

EFEITO *IN VITRO* DO DERIVADO SEMISSINTÉTICO MC-D7, OBTIDO DE UM BENZILISOTIOCIANATO ISOLADO DA *Moringa oleifera* Lam, EM BIOFILMES DE *Streptococcus mutans*

Maria Tayara Marques de Freitas
Universidade Federal do Ceará
tayaramarques@hotmail.com

Pedro Diniz Rebouças
UniFametro
pedroreboucas@gmail.com

Ramille Araújo Lima
Centro Universitário Christus
ramillelima@yahoo.com.br

Hellíada Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará
hellidachaves@ufc.br

Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará
mirna@ufc.br

Diana Kelly Castro de Almeida
Universidade Federal do Ceará
dianakelly25@hotmail.com

Jair Mafezoli
Universidade Federal do Ceará
jmafez@ufc.br

Francisco Geraldo Barbosa
Universidade Federal do Ceará
fgerhar@gmail.com

Iriana Carla Junqueira Zanin
Universidade Federal do Ceará
irianazanin@gmail.com

RESUMO

Estudos recentes observaram o efeito antitumoral, anti-inflamatório e antinociceptivo do derivado semissintético MC-D7, obtido a partir do benzilisotiocianato isolado da flor *Moringa oleifera* Lam. O efeito antimicrobiano do derivado ainda não foi avaliado. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito inibitório do MC-D7 na adesão e formação de crescimento de biofilmes de *Streptococcus mutans in vitro*. A ação do MC-D7 na inibição da adesão e formação de biofilme por *S. mutans* foi testada pela técnica de quantificação de biomassa através de coloração com cristal violeta. Adicionalmente, o modelo de formação de biofilme em discos de hidroxiapatita foi utilizado para avaliar o efeito do MC-D7 na adesão de *S. mutans* e seu efeito em biofilmes de 24 horas, 48 horas e 120 horas. Para o teste inicial de inibição de adesão, o MC-D7 apresenta efeito inibitório significativo ($p \leq 0,05$) quando placas de poliestireno (0,5 mg/mL e 0,4 mg/mL) e discos de hidroxiapatita (0,5 mg/mL) são usados como substratos após 24 horas de formação de biofilme. MC-D7 tem efeito inibitório na aderência de *S. mutans* nos dois substratos utilizados, necessitando de mais estudos utilizando concentrações maiores do fármaco para avaliar seu efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: Cárie dentária. Biofilme. Produtos naturais. Fitoterapia. *Streptococcus mutans*.

***IN VITRO* EFFECT OF THE SEMI-SYNTHETIC DERIVATIVE MC-D7 OBTAINED FROM A BENZYL-ISOTHIOCYANATE OF *Moringa oleifera* Lam ON *streptococcus mutans* BIOFILMS**

ABSTRACT

Recent studies have observed the antitumor, anti-inflammatory and antinociceptive effect of the semi-synthetic derivative MC-D7, obtained from benzyl-isothiocyanate isolated from the *Moringa oleifera* Lam flower. The antimicrobial effect of the derivative has not yet been evaluated. The aim of the present study is to evaluate the MC-D7 inhibitory effect on adhesion and formation of *Streptococcus mutans* biofilms growth *in vitro*. The action of MC-D7 in the inhibition of adhesion and biofilm formation by *S. mutans* was tested by the biomass quantification technique through staining with violet crystal. Additionally, the biofilm formation model on hydroxyapatite discs was used to assess the effect of MC-D7 on *S. mutans* adhesion and its effect on 24 hours, 48 hours and 120 hours biofilms. For the initial adhesion inhibition test, the MC-D7 shows significant inhibitory

effect ($p \leq 0.05$) when both polystyrene plates (0.5 mg/mL and 0.4 mg/mL), and hydroxyapatite disks (0.5 mg/mL) as used as substrates after 24 hours biofilm formation. MC-D7 has an inhibitory effect on the adherence of *S. mutans* on two substrates used, requiring further studies using larger concentrations of the drug to evaluate its antimicrobial effect.

Key words: Dental caries. Biofilm. Natural products. Phytotherapy. *Streptococcus mutans*.

