apoio à Ciência, Tecnologia e Inovação.

Referências

- [1] S.B. Kosalge, R.A. Fursule, Investigation of ethnomedicinal claims of some plants used by tribals of Satpuda Hills in India. *J. Ethnopharmacol.* 121 (2009) 456–61.
- [2] T.S. Araújo, D.S. Costa, N.A. Sousa, L.K. Souza, S. De Araújo, A.P. Oliveira, F.B. Sousa, D.A. Silva, A.L. Barbosa, J.R. Leite, J.V. Medeiros, Antidiarrheal activity of cashew gum, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 174 (2015) 299–307.
- [3] L. Damiki, H. Siva, Ethnomedicinal plants used for diarrhea by tribals of Meghalaya, Northeast India. *Pharmacogn. Rev.* 5 (2011) 147–154.
- [4] R.S.N. Lima, J.R. Lima, C.R. Salis, R.A. Moreira, Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: A novel bioligand tool. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35 (2002) 45–53.
- [5] D.M.W. Anderson, P.C. Bell, Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*. *Anal. Chim. Acta* 79 (1975) 185–197.
- [6] I.M. Araújo, M.F. Zampa, J.B. Moura, J. R. Dos Santos Jr., P. Eaton, V. Zucolotto, L. M. Veras, R. C. De Paula, J. P. Feitosa, J.R. Leite, C. Eiras, Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. *Mater Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 32 (2012) 1588–1593.
- [7] R.C.M. De Paula, F. Healthy, P. M. Budd, Characterization of *Anacardium occidentale*: Exudate polysaccharide. *Polym. Int.* 45 (1998) 27–35.
- [8] C.G. Mothé, I.A. Souza, G.M.T. Calazans, Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. *Agro Food Ind. Hi Tech.* 19 (2008) 50–52.
- [9] R.C.M. Paula, J.F. Rodrigues, Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydr. Polym.* 26 (1995) 177–181.
- [10] J.F. Rodrigues, R.C.M. Paula, S.M.O. Costa, “Methods of isolation of natural gums: comparison through cashew gum” (*Anacardium occidentale* L.). *Polím. Ciênc. e Tecnol.* 3 (1993) 31–36.
- [11] G.V. Schirato, F.M.F. Monteiro, F.O. Silva, J.L. Lima Filho, A.M.A.C. Leão, A.L.F. Porto, O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciênc. Rural* 36 (2006) 149–154.
- [12] N.S. Carvalho, M.M. Silva, R.O. Silva, L.A. Nicolau, F.B. Sousa, S.R. Damasceno, D.A. Silva, A.L. Barbosa, J.R. Leite, J.V. Medeiros, Gastroprotective properties of cashew gum, a

complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Drug Dev. Res.* 76 (2015) 143–151.

[13] F.T. Yamasaki, R.M. Lenzi, L. H. Campestrini, F. Bovo, M. Seyfried, A. Soldera-Silva, F.R. Stevan-Hancke, S.F. Zawadzki-Baggio, F.A. Pettolino, A. Bacic, J. B. Maurer, Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. *Carbohydr. Polym.* 125 (2015) 241–248.

[14] H. Haririan, O. Andrukhov, K. Bertl, S. Lettner, S. Kierstein, A. Moritz, X. Rausch-Fan, Microbial analysis of subgingival plaque samples compared to that of whole saliva in patients with periodontitis. *J. periodontol* 85 (2014) 819–828.

[15] Z. Armingohar, J.J. Jørgensen, A.K. Kristoffersen, K. Schenck, Z. Dembic, Polymorphisms in the *interleukin-1* gene locus and chronic periodontitis in patients with atherosclerotic and aortic aneurysmal vascular diseases. *Scand. J. Immunol.* 79 (2014) 338–345.

[16] C.S. Martins, R.F. Leitão, D.V. Costa, I.M. Melo, G.S. Santos, V. Lima, V. Baldim, D.V.T. Wong, L.E. Bonfim, C.B. Melo, M.G. Oliveira, G.A.C. Brit, Topical HPMC/S-nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontal disease in rats. *PLoS One* 11 (2016) 1–19.

[17] G.E. Salve, N.P. Lang, Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 32 (2005) 108–29.

[18] S.A. Hienz, S. Paliwal, S. Ivanovski, Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *J. Immunol. Res.* 2015 (2015) 615486–615495.

[19] O. Lapérine, A. Cloitre, J. Caillon, O. Huck, I.M. Bugueno, P. Pilet, S. Sourice, E. Le Tilly, G. Palmer, J.L. Davideau, V. Geoffroy, J. Guicheux, S. Beck-Cormier, P. Lesclous, Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis. *PLoS One* 11 (2016) 1–17.

[20] J.S. Carvalho, A.C.C.G. Vasconcelos, E.H.P. Alves, A.S. Carvalho, F.R.P. Silva, L.F.C. França, A.P.R. Nóbrega Neto, D. Di Lenardo, L.K.M. Souza, A.L.D.R. Barbosa, J.R. Medeiros, J.S. Oliveira, D.F.P. Vasconcelos, Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. *J Periodontal Res.* 52 (2017) 883–892.

[21] P. Campi, B.S. Herrera, F.N. De Jesus, M. Napolitano, S.A. Teixeira, A. Maia-Dantas, L.C. Spolidorio, E.H. Akamine, M.P.A. Mayer, M.H.C. Carvalho, S.K.P. Costa, M.N. Muscara, Endothelial dysfunction in rats with ligature-induced periodontitis: Participation of nitric oxide and cyclooxygenase-2-derived products. *Arch. Oral Biol.* 63 (2016) 66–74.

- [22] T. Nakanishi, F. Kaiho, M. Hayashi. Improvement of drug release rate from carbopol 934P formulation, *Chem. Pharm. Bull.* 46 (1998) 171-173.
- [23] J.R. Mella, E.L. Chiswick, E. King, D.G. Remick, Location, location, location: Cytokine concentrations are dependent on blood sampling site. *Shock* 42 (2014) 337–342.
- [24] M.A. Bermudez, J. Sendon-Lago, S. Seoane, N. Eiro, F. Gonzalez, J. Saa, F. Vizoso, R. Perez-Fernandez, Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp. Eye Res.* 149 (2016) 84–92.
- [25] L.S. Chaves, L.A. Nicolau, R. O. Silva, F.C. Barros, A.L. Freitas, K.S. Aragão, R.A. Ribeiro, M.H. Souza, A.L. Barbosa, J.V. Medeiros, Anti-inflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35 (2013) 93–100.
- [26] D.M. Souza, F.A. Prado, M.A. Prado, R.F. Rocha, Y.R. Carvalho, Evaluation of two morphometric methods of bone loss percentages caused by periodontitis in rats in different locations. *J. Appl. Oral Sci.* 18 (2010) 493–497.
- [27] A. Kuhr, A. Popa-Wagner, H. Schmoll, C. Schwahn, T. Kocher, Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J. Periodontal Res.* 39 (2004) 101–106.
- [28] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [29] Y. Chen, H. Zhang, Y. Wang, S. Nie, C. Li, M. Xie, Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. *Food Chem.* 186 (2015) 231–238.
- [30] L. Ma, H. Chen, W. Zhu, Z. Wang, Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Res. Int.* 50 (2013) 633–640.
- [31] J. Moradi, F. Abbasipour, J. Zaringhalam, B. Maleki, N. Ziaee, A. Khodadoustan, M. Janahmadi, Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in a rat model of LPS-induced periodontitis. *Iran J. Pharm. Res.* 13 (2014) 1319–1325.
- [32] C.A. Trindade-da-Silva, A. Bettaieb, M.H. Napimoga, K.S.S. Lee, B. Inceoglu, C. Ueira-Vieira, D. Bruun, S.K. Goswami, F.G. Haj, B.D. Hammock, Soluble epoxide hydrolase pharmacological inhibition decreases alveolar bone loss by modulating host inflammatory response, RANK-related signaling, ER stress and apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 361 (2017) 408–416.

- [33] R.O. Silva, S.R. Damasceno, T.V. Brito, J.M. Dias, A.M. Fontenele, I.S. Braúna, J.S. Júnior, J.S. Maciel, R.C. De Paula, R.A. Ribeiro, M.H. Souza, A.L. Freitas, J.V. Medeiros, D.C. Silva, A.L. Barbosa, Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 67 (2015) 1017–1027.
- [34] H.T. Dang, H.J. Lee, E.S. Yoo, P.B. Shinde, Y.M. Lee, J. Hong, D.K. Kim, J.H. Jung, Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 232–240.
- [35] J.G. Pereira, J.X. Mesquita, K.S. Aragão, A.X. Franco, M.H. Souza, T.V. Brito, J.M. Dias, R.O. Silva, J.R. Medeiros, J.S. Oliveira, C.M.W.S. Abreu, R.C.M. Paula, A.L.R. Barbosa, A.L.P. Freitas, Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. *Carbohydr. Polym.* 108 (2014) 17–25.
- [36] G. Huynh-Ba, N.P. Lang, M.S. Tonetti, G.E. Salvi, The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: A systematic review. *J. Clin. Periodontol.* 34 (2007) 305–317.
- [37] S.J. Pulikkotil, S. Nath, Effect on interleukin-1 β and interleukin-8 levels following use of fibrin sealant for periodontal surgery. *Aust. Dent. J.* 59 (2014) 156–164.
- [38] J. Sakalauskiene, D. Giedrimiene, D. Gleiznys, A. Gleiznys, R. Gleizniene, A. Vitkauskiene, Peripheral blood leukocytes interleukin-1 beta (IL-1 β) cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis. *Med. Sci. Monit.* 22 (2016) 4323–4329.
- [39] U. Balli, S.B. Dogan, F.O. Dede, E. Sertoglu, G.C. Keles, The levels of visceral adipose tissue-derived serpin, omentin-1 and tumor necrosis factor- α in the gingival crevicular fluid of obese patients following periodontal therapy. *J. Oral. Sci.* 58 (2016) 465–473.
- [40] T.E. Gonçalves, G.S. Zimmermann, L.C. Figueiredo, M.C. Souza, D.F. Da Cruz, M.F. Bastos, H.D.P. Silva, P.M. Duarte, Local and serum levels of adipokines in patients with obesity after periodontal therapy: one-year follow-up. *J. Clin. Periodontol.* 42 (2015) 431–439.
- [41] E.B. Gamel, N.T. Hashim, A. Satti, B.G. Gismalla, Salivary TNF α levels in groups of subjects with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *BMC Res. Notes* 10 (2017) 1–6.
- [42] Z. Cai, W. Li, H. Wang, W. Yan, Y. Zhou, G. Wang, J. Cui, F. Wang, Antitumor effects of a purified polysaccharide from *Rhodiola rosea* and its action mechanism. *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 296–300.
- [43] P.K. Gupta, P. Chakraborty, S. Kumar, P.K. Singh, M.G. Rajan, K.B. Sainis, S. Kulkarni, G1-4A, a polysaccharide from *Tinospora cordifolia* inhibits the survival of *Mycobacterium*

- tuberculosis* by modulating host immune responses in TLR4 dependent manner. PLoS One 11 (2016) 1–22.
- [44] H.R. Park, H.S. Lee, S.Y. Cho, Y.S. Kim, K.S. Shin, Anti-metastatic effect of polysaccharide isolated from *Colocasia esculenta* is exerted through immunostimulation. Int. J. Mol. Med. 31 (2013) 361–368.
- [45] M.S. Vilar, G.L. De Souza, D.A. Vilar, J.A. Leite, F.N. Raffin, J.M. Barbosa-Filho, F.H. Nogueira, S. Rodrigues-Mascarenhas, T.F. Moura, Assessment of phenolic compounds and anti-inflammatory activity of ethyl acetate phase of *Anacardium occidentale* L. Bark. Molecules 21 (2016) 1–17.
- [46] N. Soedarsono, D. Rabello, H. Kamei, D. Fuma, Y. Ishihara, M. Suzuki, T. Noguchi, Y. Sakaki, A. Yamaguchi, T. Kojima, Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. J. Periodontal Res. 41 (2006) 397–404.
- [47] L. Barbato, E. Francioni, M. Bianchi, E. Mascitelli, L.B. Marco, D.P. Tonelli, Periodontitis and bone metabolism. Clin. Cases Miner. Bone Metab. 12 (2015) 174–177.
- [48] A.N. Kiani, P. Aukrust, T. Ueland, I. Hollan, E. Barr, L.S. Magder, M. Petri, Serum osteoprotegerin (OPG) in subclinical atherosclerosis in systemic *Lupus erythematosus*. Lupus 26 (2017) 865–870.
- [49] J. Zupan, R. Komadina, J. Marc, The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. J. Biomed. Sci. 19 (2012) 1–10.
- [50] J. Zupan, M. Jeras, J. Marc, Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. Biochem. Med. 23 (2013) 43–63.
- [51] B. Amulic, C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, A. Zychlinsky, Neutrophil function: From mechanisms to disease. Annu. Rev. Immunol. 30 (2012) 459–489.
- [52] E. Hajishengallis, G. Hajishengallis, Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults. J. Dent. Res. 93 (2014) 231–237.
- [53] M. Dagar, D.K. Deepa, M. Molly, A. Sharma, B.P. Khattak, Effect of nonsurgical periodontal therapy on salivary myeloperoxidase levels: A biochemical study. J. Indian. Soc. Periodontol. 19 (2015) 531–536.
- [54] D.A. Gomes, J.R. Pires, E.P. Zuza, M.N. Muscara, B.S. Herrera, L.C. Spolidorio, B.E.C. Toledo, D.M.P. Spolidorio, Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: Experimental study in rats. Immunol. Invest. 38 (2009) 117–122.

