

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ และ
เซลล์มะเร็งในช่องปากของสารสำคัญกรดอนาคาร์ดิกจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์
In Vitro Study of the Inhibitory Effects of Anacardic Acid from Cashew Nut
Shells on *Candida Albicans*, *Streptococcus Mutans*, and Oral Cancer Cells

พิมพ์พร โชติการ^{1*}, งามพัคตร์ ทายะนา², วรณญา วรดุลยพินิจ³ และ เอสเธระ ประทีปทองคำ⁴

Pimporn Chotikarn^{1*}, Nyampak Tayana², Warunya Woradulayapinij³ and

Esthera Prateeptongkum⁴

^{1,4}สถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์

^{2,3}ศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนาฯ, สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

^{1,4}Institute of Dentistry, Department of Medical Services

^{2,3}Drug Discovery and Development Center, Office of Advance Science and Technology, Thammasat University

(Received: February 18, 2025; Revised: April 24, 2025; Accepted: May 19, 2025)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดและแยกกรดอนาคาร์ดิกจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ พร้อมศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก และฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ *Candida albicans* และ *Streptococcus mutans* โดยได้นำเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พร้อมทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ด้วยวิธี MTT assay และฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ ด้วยวิธี Agar well diffusion และนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากพบว่า สาร Doxorubicin มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ตามด้วย Calcium anacardate ส่วน Anacardic acid มีประสิทธิภาพรองลงมา และ Cashew nut shell liquid มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด สำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* แต่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Streptococcus mutans*

เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้เปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ที่มาจากแหล่งเดียว ซึ่งปัจจัยจากแหล่งปลูกไม่ว่าจะเป็นดิน หรือน้ำ สภาพอากาศ อาจจะมีผลต่อชนิด และปริมาณสารสำคัญ รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในช่องปากได้ อีกทั้งกรดอนาคาร์ดิกมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ Calcium anacardate มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ซึ่งควรจะมีการทดสอบความเป็นพิษเทียบกับเซลล์ปกติ รวมถึงมะเร็งช่องปากชนิดอื่นๆ และมีความน่าสนใจที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาทางเลือกให้กับผู้ป่วยโรคต่อไปในอนาคต แต่สารสกัด Calcium anacardate ละลายได้ค่อนข้างยาก หากมีการปรับเปลี่ยนหมู่โลหะเป็นโซเดียม หรือ โพแทสเซียมค่าการละลายน่าจะดีขึ้นทำให้สามารถนำไปใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น

คำสำคัญ: กรดอนาคาร์ดิก, การยับยั้งจุลชีพ, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก,
เปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์, มะม่วงหิมพานต์

*ผู้ให้การติดต่อ (Corresponding email: pimporn_bee@hotmail.com)

Abstract

This research was an experimental study that aimed to extract and isolate anacardic acid from cashew nut shells, and to investigate its cytotoxic effects on oral cancer cells as well as its antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. The cashew nut shells were extracted using hexane as the solvent. The cytotoxicity against oral cancer cells was assessed using the MTT assay, while the antimicrobial activity was evaluated using the agar well diffusion method. The data were analyzed statistically using one-way ANOVA.

The cytotoxicity test on oral cancer cells showed that Doxorubicin had the highest efficacy in inhibiting oral cancer cells, followed by Calcium anacardate. Anacardic acid demonstrated moderate efficacy, while Cashew nut shell liquid exhibited the lowest efficacy. In the antimicrobial activity test, it was found that none of the three extracts from cashew nut shells inhibited *Candida albicans*, but all showed inhibitory effects against *Streptococcus mutans*.

Since this study used cashew nut shells obtained from a single source, factors related to the cultivation environment—such as soil, water, and climate—may have influenced the type and amount of active compounds, as well as their antimicrobial and oral cancer cell inhibitory effects. Anacardic acid demonstrated good antibacterial activity against *S. mutans*, while calcium anacardate exhibited strong inhibitory effects on oral cancer cells. Further studies should assess the toxicity of these compounds on normal cells and other types of oral cancer cells. Additionally, there is potential for developing these compounds as alternative therapeutic agents for consumers in the future. However, calcium anacardate has relatively poor solubility; modifying the metal group to sodium or potassium may improve its solubility, facilitating its use in product development.

Keywords: Anacardic Acid, Antimicrobial Activity, Cytotoxicity Against Oral Cancer Cells, Cashew Nut Shell, Cashew

บทนำ

จากสถิติผู้สูงอายุไทย ปี พ.ศ. 2565 จากงานบริการสถิติข้อมูล กรมการปกครอง กระทรวงมหาดไทย ข้อมูล ณ วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2565 พบว่า มีจำนวนผู้สูงอายุคิดเป็นร้อยละ 18.94 ของประชากรทั้งหมด โดยเป็นเพศชาย และเพศหญิงคิดเป็นร้อยละ 44.03 และ 55.97 ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ภาวะผู้สูงอายุสภาวะช่องปากจะมีการเปลี่ยนแปลงลิ้นของผู้สูงอายุจะพบการสูญเสียรส โดยเฉพาะรสเค็มและขม ทำให้ผู้สูงอายุมีความอยากอาหารลดลง กลืนยากขึ้น อาการที่สามารถพบได้บ่อยในผู้สูงอายุอีกอย่างคืออาการแสบร้อนบริเวณลิ้น (Burning tongue) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะทำให้ช่องปากเกิดการบาดเจ็บและการติดเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อผู้ป่วยใช้ฟันเทียมหรือได้รับผลกระทบจากการรบกวนการทำงานของน้ำลาย เช่น ยารักษาโรคประจำตัว ซึ่งสาเหตุเหล่านี้เพิ่มโอกาสในการเป็นมะเร็งในช่องปาก การเกิดฟันผุและติดเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) ได้