1. INTRODUÇÃO

A adesão das bactérias orais à película adquirida durante os eventos iniciais da formação da placa dentária é fundamental para o aparecimento da cárie dentária, uma doença biofilme açúcar dependente, decorrente da desmineralização dos tecidos dentários (FEJERSKOV, 2004; NORONHA et al., 2016). Os tratamentos disponíveis para pacientes que sofrem de doenças bucais mediadas por biofilmes envolvem a remoção mecânica e o uso do fio dental (KLEIN et al., 2015), além do uso de antissépticos e antimicrobianos (OBEROI et al., 2015).

Porém, dados relacionados a ensaios *in vitro* indicaram que as células bacterianas em biofilmes estão em estado fisiológico diferente de sua forma planctônica e podem se tornar substancialmente mais resistentes à ação de antibióticos (ASLAM et al., 2018).

Em relação aos antissépticos, o digluconato de clorexidina é considerado padrão ouro na linhaagem de enxaguantes bucais. Porém, alguns efeitos adversos decorrentes do seu uso têm sido observados na literatura (CIEPLIK et al., 2019). Outro fato que preocupa os pesquisadores é que o surgimento de novos medicamentos não acompanha os microrganismos resistentes, proporcionando

grande estímulo para o estabelecimento de programas de administração de antibióticos (ALLERBERGER et al., 2009), bem como a busca por medidas antimicrobianas alternativas, como peptídeos antimicrobianos, compostos naturais, plasma atmosférico ou terapias com luz (CZAPLEWSKI et al., 2016; KARYGIANNI et al., 2016; WAINWRIGHT et al., 2017).

Nesse sentido, os produtos naturais surgiram como uma importante opção terapêutica para a prevenção e tratamento de doenças dependentes de biofilme, apresentando vantagens, como propriedades biológicas, disponibilidade na natureza e baixo custo (ARADA; PEREZ, 2019). Neste contexto, a *Moringa oleifera* Lam (família Moringaceae), tem se destacado por apresentar uma ampla gama de utilizações (SAINI; SIVANESAN; KEUM, 2016). Um estudo recente observou o efeito antiinflamatório e antinociceptivo da molécula semissintética N-[4-(4'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida (MC-D7), obtida a partir de 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi)benzilisotiocianato (MC-1), um benzilisotiocianato isolado das flores da *M. oleifera* Lam. (ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018). O derivado MC-D7 parece não apresentar citotoxicidade em culturas de células humanas (ALMEIDA et al., 2017).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito inibitório do MC-D7 na adesão e formação de crescimento de biofilmes de *Streptococcus mutans in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 3.416.373) por utilizar saliva humana para formação da película adquirida.

2.1 Grupos experimentais

MC-D7 foi obtido a partir de MC-1 isolado de flores de *M. oleifera* Lam, conforme descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018). O derivado MC-D7 foi patenteado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (BR10 2016 030480 6). O composto de teste MC-D7 foi utilizado na concentração de 0,5 mg/mL. O diluente (solução Tween 80 1% e NaCl 0,89%) e um grupo não tratado foram utilizados como controle positivo. O grupo digluconato de clorexidina 0,12% foi utilizado como controle negativo de crescimento do biofilme.

2.2 Preparação do inóculo

O microrganismo utilizado neste estudo foi *Streptococcus mutans* UA159. As bactérias foram semeadas em ágar sangue por 48 horas a 37 °C e 5% de CO². Posteriormente, 8 colônias foram transferidas para meio caldo Triptona Soja

(TSB) (Difco, Detroit, MI, EUA) e extrato de levedura (EL) suplementado com glicose a 1% e foram incubadas por 18 horas conforme descrito acima.

2.3 Formação da película adquirida

A saliva humana foi coletada de dois doadores saudáveis por estimulação com filme flexível (ParafilmM, Pechiney Safety Laboratory Products and Equipment, EUA). Tampão de adsorção (KCl 50 mM, KPO₄ 1,0 mM, CaCl₂ 1,0 mM, MgCl₂ 0,1 mM, pH = 6,5) foi adicionado à saliva na proporção de 1:1 e fluoreto de fenilmetilsulfonil foi adicionado (proporção de 1:1000). Esta solução foi agitada em vórtex e depois clarificada por centrifugação (8500 rpm, 10 min, 4 °C) e filtrada com filtro de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 µm (Stericup, Millipore, EUA) (DUARTE et al., 2008). A saliva resultante foi utilizada para permitir a formação de película salivar nas experiências seguintes.