- [55] G.H. Kulkarni, P. Jadhav, K. Kulkarni, S.V. Shinde, Y.B. Patil, M. Kumar, Assessment of myeloperoxidase and nitric levels around dental implants and natural teeth as a marker of inflammation: A comparative study. *J. Contemp. Dent. Pract.* 17 (2016) 934–938.
- [56] L.V. Forbes, T. Sjögren, F. Auchère, D.W. Jenkins, B. Thong, D. Laughton, P. Hemsley, G. Pairaudeau, R. Turner, H. Eriksson, J.F. Unitt, A.J. Kettle, Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 36636–36647.
- [57] S. Singh, A.B. Acharya, S.C.V. Kumar, Myeloperoxidase staining in the diagnosis of aggressive periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* 15 (2011) 152–155.
- [58] L.P., Pereira, M.R., Mota, L.A., Brizeno, F.C., Nogueira, E.G., Ferreira, M.G. Pereira, A.M. Assreuy, Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . *J. Ethnopharmacol.* 187 (2016) 213–223.
- [59] A. Subash, G. Veeraraghavan, V.K. Sali, M. Bhardwaj, H.R. Vasanthi, Attenuation of inflammation by marine algae *Turbinaria ornata* in cotton pellet induced granuloma mediated by fucoidan like sulphated polysaccharide. *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 1261–1268.
- [60] R. Kumar, M.B. Patil, S.R. Patil, M.S. Paschapur, Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac gel. *Int. J. PharmTech Res.* 1 (2009) 695–704.
- [61] E.S.O. Vanderlei, I.W.F. Araújo, A.L.G. Quinderá, B.P. Fontes, Y.R.G. Eloy, J.A.G. Rodrigues, A.A.R. Silva, H.V. Chaves, R.J.B. Jorge, D.B. Menezes, J.S.A.M. Evangelista, M.M. Bezerra, N.M.B. Benevides, The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflamm. Res.* 60 (2011) 1121–1130.
- [62] A.C.M. Leódidio, L.E.C. Costa, T.S.L. Araújo, D.S. Costa, N.A. Sousa, L.K.M. Souza, F.B. Sousa, M.D. Filho, D.F. Vasconcelos, F.R. Silva, K.M. Nogueira, A.R. Araújo, F.C. Barros, A.L. Freitas, J.V. Medeiros, Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 34–45.
- [63] I.A. Ajayi, O.S. Oladeji, V.N. Aghanu, Short-term toxicological evaluation of *Anacardium occidentale* oil in albino rats. *Food Sci. Qual. Manag.* 16 (2013) 8–16.
- [64] T. Tomofuji, T. Sanbe, D. Ekuni, T. Azuma, K. Irie, T. Maruyama, N. Tamaki, T. Yamamoto, Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. *Arch Oral Biol.* 53 (2008) 1113–1118.
- [65] A.H. Biazus, A.S. Da Silva, Bottari, N.B., M.D. Baldissera, G.M. Do Carmo, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, R. Casagrande, N.S. Guarda, R.N. Moresco, L.M. Stefani, G.

- Campigotto, M.M. Boiago, Fowl typhoid in laying hens cause hepatic oxidative stress. *Microb. Pathog.* 103 (2016) 162–166.
- [66] D.F. Vasconcelos, F.R. Pereira da Silva, M.E. Pinto, L.A. Santana, I.G. Souza, L.K. Miranda de Souza, N.C. Oliveira, C.A. Ventura, P.D. Novaes, A.L. Barbosa, J.R. Medeiros, I. Mikolasevic, A. Mani, J. Soares de Oliveira, Decrease of pericytes is associated with liver disease caused by ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 88 (2017) 49–57.
- [67] V.P. Singh, N. Singh, A.S. Jaggi, A review on renal toxicity profile of common abusive drugs. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 17 (2013) 347–357.
- [68] F. Cui, M. Li, Y. Chen, Y. Liu, Y. He, D. Jiang, J. Tong, J. Li, X. Shen, Protective effects of polysaccharides from *Sipunculus nudus* on Beagle dogs exposed to γ -radiation. *PLoS One* 9 (2014) 1–10.
- [69] P.S. Iqbal, S.N. Khan, M. Haris, M. Narayanan, S. Laju, S.S. Kumar, Assessment of systemic inflammatory markers in patients with aggressive periodontitis. *J. Int. Oral Health* 7 (2015) 48–51.
- [70] C. Pink, T. Kocher, P. Meisel, M. Dörr, M.R. Markus, L. Jablonowski, A. Grotevendt, M. Nauck, B. Holtfreter, Longitudinal effects of systemic inflammation markers on periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 42 (2015) 988–997.
- [71] H. Fröhlich, K. Herrmann, J. Franke, A. Karimi, T. Täger, R. Cebola, H.A. Katus, C. Zugck, L. Frankenstein, Periodontitis in chronic heart failure. *Tex. Heart Inst. J.* 43 (2016) 297–304.
- [72] J.I. Suzuki, H. Sato, M. Kaneko, A. Yoshida, N. Aoyama, S. Akimoto, K. Wakayama, H. Kumagai, Y. Ikeda, H. Akazawa, Y. Izumi, M. Isobe, I. Komuro, Periodontitis and myocardial hypertrophy. *Hypertens. Res.* 40 (2017) 324–328.
- [73] J. Hirschfeld, T. Kawai, Oral inflammation and bacteremia: Implications for chronic and acute systemic diseases involving major organs. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 15 (2015) 70–84.
- [74] Y.G. Bachhav, V.B. Patravale, Formulation and evaluation of meloxicam gels. *Acta Pharm.* 60 (2010) 153–163.
- [75] K. Dua, K. Pabreja, M.V. Ramana, Aceclofenac topical dosage forms: In vitro and in vivo characterization. *Acta Pharm.* 60 (2010) 467–478.
- [76] B. Das, A.K. Nayak, U. Nanda, Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 514–517.

- [77] J.A. Karasneh, K. Al-Eryani, G.T. Clark, P.P. Sedghizadeh, Modified protocol including topical minocycline in orabase to manage medication-related osteonecrosis of the jaw cases. *J. Oral Pathol. Med.* 45 (2016) 718–720.
- [78] G.S. Labib, H. Aldawsari, Innovation of natural essential oil-loaded orabase for local treatment of oral candidiasis. *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 3349–3359.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que:

- O processo de purificação da goma do cajueiro obteve alto rendimento e resultou em um polissacarídeo livre de proteínas.
- O método de indução da periodontite por meio de ligadura provocou perda óssea alveolar em todos os animais do experimento.
- A aplicação tópica de P-GC150 inibiu significativamente a perda óssea alveolar.
- A administração do P-GC50 não mostrou efeito protetor no osso alveolar dos animais após a indução da periodontite.
- Os animais tratados com P-GC150 apresentaram redução na expressão relativa de RNAm de *TNF- α* e *IL-1 β* no tecido periodontal.
- Houve diminuição nos níveis de expressão de RNAm de *RANKL* e na expressão de RNAm da proporção *RANKL/OPG* nos animais tratados com P-GC150.
- Ocorreu redução nos níveis de MPO do tecido gengival dos animais tratados com P-GC50 ou P-GC150.
- O estudo da via *RANK/RANKL/OPG* não revelou diferença nos níveis de expressão de RNAm de *RANK* e *OPG*.
- A avaliação dos efeitos do gel com P-GC sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos não apresentou alterações significativas nesses parâmetros entre os grupos.
- Apesar da esteatose hepática microvesicular provocada pela periodontite induzida por ligadura, o tratamento com o P-GC em orabase não foi capaz de agravar essa alteração ou causar danos significativos nesse órgão.
- Após o tratamento, todos os grupos apresentaram níveis séricos de TGO, TGP, creatinina e ureia semelhantes, e em relação aos efeitos da aplicação tópica de P-GC na contagem global de leucócitos, os grupos P-GC50 e P-GC150 obtiveram valores inferiores quando comparados aos demais grupos.
- Após indução da periodontite, os animais tratados com P-GC150 em orabase apresentaram o tecido periodontal dos primeiros molares inferiores em melhores condições clínico-patológicas.

6. REFERÊNCIAS

1. ABBAS, S.; MAHENDRA, J.; ARI, G. Minocycline ointment as a local drug delivery in the treatment of generalized chronic periodontitis - a clinical study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 6, p. 15-19, 2016.
2. ABREU, F.O.M.S. *et al.* Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1277-1282, 2012.
3. AHN, Y.B. *et al.* Periodontitis is associated with the risk of subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease in Korean adults. **Atherosclerosis**, v. 251, p. 311-318, 2016.
4. AIMETTI, M. Nonsurgical periodontal treatment. **International Journal of Esthetic Dentistry**, v. 9, n. 2, p. 251-267, 2014.
5. AKRIVOPOULOU, C. *et al.* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype prevalence and antibiotic resistance in a UK population with periodontitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 54-58, 2017.
6. ALBANDAR, J.M. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n.3, p. 517-532, 2005.
7. ALVARENGA, T.A. *et al.* Schistosomicidal activity of alkyl-phenols from the cashew *Anacardium occidentale* against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 46, p. 8821-8827, 2016.
8. ALVES, C. *et al.* Mecanismos Patogênicos da Doença Periodontal Associada ao Diabetes Melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n.7, p.1050-1057, 2007.
9. ANAND, G. *et al.* *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 69-74, 2015.
10. ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*. **Analytica Chimica Acta**, v. 79, p. 185-197, 1975.
11. ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C.; MILLAR, J.R.A. Composition of gum exudates from *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2189-2193, 1974.
12. ANNAJI, S. *et al.* Efficacy of photodynamic therapy and lasers as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis - A clinical and

- microbiologic short term study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 2, p. 08-12, 2016.
13. ARAGÃO-NETO, A.C. *et al.* Combined therapy using low level laser and chitosan-policaju hydrogel for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 268-272, 2017.
 14. ARAÚJO, A.A. *et al.* Olmesartan decreases IL-1 β and TNF- α levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 386, n. 10, p. 875-884, 2013.
 15. ARAÚJO, I.M.S. *et al.* Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1588-1593, 2012.
 16. ARAÚJO, J. Programa nacional de pesquisa do caju. Fortaleza: Embrapa, **Centro Nacional de Pesquisa do cajueiro – CNPCa**, 1991.
 17. ARAÚJO, T.S. *et al.* Antidiarrheal activity of cashew gum, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299-307, 2015.
 18. ARMINGOHAR, Z. *et al.* Polymorphisms in the *interleukin-1* gene locus and chronic periodontitis in patients with atherosclerotic and aortic aneurysmal vascular diseases. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 79, n. 5, p. 338-345, 2014.
 19. ASANTEWAA, Y. *et al.* Investigation of the emulsifying and suspending potential of cashew tree gum in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 215-219, 2011.
 20. ASOGWA, E.U.; HAMMED, L.A.; NDUBUAKU, T.C.N. Integrated production and protection practices of cashew (*Anacardium occidentale*) in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 25, p. 4868-4873, 2008.
 21. ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): Variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 495-502, 2003.
 22. ATAUGLU, T. *et al.* Interleukin-1 β and tumour necrosis factor alpha levels in periapical exudates. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 181-185, 2002.
 23. AYEPOLA, O.O.; ISHOLA, R.O. Evaluation of antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* (Linn.). **Advances in Medical and Dental Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2009.