ปัจจุบันมะเร็งช่องปากเป็นสาเหตุทำให้มีผู้เสียชีวิตเป็นจำนวนมากโดยแต่ละปีพบผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งชนิดนี้ถึง 600,000 คน โดยจากข้อมูลสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2565 พบว่า มีผู้ป่วยเป็นมะเร็งเกิดใหม่โดยถ้าแบ่งตามอายุ พบว่า เมื่อเข้าสู่วัยสูงอายุจะมีโอกาสเป็นมะเร็งเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่า ในเพศชายและหญิงผู้ป่วยที่เป็นผู้สูงอายุที่เป็นมะเร็งในช่องปากคิดเป็นร้อยละ 44.08 และ 64 ตามลำดับ

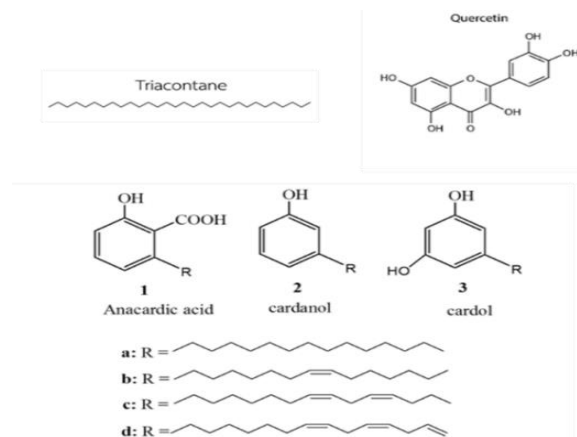
มะเร็งช่องปากพบได้บริเวณช่องปาก ลิ้น กระพุ้งแก้ม หรือต่อมน้ำลาย ลักษณะมะเร็งช่องปาก จะเกิดความรุนแรงลักษณะเฉพาะก็คือมีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองที่คอ การเกิดมะเร็งบริเวณลิ้นจะเกิด บริเวณด้านข้างลิ้น ด้านหน้าลิ้น ด้านหลังลิ้น ลักษณะมะเร็งช่องปากที่เจอบ่อยกว่าร้อยละ 90 เป็นกลุ่มเซลล์ สแควมัส (Squamous cell carcinoma) (Gutiérrez, Sánchez, Delmas, Gómez, & Bonneau, 2020)

เชื้อรา *C. albicans* (Talapko, Juzbašić, Matijević, Pustijanac, Bekić, Kotris, et al., 2021) เป็นเชื้อราประจำถิ่นของผิวหนังและของเนื้อเยื่อในช่องปาก ลำคอ และอาจรวมไปถึงหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ และที่อวัยวะเพศ แบ่งตัวโดยวิธีการแตกหน่อ (Budding) รูปร่างกลมรี เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 37 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนี คือ กลมและมีสีขาวครีม

โรคฟันผุเป็นโรคที่พบได้บ่อยในช่องปาก ร่วมกับสภาวะในช่องปากที่เปลี่ยนแปลงของผู้สูงอายุ โดยเฉพาะภาวะปากแห้ง น้ำลายแห้ง ส่งผลให้เกิดฟันผุได้ง่ายขึ้น โดยโรคฟันผุจัดเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจาก แบคทีเรีย โดยทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (Demineralization) จากภาวะความเป็นกรดที่เกิดจากการย่อยสลาย อาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียบางชนิดในแผ่นคราบจุลินทรีย์ (Biofilm) เช่น *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* เป็นต้น โดย *S. mutans* ถือเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุในช่องปาก (Loesche, 2007) *S. mutans* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (Gram-positive cocci) ขนาด 0.5 - 0.75 μm แบคทีเรีย ชนิดนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Non-motile) ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ต้องอาศัยไนโตรเจน หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อเจริญได้ดี คือ 37 °C และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45°C และต่ำสุด 10°C (Johnson, Bozzola, & Shechmeister, 1974)

มะม่วงหิมพานต์มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Anacardium occidentale* L. เป็นไม้ผลยืนต้น มีทรงพุ่มกว้าง แผ่กระจายไม่ผลัดใบ มีลำต้นสูง 10 - 12 เมตร มีฐานรองดอกเจริญ ขึ้นมาคล้ายผล ที่เรียกว่า ผลปลอม มีสีต่าง ๆ กัน ตามแต่ละพันธุ์ เช่น เขียว แดง ส้ม เหลือง ฯลฯ ส่วนผลจริงที่เรียกว่า เมล็ด มีลักษณะยาว เรียวโค้งงอ คล้ายรูปไต ห้อยติดอยู่กับผลปลอม ส่วนเนื้อในสุดของเมล็ด (Kernel) เป็นส่วนที่ใช้รับประทาน และมีคุณค่าทางอาหารสูงมาก มีไขมันร้อยละ 47 โปรตีนร้อยละ 21 แป้งร้อยละ 22 มีวิตามินและธาตุอาหารอื่น ๆ อีกมากมาย ส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด (Cashew nut shell) มีลักษณะหนาและแข็ง มีน้ำมันที่เรียกโดยทั่วไปว่า Cashew nut shell oil หรือ Cashew nut shell liquid ซึ่งมักใช้ค้าขายว่า “CNSL” มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม เหนียวข้น โดยมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก (Paramashivappa, Kumar, Vithayathil, & Rao, 2001)