2.4 Inibição da aderência e inibição da formação de biofilme pelo método do Cristal Violeta

Este teste foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato, de acordo com a metodologia descrita por O'Toole e Kolter (O'TOOLE; KOLTER, 1998). Para avaliar a inibição da aderência, a solução de saliva (100 µL) foi adicionada a cada poço da placa contendo mais 100 µL de cada solução testada e foi mantida por 1 hora em agitador orbital com atmosfera de 5% CO² a 37 °C. Após a formação

da película adquirida na presença das soluções testadas, os poços foram esvaziados por pipetagem e inoculados com 200 µL de caldo TSB contendo extrato de levedura e sacarose a 10% e inoculados com *S. mutans*. Para o ensaio de inibição da formação de biofilme, apenas a solução de saliva filtrada (200 µL) foi adicionada aos poços durante a formação da película adquirida. Em seguida, os poços foram esvaziados por pipetagem e inoculados com 100 µL da solução testada e 100 µL do caldo TSB contendo extrato de levedura e sacarose a 1% inoculado com *S. mutans*. Para ambos os testes, a concentração final nos poços foi de $1-2 \times 10^6$ células bacterianas e as placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 590 nm.

2.5 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição da adesão de *S. mutans* em discos de hidroxiapatita

Os resultados promissores encontrados na inibição de adesão encontrados no experimento anterior fizeram os autores testarem se o MC-D7 teria o mesmo efeito em substratos de hidroxiapatita. Para tanto, foram utilizados discos de hidroxiapatita (63,58 mm²) como substrato para adesão de bactérias em placas de 24 poços para simular uma situação mais próxima da encontrada na cavidade oral humana. (Figura 1A). Para suportar esses discos, foram confeccionados dispositivos de aço inoxidável para simular as forças de gravidade encontradas nos biofilmes dentários (Figura 1B). Antes dos testes, os discos de hidroxiapatita (HA) foram

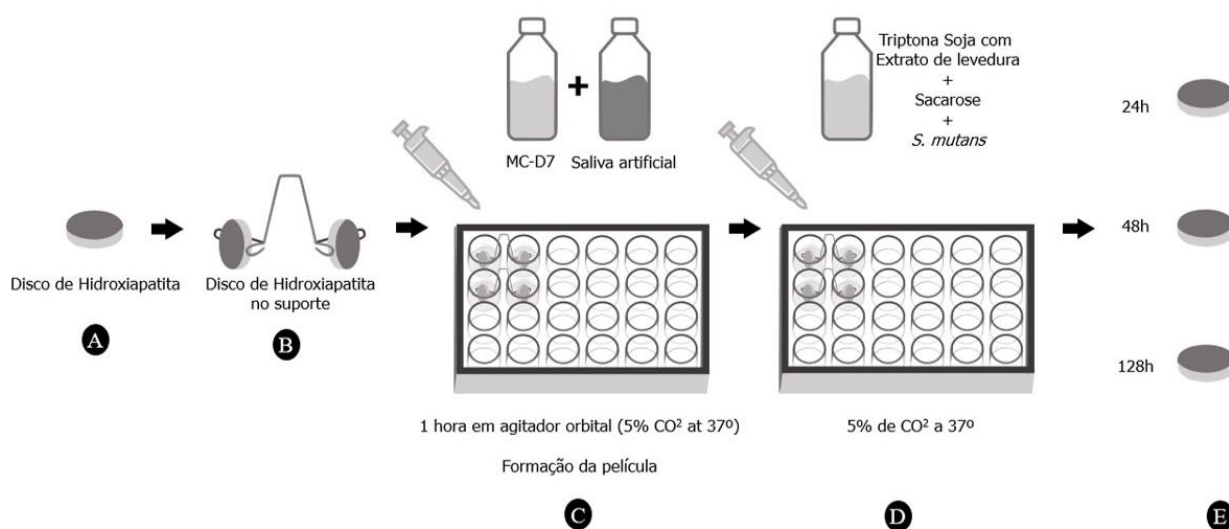
submetidos a banho ultrassônico por 10 minutos e em seguida autoclavados (121 °C, 15 minutos). Para avaliar o efeito do MC-D7 na aderência inicial de *S. mutans*, a mistura de saliva foi adicionada juntamente com os compostos testados na proporção de 1:1 totalizando 2 mLs de líquido em cada poço durante a fase da formação da película adquirida. Para o grupo não tratado foi adicionada apenas saliva. A placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C num agitador orbital (Figura 1C).