24. BALATA, *et al.* Terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico. **Revista Periodontia**, v. 20, n.2, p. 22-32, 2010.
25. BARKHORDAR, R.A.; HUSSAIN, M.Z.; HAYASHI, C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 73, n. 3, p. 334-336, 1992.
26. BARROS, S.B. *et al.* Multilayer films electrodes consisted of cashew gum and polyaniline assembled by the layer-by-layer technique: electrochemical characterization and its use for dopamine determination. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
27. BELSTRØM, D. *et al.* Microbial profile comparisons of saliva, pooled and site-specific subgingival samples in periodontitis patients. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p.1-17, 2017.
28. BERTRAND, K.A. *et al.* Periodontal disease and risk of non-Hodgkin lymphoma in the health professionals follow-up study. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 5, p. 1020-1026, 2017.
29. BEUKERS, N.G. *et al.* Periodontitis is an independent risk indicator for atherosclerotic cardiovascular diseases among 60,174 participants in a large dental school in the Netherlands. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 71, n. 1, p. 37-42, 2017.
30. BHATIA, M. *et al.* Novel therapeutic approach for the treatment of periodontitis by curcumin. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. 65-69, 2014.
31. BOCHNIAK, M.; SADLAK-NOWICKA, J. Periodontitis and cardiovascular diseases- review of publications. **Przegląd Lekarski**, v. 61, n. 5, p. 518-522, 2004.
32. BODET, C.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. **Pathologie Biologie**, v.55, n.3-4, p. 154-162, 2007.
33. BOEH, T.K.; SCANNAPIECO, F.A. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, p. 26-33, 2007.
34. BOKHARI, S.A. *et al.* Association of periodontal and cardiovascular diseases: South-Asian studies 2001-2012. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.19, n. 5, p. 495-500, 2015.
35. BOOTH, V. *et al.* Gram-positive anaerobic bacilli in human periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 4, p. 213-220, 2004.

36. BOSTANCI, V. *et al.* Evaluation of IL-1 β , IL-1ra, and IL-10 levels and outcome of periodontal therapy in chronic periodontitis with familial Mediterranean fever. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 1, p. 469-475, 2017.
37. BOTREL, D.A. *et al.* Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1522-1529, 2017.
38. BURGESS, D. *et al.* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in african americans with localized aggressive periodontitis. **JDR Clinical & Translational Research**, v. 2, n. 3, p. 249-257, 2017.
39. CAI, X. *et al.* Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 1, p. 14-21, 2008.
40. CAMPOS, D.A. *et al.* Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270-274, 2012.
41. CARRANZA, F. A. *Periodontia Clínica de Glickman*. 5.ed. Rio de Janeiro. **Interamericana**, 1983, 968p.
42. CARVALHO, A.L. *et al.* Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.
43. CARVALHO, J.S. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. **Journal of Periodontal Research**, v.52, n. 2, p.883-892, 2017.
44. CARVALHO, N.S. *et al.* Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v. 76, n. 3, p. 143-151, 2015.
45. CHEN, J. *et al.* Effectiveness of alendronate as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontitis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 46, n. 6, p. 382-395, 2016.
46. COBB, C. M. Lasers and the treatment of periodontitis: the essence and the noise. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 205-295, 2017.
47. COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 1569-1576, 2008.
48. COMUNIAN, T.A. *et al.* Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319-329, 2016.

49. CORBET, E.F.; LEUNG, W.K. Epidemiology of periodontitis in the Asia and Oceania regions. **Periodontology** **2000**, v. 56, n. 1, p. 25-64, 2011.
50. CORRÊA, M.G. *et al.* Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 2, p. 201-209, 2017.
51. COSTA, S.; RODRIGUES, J.; PAULA, R. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: goma do cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 6, p. 49-55, 1996.
52. DA SILVA, M.A. *et al.* Evaluation of metronidazole-loaded poly(3-hydroxybutyrate) membranes to potential application in periodontitis treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 1, p. 106-115, 2016.
53. DAS, B. *et al.* Zinc alginate-carboxymethyl cashew gum microbeads for prolonged drug release: Development and optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 506-515, 2014.
54. DAS, B.; NAYAK, A.K.; NANDA, U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 514-517, 2013.
55. DE ARAÚJO JÚNIOR, R.F. *et al.* Carvedilol decrease *IL-1 β* and *TNF- α* , inhibits *MMP-2*, *MMP-9*, *COX-2*, and *RANKL* expression, and up-regulates *OPG* in a rat model of periodontitis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-6, 2013.
56. DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 177-181, 1995.
57. DE PAULA, R.C.M.; HEALTHY, F.; BUDD, P.M. Characterization of *Anacardium occidentale*: Exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, p. 27-35, 1998.
58. DENG, Z.L. *et al.* Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-34, 2017.
59. D'ERCOLE, S. *et al.* Effectiveness of ultrasonic instruments in the therapy of severe periodontitis: a comparative clinical-microbiological assessment with cures. **New Microbiologica**, v.29, n. 2, p. 101-110, 2006.
60. DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25-39, 2003.
61. DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 17, p. 3720-3732, 2011.

62. DUA, K.; PABREJA, K.; RAMANA, M.V. Aceclofenac topical dosage forms: In vitro and in vivo characterization. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 4, p. 467-478, 2010.
63. DUARTE, F.N. *et al.* Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on Lactobacillus species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.1, p. 1-8, 2017.
64. DYE, B.A. Global periodontal disease epidemiology. **Periodontology 2000**, v. 58, n. 1, p. 10-25, 2012.
65. EKE, P.I. *et al.* Risk indicators for periodontitis in US adults: NHANES 2009 to 2012. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 10, p. 1174-1185, 2016.
66. EL-SHARKAWY, H.M.; ANEES, M.M.; VAN DYKE, T.E. Propolis improves periodontal status and glycemic control in patients with Type 2 *Diabetes Mellitus* and chronic periodontitis: a randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 12, p. 1418-1426, 2016.
67. ESCALONA, L.A.; MASTROMATTEO-ALBERGA, P.; CORRENTI, M. Cytokine and metalloproteinases in gingival fluid from patients with chronic periodontitis. **Investigacion Clinica**, v. 57, n. 2, p. 131-142, 2016.
68. FAGBOHUN, T.R.; ODUFUWA, K.T. Hypoglycemic effect of methanolic extract of *Anacardium occidentale* leaves in alloxan-induced diabetic rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 87-90, 2010.
69. FERNANDES, L.; MESQUITA, A. M. *Anacardium occidentale* (cashew) pollen with allergic bronchial asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 95, n. 2, p. 501-504, 1993.
70. FERNANDES, R.V.B. *et al.* Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 133-142, 2016.
71. FIGUEREDO, C.M. *et al.* Activity of inflammatory bowel disease influences the expression of cytokines in gingival tissue. **Cytokine**, v. 8, n. 95, p. 1-6, 2017.
72. FLYNN, M.J.; LI, G.; SLOTS, J. *Mitsuokella dentalis* in human periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 9, n. 4, p. 248-250, 1994.
73. FRANCO, E.J. *et al.* Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.11, n. 1, p. 41-47, 2014.
74. FRÖHLICH, H. *et al.* Periodontitis in chronic heart failure. **Texas Heart Institute Journal**, v. 43, n. 4, p. 297-304, 2016.

75. GARRUTI, D.S. *et al.* Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC-MS and GC-olfactometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 372-377, 2006.
76. GBIF. Global biodiversity information facility. *Anacardium occidentale* L. **Taxonomy**. < <http://www.gbif.org/species/5421368> > (accessed 18.04.17). 2016a.
77. GBIF. Global biodiversity information facility. *Anacardium occidentale* L. **Georeferenced data**. < <http://www.gbif.org/species/5421368> > (accessed 18.04.17). 2016b.
78. GEEVARGHESE, A.; BASKARADOSS, J.K.; SARMA, P.S. Oral health-related quality of life and periodontal status of pregnant women. **Maternal and Child Health Journal**, p. 1-9, 2017.
79. GOES, P. *et al.* Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 1, p. 45-54, 2014.
80. GOLUB, L.M. *et al.* Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. **International Dental Journal**, v. 66, n. 3, p. 127-135, 2016.
81. GOMES-FILHO, I.S. *et al.* Severity of periodontitis and metabolic syndrome: Is there an association? **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 4, p. 357-366, 2016.
82. GONÇALVES, C. *et al.* Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 2, p. 181-185, 2016.
83. GOWTHAMARAJAN, K. *et al.* Development of buccal tablets for curcumin using *Anacardium occidentale* gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1177-1183, 2012.
84. GOWTHAMARAJAN, K. *et al.* Preliminary study of *Anacardium occidentale* gum as binder in formulation of paracetamol tablets. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 506-511, 2011.
85. GRANICA, S.; PIWOWARSKI, J.P.; KISS, A.K. Ellagitannins modulate the inflammatory response of human neutrophils *ex vivo*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 14, p. 1215-1222, 2015.
86. GRAZIANI, F. *et al.* Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 152-188, 2017.

87. GRIMM, S. *et al.* Effect of compressive loading and incubation with clodronate on the RANKL/OPG system of human osteoblasts. **Journal of Orofacial Orthopedics**, v. 76, n. 6, p. 531-542, 2015.
88. GROSSI, S.G. *et al.* Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **Journal of Periodontology**, v. 65, n. 3, p. 260-267, 1994.
89. GUPTA, R. *et al.* Ayurveda in Dentistry: A Review. **Journal of International Oral Health**, v. 7, n. 8, p. 141-143, 2015.
90. GUSTKE, C.J. Irrigation with antimicrobial agents for the treatment of periodontitis- is it effective? **General Dentistry**, v.47, n. 2, p. 164-168, 1999.
91. GYEDU-AKOTO, E. *et al.* Physico-chemical properties of cashew tree gum. **African Journal of Food Science**, v. 2, p. 60-64, 2008.
92. HAAS, A.N. *et al.* Adjunctive azithromycin in the treatment of aggressive periodontitis: microbiological findings of a 12-month randomized clinical trial. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 7, p. 556-563, 2012.
93. HAN, K.; HWANG, E.; PARK, J.B. Excessive consumption of green tea as a risk factor for periodontal disease among Korean adults. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2016.
94. HANI, U.; KRISHNA, G.; SHIVAKUMAR, H.G. Design and optimization of clotrimazole-hydroxypropyl- β -cyclodextrin bioadhesive vaginal tablets using *Anacardium occidentale* gum by 3^2 factorial design. **RSC Advances**, v. 5, p. 35391-35404, 2015.
95. HASHIM, N.T. *et al.* Putative periodontal pathogens in the subgingival plaque of Sudanese subjects with aggressive periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 81, p. 97-102, 2017.
96. HASSEL, T. M. Periodontal tissues structure and function. **Periodontology 2000**. v.3, p.9-38, 1993.
97. HEATON, B. *et al.* A clinical validation of self-reported periodontitis among participants in the black women's health study. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 6, p. 582-592, 2017.
98. HEITZ-MAYFIELD, L.J.; LANG, N.P. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 218-231, 2013.
99. HIENZ, S.A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p.1-10, 2015.
100. HIRANMAYI, K.V. *et al.* Novel pathogens in periodontal microbiology. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 155-163, 2017.