องค์ประกอบของ CNSL จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับโหมดของการสกัด โดยการสกัดด้วยความร้อน กระบวนการให้ความร้อนนำไปสู่การดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะนาคาร์ดิกเพื่อสร้างคาร์ดานอล และโดยทั่วไปจะมีคาร์ดานอล ประมาณ 60 - 65% คาร์ดอล 15 - 20% กลุ่มพอลิเมอร์อื่นๆอีกประมาณ 10% (Hamad & Mubofu, 2015)



ภาพ 1 ลักษณะโครงสร้างสารสำคัญในเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์

มีการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ชีวภาพ และเภสัชวิทยา Anacardic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ (Antimicrobial activity) (De Oliveira, Cunha, Sousa, Bezerra, Lomonaco, Mazzetto, et al, 2022) มีรายงานการศึกษา พบว่า Anacardic acid ช่วยยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อราได้ นอกจากนี้ยังพบว่า Anacardic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ลดความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Zhao, Zhang, Cai, Zhang, Kong, Ge, et al, 2018) ซึ่งการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและมีแนวโน้มในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้โมเลกุลสู่การพัฒนาไปเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะยารักษาโรคมะเร็ง

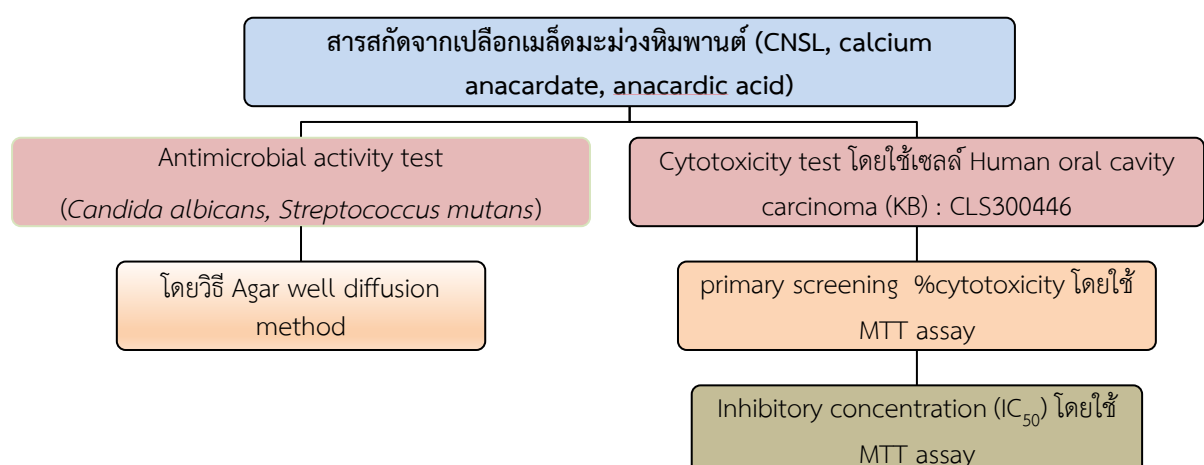
ถึงแม้ว่าปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ (Antimicrobial activity) และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของ Anacardic acid ในรูปแบบของ oil และรูปเกลือ (Calcium anacardate) เกี่ยวกับคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และเซลล์มะเร็งในช่องปาก ในการศึกษาจึงต้องการศึกษาทั้งปริมาณของ Anacardic acid รวมถึงผลต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และเซลล์มะเร็งในช่องปาก ซึ่งถือว่าเป็นอีกตัวช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก การติดเชื้อมี และการเกิดโรคฟันผุ

วัตถุประสงค์วิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของสารสำคัญ Anacardic acid ในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ *Candida albicans* และ *Streptococcus mutans* ของสารสำคัญ anacardic acid ในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์

กรอบแนวคิดการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาสารสำคัญ Anacardic acid ในสารสกัดเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ โดยสกัดสารมา 3 ชนิดได้แก่ CNSL calcium anacardate และ Anacardic acid โดยนำไปทดสอบ Antimicrobial activity test โดยใช้เชื้อที่สนใจคือ *Candida albicans* และ *Streptococcus mutans* โดยวิธี Agar well diffusion method และนำไปทดสอบ Cytotoxicity test โดยใช้เซลล์ Human oral cavity carcinoma (KB) cell ดังกรอบแนวคิดการวิจัยภาพ 2



ภาพ 2 กรอบแนวคิดการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ มีรูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (In vitro experimental research)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเซลล์มะเร็ง

กลุ่มตัวอย่าง คือ *Candida albicans* DMST 5815 (ATCC 10231), *Streptococcus mutans* DMST 18777 (ATCC 25175T) และ Human oral cavity carcinoma (KB) : CLS300446