Em seguida, aos discos de HA revestidos com saliva, foi adicionado caldo TSB com EL com 1% de sacarose inoculado com *S. mutans* nas placas de 24 poços (Figura 1D). Os biofilmes foram então formados nos discos de HA por 120 horas, sendo o meio de cultura substituído por um novo a cada 24 horas. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Ao final de cada período experimental, os biofilmes maduros foram lavados em solução de NaCl 0,89% e posteriormente coletados com espátulas plásticas descartáveis estéreis. As análises foram realizadas após 24 horas, 48 horas e 120 horas da formação do biofilme (Figura 1E).

Para contagem microbiológica, amostras dos biofilmes formados foram coletadas em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de solução de NaCl 0,89%. O biofilme foi dispensado em um sonicador (Digital Sonifer™ 450 Sonicator, 50/60 Hz, 4A, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA) com 3 pulsos de 10 segundos a 6 watts com intervalo de 1 minuto entre eles em gelo. As suspensões foram então diluídas em séries decimais, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 e plaqueadas em meio BHI Agar. Em seguida, foram

incubados a 37 °C por 48 horas, em atmosfera parcial de 5% de CO². Após o tempo de

Figura 1 - Avaliação experimental da atividade do MC-D7 na inibição da adesão de *Streptococcus mutans* em discos de hidroxiapatita. (A) Discos de hidroxiapatita como substrato para adesão de bactérias. (B) Discos sobre suporte - dispositivos de aço inoxidável foram confeccionados para simular as forças de gravidade encontradas nos biofilmes dentários. (C) Formação adquirida de película salivar. (D) Formação de biofilme. (E) Plaqueamento da amostra.



Fonte: Autor (2023).

incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), e o número de UFC/mg de biofilme foi estabelecido após determinação do peso seco de cada amostra (DUARTE et al., 2008).

2.6 Análise estatística

Triplicatas de pelo menos três experimentos separados foram conduzidos em cada um dos ensaios. Unidades formadoras de colônias (UFC) para análise de biofilme após 24 horas, 48 horas e 120 horas de formação foram transformadas em UFC log₁₀, com o objetivo de reduzir a heterogeneidade de variância. Para o teste de microdiluição em caldo, foi considerada significativa redução de 80% ou mais no