- 101.HOLTFRETER, B. *et al.* Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 42, n. 5, p. 407-412, 2015.
- 102.HOSADURGA, R.R. *et al.* Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis. **Pharmacognosy Research**, v. 6, n. 4, p. 326-333, 2014.
- 103.HOSADURGA, R.R. *et al.* Evaluation of the efficacy of 2% *Ocimum sanctum* gel in the treatment of experimental periodontitis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 5, n. 1, p. 35-42, 2015.
- 104.HUNG, S.H. *et al.* A population-based study on the association between chronic periodontitis and sialolithiasis. **Laryngoscope**, v. 126, n. 4, p. 847-850, 2016a.
- 105.HUNG, S.H. *et al.* Allergic rhinitis is associated with periodontitis: A population-based study. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 7, p. 749-755, 2016b.
- 106.IBEZIM, E.C.; KHANNA, M.; SINGH, S. A study of the suspending properties of *Anacardium occidentale* gum. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 59, p. 1038-1043, 2000.
- 107.INTINI, M. Phytopathological aspects of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Tanzania. **International journal of tropical plant diseases**, v. 5, n. 2, p. 115-119, 1987.
- 108.ISHIKAWA, I. *et al.* Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? **Periodontology 2000**, v. 50, p. 90-126, 2009.
- 109.ISSAC, A.V. *et al.* Management of Chronic Periodontitis Using Subgingival Irrigation of Ozonized Water: A Clinical and Microbiological Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 8, p.1-16, 2015.
- 110.JAKOVLJEVIC, A. *et al.* Epstein-Barr virus infection induces bone resorption in apical periodontitis via increased production of reactive oxygen species. **Medical Hypotheses**, v. 94, p. 40-42, 2016.
- 111.JEPSEN, S. *et al.* Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 85-93, 2017.
- 112.JOHN, P. *et al.* Adjunctive effects of a piscean collagen-based controlled-release chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and

- microbiological study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 5, p. 70-74, 2015.
113. JONG, T.; BAKKER, A. D.; EVERTS, V.; SMIT, T. H. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. **Journal of Periodontal Research**. p. 1-10, 2017.
114. KAMBALYAL, P. *et al.* Comparison of salivary calcium level in smokers and non-smokers with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, and healthy controls. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 5, p. 68-73, 2015.
115. KASSEBAUM, N.J. *et al.* Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and metaregression. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 11, p. 1045-1053, 2014.
116. KAYE, E.K. *et al.* Metabolic syndrome and periodontal disease progression in men. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 7, p. 822-828, 2016.
117. KESKINER, I. *et al.* Dietary supplementation with low-dose omega-3 fatty acids reduces salivary tumor necrosis factor- α levels in patients with chronic periodontitis: a randomized controlled clinical study. **Journal of Periodontal Research**, p. 1-9, 2017.
118. KHAN, I.N. *et al.* Thrombolytic potential of *Ocimum sanctum* L., *Curcuma longa* L., *Azadirachta indica* L. and *Anacardium occidentale* L. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 125-127, 2011.
119. KHORSHIDI, H. *et al.* The prevalence of pathologic tooth migration with respect to the severity of periodontitis. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 6, p. 122-125, 2016.
120. KNUDSEN, L.F.; CURTISS, J.M. The use of the angular formulation in biological assays. **Journal of the American Statistical Society**, v. 42, n. 238, p. 282-296, 1947.
121. KOBAYASHI, T. *et al.* Increased expression of *interleukin-6 (IL-6)* gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 69, p. 89-94, 2016.
122. KONGSTAD, J. *et al.* Impact of periodontitis case criteria: A cross-sectional study of lifestyle. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 6, p. 602-609, 2017.
123. KÖNÖNEN, E.; MÜLLER, H. P. Microbiology of aggressive periodontitis. **Periodontol** **2000**, v.65, n.1, p.46-78, 2014.

- 124.KOPYTYNSKA-KASPERCZYK, A. *et al.* Local delivery system of doxycycline hyclate based on ϵ -caprolactone copolymers for periodontitis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1, p. 335-344, 2015.
- 125.KORNMAN, K.S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: A new look. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 1560-1568, 2008.
- 126.KOSTENUIK, P.J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 618-625, 2005.
- 127.KOSTIĆ, M. *et al.* Anti-inflammatory effect of the *Salvia sclarea* L. ethanolic extract on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 52-59, 2017.
- 128.KOWALSKI, J. *et al.* Clinical state of the patients with periodontitis, IL-1 polymorphism and pathogens in periodontal pocket - is there a link? **Advances in Medical Sciences**, v. 51, p. 9-12, 2006.
- 129.KUMAR, A.J.; RAMESH REDDY, B.V.; CHAVA, V.K. Effect of chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 268-272, 2014.
- 130.KUMAR, G. *et al.* Emerging trends of herbal care in dentistry. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 8, p.1827-1829, 2013.
- 131.KUMAR, R. *et al.* Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac gel. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 695-704, 2009.
- 132.KUMARI, M.; MARTANDE, S.S.; PRADEEP, A.R. Subgingivally delivered 1.2% atorvastatin in the treatment of chronic periodontitis among smokers: A randomized, controlled clinical trial. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v.8, n.2, p.1-8, 2017.
- 133.KWAMIN, F. *et al.* Interactions of extracts from selected chewing stick sources with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 203, p. 1-9, 2012.
- 134.LAKHDAR, L. *et al.* Antibacterial activity of essential oils against periodontal pathogens: A qualitative systematic review. **Odontostomatol Trop Journal**, v. 35, n. 140, p. 38-46, 2012.
- 135.LAPÉRINE, O. *et al.* Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. 1-17, 2016.

- 136.LAVU, V. *et al.* Clinical relevance of cytokines gene polymorphisms and protein levels in gingival cervical fluid from chronic periodontitis patients. **Iranian Journal of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 51-58, 2017.
- 137.LECIC, J. *et al.* Different methods for subgingival application of chlorhexidine in the treatment of patients with chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.74, n. 6, p. 502-507, 2016.
- 138.LIEBERMAN, M.B. A life-threatening, spontaneous, periodontitis-induced infective endocarditis. **Journal of the California Dental Association**, v. 20, n. 9, p. 37-39, 1992.
- 139.LIMA, A.C. *et al.* *In vitro* bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 161, p. 142-147, 2014.
- 140.LIMA, R.S.N. *et al.* Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 45-53, 2002.
- 141.LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5.ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2010, 1304p.
- 142.LISTYARIFAH, D. *et al.* Infection and apoptosis associated with inflammation in periodontitis: An immunohistologic study. **Oral Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1144-1154, 2017.
- 143.LOGRADO, L.P. *et al.* Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3480-3489, 2010.
- 144.LÖHR, G. *et al.* Polyphenols from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. inhibit *in vitro* adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and exert anti-inflammatory cytoprotective effects in KB cells. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 5, p. 457-469, 2011.
- 145.LÓPEZ, R. *et al.* Ageing, dental caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 145-152, 2017.
- 146.LU, B. *et al.* Expression of *interleukin-1 β* and *matrix metalloproteinase-8* in cytolytic and noncytolytic *Enterococcus faecalis*-induced persistent apical periodontitis: A comparative study in the rat. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1288-1293, 2015.
- 147.LUGONJA, B. *et al.* Periodontitis prevalence and serum antibody reactivity to periodontal bacteria in primary Sjögren's syndrome: A pilot study. **Journal of Clinical Periodontology**, v.43, n. 1, p.26-33, 2016.

- 148.MABBERLEY, D.J. The plant book: A portable dictionary of the vascular plants. **Cambridge University Press**, 858p. 1997.
- 149.MACIEL, J.S. *et al.* Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 522-529, 2007.
- 150.MADHUMATHI, K.; KUMAR, T.S.S. Regenerative potential and anti-bacterial activity of tetracycline loaded apatitic nanocarriers for the treatment of periodontitis. **Biomedical Materials**, v. 9, n. 3, p.1-10, 2014.
- 151.MADUREIRA, A.M. *et al.* Antibacterial activity of some African medicinal plants used traditionally against infectious diseases. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 4, p. 481-489, 2012.
- 152.MAHATA, D. *et al.* Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 5-11, 2014.
- 153.MAHENDRA, J. *et al.* Clinical and microbiological efficacy of 4% *Garcinia mangostana* L. pericarp gel as local drug delivery in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, p.1-9, 2017.
- 154.MAHENDRA, J. *et al.* Prevalence of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm and atherosclerotic plaques of patients undergoing coronary revascularization surgery. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.17, n. 6, p. 719-724, 2013.
- 155.MALCOLM, J. *et al.* IL-33 exacerbates periodontal disease through induction of RANKL. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 7, p. 968-975, 2015.
- 156.MALLIKARJUN, S. *et al.* Neutrophil elastase levels in the gingival crevicular fluid following hyaluronan gel application in the treatment of chronic periodontitis: A randomized split-mouth study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 27, n. 4, p. 397-404, 2016.
- 157.MANGAIYARKARASI, S.P. *et al.* Benefits of *Aloe vera* in dentistry. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 7, p. 255-259, 2015.
- 158.MARTINS, C.S. *et al.* Topical HPMC/S-nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontal disease in rats. **PLoS One**, v. 11, n.4, p.1-19, 2016.

- 159.MARTINS, S.H.L. *et al.* Effect of surgical periodontal treatment associated to antimicrobial photodynamic therapy on chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 7, p. 717-728, 2017.
- 160.MATSUDA, Y. *et al.* Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 5, p. 639-646, 2016.
- 161.MAVROMMATIS, K. *et al.* Complete genome sequence of *Cryptobacterium curtum* type strain (12-3). **Standards in Genomic Sciences**, v. 1, n. 2, p. 93-100, 2009.
- 162.MAZZETTO, S.E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.
- 163.McKAIG, R.G. *et al.* Factors associated with periodontitis in an HIV infected southeast USA study. **Oral Diseases**, v. 6, n. 3, p. 158-165, 2000.
- 164.MEDAIAH, S. *et al.* Chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis - a clinical study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 6, p. 22-25, 2014.
- 165.MELO-CAVALCANTE, A.A. *et al.* *In vivo* antigenotoxic and anticlastogenic effects of fresh and processed cashew (*Anacardium occidentale*) apple juices. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7, p. 792-798, 2011.
- 166.MENESTRINA, J.M. *et al.* Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 715-721, 1998.
- 167.MENEZES, R. *et al.* Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: Possible association with progressive or stable nature of the lesions. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 932-938, 2008.
- 168.MIRANDA, T.S. *et al.* Influence of glycemic control on the levels of subgingival periodontal pathogens in patients with generalized chronic periodontitis and type 2 diabetes. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 1, p. 82-89, 2017.
- 169.MONTEIRO, F.M.F. *et al.* Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 884-888, 2007.

- 170.MOO-HUCHIN, V.M. *et al.* Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 166, p. 17-22, 2015.
- 171.MORAIS, S.M. *et al.* Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.
- 172.MORANDINI, A.C. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* fimbriae dampen P2X7-dependent interleukin-1 β secretion. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n.6, p. 831-845, 2014.
- 173.MOTER, A. *et al.* Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3078-3085, 2006.
- 174.MOTHÉ, C.G.; RAO, M.A. Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 501-506, 1999.
- 175.MOTHÉ, C.G.; RAO, M.A. Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. **Thermochimica Acta**, v. 357-358, p. 9-13, 2000.
- 176.MOTHÉ, C.G.; SOUZA, I.A.; CALAZANS, G.M.T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. **Agro Food Industry Hi-Tech Journal**, v. 19, n. 6, p. 50-52, 2008.
- 177.MUÑOZ, J. *et al.* Rheological properties and surface tension of *Acacia tortuosa* gum exudate aqueous dispersions. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 2, p. 198-205, 2007.
- 178.MURAINA, I.A. *et al.* Antimycoplasmal activity of some plant species from northern Nigeria compared to the currently used therapeutic agent. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 10, p. 1103-1107, 2010.
- 179.MURATA, W. *et al.* Protective effects of α -tocopherol and ascorbic acid against cardol-induced cell death and reactive oxygen species generation in *Staphylococcus aureus*. **Planta Medica**, v. 79, n. 9, p. 768-774, 2013.
- 180.NAGARAKANTI, S. *et al.* Effectiveness of subgingival irrigation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A systematic review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 7, p. 1-14, 2015.
- 181.NAGPAL, D. *et al.* Detection and comparison of *Selenomonas sputigena* in subgingival biofilms in chronic and aggressive periodontitis patients. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 20, n. 3, p. 286-291, 2016.