Intervention คือ สารสำคัญจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้แก่ 1) เครื่องชั่ง (Mettler Toledo ML104) 2) เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator, Heidolph™ Hei-Vap™ Rotary Evaporators) 3) เครื่องดูดสุญญากาศ (High vacuum) 4) อ่างควบคุมอุณหภูมิความถี่สูง (Bandelin sonorex digitec) 5) อ่างควบคุมอุณหภูมิความถี่สูง (Sonicator) (Bandelin sonorex digitec) 6) Heidolph MR Hei-Tec 135mm Magnetic Stirrer และ 7) OS40-Pro LCD Digital Enhanced Stirrer

2. สารเคมี ดังนี้

2.1 สารเคมีที่ใช้สกัดและแยกสารจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ได้แก่ 1) Distilled hexane 2) Distilled ethyl acetate 3) Calcium hydroxide และ 4) Sodium sulphate anhydrous

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ 1) Methanol 2) Chloroform- d_1 3) ด็อกโซรูบิซิน (Doxorubicin) 4) ตัวทำละลายหลักไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) 5) Fluconazole และ 6) Chlorhexidine

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 1) Mueller hinton agar และ 2) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

4. เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ 1) *Candida albicans* DMST 5815 (ATCC 10231) และ 2) *Streptococcus mutans* DMST 18777 (ATCC 25175T)

5. เซลล์ที่ใช้ทดสอบ Cytotoxicity ได้แก่ Human oral cavity carcinoma (KB): CLS300446

วิธีการวิจัย

1. การสกัดสาร

1.1 การสกัดให้ได้ Cashew nut shell liquid

เตรียมสารสกัดหยาบ (Crude extract) โดยแบ่งตัวอย่างเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ที่บดแล้ว ปริมาณ 10 กรัม เติมหกเซน ลงไป 50 มล. และนำเข้าเครื่อง Sonicator เป็นเวลา 30 นาที พร้อมควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 45 องศา จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง ทำซ้ำทั้งหมด 4 รอบ จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายหกเซน ที่ได้จากการกรองด้วยเครื่อง Rotary evaporator และเครื่อง High vacuum ซึ่งสารสกัดที่ได้ และนำสารสกัดตรวจวิเคราะห์ทางเคมีด้วยเครื่อง ^1H NMR โดยใช้ Chloroform- d (CDCl_3) เป็นตัวทำละลาย

1.2 การเปลี่ยน Cashew nut shell liquid ให้เป็น Calcium anacardate โดยใช้วิธี Modified R. Paramashivappa (Paramashivappa, Kumar, Vithayathil, & Rao, 2001)

นำ CNSL 25 กรัมเติม 5% Aqueous methanol ลงไป 300 มล. คนด้วยเครื่อง Stirrer ชนิด Overhead โดยกำหนดรอบอยู่ที่ 500 rpm และเปิด Hotplate อยู่ที่ 50 องศา จากนั้นเติม Calcium hydroxide 12.5 กรัม โดยค่อย ๆ เติมทีละน้อย และ Stir ต่อไปเรื่อย ๆ จนทดสอบ Thin layer chromatography (TLC) แล้วไม่ปรากฏ Anacardic acid ใน TLC จากนั้นนำสารที่ได้มาล้างและกรองสุญญากาศด้วย 50% Aqueous methanol 200 มล. 2 รอบ และ Methanol 200 มล. 2 รอบ นำน้ำที่ล้างทดสอบ TLC จนไม่มี Cardol และ Carnardol เหลืออยู่ ส่วนของแข็งจะได้ลักษณะของแข็งสีน้ำตาล จากนั้นนำของแข็งมาบดให้ละเอียดแล้วไปอบที่ 50 องศาเป็นเวลา 1 ชม.

1.3 การเปลี่ยน Calcium anacardate ให้เป็น Anacardic acid โดยใช้วิธี Modified R. Paramashivappa (Paramashivappa, Kumar, Vithayathil, & Rao, 2001)

นำ Calcium anacardate 25 กรัม ผสมด้วยน้ำกลั่น 100 มล. คนจนเป็นสารแขวนลอย เติมกรด HCl 2M 170 มล. คนด้วยเครื่อง Magnetic stirrer ด้วยความเร็ว 450 รอบต่อนาที 3 ชั่วโมง เช็ด pH นำสารที่ได้ใส่กรวยแยกสาร จากนั้นเติม Ethyl acetate 150 มล. จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนสารแยกชั้น ไซสารชั้นล่างออก เก็บสารชั้นบนไว้ นำสารชั้นบนที่ได้เติม Sodium sulphate anhydrous จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วทำการระเหยโดยเครื่อง Rotary evaporator และเครื่อง High vacuum

1.4 จากนั้นทำสารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ CNSL Anacardic acid และ Calcium anacardate มาละลายกับ DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 5,000 10,000 ($\mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ

2. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก; *in vitro*

นำสารสกัดของเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ CNSL, Calcium anacardate และ Anacardic acid ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก Human oral cavity carcinoma (KB) cell line โดยใช้วิธี MTT assay ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide test) เทียบกับสารมาตรฐาน ดอกโซรูบิซิน (Doxorubicin) ซึ่งเป็น Gold standard ในการรักษามะเร็ง (D'Angelo, Noronha, Câmara, Kurnik, Feng, Araujo, et al, 2022) และตัวทำละลายหลักไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) และนำไปหาค่า %cytotoxicity โดยใช้สูตร $\% \text{cytotoxicity} = (A-B)/A \times 100$ โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง) B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารตัวอย่าง จากนั้นนำค่า %cytotoxicity มาคำนวณหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0

3. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* และแบคทีเรีย *S. mutans*

นำสารสกัดของเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ได้แก่ CNSL, Calcium anacardate และ Anacardic acid ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* (ATCC 10231) และ *S. mutans* (ATCC 25175T) ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton agar โดยใช้วิธี Agar well diffusion method เทียบกับสารมาตรฐาน fluconazole ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ Chlorhexidine ซึ่งเป็น Gold standard (Jones, 1997) ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide; DMSO) โดยวิธีนี้ใช้การวัด Inhibition halo จากเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นจาก Clear zone ซึ่งเกิดจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ โดยดำเนินการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง สำหรับแต่ละการทดสอบ โดยใช้ one-way ANOVA สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistic version 22

จริยธรรมวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณารับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัยและจริยธรรมกรรมการแพทย์ หมายเลขรับรอง 1/2566 รหัสโครงการวิจัย 2/2566

ผลการวิจัย

1. เปรียบเทียบ %cytotoxicity และ IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์กับ Doxorubicin ดังตาราง 1

ตาราง 1 เปรียบเทียบ %cytotoxicity และ IC₅₀ ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ กับ Doxorubicin

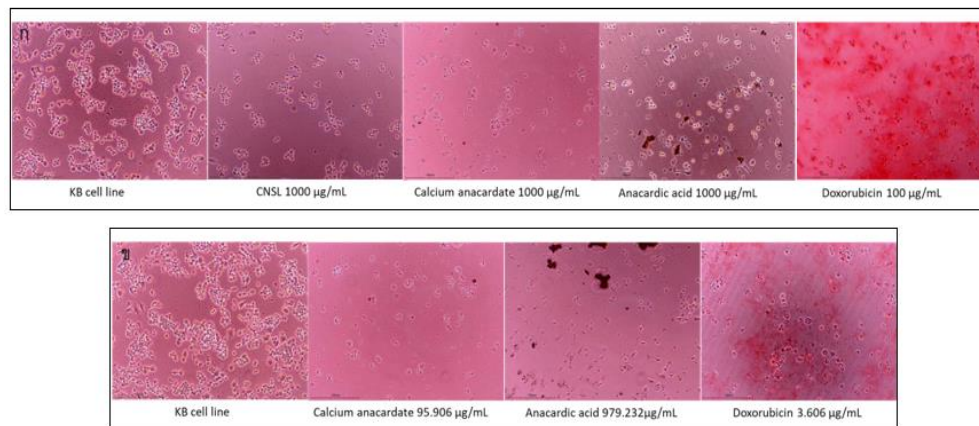
สาร	%cytotoxicity			IC ₅₀		
	ค่าเฉลี่ย %cytotoxicity	p-value	Post hoc	ค่าเฉลี่ย IC ₅₀	p-value	Post hoc
Cashew nut shell liquid	11.35±0.59	<0.001	DMSO<Cashew nut shell liquid	N/A	N/A	Doxorubicin<Calcium anacardate
Calcium anacardate	80.94±0.60	0.162	<Anacardic acid	95.90±0.43	<0.001	anacardate<Anacardic acid
Anacardic acid	53.56±0.59	<0.001	acid<Calcium anacardate<Doxorubicin	979.23±3.24	<0.001	
Doxorubicin	82.12±0.44			3.60±0.01		
DMSO	3.82±0.01	<0.001		N/A	N/A	

ตัวย่อ IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; DMSO, dimethyl sulfoxide

จากตาราง 1 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ด้วยวิธี MTT assay โดยในส่วนของ Primary screening หา %cytotoxicity พบว่า calcium anacardate มี %cytotoxicity สูงที่สุด 80.94 ± 0.60 รองลงมาคือ Anacardic acid 53.56 ± 0.59 และ Cashew nut shell liquid (CNSL) ต่ำที่สุด 11.35 ± 0.23 เทียบกับ Positive control doxorubicin 82.12 ± 0.44 เมื่อนำข้อมูลเข้าผ่านโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ พบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) จึงนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มตัวอย่างทั้งห้าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จากการวิเคราะห์ Post hoc ด้วยวิธี Tukey HSD พบว่า กลุ่ม Doxorubicin และ Calcium anacardate ให้ค่า %cytotoxicity ใกล้เคียงกัน และ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กลุ่ม Anacardic acid ให้ค่า %cytotoxicity รองลงมา โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่ม Doxorubicin และ Calcium anacardate ($p < 0.001$) กลุ่ม CNSL ให้ค่าความเป็นพิษต่ำกว่าทุกกลุ่ม และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก Anacardic acid, Calcium anacardate และ Doxorubicin ($p < 0.001$) กลุ่มควบคุมลบ (Negative control) DMSO มีค่าความเป็นพิษต่ำสุด และแตกต่างจากทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากนั้นได้นำสารที่มีค่า %cytotoxicity ที่มากกว่า 50% ไปทดสอบหาค่า IC₅₀ พบว่า Calcium anacardate มีค่าอยู่ที่ $95.90 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$ และ Anacardic acid มีค่าอยู่ที่ $979.23 \pm 3.24 \mu\text{g/mL}$ เทียบกับ Positive control doxorubicin อยู่ที่ $3.60 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ เมื่อนำข้อมูลเข้าผ่านโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ พบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) จึงนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มตัวอย่างทั้งสามแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จากการวิเคราะห์ Post Hoc ด้วยวิธี Tukey HSD พบว่า ค่า IC₅₀ ของกลุ่ม Doxorubicin มีความแตกต่างจากทั้ง Calcium anacardate และ Anacardic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) กลุ่ม Calcium anacardate และ Anacardic acid ก็มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