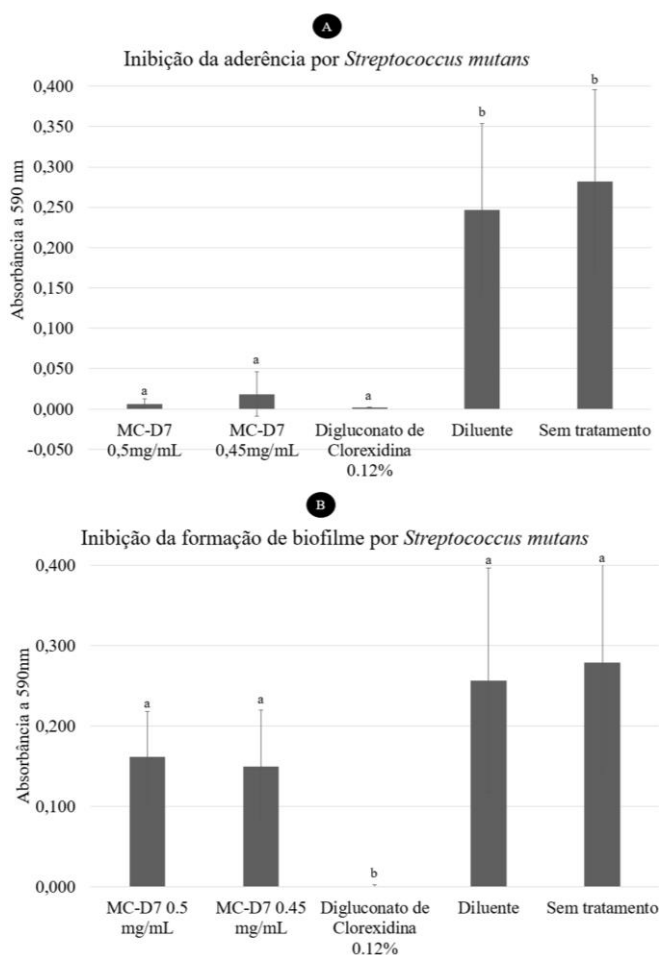
crescimento quando comparado ao controle. A distribuição de normalidade foi verificada pelo teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. Para análise das diferenças entre os grupos foi realizado o teste ANOVA com pós-teste de Tukey sendo considerado nível de significância inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o IBM SPSS (Statistics for Windows, Versão 20.0. Armonk Software, NY ou GraphPad Prism 6, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

Os resultados de inibição da aderência e inibição da formação de biofilme pelo método de coloração violeta cristal demonstraram interferência significativa do MC-D7 na inibição

da adesão inicial da bactéria $0,0063 \pm 0,0058$ (Figura 2A), apresentando resultados semelhantes aos encontrados pelo digluconato de clorexidina 0,12% grupo $0,002 \pm 0,0002$. Por outro lado, na avaliação da formação de biofilme não houve diferença estatística entre todos os grupos testados (Figura 2B).

Figura 2 - Gráfico da atividade do MC-D7 na inibição da adesão de *S. mutans* (A) e na inibição da formação do biofilme de *S. mutans* após 24 horas da formação do biofilme, utilizando o método de coloração Cristal Violeta. Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. $p \leq 0,05$ (ANOVA; pós teste Tukey).



Fonte: Autor (2023).

A avaliação da atividade do MC-D7 na inibição da adesão de *S. mutans* na superfície do

disco de Hidroxiapatita em biofilmes com 24 horas, 48 horas e 120 horas pode ser observada na Figura 3. O MC-D7 reduziu significativamente a viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes de $1,65 \times 10^8 (\pm 1,26 \times 10^7)$ no grupo não tratado a $1,79 \times 10^7 (\pm 1,93 \times 10^6)$ no grupo 0,5 mg/mL MC-D7 somente após 24 horas da formação do biofilme. Como esperado, o tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% inibiu completamente a formação do biofilme de *S. mutans*. A inibição da adesão por *S. mutans* não foi observada em biofilmes mais antigos e mais complexos com 48 e 120h nas condições testadas (Figuras 3B e 3C). O efeito do MC-D7 no peso seco do biofilme também pode ser encontrado na figura 3A–3C. A concentração de 0,5 mg/mL reduziu significativamente o peso seco nas 24 horas e 48 horas de formação do biofilme.

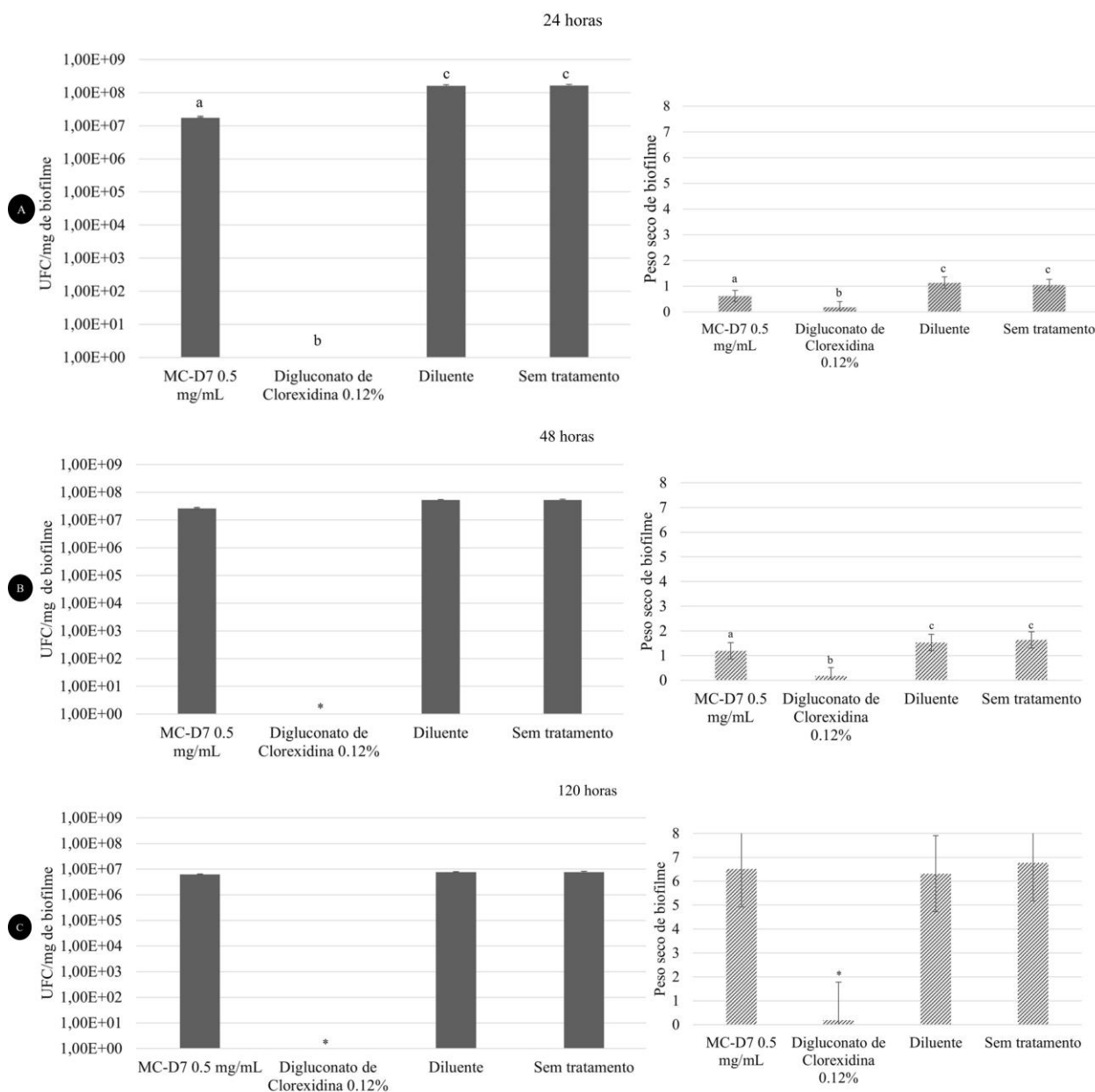
4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito do derivado semissintético MC-D7 na inibição da adesão de *S. mutans* (utilizado durante a formação da película adquirida) e na inibição da formação de biofilme (utilizado após a formação da película adquirida). Este é o primeiro estudo *in vitro* que avalia seu efeito na inibição da adesão e formação de biofilme de *Streptococcus mutans*.

Ao avaliar publicações que testam antimicrobianos, devemos observar se estamos estudando seus efeitos em culturas planctônicas ou em biofilmes, pois as células bacterianas em biofilmes podem se tornar substancialmente mais resistentes à ação de antissépticos e antibióticos

(ASLAM et al., 2018). Além disso, tendo em conta o problema crescente da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, seria valioso o uso de uma abordagem alternativa à qual as bactérias não consigam ganhar resistência.

Figura 3 - Resultado microbiológico do tratamento com MC-D7 na inibição da adesão de *S. mutans* e quantidade de peso seco de biofilme formado após 24 horas (A), 48 horas (B) e 120 horas (C) de formação de biofilme. Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O * representa um valor de $p < 0,01$.



Fonte: Autor (2023).

Em nosso estudo optamos por utilizar um composto isolado, pois sua capacidade de reprodutibilidade nos permite testar suas diferentes propriedades, diferentemente dos extratos que podem ser afetados pela sazonalidade (SONI; BRAR; GAUTTAM, 2015; MABAPA; AYISI; MARIGA, 2018). A

utilização de produtos naturais para esse fim seria uma alternativa viável devido à grande quantidade e diversidade disponível na natureza, também pelo seu baixo custo, acessibilidade e fácil manuseio. Porém, apesar da crença popular de que os produtos naturais não causam efeitos colaterais, deve-se ter cuidado com a quantidade

de produto utilizado *in natura* (BALBINO; DIAS, 2010). No caso do MC-D7, pelo fato de ser um composto semissintético derivado de um produto natural puro, com seus componentes sempre na mesma concentração, esse risco pode ser minimizado.

Jwa (JWA, 2019) investigou o efeito antimicrobiano e antibiofilme de extratos aquosos e etanólicos de folhas de *M. oleifera* em *S. mutans*. Em seu estudo utilizou as concentrações de 6,25 µg/mL e 25 µg/mL e seus resultados mostraram que os extratos possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme, sendo o extrato etanólico mais eficaz, confirmando que as folhas de *M. oleifera* podem ser candidatas potenciais para prevenir a formação de lesões cariosas. Embora Jaw (JWA, 2019) tenha testado o efeito antimicrobiano de *M. oleifera* Lam. contra biofilmes de *S. mutans*, apenas extratos aquosos e etanólicos foram testados e a limitação do fator sazonalidade deve ser levada em consideração quando a reprodutibilidade dos resultados for analisada.

O teste de coloração do cristal violeta é um indicativo de formação de biofilme. Quando da utilização do MC-D7 durante a formação da película adquirida, foi observada redução significativa na formação de biofilme de *S. mutans* após 24h, nas concentrações testadas de MC-D7 de 0,5 mg/mL como encontrada para digluconato de clorexidina 0,12%, demonstrando potencial antiplaca desse fármaco, possivelmente por bloquear os sítios de ligação de moléculas presentes na película adquirida. Padla e colaboradores (PADLA et al., 2012) também avaliaram em seus estudos, o efeito antimicrobiano de dois compostos obtidos a

partir de isotiocianatos presentes em *M. oleifera* Lam. Os resultados encontrados demonstraram efeito em todas as bactérias Gram-positivas testadas na concentração inibitória mais baixa de 1 mg/mL por meio do teste de difusão em ágar.

No presente estudo foram utilizados discos de hidroxiapatita como substrato para adesão de *S. mutans*, para simular situação semelhante à encontrada na cavidade oral. Suportes metálicos foram utilizados para simular as forças da gravidade enfrentadas pelas bactérias presentes nos biofilmes dentais humanos. Para este substrato foi observada redução significativa na viabilidade microbiana e no peso seco com 24 horas de formação, o que não ocorreu quando um biofilme mais complexo já estava estabelecido. O efeito observado nas primeiras horas de formação do biofilme sugere que o MC-D7 parece necessitar de manutenção constante da concentração do fármaco para que o efeito desejado aconteça, o que não ocorreu em nosso estudo. Além disso, houve uma redução significativa na quantidade de peso seco do biofilme de *S. mutans* 24 horas e 48 horas formado nos discos de hidroxiapatita após o tratamento com MC-D7, sugerindo que o composto testado tem efeito na redução da biomassa do biofilme cariogênico.

Finalmente, o MC-D7 demonstrou inibir eficazmente a adesão de *S. mutans* durante os estágios iniciais de formação de biofilmes. O fato deste composto ser derivado de um produto puro e natural torna improvável a interferência da sazonalidade nesta formulação. Assim, maiores concentrações do medicamento, tratamento diário e formulações alternativas do medicamento podem melhorar seu efeito

antiplaca, tornando provável sua aplicação em enxaguantes bucais.

4. CONCLUSÃO

A molécula semissintética MC-D7, obtida a partir de um composto isolado de *Moringa oleifera* Lam, demonstra efeito inibitório na adesão e peso seco do biofilme de *Streptococcus mutans* por 24 horas. Mais estudos são necessários para melhorar seu efeito antiaderente.

REFERÊNCIAS

- ALLERBERGER, F. et al. Antibiotic stewardship implementation in the EU: The way forward. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 10, p. 1175–1183, 2009.
- ALMEIDA, D. et al. New semisynthetic derivatives of a benzylisothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* and evaluation of their cytotoxic activity. **Química Nova**, v. 40, n. 10, p. 1186–1190, 2017. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6684&nomeArquivo=AR20170231.pdf>.
- ARADA, J.; PEREZ, Z. PHYTOTHERAPY IN DENTISTRY: SURVEY OF PRODUCTS OF PLANT ORIGIN FOR HEALTH ORAL. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 1, n. 3, p. 35–40, 29 ago. 2019. Disponível em: <<https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/9>>.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Pharmacovigilance: a step towards the rational use of herbs and herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 3310–3319, 2010.
- CIEPLIK, F. et al. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 587, 22 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00587/full>>.
- CZAPLEWSKI, L. et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 239–251, 2016.
- DOS SANTOS, A. O. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and toxicological evaluation of semi-synthetic molecules obtained from a benzyl-isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* Lam. in a temporomandibular joint inflammatory hypernociception model in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, n. December 2017, p. 609–618, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.102>>.
- DUARTE, S. et al. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 3, p. 206–212, 2008.
- FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries : Consequences for Oral Health Care. **Caries Research**, v. 38, p. 182–191, 2004.
- JWA, S. K. Efficacy of moringa oleifera leaf extracts against cariogenic biofilm. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 308–312, 2019.
- KARYGIANNI, L. et al. Natural antimicrobials and oral microorganisms: A systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–17, 2016.
- KLEIN, M. I. et al. *Streptococcus mutans*- derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and infection microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1–8, 2015.
- MABAPA, M. P.; AYISI, K. K.; MARIGA, I. K. Seasonal effect on *Moringa oleifera* gaseous exchange and water use efficiency under diverse planting densities Seasonal effect on *Moringa oleifera* gaseous exchange and water use efficiency under diverse planting densities. **Journal of applied and Food quality**, v. 91, p. 219–225, 2018.
- NORONHA, M. dos S. et al. Effect of Fluoride Concentration on Reduction of Enamel Demineralization According to the Cariogenic Challenge. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 4, p. 393–398, 2016.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple , convergent signalling pathways : a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449–461, 1998.
- OBEROI, S. S. et al. Antibiotics in dental practice : how justifi ed are we. **International Dental Journal**, v. 65, n. 1, p. 4–10, 2015.

PADLA, E. P. et al. Antimicrobial Isothiocyanates from the Seeds of *Moringa oleifera* Lam. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 67, n. 11–12, p. 557–564, 2012.

SAINI, R. K.; SIVANESAN, I.; KEUM, Y. S. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–14, 2016.

SONI, U.; BRAR, S.; GAUTTAM, V. K. Effect of Seasonal Variation on Secondary Metabolites of Medicinal Plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 9, p. 3654–3662, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6>>.

WAINWRIGHT, M. et al. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e49–e55, 2017.

Maria Tayara Marques de Freitas

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia na Universidade Federal do Ceará

Pedro Diniz Rebouças

Docente do Curso de Odontologia na UniFametro

Ramille Araújo Lima

Docente do Curso de Odontologia na Unichristus

Hellíada Vasconcelos Chaves

Docente do Curso de Odontologia na Universidade Federal do Ceará

Mirna Marques Bezerra

Docente do Curso de Medicina na Universidade Federal do Ceará

Diana Kelly Castro de Almeida

Docente da Rede Estadual do Ceará

Jair Mafezoli

Docente do curso de Química na Universidade Federal do Ceará

Francisco Geraldo Barbosa

Docente do curso de Química na Universidade Federal do Ceará

Iriana Carla Junqueira Zanin

Docente do Curso de Odontologia na Universidade Federal do Ceará