- 182.NASRA, M.M. *et al.* Formulation, in-vitro characterization and clinical evaluation of curcumin *in-situ* gel for treatment of periodontitis. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 133-142, 2017.
- 183.NG, S.K.; KEUNG LEUNG, W. A community study on the relationship between stress, coping, affective dispositions and periodontal attachment loss. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 34, n. 4, p. 252-266, 2006.
- 184.NIELSEN, S.J. *et al.* Dietary fiber intake is inversely associated with periodontal disease among US adults. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 12, p. 2530-2536, 2016.
- 185.OFORI-KWAKYE, K. *et al.* Mechanical and tablet coating properties of cashew tree (*Anacardium occidentale* L) gum-based films. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 62-68, 2012.
- 186.OFORI-KWAKYE, K.; ASANTEWAA, Y.; KIPO, S.L. Physicochemical and binding properties of cashew tree gum in metronidazole tablet formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 105-109, 2010.
- 187.OH, J.H. *et al.* Antimicrobial activities against periodontopathic bacteria of *Pittosporum tobira* and its active compound. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3607-3616, 2014.
- 188.OKPASHI, V.E.; BAYIM, B.P.; OBI-ABANG, M. Comparative effects of some medicinal plants: *Anacardium occidentale*, *Eucalyptus globulus*, *Psidium guajava*, and *Xylopiya aethiopica* extracts in alloxan-induced diabetic male Wistar albino rats. **Biochemistry Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- 189.OLAJIDE, O.A. *et al.* Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2, p. 139-142, 2004.
- 190.OLAJIDE, O.A.; ADEROGBA, M.A.; FIEBICH, B.L. Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: inhibition of NF- κ B and MAPK signalling in the microglia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 42-49, 2013.
- 191.OLIVEIRA, E.F.; PAULA, H.C.B.; PAULA, R.C.M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146-151, 2014.
- 192.OLORUNSOLA, E.O. *et al.* Thermochemical properties of hydrophilic polymers from cashew and khaya exudates and their implications on drug delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2016, p. 1-7, 2016.
- 193.OWUMI, S.E. *et al.* Clastogenic and toxicological assessment of cashew (*Anacardium occidentale*) nut bark extracts in Wistar rats. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 563-567, 2015.

- 194.OZGÖREN, O. *et al.* The adjunctive effect of tenoxicam during non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and gingival crevicular fluid levels of MMP-8 and TNF- α in patients with chronic periodontitis - randomized, double-blind clinical trial. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 4, p. 559-565, 2014.
- 195.PAGE, R.C. *et al.* Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, v. 14, p. 216-248, 1997.
- 196.PARK, H.R. *et al.* Anti-metastatic effect of polysaccharide isolated from *Colocasia esculenta* is exerted through immunostimulation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 2, p. 361-368, 2013.
- 197.PATERNITI, I. *et al.* Effects of *Hypericum perforatum*, in a rodent model of periodontitis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 73, p. 1-10, 2010.
- 198.PAUL, T.P. *et al.* Comparative evaluation of sustained release collagen device containing 5% metronidazole (Metrogene) along with and without scaling and root planing at regular intervals with treatment of chronic periodontitis: A case control study. **Journal of International Oral Health**, v. 7, n. 6, p. 18-22, 2015.
- 199.PAULA-SILVA, F.W. *et al.* Dual role of 5-Lipoxygenase in osteoclastogenesis in bacterial-induced apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 3, p. 447-454, 2016.
- 200.PAWAR, S.P. *et al.* Anti-Inflammatory and analgesic activity of *Anacardium occidentale* leaf extracts. **Ancient Science of Life**, v. 19, n. 3, p. 169-173, 2000.
- 201.PERAYIL. J. *et al.* Comparison of the efficacy of subgingival irrigation with 2% povidone-iodine and tetracycline HCl in subjects with chronic moderate periodontitis: A clinico microbiological study. **Dental Research Journal**, v. 13, n. 2, p. 98-109, 2016.
- 202.PEREIRA-NETTO, A.B. *et al.* Cashew-nut tree exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 173, p. 468-477, 2007.
- 203.PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology 2000**, v. 60, n. 1, p. 15-39, 2012.
- 204.PHOGAT, M. *et al.* Comparative evaluation of subgingivally delivered xanthan-based chlorhexidine gel and herbal extract gel in the treatment of chronic periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 2, p. 172-177, 2014.

- 205.PINTO, G.L. *et al.* Comparison of three anacardiaceae gum exudates. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, p. 151-156, 1995.
- 206.POLEPALLE, T. *et al.* Local delivery of hyaluronan 0.8% as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 19, n. 1, p. 37-42, 2015.
- 207.PORTO, B.C.; CRISTIANINI, M. Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying Properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, p. 1325-1331, 2014.
- 208.PRADEEP, A.R. *et al.* 1.2% Rosuvastatin versus 1.2% atorvastatin gel local drug delivery and redelivery in treatment of intrabony defects in chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 7, p. 756-762, 2016a.
- 209.PRADEEP, A.R. *et al.* Comparative evaluation of subgingivally delivered 1% alendronate versus 1.2% atorvastatin gel in treatment of chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, p. 1-7, 2016b.
- 210.PRADEEP, A.R. *et al.* Efficacy of locally delivered 1.2% rosuvastatin gel to non-surgical treatment of patients with chronic periodontitis: A randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 6, p. 738-745, 2015.
- 211.PRADEEP, A.R. *et al.* Efficacy of locally-delivered 1% metformin gel in the treatment of intrabony defects in patients with chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 7, n. 3, p. 239-245, 2016c.
- 212.PRAVEEN, N.C. *et al.* *In vitro* evaluation of antibacterial efficacy of pineapple extract (Bromelain) on periodontal pathogens. **Journal of International Oral Health**, v. 6, n. 5, p. 96-98, 2014.
- 213.PRIYANKA, N. *et al.* Clinical and microbiological efficacy of 3% satranidazole gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 6, n. 3, p. 364-370, 2015.
- 214.PRIYANKA, N. *et al.* Clinical efficacy of subgingivally delivered 1.2 mg simvastatin in the treatment of patients with aggressive periodontitis: A randomized controlled clinical trial. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 37, n. 2, p. 135-141, 2017.

215. PUERTAS, A. *et al.* Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: A comprehensive review. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, p.1-6, 2017.
216. QUELEMES, P.V. *et al.* Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4969-4981, 2013.
217. RAMOS, G.Q.; COTTA, E.A.; DA FONSECA FILHO, H.D. Studies on the ultrastructure in *Anacardium occidentale* L. leaves from Amazon in northern Brazil by scanning microscopy. **Scanning**, v. 38, n. 4, p. 329-335, 2016.
218. REN, H.; DU, M. Role of maternal periodontitis in preterm birth. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 139, p. 1-10, 2017.
219. RENATUS, A. *et al.* Clinical efficacy of azithromycin as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.10, n. 7, p. 1-7, 2016.
220. REPEKE, C.E. *et al.* Non-inflammatory destructive periodontal disease: A clinical, microbiological, immunological and genetic investigation. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 1, p. 113-121, 2012.
221. RIBEIRO, A.J. *et al.* Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188-200, 2016.
222. RIBEIRO, F.V. *et al.* A preliminary study on the FAM5C expression in generalized chronic periodontitis. **Oral Diseases**, v. 18, n. 2, p. 147-152, 2012.
223. RICO, R.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 329-338, 2015.
224. ROCHA, E.M.F.F. *et al.* Obtenção de suco de caju atomizado através do controle das condições de secagem. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v.18, n.6, p.646-651, 2014.
225. RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M.; COSTA, S.M.O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 31-36, 1993.
226. ROMANDINI, M. *et al.* The association between periodontitis and sleep duration. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 5, p. 490-501, 2017.
227. ROSSOMANDO, E.F.; WHITE, L. A novel method for the detection of TNF- α in gingival crevicular fluid. **Journal of Periodontology**, v. 64, p. 445-449, 1993.

- 228.SAĞLAM, M. *et al.* Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 1, p. 33-41, 2015.
- 229.SANDERS, A.E. *et al.* Chronic periodontitis genome-wide association study in the hispanic community health study/study of latinos. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 1, p. 64-72, 2017.
- 230.SANGHANI, N.N.; SHIVAPRASAD, B.M.; SAVITA, S. Health from the hive: Propolis as an adjuvant in the treatment of chronic periodontitis - a clinicomicrobiologic study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 9, p. 41-44, 2014.
- 231.SANTOS, E. *et al.* Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 299-302, 2010.
- 232.SANTOS, F.O. Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn). **Dissertação de mestrado**, 57p. 2011.
- 233.SANTOSH, A.B.R. *et al.* Epidemiology of oral and maxillofacial infections. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 217-233, 2017.
- 234.SANZ, M. *et al.* Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the joint EFP(ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 5-11, 2017.
- 235.SATO, M. *et al.* Association between periodontitis and medical expenditure in older adults: A 33-month follow-up study. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 16, n. 7, p. 856-864, 2016.
- 236.SCAPOLI, L. *et al.* Quantitative analysis of periodontal pathogens in periodontitis and gingivitis. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 29, n. 3, p. 101-110, 2015.
- 237.SETE, M.R. *et al.* Periodontitis and systemic lupus erythematosus. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 165-170, 2016.
- 238.SEYMOUR, G.J. *et al.* Relationship between periodontal infections and systemic disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p. 3-10, 2007.
- 239.SHAHZAD, M. *et al.* Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. **Food & Function**, v. 6, n. 3, p. 719-729, 2015.

240. SHILPA, P.; KAVERI, K.; SALIMATH, B.P. Anti-metastatic action of anacardic acid targets VEGF-induced signalling pathways in epithelial to mesenchymal transition. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 53-65, 2015.
241. SILVA, I.; BRANCO, J.C. RANK/RANKL/OPG: Literature review. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v. 36, n. 3, p. 209-218, 2011.
242. SILVA, R.A. Ação antimicrobiana de *Anacardium occidentale* L.: Potencial biotecnológico na geração de produtos anticárie. **Tese de doutorado**, 153p. 2012.
243. SILVA, R.A. *et al.* Evaluation of antioxidant and mutagenic activities of honey-sweetened cashew apple nectar. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 61-67, 2013.
244. SINGH, P. *et al.* Salivary TNF- α : A potential marker of periodontal destruction. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 3, p. 306-310, 2014.
245. SINHA, S. *et al.* Effect of tetracycline HCl in the treatment of chronic periodontitis - a clinical study. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 149-153, 2014.
246. SOBOKU, K. *et al.* Altered gene expression in gingival tissues and enhanced bone loss in rats with diabetes with experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p. 455-464, 2014.
247. SÖDER, B.; MEURMAN, J.H.; SÖDER, P.Ö. Dental calculus links statistically to *Angina Pectoris*: 26-year observational study. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. 1-8, 2016.
248. SRIVASTAVA, M. *et al.* Nanoemulgel (NEG) of ketoprofen with eugenol as oil phase for the treatment of ligature-induced experimental periodontitis in Wistar rats. **Drug Delivery**, v. 23, n. 7, p. 2228-2234, 2016a.
249. SRIVASTAVA, M.; KOHLI, K.; ALI, M. Formulation development of novel *in situ* nanoemulgel (NEG) of ketoprofen for the treatment of periodontitis. **Drug Delivery**, v. 23, n. 1, p. 154-166, 2016b.
250. STASIUK, M.; JANISZEWSKA, A.; KOZUBEK, A. Phenolic lipids affect the activity and conformation of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Electric eel). **Nutrients**, v. 6, n. 5, p. 1823-1831, 2014.
251. SUSIN, C.; HAAS, A.N.; ALBANDAR, J.M. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 65, n. 1, p. 27-45, 2014.
252. SUTTON, J.D.; SALAS MARTINEZ, M.L.; GERKOVICH, M.M. Environmental tobacco smoke and periodontitis in US non-smokers, 2009 to 2012. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 6, p. 565-574, 2017.