สรุปว่า สาร Doxorubicin มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ตามด้วย Calcium anacardate ส่วน Anacardic acid มีประสิทธิภาพรองลงมา และ Cashew nut shell liquid มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด



ภาพ 3 ภาพถ่ายเซลล์ไลน์มะเร็งช่องปาก หลังได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 200 เท่า

ก ผลการทดสอบ %cytotoxicity ซึ่งเป็น Primary screening โดยใช้ Doxorubicin เป็น Positive control ที่ความเข้มข้น 100 ppm เทียบกับ CNSL Calcium anacardate และ Anacardic acid ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm

ข ภาพถ่ายเซลล์ หลังทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ 50% (IC_{50})

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* และแบคทีเรีย *S. mutans* ดังตาราง 2

ตาราง 2 เปรียบเทียบ Inhibition halo ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* กับ fluconazole และ *Streptococcus mutans* กับ 2% chlorhexidine

Microbial สาร	<i>Candida albicans</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
		Inhibition halo (mm.)	Inhibition halo (mm.)	p-value
CNSL (µg/mL)	1,000	<6	N/A	
	5,000	<6	16±0.5	<0.001
	10,000	<6	18±0.5	<0.001
Calcium anacardate (µg/mL)	1,000	<6	N/A	
	5,000	<6	11±0.5	<0.001
	10,000	<6	13±1	<0.001
Anacardic acid (µg/mL)	1,000	<6	N/A	
	5,000	<6	17.5±0.5	<0.001
	10,000	<6	18±0.5	<0.001
Fluconazole 250 µg/mL		26±1	N/A	
2% CHX		N/A	31±0.5	
10% DMSO		<6	<6	

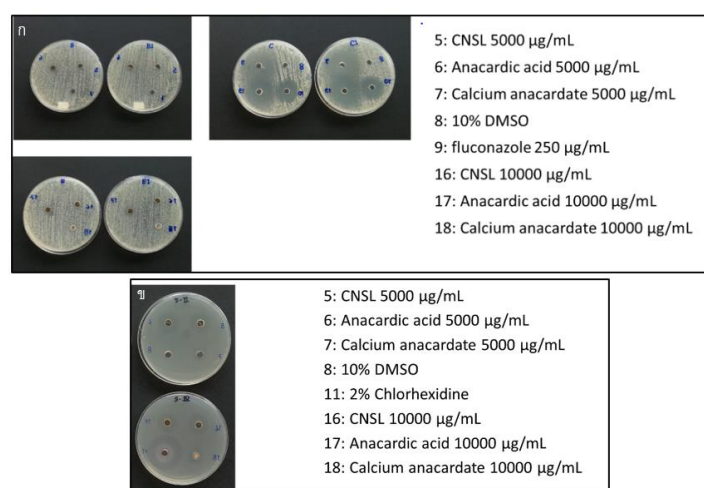
ตัวย่อ CNSL, cashew nut shell liquid; DMSO, dimethyl sulfoxide; CHX, chlorhexidine

จากตาราง 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* และแบคทีเรีย *S. mutans* โดยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ทดสอบสาร CNSL, calcium anacardate และ anacardic acid ที่ความเข้มข้น 1000, 5000, 10,000 µg/mL และ Fluconazole ที่ 250 µg/mL พบว่า Inhibition halo

มีค่าน้อยกว่า 6 มิลลิเมตร ขณะที่ Positive control มีค่า 26 ± 1 มิลลิเมตร ดังนั้น สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *C. albicans*

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยทดสอบ Cashew nut shell liquid, Calcium anacardate และ Anacardic acid ที่ความเข้มข้น 5,000, 10,000 $\mu\text{g/mL}$ และ 2% chlorhexidine พบว่า 2% Chlorhexidine มี Inhibition halo มากที่สุดคือ 31 ± 0.5 มิลลิเมตร รองลงมาคือ Anacardic acid และ CNSL ที่ความเข้มข้น 10,000 $\mu\text{g/mL}$ มี Inhibition halo 18 ± 0.5 มิลลิเมตร Anacardic acid ที่ความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g/mL}$ มี Inhibition halo 17.5 ± 0.5 มิลลิเมตร CNSL ที่ความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g/mL}$ มี Inhibition halo 16 ± 0.5 มิลลิเมตร และ Calcium anacardate ที่ความเข้มข้น 10,000 $\mu\text{g/mL}$ มี Inhibition halo 13 ± 1 มิลลิเมตร Calcium anacardate ที่ความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g/mL}$ มี Inhibition halo 11 ± 0.5 มิลลิเมตร และ 10% DMSO มี Inhibition halo < 6 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลเข้าผ่านโปรแกรมสำเร็จรูปทางคอมพิวเตอร์ พบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA พบว่า ขนาดของวงยับยั้งเชื้อ *S. mutans* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบรายคู่ด้วยวิธี Tukey HSD พบว่า 2% Chlorhexidine มีขนาดวงยับยั้งเชื้อเฉลี่ยสูงที่สุด และแตกต่างจากทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) กลุ่ม Anacardic acid ทั้งความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 $\mu\text{g/mL}$ แตกต่างจากกลุ่ม Calcium anacardate และ DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่ม CNSL ทั้งความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กลุ่ม Calcium anacardate ให้ค่าการยับยั้งต่ำที่สุด และแตกต่างจากกลุ่ม CNSL และ Anacardic acid อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กลุ่มควบคุมลบ (Negative control) DMSO ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ และแตกต่างจากทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Anacardic acid และ CNSL มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ดี โดยเฉพาะในความเข้มข้นสูง