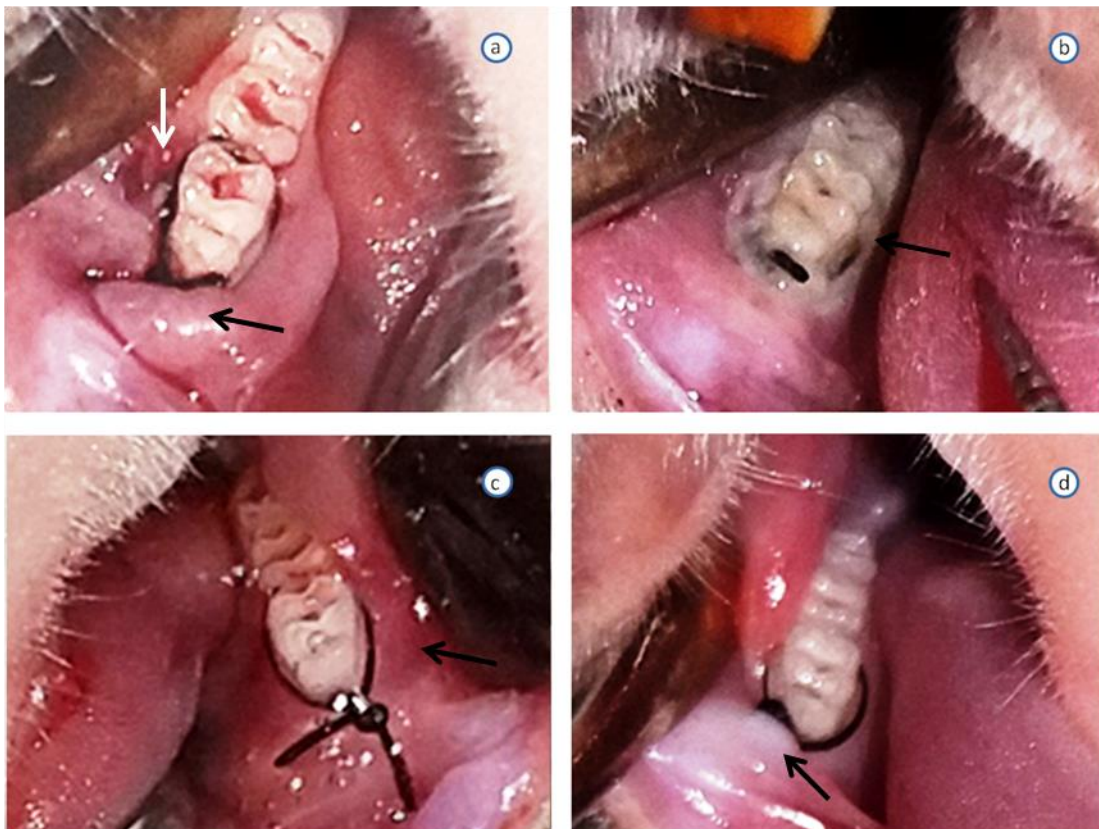
- 253.SZAFRAŃSKI, S.P. *et al.* Functional biomarkers for chronic periodontitis and insights into the roles of *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*; a metatranscriptome analysis. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 1, p.1-38, 2015.
- 254.TAIWO, B.J. *et al.* Identification of compounds with cytotoxic activity from the leaf of the Nigerian medicinal plant, *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 2327-2335, 2017.
- 255.TCHIKAYA, F.O. *et al.* *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae) stem bark extract induces hypotensive and cardio-inhibitory effects in experimental animal models. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 8, n. 4, p. 452-461, 2011.
- 256.TEEUW, W.J. *et al.* Periodontitis as a possible early sign of *diabetes mellitus*. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2017.
- 257.TELES, R.P. *et al.* Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: A cross-sectional study. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 3, p. 411-417, 2009.
- 258.TIAN, Y.; SHEN, Y.; JV M. Synthesis, characterization and evaluation of tinidazole-loaded mPEG-PDLLA (10/90) *in situ* gel forming system for periodontitis treatment. **Drug Delivery**, v. 23, n. 8, p. 2726-2735, 2016.
- 259.TOMOFUJI, T. *et al.* Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p.1113-1118, (2008) 1113–1118.
- 260.TORQUATO, D.S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505-507, 2004.
- 261.TORRES, R.C.; GARBO, A.G.; WALDE, R.Z. Characterization and bioassay for larvicidal activity of *Anacardium occidentale* (cashew) shell waste fractions against dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3699-3702, 2015.
- 262.TRINDADE DA SILVA, C.A. *et al.* Soluble epoxide hydrolase pharmacological inhibition decreases alveolar bone loss by modulating host inflammatory response, RANK-related signaling, endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 361, n. 3, p. 408-416, 2017.
- 263.TRIPATHY, A. *et al.* The mosquitocidal activity of methanolic extracts of *Lantana camara* root and *Anacardium occidentale* leaf: Role of glutathione S-transferase in insecticide resistance. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 291-295, 2011.

264. TUNKEL, J.; HEINECKE, A.; FLEMMIG, T.F. A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 72-81, 2002.
265. VAN DYKE, T.E.; SHEILESH, D. Risk factors for periodontitis. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 7, n. 1, p. 3-7, 2005.
266. VASCONCELOS, M.S. *et al.* Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 240, n. 12, p. 1648-1655, 2015.
267. VIEIRA, D.R. *et al.* Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1441-1449, 2014.
268. VILAR, M.S. *et al.* Assessment of phenolic compounds and anti-inflammatory activity of ethyl acetate phase of *Anacardium occidentale* L. bark. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1-17, 2016.
269. WANG, G.F. *et al.* Influence of baicalin on the expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in cultured human periodontal ligament cells. **Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 71-77, 2006.
270. WANG, H.F. *et al.* Association between the interleukin-1 β C-511T polymorphism and periodontitis: A meta-analysis in the Chinese population. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2017.
271. WANG, J. *et al.* Alcohol consumption and risk of periodontitis: A meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 7, p. 572-583, 2016.
272. WARAD, S.B. *et al.* Lemongrass essential oil gel as a local drug delivery agent for the treatment of periodontitis. **Ancient Science of Life**, v. 32, n. 4, p. 205-211, 2013.
273. WEI, X.M. *et al.* Tumor necrosis factor- α G-308A (rs1800629) polymorphism and aggressive periodontitis susceptibility: A meta-analysis of 16 case-control studies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-8, 2016.
274. WHO. **Oral health: Fact sheet N 318. 2012.**
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>) (Accessed 21.09.17). 2016.
275. WOLF, H.F.; EDITH, M.; RATEITSCHAK, K.H. Periodoncia: Atlas en color de odontología. 3.ed. **Masson**, 2015, 532p.
276. WONG, B.K. *et al.* Association of clinical parameters with periodontal bacterial haemolytic activity. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 6, p. 503-511, 2016.

277. YAMASSAKI, F.T. *et al.* Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241-248, 2015.
278. YAO, W. *et al.* Local delivery of minocycline-loaded PEG-PLA nanoparticles for the enhanced treatment of periodontitis in dogs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3963-3970, 2014.
279. YAO, W. *et al.* RGD functionalized polymeric nanoparticles targeting periodontitis epithelial cells for the enhanced treatment of periodontitis in dogs. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 458, p. 14-21, 2015.
280. YUSOF, Z.A. Prevention of bacterial endocarditis in localised juvenile periodontitis and Papillon-Lefevre syndrome patients. **Dental Journal of Malaysia**, v. 10, n. 2, p. 31-35, 1988.
281. ZAKARIA, M.B.; RAHMAN, Z.A. Rheological properties of cashew gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 25-27, 1996.
282. ZAKARIA, M.B.; RAHMAN, Z.A.; MAHMOOD, N.N.A.N. Solution properties of polysaccharides from *Anacardium occidentale*. **Pertanika Journal of Science & Technology**, v. 5, n. 1, p. 69-76, 1997.
283. ZDARILOVÁ, A. *et al.* Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 3, p. 386-392, 2009.
284. ZENG, J. *et al.* Reexamining the association between smoking and periodontitis in the dunedin study with an enhanced analytical approach. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 10, p. 1390-1397, 2014.
285. ZHANG, Y. *et al.* Population-genomic insights into variation in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates and its association with periodontal disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p.1-35, 2017.
286. ZHUANG, J.X. *et al.* Irreversible competitive inhibitory kinetics of cardol triene on mushroom tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12993-12998, 2010.
287. ZUCCARELLO, D. *et al.* Role of familiarity *versus* interleukin-1 genes cluster polymorphisms in chronic periodontitis. **Gene**, v. 535, n. 2, p. 286-289, 2014.
288. ZUK, A. *et al.* The association between undiagnosed glycaemic abnormalities and cardiometabolic risk factors with periodontitis: results from 2007-2009 Canadian Health Measures Survey. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n.2, p. 132-141, 2017.

APÊNDICE A

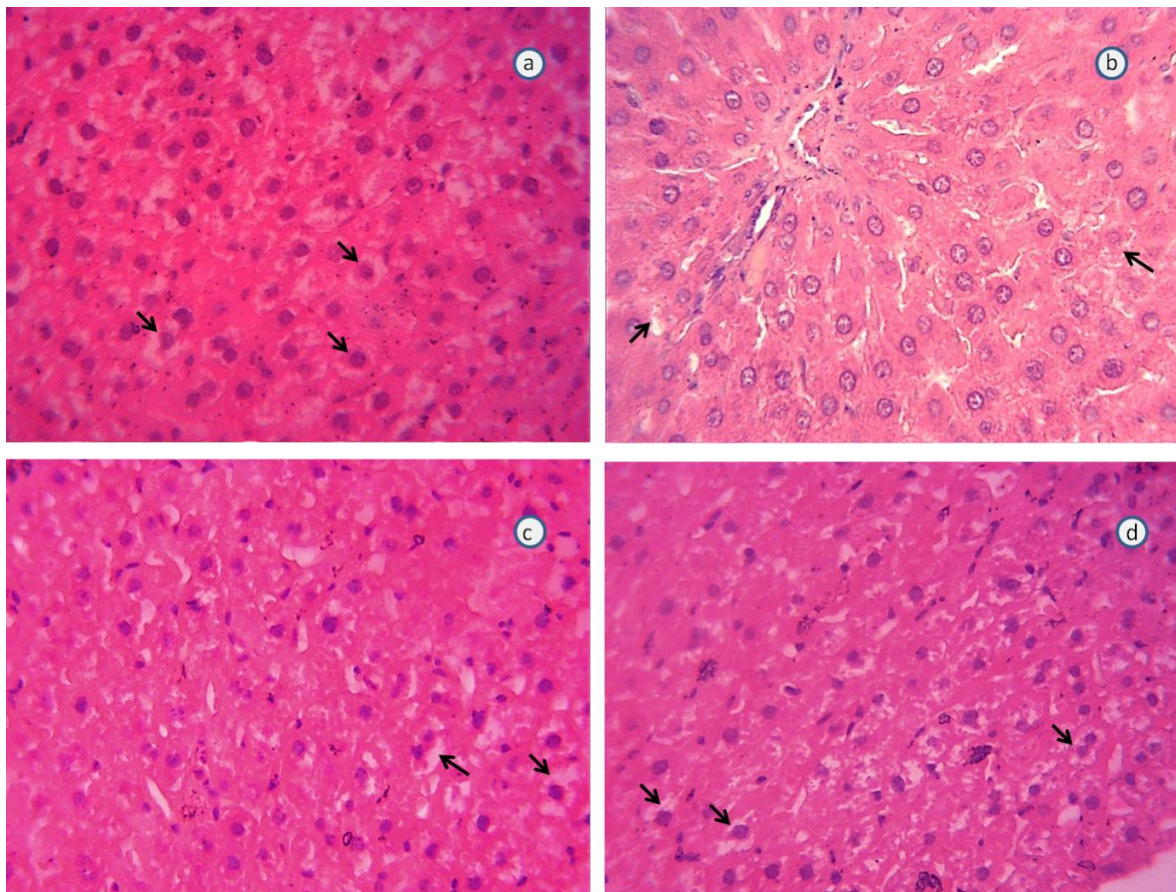
Aspecto clínico dos 1º molares inferiores ao final do tratamento com P-GC em orabase.



(a) Grupo Sal: Extenso edema gengival na região lingual (seta preta) e erosão tecidual no periodonto vestibular (seta branca); (b) Grupo Gel: Formação de placa bacteriana ao longo da ligadura (seta); (c) Grupo P-GC50: Leve inflamação periodontal (seta) e (d) Grupo P-GC150: Leve edema periodontal (seta). Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite.

APÊNDICE B

Secções histológicas do fígado dos animais após o tratamento com P-GC em orabase.