ภาพ 4 ก. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Candida albicans* ที่ความเข้มข้น 1,000, 5,000, และ 10,000 ppm

ข. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus mutans* ที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm

อภิปรายผล

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษาศาสตรสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ที่มาจากจังหวัดจันทบุรี โดยทำการหาปริมาณสารสำคัญ Anacardic acid และสารสำคัญในรูปแบบเกลือ Calcium anacardate เพื่อนำมา

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ชนิด Human oral cavity carcinoma (KB) cell line และนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ 2 ชนิด คือ *C. albicans* และ *S. mutans*

สารที่นำมาทดสอบได้แก่ CNSL anacardic acid และ Calcium anacardate การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก Human oral cavity carcinoma (KB) cell line เมื่อเทียบกับ doxorubicin สารทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดย Doxorubicin มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ตามด้วย Calcium anacardate ส่วน Anacardic acid มีประสิทธิภาพรองลงมา และ Cashew nut shell liquid มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Legut, Lipka, Filipczak, Piwoni, Kozubek, & Gubernator (2014); Tan, Jiang, Yin, He, Liu, Long, et al (2017); Park, Upton, Blackmon, Dixon, Craver, Neal, et al (2018) และ Zhao, Zhang, Cai, Zhang, Kong, Ge, et al (2018) ที่พบว่า Anacardic acid สามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Kishore, Vedomurthy, Mantelingu, Agrawal, Reddy, Roy, et al (2008) รายงานว่า Anacardic acid ช่วยเพิ่มกิจกรรมของ Aurora kinase A ผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง สารประกอบนี้ออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์โดยการยับยั้ง histone acetyltransferase (HAT) นอกจากนี้ CNSL, Anacardic acid และอนุพันธ์พบว่าสามารถยับยั้งเนื้องอก โดยทำให้ไม่เกิดการกลายพันธุ์สูงถึง 0.003% (George & Kuttan, 1997)

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อรา *C. albicans* พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราชนิด *C. albicans* ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Da Silva, Liberio, do Amaral, do Nascimento, Torres, Neto, et al (2016) ที่พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อราชนิด *C. albicans* ได้ แต่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sudjaroen (2018) และ Ajileye, Obuotor, Akinkunmi, & Aderogba (2015) อาจเป็นเพราะความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อรา รวมถึงถิ่นปลูกของมะม่วงหิมพานต์ที่มีสภาพดิน น้ำ สภาพอากาศ ที่มาจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันทำให้ผลวิจัยที่ได้มีความแตกต่างกัน

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ทั้ง 3 ชนิด ใน 2 ความเข้มข้นที่นำมาทดสอบ เปรียบเทียบกับ 2% Chlorhexidine ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี ตามงานวิจัยของ Poppolo & Ouanounou (2022) เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า 2% Chlorhexidine มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) รองลงมาจะเป็นกลุ่มของ CNSL และ Anacardic acid และสุดท้ายคือกลุ่มของ Calcium anacardate ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่า 2 กลุ่มแรก แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ทั้ง 3 ชนิดซึ่งได้แก่ CNSL calcium anacardate และ Anacardic acid มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. mutans*

Murata, Irie, & Homma (1997) รายงานว่า กรดอนาคาร์ดิกป้องกันการสังเคราะห์ไขมันในเซลล์แบคทีเรียโดยการยับยั้งเอนไซม์ glycerol-3-phosphate dehydrogenase และ Muroi & Kubo (1996) เสนอว่ากรดอนาคาร์ดิกทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้เกิดการรบกวนเยื่อหุ้มแบคทีเรีย ตามมาด้วยการขัดขวางที่ electron transport chain และ ATPase ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งห่วงโซ่ทางเดินหายใจ

อย่างไรก็ตาม Anacardic acid สามารถใช้ในรูปแบบของ calcium anacardate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เกลือแคลเซียมที่เกิดจากการตกตะกอนของของเหลวจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้สามารถใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ง่ายกว่าเนื่องจากอยู่ในรูปแบบผงและไม่เป็นพิษ (Cruz, Freitas, Braz, Salles, & Silva, 2018)

การนำผลการวิจัยไปใช้

1. Anacardic acid มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกให้กับผู้บริโภคต่อไปในอนาคต

2. Calcium anacardate มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก Human oral cavity carcinoma (KB) cell line ซึ่งควรจะมีการทดสอบความเป็นพิษเทียบกับ oral cell ปกติ รวมถึงมะเร็งช่องปากชนิดอื่นๆ ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาทางเลือกให้กับผู้ป่วยโรคต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งถัดไป

1. เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้เปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ที่มาจากแหล่งเดียว ซึ่งปัจจัยจากแหล่งปลูกไม่ว่าจะเป็น ดิน หรือ น้ำ สภาพอากาศ อาจจะมีผลต่อชนิด และปริมาณสารสำคัญ รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในช่องปากได้ ซึ่งหากมีการพัฒนาต่อควรจะนำเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์จากแหล่งอื่นมาวิเคราะห์

2. สารสกัด Calcium anacardate ละลายได้ค่อนข้างยาก หากมีการปรับเปลี่ยนหมู่ Metal เป็น Sodium หรือ Potassium ค่าการละลายน่าจะดีขึ้นทำให้สามารถนำไปใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น

3. Calcium anacardate มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ควรจะมีการทดสอบความเป็นพิษเทียบกับ เซลล์ปกติในช่องปาก รวมถึงมะเร็งช่องปากชนิดอื่น ๆ

Reference

- Ajileye, O. O., Obuotor, E. M., Akinkunmi, E. O., & Aderogba, M. A.. (2015). Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. *Journal of King Saud University*, 27(3), 244-52.
- Cruz, C., Freitas, E., Braz, N., Salles, R., & Silva, I. (2018). Blood parameters and enzymatic and oxidative activity in the liver of chickens fed with calcium anacardate. *Revista ciência Agrônômica*, 49(2).
- D'Angelo, N. A., Noronha, M. A., Câmara, M. C. C., Kurnik, I. S., Feng, C., Araujo, et al. (2022). Doxorubicin nanoformulations on therapy against cancer: An overview from the last 10 years. *Biomaterials Advances*, 133, 112623.
- Da Silva, R. A., Liberio, S. A., do Amaral, F. M. M., do Nascimento, F. R. F., Torres, L. M. B., Neto, V. M., et al. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of *anacardium occidentale* flowers in comparison to bark and leaves extracts. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, 87-99.
- De Oliveira, S. N., Cunha, D. A., Sousa, R. N., Bezerra, T. T., Lomonaco, D., Mazzetto, S. E., Martins, C. H. G., Casemiro, L. A., & de Paulo, A. S. V. (2022). Physicochemical and microbiological assessment of a dental adhesive doped with cashew nut shell liquid. *Odontology*, 110(3), 434-443.
- George, J. & Kuttan, R. (1997). Mutagenic, carcinogenic and cocarcinogenic activity of cashewnut shell liquid. *Cancer Letters*, 112(1), 11-16.
- Gutiérrez-Venegas, G., Sánchez-Carballido, M. A., Delmas, S. C., Gómez-Mora, J. A., & Bonneau, N. (2020). Effects of flavonoids on tongue squamous cell carcinoma. *Cell Biology International*, 44(3), 686-720.
- Hamad, F. B. & Mubofu, E. B. (2015). Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8569-8590.

- Johnson, M. C., Bozzola, J. J., & Shechmeister, I. L. (1974). Morphological study of streptococcus mutans and two extracellular polysaccharide mutants. *Journal of Bacteriology*, 118(1), 304–311.
- Jones C. G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontology 2000*, 15, 55–62.
- Kishore, A. H., Vedamurthy, B. M., Mantelingu, K., Agrawal, S., Reddy, B. A., Roy, S., et al. (2008). Specific small-molecule activator of aurora kinase a induces autophosphorylation in a cell-free system. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(4), 792–797.
- Legut, M., Lipka, D., Filipczak, N., Piwoni, A., Kozubek, A., & Gubernator, J. (2014). Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines - in vitro studies. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 653–668.
- Loesche, W. (2007). Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 21(2), 471–vii.
- Murata, M., Irie, J., & Homma, S. (1997). Inhibition of lipid synthesis of bacteria, yeast and animal cells by anacardic acids, glycerol-3-phosphate dehydrogenase inhibitors from ginkgo. *LWT- Food Science and Technology*, 30(5), 458–63.
- Muroi, H. & Kubo, I. (1996). Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *The Journal of Applied Bacteriology*, 80(4), 387–394.
- Paramashivappa, R., Kumar, P. P., Vithayathil, P. J., & Rao, A. S. (2001). Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (Anacardium occidentale L.) nut shell liquid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2548–2551.
- Park, M., Upton, D., Blackmon, M., Dixon, V., Craver, S., Neal, et al. (2018). Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A - ATM - p53 signaling pathway. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 71.
- Poppolo, D. F. & Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in dentistry: pharmacology, uses, and adverse effects. *International Dental Journal*, 72(3), 269–277.
- Sudjaroen, Y. (2018). Inappropriate of in vitro antimicrobial and anticancer activities from cashew (Anacardium occidentale L.) nut shell extracts. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 9(1), 33–38
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi (Basel,Switzerland)*, 7(2), 79.
- Tan, J., Jiang, X., Yin, G., He, L., Liu, J., Long, et al, (2017). Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. *Oncology Reports*, 38(3), 1373–1382.
- Zhao, Q., Zhang, X., Cai, H., Zhang, P., Kong, D., Ge, et al, (2018). Anticancer effects of plant derived anacardic acid on human breast cancer mda-mb-231 cells. *American Journal of Translational Research*, 10(8), 2424–24.