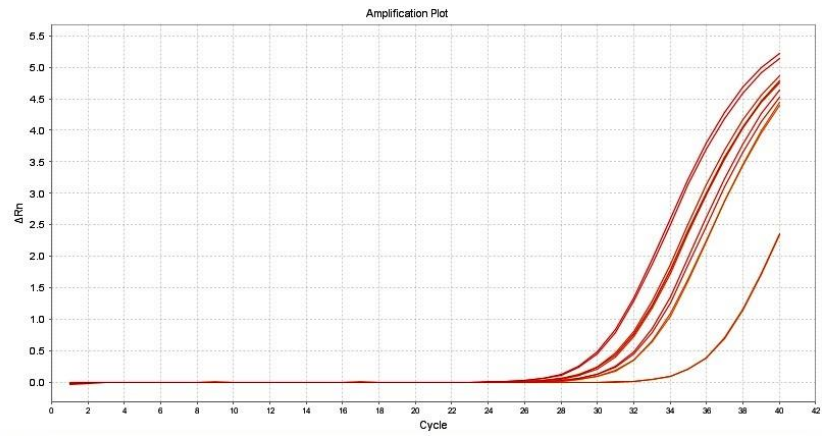


(a) Grupo Sal; (b) Grupo Gel; (c) Grupo P-GC50 e (d) Grupo P-GC150. As setas indicam hepatócitos com esteatose microvesicular. Todos os animais foram submetidos à indução da periodontite. Aumento 400x.

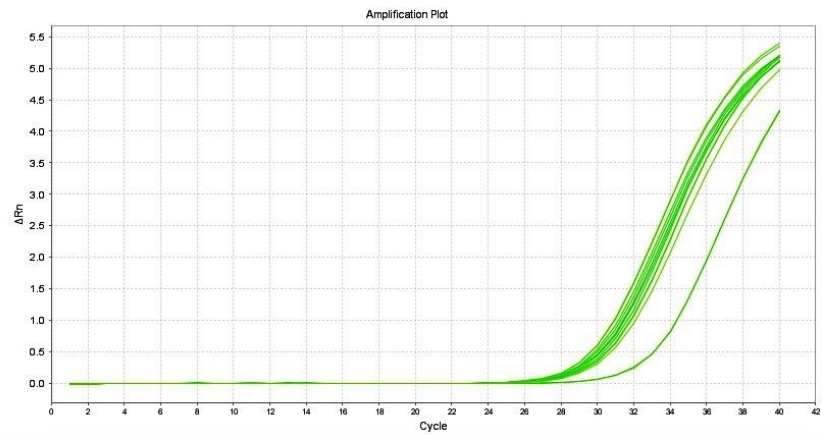
APÊNDICE C

Real time PCR amplification plot da expressão de RNAm do gene TNF- α

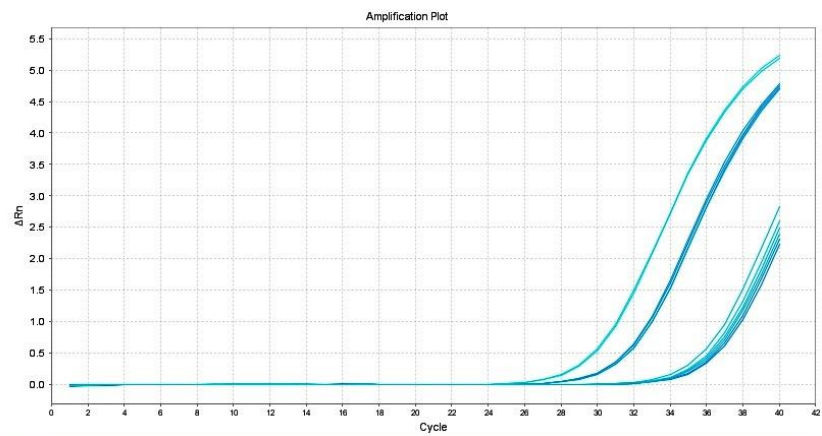
Grupo Sal



Grupo Gel

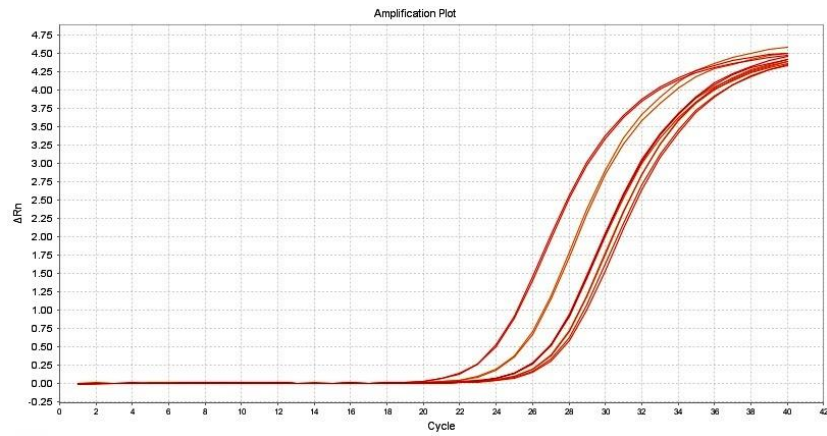
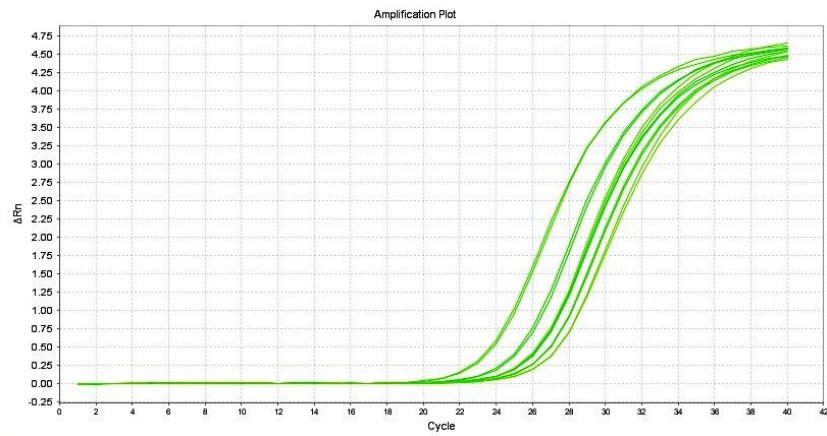
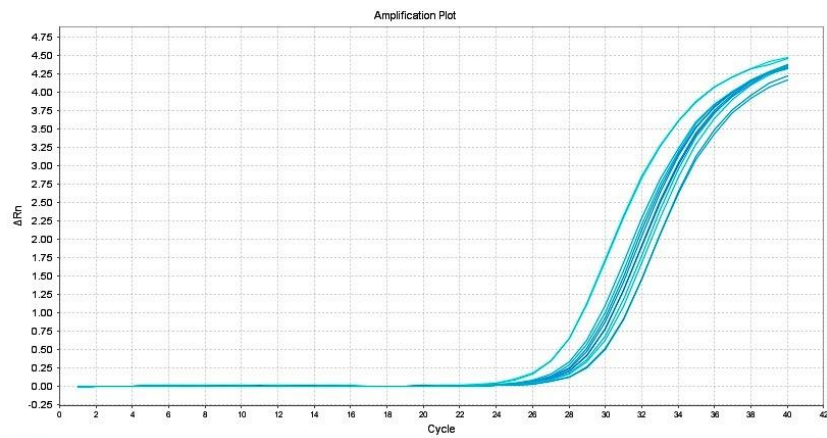


Grupo P-GC150



APÊNDICE D

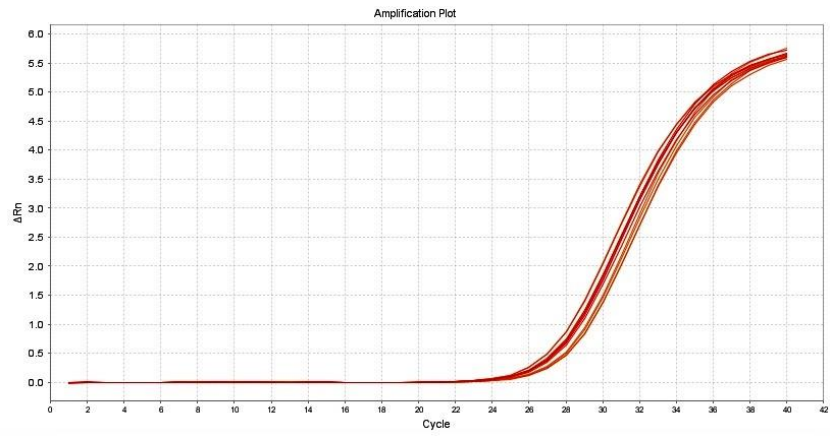
Real time PCR amplification plot da expressão de RNAm do gene IL-1 β

Grupo Sal**Grupo Gel****Grupo P-GC150**

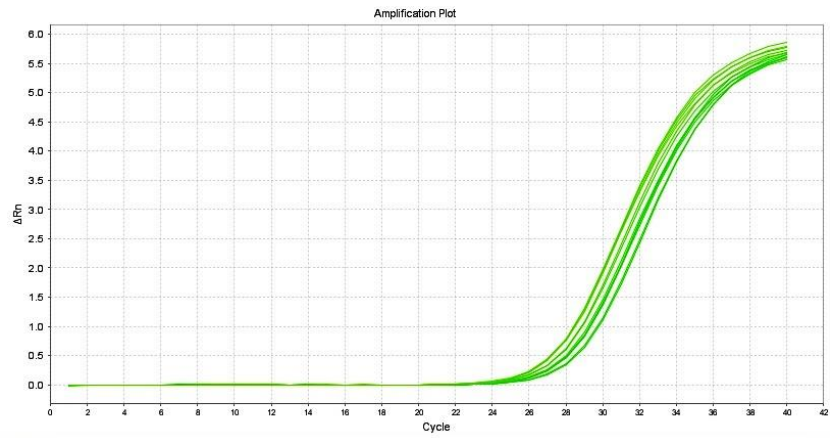
APÊNDICE E

Real time PCR amplification plot da expressão de RNAm do gene RANK

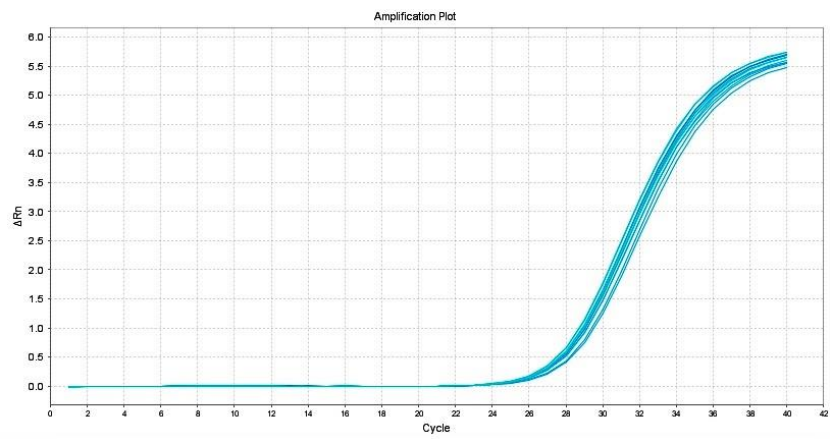
Grupo Sal



Grupo Gel

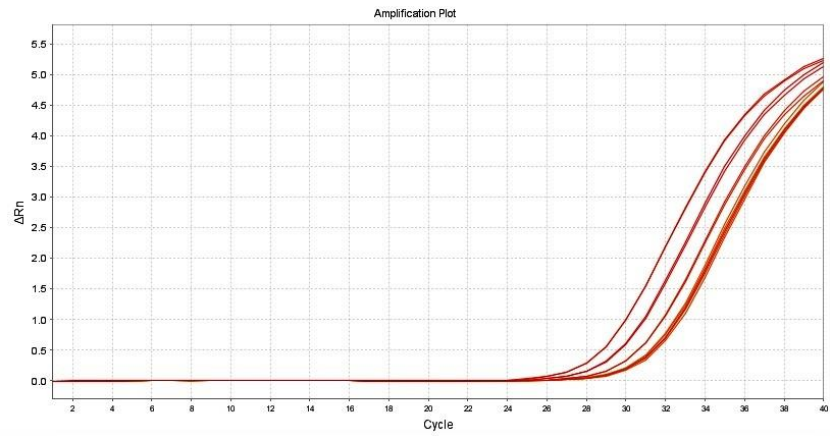
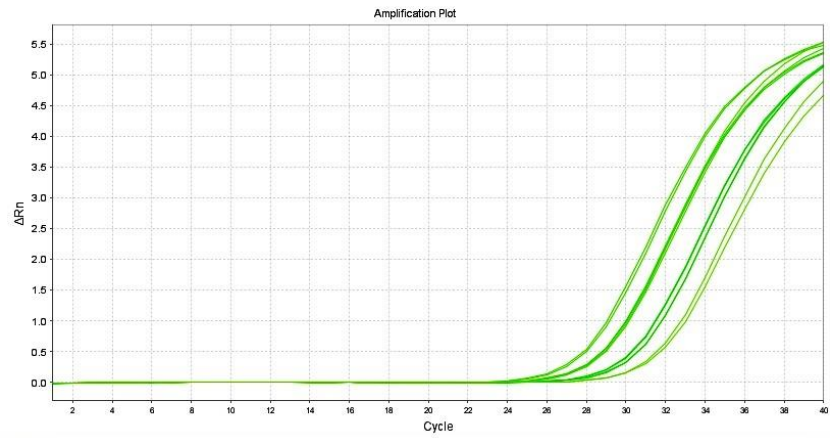
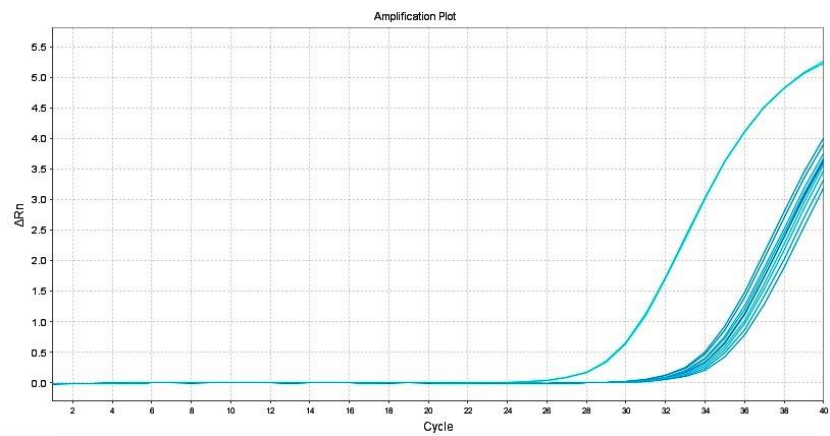


Grupo P-GC150



APÊNDICE F

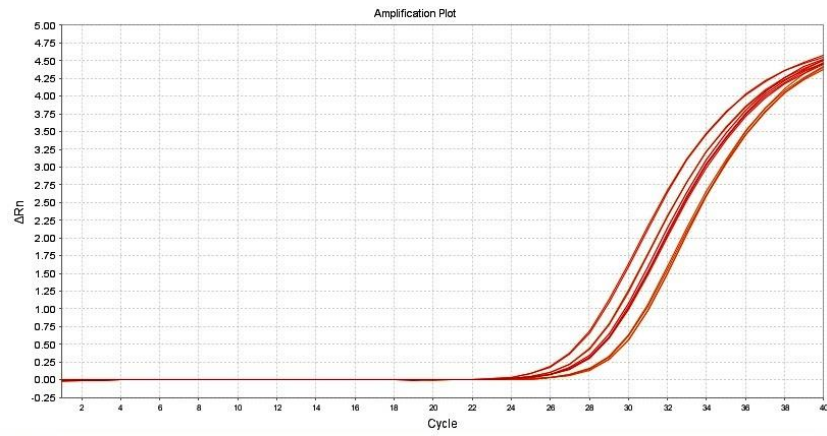
Real time PCR amplification plot da expressão de RNAm do gene RANKL

Grupo Sal**Grupo Gel****Grupo P-GC150**

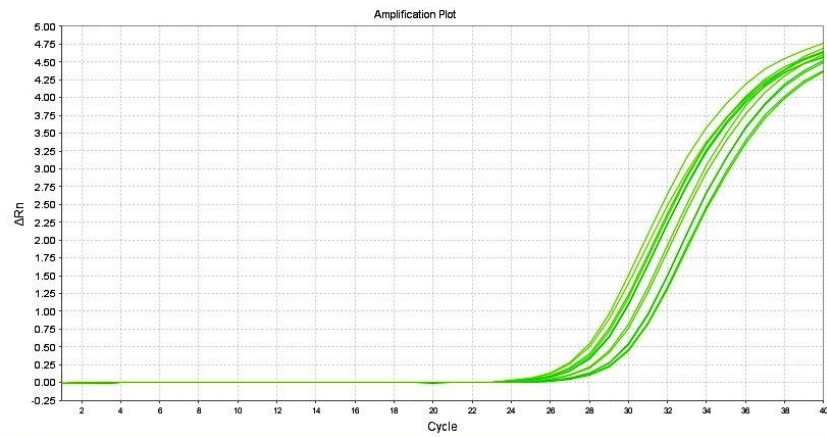
APÊNDICE G

Real time PCR amplification plot da expressão de RNAm do gene OPG

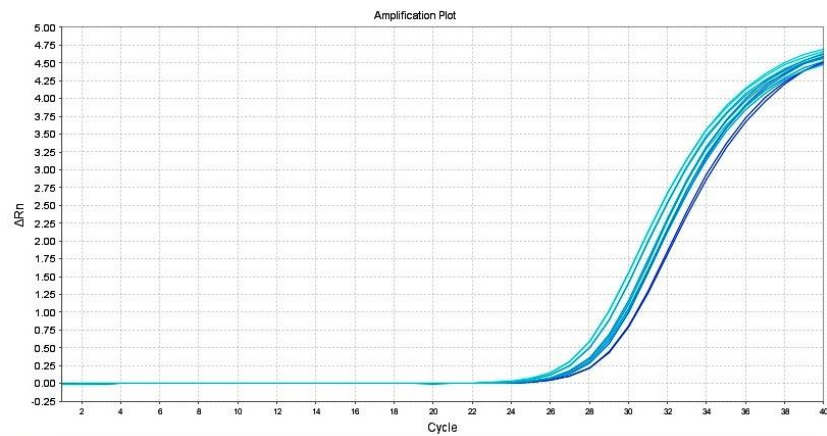
Grupo Sal



Grupo Gel



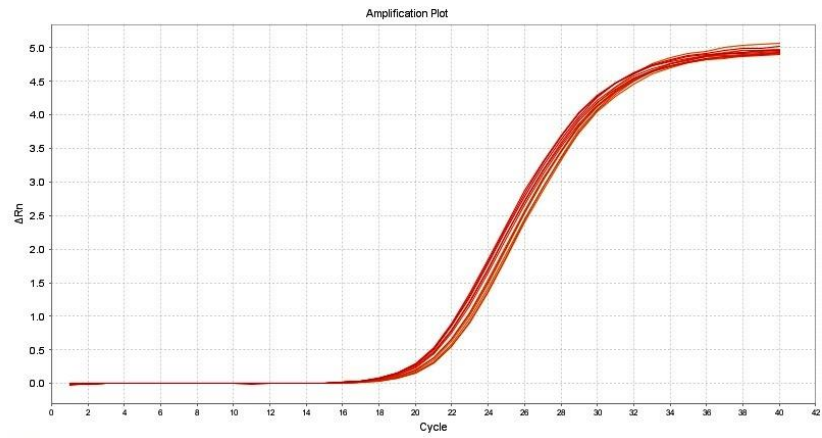
Grupo P-GC150



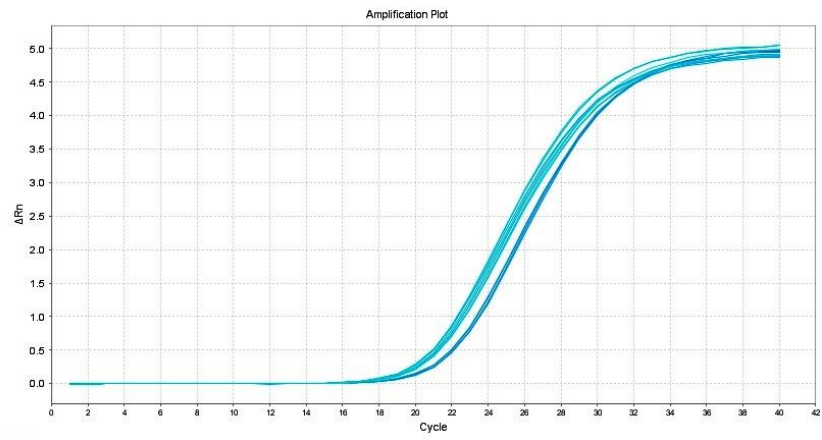
APÊNDICE H

Real time PCR amplification plot da expressão de RNAm do gene GAPDH

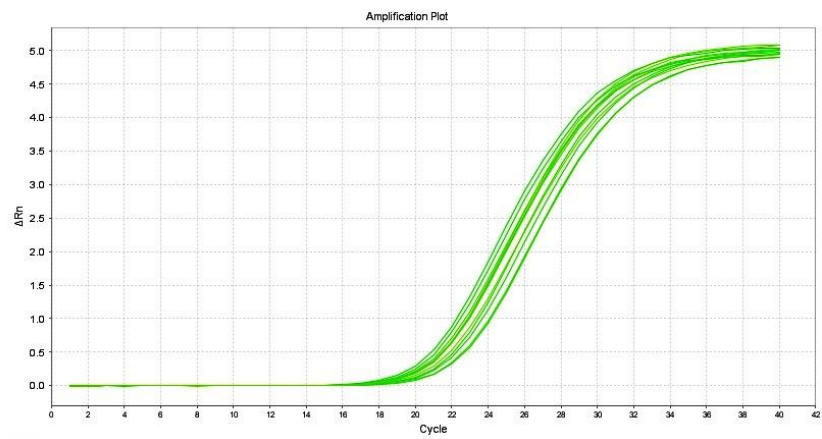
Grupo Sal



Grupo Gel



Grupo P-GC150



ANEXO 1

COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO INTITULADO “ORABASE FORMULATION WITH CASHEW GUM POLYSACCHARIDE DECREASES INFLAMMATORY AND BONE LOSS HALLMARKS IN EXPERIMENTAL PERIODONTITIS”

G Model
BIOMAC-8264: No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

International Journal of Biological Macromolecules xxx (2017) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis

Manoel D. Souza Filho^{a,*}, Jand V.R. Medeiros^a, Daniel F.P. Vasconcelos^a,
Durcilene A. Silva^a, Ana C.M. Leódidio^a, Hygor F. Fernandes^a, Felipe R.P. Silva^b,
Luiz F.C. França^b, David Lenardo^b, Giovanni R. Pinto^b

^a The Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, PI, 64049-550, Brazil

^b Post-graduation Program in Biomedical Sciences, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, 64202-020, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 June 2017
Received in revised form
16 September 2017
Accepted 21 September 2017
Available online xxx

Keywords:
Anacardium occidentale
Anti-inflammatory
Gene expression

ABSTRACT

This study aimed to investigate the chemical characteristics and the effects of an orabase gel with Cashew Gum Polysaccharide (CG-P) from *Anacardium occidentale* L. on alveolar bone loss and relative mRNA expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANK*, *RANKL*, and *OPG* in the periodontal tissue of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) subjected to ligature-induced periodontitis. Crude cashew gum was collected and purified by chemical processes; then, the CG-P was mixed with orabase gel. Female rats were randomly divided into four groups of six animals each: saline 0.9% (Sal Group); orabase gel (Gel Group); 50 mg CG-P/1 g orabase gel (CG-P50 Group) and 150 mg CG-P/1 g orabase gel (CG-P150 Group). Periodontitis was induced in the animals; they were treated for 20 days with one daily topical application. The purification process of CG-P presented high yield and resulted in a protein-free product. The treatment with CG-P150 (150 mg CG-P/1 g orabase gel) significantly reduced alveolar bone loss, decreased the relative mRNA expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , *RANKL* and the *RANKL/OPG* ratio, and caused a significant decrease in myeloperoxidase activity of the gingival tissue. Thus, the CG-P in orabase represents a potential adjuvant drug for the treatment of periodontitis and possible source of new biotechnological discoveries.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO 2

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



1

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do Potencial Terapêutico e Biotecnológico de Polissacarídeos no tratamento da Periodontite induzida em ratos", registrada nº 229/16, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS- Biologia_ Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **04/11/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Dezembro/ 2016 à Dezembro/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	126
Peso/ Idade	190-230g/ 42 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de Manutenção de Animais destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI.

Teresina, 04 de Novembro de 2016.


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora