



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**MARIA TAYARA MARQUES DE FREITAS**

**EFEITO DO DERIVADO SEMISSINTÉTICO MC-D7, OBTIDO DA *Moringa oleifera*  
Lam., NA INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA E DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR  
*Streptococcus mutans* - ESTUDO *IN VITRO***

**FORTALEZA**

**2019**

MARIA TAYARA MARQUES DE FREITAS

EFEITO DO DERIVADO SEMISSINTÉTICO MC-D7, OBTIDO DA *Moringa oleifera*  
Lam., NA INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA E DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR  
*Streptococcus mutans* - ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M319e Marques de Freitas, Maria Tayara.  
Efeito do derivado semissintético MC-D7, obtido da Moringa oleifera Lam., na inibição de aderência e de formação de biofilme por *Streptococcus mutans* : Estudo in vitro / Maria Tayara Marques de Freitas. – 2019.  
52 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.
1. Placa dental. 2. Cárie dentária. 3. Moringa oleifera. I. Título.

CDD 617.6

---

MARIA TAYARA MARQUES DE FREITAS

EFEITO DO DERIVADO SEMISSINTÉTICO MC-D7, OBTIDO DA *Moringa oleifera*  
Lam., NA INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA E DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR  
*Streptococcus mutans* - ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos. (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr Francisco Geraldo Barbosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Ramille Araújo Lima  
Unichristus

À Deus, que é o Senhor de tudo.

À minha família, que me apoiou em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, por meio do seu Magnífico Reitor **Henry de Holanda Campos** e do vice-reitor **Custódio Luís Silva de Almeida**.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de sua diretora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage** e vice-diretora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Karina Bezerra Pinheiro**.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Ceará, **Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia** e sua vice-coordenadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Sá Roriz Fonteles**.

À Coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Karine Macedo Teixeira** e sua vice-coordenadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alynne Vieira de Menezes**.

À **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)**, pela concessão de bolsa durante o período do mestrado.

Aos funcionários da coordenação do PPGO, **Joana Karla de Assis Pinheiro** e **Rafael Maia Reis**, pela dedicação e disponibilidade em ajudar no que for preciso.

A todos os **funcionários e servidores** do Curso de Odontologia da UFC, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao técnico do laboratório de pesquisa da pós-graduação, **David Queiroz de Freitas**, por sempre ter me ajudado a solucionar os problemas que apareciam pelo caminho e por trazer leveza aos dias no laboratório.

À banca, composta pelos professores **Francisco Geraldo Barbosa** e **Ramille Araújo lima** por terem aceitado o convite, pelo tempo dedicado e pelas considerações.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, o Criador de todas as coisas, que sempre caminha comigo, que está sempre me ajudando, dando-me forças e me protegendo de todo mal. Sou grata por me permitir vencer mais essa etapa em minha vida

Aos meus pais, **Miguel Elizeu de Freitas** (*in memorium*) e **Maria Claudia Marques de Freitas**, por me ensinarem que nada se conquista com facilidade e por sempre terem feito o possível para que eu tivesse uma boa formação e por serem meu maior exemplo.

À minha irmã, **Ana Taline Marques de Freitas**, por ter feito tudo por mim, inclusive aguentado os meus dias de estresse, pelas esperas na faculdade e por todo o apoio na vida, sempre.

À minha família, em especial minha tia **Maria Cláudia Marques Magalhães** e meu primo **Lucas Silveira Rocha**, que sempre vibraram à cada conquista.

À minha tão querida Orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos**, por todo apoio, conhecimento transmitido, hospitalidade, confiança, paciência, amizade e pela oportunidade que me foi dada, ainda na graduação. A senhora é uma inspiração, tanto como pesquisadora e professora, quanto pessoa.

À professora **Hellíada Vasconcelos Chaves**, por ter disponibilizado a droga teste utilizada para realização desse trabalho.

À amiga **Luciana Maria Arcanjo Frota**, por ter me incentivado e ajudado em vários momentos desta caminhada, mas o mais importante, por sempre me lembrar o quanto devemos confiar em Deus e acreditar que Ele está sempre cuidando de tudo.

À amiga **Iana Sá de Oliveira**, um grande presente do mestrado, por toda a amizade, apoio e incentivo nesses dois anos.

À amiga **Myrna Maria Arcanjo Frota**, por sempre ser uma pessoa solícita e por ter me ajudado tanto, em vários momentos, seja pela hospitalidade ou pelos bons conselhos.

À amiga **Ramille de Araújo Lima**, um exemplo desde a iniciação científica, por todo o ensinamento e paciência, principalmente na reta final dos meus experimentos.

À amiga **Tamara de Abreu Sousa**, por todo o apoio e amizade, principalmente no período da seleção do doutorado, e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao amigo **Pedro Diniz Rebouças**, pela ajuda na análise estatística do trabalho e por sempre ser tão solícito.

À amiga **Ludimila Gomes Pinheiro**, por toda a ajuda durante os experimentos em Sobral/Fortaleza, pelas conversas e, principalmente, pela amizade.

À amiga **Talyta Teixeira Soares**, pela hospitalidade e pela amizade de sempre.

Ao amigo, **Ruliglésio Rocha**, pela ajuda em vários momentos, seja tirando dúvidas sobre metodologias, nas coletas de biofilme ou pelos conselhos e palavras de animação, que sempre vinham em boa hora.

Às técnicas do laboratório de Imunologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará *campus* Sobral, **Rafaela Mesquita Bastos Cavalcante** e **Nayara Alves Sousa**, respectivamente, pela ajuda nos experimentos.

Às alunas **Laís Aragão Lima**, **Stéffani Vasconcelos Santos**, **Ana Larissa Ximenes Batista** e **Fernanda Freitas Sousa** por toda a ajuda durante a realização dos experimentos e por tornarem o ambiente mais alegre.

Aos amigos do grupo de pesquisa, **Hellén Súzany Freire Silva**, **Ádália Samara Gadêlha de Holanda**, **Daniela Nunes Pinto**, **Paula Ventura Silveira**, **Roberto Haniery Pontes Alves**, pela amizade, companhia e apoio, seja ajudando nos experimentos ou tirando quaisquer dúvidas a respeito da metodologia.

Aos colegas do programa de pós-graduação, em especial à **Marcela Maria Rocha Lima**, **Sarah Florindo de Figueiredo Guedes**, **Ernanda Maria Almeida Sales**, **Diana Araújo Cunha**, **Amanda Mourão Ley**, **Francisca Livia Parente Viana**, **Helaine Cajado Alves** e **Sussan Daniela Salazar Segales**, pela amizade e por toda a ajuda.



## RESUMO

Nos últimos anos, temos observado o crescente interesse das indústrias farmacêuticas pelo desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, principalmente aquelas derivadas de fontes naturais, uma vez que o surgimento de novos medicamentos não acompanha o surgimento de microrganismos resistentes. Diante disso, a espécie *Moringa oleifera* Lam. tem se destacado por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas, ação anti-inflamatória, diurética, antimicrobiana, antioxidante, hipoglicemiante, hipolipidêmica, anticancerígena e anti-hipertensiva. Estudos recentes observaram o efeito antitumoral, anti-inflamatório e antinociceptivo do derivado semissintético **MC-D7**, obtido de um benzil-isotiocianato isolado da flor da *M. oleifera* Lam.. O efeito antimicrobiano desse derivado ainda não foi avaliado. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito antimicrobiano do **MC-D7**, bem como seu efeito na inibição de aderência e de formação de biofilme por *Streptococcus mutans* UA159 formados *in vitro*. Para avaliação da atividade antimicrobiana do composto em células planctônicas foi utilizado método de difusão em Ágar e microdiluição em caldo. No que diz respeito à formação de biofilme, a ação do **MC-D7** na inibição de aderência e na inibição da formação de biofilme por *S. mutans* foi inicialmente testada pela técnica de quantificação da biomassa por meio de coloração com cristal violeta com 24h de formação. Adicionalmente, o modelo de formação de biofilme sobre discos de hidroxiapatita também foi utilizado para avaliar o efeito do **MC-D7** na aderência inicial de biofilme por *S. mutans* durante 24h, 48h e 120h. Os resultados demonstraram que o **MC-D7** não apresentou efeito antimicrobiano nas concentrações testadas (0,5 mg/mL a 0,00248 mg/mL). Para o teste de inibição da aderência inicial, o **MC-D7** apresentou efeito inibitório significativo ( $p \leq 0,05$ ) para placas de poliestireno nas concentrações 0,5 mg/mL, 0,45 mg/mL e 0,4 mg/mL, e discos de hidroxiapatita na concentração de 0,5 mg/mL, com 24h de formação de biofilme. Portanto, pode-se concluir que o **MC-D7** apresentou um efeito inibitório na aderência de *S. mutans* nos dois substratos utilizados, sendo necessário outros estudos utilizando maiores concentrações da droga a fim de confirmar seu efeito antimicrobiano.

**Palavras-chave:** Placa dental; Cárie dentária; *Moringa oleifera*.

## ABSTRACT

In recent years, we have observed the growing interest of the pharmaceutical industry for the development of new antimicrobial drugs, especially those derived from natural sources, since the emergence of new drugs does not accompany the emergence of resistant microorganisms. *Moringa oleifera* Lam. has been shown a broad spectrum of biological activities, among them, anti-inflammatory, diuretic, antimicrobial, antioxidant, hypoglycemic, hypolipidemic, anticancer and antihypertensive action. Recent studies have observed the antitumor, anti-inflammatory and antinociceptive effect of the **MC-D7**, a semisynthetic derivative obtained from a benzylisothiocyanate isolated from the flower of *M. oleifera* Lam.. The antimicrobial effect of this derivative has not yet been evaluated. The objective of the present study is to evaluate the antimicrobial effect of **MC-D7** as well as its effect on inhibition of adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans* UA159 formed *in vitro*. To evaluate the antimicrobial activity of the compound in planktonic cells, a diffusion method was used in Agar and broth microdilution. As regards biofilm formation, the action of **MC-D7** on the inhibition of adhesion and inhibition of biofilm formation by *S. mutans* was initially tested by the technique of quantification of the biomass by means of violet crystal staining with 24h formation. Additionally, the biofilm formation model on hydroxyapatite discs was also used to evaluate the effect of **MC-D7** on the initial adherence of biofilm by *S. mutans* for 24h, 48h and 120h. The results showed that **MC-D7** showed no antimicrobial effect at the concentrations tested (0,5 mg/mL to 0.0024 mg/mL). For the initial adhesion inhibition test, **MC-D7** showed a significant inhibitory effect ( $p \leq 0.05$ ) for polystyrene plates at concentrations 0,5 mg/mL, 0.45 mg/mL and 0.4 mg/mL, and for hydroxylapatite disks at a concentration of 0,5 mg/mL, with 24 hours of biofilm formation. Therefore, it can be concluded that **MC-D7** had an inhibitory effect on the adherence of *S. mutans* in the two substrates used, although other studies were necessary using higher concentrations of the drug in order to confirm its antimicrobial effect.

**Key-words:** Dental plaque; Dental caries; *Moringa oleifera*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química do digluconato de clorexidina.....	17
Figura 2 -	Aspectos das flores da <i>Moringa oleifera</i> Lam..	19
Figura 3 -	Colonização bacteriana da película adquirida.....	21
Figura 4 -	Estrutura química do <i>N</i> -[4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida ( <b>MC-D7</b> ) .....	24
Figura 5-	Esquema ilustrativo de teste de Difusão em Ágar.....	26
Figura 6 -	Esquema ilustrativo do teste de Microdiluição em caldo.....	27
Figura 7 -	Imagem ilustrativa de dispositivo metálico e disco de hidroxiapatita utilizado no experimento.....	31
Figura 8 -	Método de difusão em disco tratado com <b>MC-D7</b> e digluconato de clorexidina 0,12%.....	36
Figura 9 -	Gráfico do efeito inibitório do <b>MC-D7</b> após 24h de crescimento de <i>S. mutans</i> , testado em diferentes concentrações.....	34
Figura 10 -	Gráfico da atividade do <b>MC-D7</b> na inibição de aderência de <i>S. mutans</i> após 24h de formação de biofilme, pelo método de coloração com CV.....	38
Figura 11 -	Gráfico da atividade do <b>MC-D7</b> na inibição de formação de biofilme de <i>S. mutans</i> após 24h de formação, pelo método de coloração com CV.....	38
Figura 12 -	Resultado microbiológico do tratamento com <b>MC-D7</b> na inibição da aderência de <i>S. mutans</i> após 24h de formação de biofilme.....	39
Figura 13 -	Resultado microbiológico do tratamento com <b>MC-D7</b> na inibição da aderência de <i>S. mutans</i> após 48h de formação de biofilme.....	40
Figura 14 -	Resultado microbiológico do tratamento com <b>MC-D7</b> na inibição da aderência de <i>S. mutans</i> após 120h de formação de biofilme.....	40
Figura 15 -	Quantidade de peso seco de biofilme formado após 24, 48 e 120 horas de formação.....	41

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Descrição dos grupos experimentais utilizados para o teste de CV.....	28
Quadro 2 -	Descrição dos grupos experimentais utilizados para avaliação da aderência inicial sobre biofilmes de <i>S. mutans</i> formados sobre discos de HA.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Articulação Temporomandibular
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BR	Brasil
Ca <sup>2+</sup>	Cátion cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CHX	Digluconato de Clorexidina
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CV	Cristal Violeta
EL	Extrato de Levedura
EUA	Estados Unidos da América
GtfB	Glicosiltransferase B
GtfC	Glicosiltransferase C
GtfD	Glicosiltransferase D
GTFs	Enzimas Glicosiltransferases
GTFs	Glicosiltransferases
H <sub>2</sub> O	Água
HA	Discos de Hidroxiapatita
HCT-116	Linhagem tumoral do adenocarcinoma do cólon
HL-60	Linhagem tumoral da leucemia
K <sup>+</sup>	Cátion potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KPO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MC-1	4-[(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato
MC-D7	<i>N</i> -[4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil) hidrazina-1-carbotioamida
MFC	Extrato de clorofórmio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

P.A	Puro para Análise
PC-3	Linhagem tumoral do câncer de próstata
PEC	Polissacarídeos Extracelulares
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfônico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SF-295	Linhagem tumoral do glioma
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
ST	Sem Tratamento
THF	Tetraidrofurano
TSB	Tryptic Soy Broth
UA159	Sorotipo C de <i>Streptococcus mutans</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
g	Gramas
mL	Militro
h	Horas
°C	Grau Celsius
L	Litros
mg	Miligrama
min	Minuto
μL	Microlitro
®	Marca registrada
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
p	Significância estatística
<	Menor que
≤	Menor ou igual
μg	Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
<b>2.1 Biofilme e cárie dentária</b> .....	20
<b>2.3 <i>Moringa oleifera</i> Lam.</b> .....	22
<b>3 OBJETIVO</b> .....	26
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	27
<b>4.1 Droga utilizada</b> .....	27
<i>4.1.1 Síntese do derivado MC-D7 (N-[4-(4'-O-acetil-<math>\alpha</math>-L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida) a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil-<math>\alpha</math>-L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]</i> .....	27
<b>4.2 Cepa padrão e condições de cultura</b> .....	28
<b>4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana em culturas planctônicas</b> .....	28
<i>4.3.1 Método de difusão em Ágar</i> .....	28
<i>4.3.2 Teste de microdiluição em caldo</i> .....	29
<b>4.4 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência e da formação de biofilme por <i>S. mutans</i></b> .....	30
<i>4.4.1 Grupos experimentais</i> .....	31
<i>4.4.2 Formação da película adquirida</i> .....	31
<i>4.4.3 MC-D7 na inibição de aderência de <i>S. mutans</i></i> .....	31
<i>4.4.4 MC-D7 na inibição de formação de biofilme por <i>S. mutans</i></i> .....	32
<i>4.4.5 Quantificação da biomassa pelo método de Coloração com Violeta de Cristal</i> .....	32
<b>4.5 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência de <i>S. mutans</i> em hidroxiapatita</b>	32
<i>4.5.1 Preparo dos espécimes</i> .....	33



4.5.2 Formação da película adquirida sobre discos de Hidroxiapatita.....	33
4.5.3 Formação dos biofilmes in vitro sobre discos de HA.....	34
4.5.4 Análise da composição microbiana dos biofilmes.....	34
4.5.5 Determinação do peso seco do biofilme.....	35
4.6 Análise estatística.....	35
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Atividade da antimicrobiana em culturas planctônicas.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência e da formação de biofilme por <i>S. mutans</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência de <i>S. mutans</i> em hidroxiapatita.....</b>	<b>39</b>
<b>5.4 Peso seco do biofilme.....</b>	<b>41</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>51</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes bacterianos podem ser definidos como agregados de microrganismos, nos quais as células são frequentemente incorporadas a uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares que se tornam aderidas entre si e a uma superfície sólida (FLEMMING *et al.*, 2016). Na cavidade oral existe uma grande diversidade anatômica com estruturas interdependentes que tornam o desenvolvimento dos biofilmes interessante, com os dentes constituindo superfícies favoráveis à formação e maturação desses biofilmes, tanto na região supragengival como na região subgengival (MARSH, 1994).

Ao biofilme bacteriano formado naturalmente na superfície dos dentes, damos o nome de placa dental. Essa placa apresenta composição bacteriana e bioquímica que pode variar em decorrência de fatores intrínsecos e extrínsecos ao hospedeiro. Na verdade, os microrganismos não se depositam ou aderem diretamente à superfície do esmalte dental, mas se ligam a uma fina camada acelular composta por proteínas salivares e outras macromoléculas que recobrem as superfícies dentárias denominadas de película adquirida (MARSH, 2010).

A adesão das bactérias orais a esta película durante os eventos iniciais da formação da placa dentária é fundamental para o surgimento da cárie dentária, que é um problema de saúde comum entre crianças e adolescentes, podendo ser encontrada frequentemente na prática clínica diária e continua sendo um dos mais importantes problemas de saúde pública no país, apesar de sua prevalência ter diminuído em todo o mundo (BRASIL, 2012; MARCENES *et al.*, 2013).

O biofilme dental é colonizado por uma comunidade bacteriana complexa, porém existem evidências de que a presença de *Streptococcus mutans* esteja diretamente relacionada a estágios iniciais da formação de lesões de cárie em humanos (LOESCHE, 1986; MATTOS-GRANER; KLEIN; SMITH, 2014). Esse microrganismo, mesmo quando presente em baixo número, parece desempenhar um papel principal na orquestração da montagem inicial da matriz do biofilme cariogênico permitindo que, em seguida, outras bactérias residentes relevantes se tornem dominantes à medida que o biofilme amadurece. Assim, os *S. mutans* continuam sendo organismos indicadores adequados para explorar propriedades de virulência cariogênica, bem como podem ser utilizados para estudo de novos agentes antimicrobianos (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018).

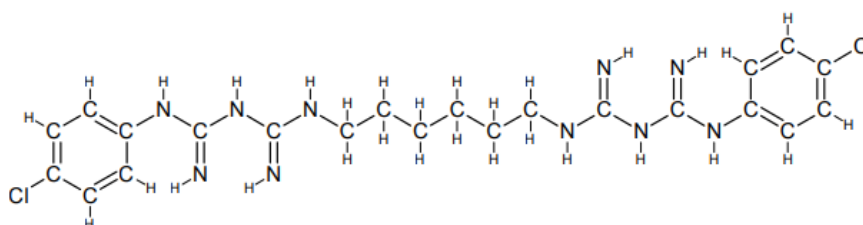
Os *S. mutans* possuem a habilidade de degradar rapidamente carboidratos fermentáveis advindos da dieta, promovendo a formação de ácido (acidogênicos), além da sua capacidade de tolerar ambientes com baixo pH (acidúricos) (KLEIN *et al.*, 2015). Além disso, apresentam também alta afinidade pela superfície dentária mediada pela presença de polissacarídeos

extracelulares e adesinas que contribuem para a sua patogenicidade (KOO; FALSETTA; KLEIN, 2013). Desta forma, na presença de sacarose, *S. mutans* passam a sintetizar enzimas glicosiltransferases (GTFs B, C e D) cuja ação integrada é essencial para adesão celular ao dente (COLBY; RUSSELL, 1997).

Os tratamentos disponíveis para pacientes que sofrem de doenças orais mediadas por biofilmes envolvem a remoção mecânica, o uso de antissépticos e antimicrobianos (DE FREITAS *et al.*, 2017). No entanto, dados relacionados a ensaios *in vitro* têm indicado que células bacterianas em biofilmes estão em um estado fisiológico diferente da sua forma planctônica e podem se tornar substancialmente mais resistentes à ação de antibióticos (ARAÚJO *et al.*, 2014). Isso se dá devido a alguns fatores, dentre eles, a deficiente penetração e difusão dos antibióticos através da matriz polissacarídica estável, a adsorção dos antibióticos na matriz exopolimérica, a produção de enzimas inativadoras dos antibióticos, a resposta fisiológica dos microrganismos ao ambiente químico heterogêneo existente nos biofilmes e um aumento da expressão de bombas de efluxo presentes na célula (COSTA; JUNIOR, 2017).

Em relação aos antissépticos utilizados no controle de doenças relacionadas a presença de biofilme na cavidade oral, o digluconato de clorexidina cuja estrutura pode ser observada na Figura 1, tem efetiva ação contra placa bacteriana, gengivite e é biocompatível com os tecidos bucais, sendo considerado padrão-ouro na linhagem dos antissépticos bucais. Após o bochecho com clorexidina, a mesma exerce ação na cavidade oral por aproximadamente 12 horas, inibindo a colonização e aderência dos microrganismos nos elementos dentários. No entanto, tem sido observado na literatura alguns efeitos adversos do uso do digluconato de clorexidina, tais como alteração na coloração dos elementos dentários, restaurações, próteses e língua, formação de cálculo supragengival, perda do paladar, queimaduras no tecido mole, dor, xerostomia, e gosto residual desagradável na boca (PEGORARO *et al.*, 2014).

Figura 1 – Estrutura química do digluconato de clorexidina.



Fonte: PUBCHEM, 2008

Devido a esses efeitos adversos do digluconato de clorexidina, cada vez mais tem surgido o interesse de desenvolver substâncias que sejam capazes de substituir o uso da mesma, e aliado ao surgimento de resistência aos antimicrobianos, as indústrias farmacêuticas estão buscando o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, visto que o surgimento de novos medicamentos não acompanha a velocidade de surgimento de microrganismos resistentes, fato esse que é motivo de preocupação entre os pesquisadores. A maioria dos antibióticos disponíveis atualmente são derivados de estruturas básicas introduzidas entre a década de 1930 e o final da década de 1960, e as novas gerações de antibióticos são, em sua grande maioria, resultados de modificações químicas periféricas desses arcabouços antigos. Nesse contexto, o interesse da indústria farmacêutica pelo desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais, principalmente aqueles de origem vegetal, está crescendo em todo o mundo (MORALEZ; CALDAS, 2010).

Cerca de 75% da população mundial utiliza as plantas medicinais no tratamento de enfermidades devido às características desejáveis associadas ao uso, como eficácia e baixo custo. Elas têm sido utilizadas na assistência primária à saúde com excelentes resultados em muitos países da América Latina, Europa e extensamente na Ásia, em razão da presença de substâncias ativas como taninos, alcaloides, compostos fenólicos, óleos essenciais e vitaminas (MORALEZ; CALDAS, 2010; WHO, 2013)

Nesse contexto, *Moringa oleifera* Lam., uma planta pertencente à família Moringaceae, tem se destacado por apresentar um amplo campo de utilidades, como por exemplo, potenciais aplicações em medicamentos, preparações alimentícias funcionais, purificação de água e produção de biodiesel (SAINI; SIVANESAN; KEUM, 2016). Dentre as atividades biológicas de *M. oleifera* Lam., se destacam a capacidade hepatoprotetora, antiespasmódica, anti-inflamatória, diurética, antimicrobiana, antioxidante, hipoglicemiante, hipolipidêmica, anticancerígena e anti-hipertensiva (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Essa planta é nativa do Nordeste da Índia, mas tornou-se naturalizada em áreas tropicais e subtropicais do todo o mundo devido sua capacidade de crescer em solo úmido e quente, terras secas e solos menos férteis (ALMEIDA *et al.*, 2017). Na figura 2, pode ser observado as flores da *M. oleifera* Lam..

Figura 2 – Aspectos das flores da *Moringa oleifera* Lam..



Fonte: Silva, 2018.

Recentemente, Dos Santos e colaboradores (2018) observaram o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de moléculas semissintéticas obtidas de um benzil-isotiocianato isolado da flor de *M. oleifera* Lam., que foi patenteado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil como **MC-D7** (BR10 2016 030480 6). O composto também não apresentou citotoxicidade em culturas de células humanas (ALMEIDA *et al.*, 2017). Apesar desses resultados positivos encontrados, não há estudos na literatura avaliando o potencial antimicrobiano do **MC-D7** contra microrganismos orais.

Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano do **MC-D7** em culturas planctônicas de *S. mutans*, bem como seu efeito em biofilmes de *S. mutans* formados em placas e poliestireno e discos de hidroxiapatita.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Biofilme e cárie dentária

Os biofilmes podem ser definidos como um conjunto de microrganismos firmemente aderidos à uma superfície, e englobados por uma matriz polissacarídeos extracelulares (PEC) produzidos pelos próprios microrganismos (FLEMMING *et al.*, 2016). As bactérias inseridas nos biofilmes passam a exibir características fisiológicas distintas comparadas às mesmas, quando crescidas em forma planctônica, o que resulta no aumento da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos (SVENSATER *et al.*, 2001).

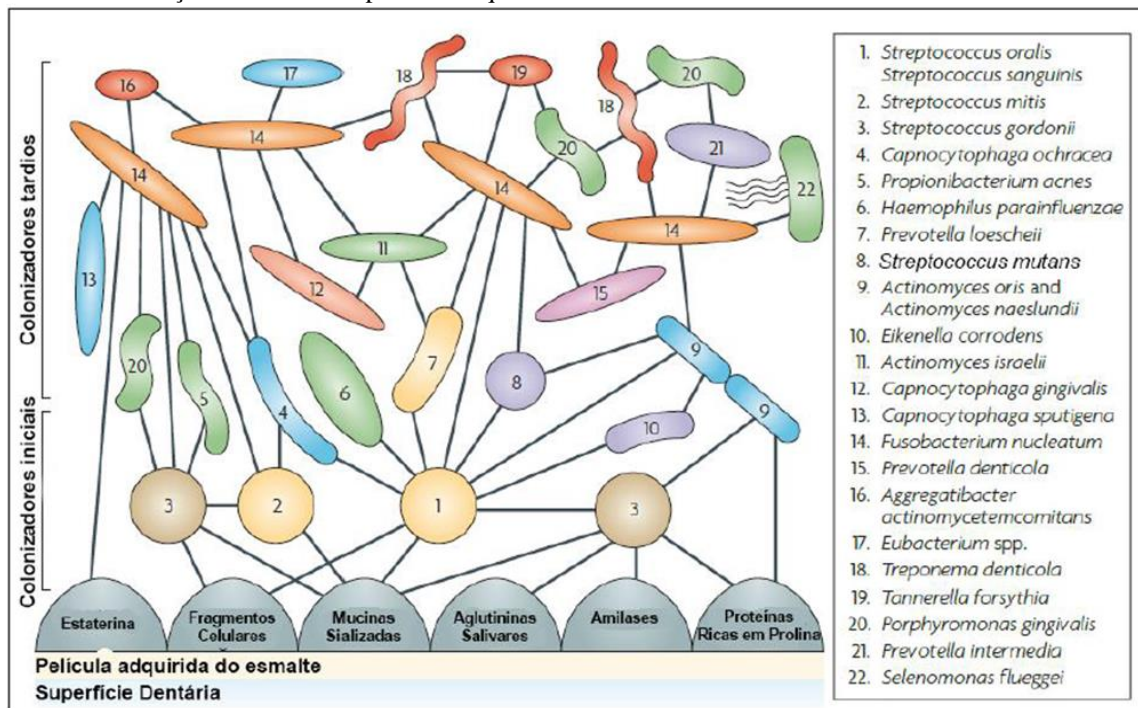
A cavidade oral humana é colonizada por diversas bactérias, tendo mais de 700 espécies identificadas em amostras de biofilme oral (AAS *et al.*, 2005). Sendo composta por diferentes estruturas anatômicas, como dentes, língua, bochechas, sulco gengival e outras, essa cavidade propicia um ambiente diversificado para a colonização bacteriana (DEWHIRST *et al.*, 2010; KOLENBRANDER *et al.*, 2010), e o biofilme formado sobre a superfície dos dentes pode ser chamado de placa dentária (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015).

O primeiro passo para o desenvolvimento do biofilme sobre a superfície dos dentes, é a formação da película adquirida, que ocorre imediatamente após a erupção ou a remoção mecânica do biofilme dentário por meio da escovação. Essa película é uma estrutura rica em proteínas e glicoproteínas, como estatinas, mucinas, aglutininas, alfa-amilase e prolinas, oriundas da saliva e do fluido crevicular gengival. Essa película, ao aderir à superfície dental, modifica a carga dessa superfície favorecendo a adesão de microrganismos. Trata-se de uma interação direta entre moléculas bacterianas e receptores da película que favorecem uma colonização primária (KOLENBRANDER *et al.*, 2010; MARSH, 2010).

Inicialmente, apenas algumas espécies bacterianas são capazes de aderir à película adquirida e são mantidas próximas à superfície de forma reversível, através de forças físico-químicas. As bactérias colonizadoras iniciais, principalmente estreptococos como *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*, apresentam adesinas que podem se ligar a receptores complementares na película adquirida para tornar essa adesão irreversível favorecendo a proliferação dessas espécies pioneiras. O metabolismo dos primeiros colonizadores modifica o ambiente local tornando-o mais anaeróbico após seu consumo de oxigênio. À medida que o biofilme se desenvolve, as adesinas na superfície celular de colonizadores secundários mais exigentes, tais como anaeróbios obrigatórios, ligam-se a receptores de bactérias já ligadas por um processo denominado, coesão ou coagregação, e a composição do biofilme torna-se mais

diversificada e complexa. As bactérias aderidas produzem polímeros extracelulares que formam a matriz da placa e favorecem a fixação do biofilme. Essa matriz de PEC também apresenta função de armazenar nutrientes e água, além de proteger as bactérias da resposta imune do hospedeiro e agentes antimicrobianos (KOLENBRANDER *et al.*, 2010; MASH, 2010). A figura abaixo representa um esquema organizacional referente à estruturação em biofilmes das bactérias que residem em ambiente oral (Figura 3).

Figura 3 - Colonização bacteriana da película adquirida.



Fonte: traduzido de Kolenbrander *et al.*, 2010.

A composição de espécies em um determinado local de um biofilme oral estabelecido é caracterizada por um grau de estabilidade ou equilíbrio entre as espécies componentes. Essa estabilidade reflete um estado altamente dinâmico em que as proporções individuais das espécies estão em equilíbrio graças às muitas interações sinérgicas e antagônicas. Devido a alguma mudança substancial em determinado parâmetro crítico nesse local, essa estabilidade pode ser quebrada, resultando em um aumento do número de componentes anteriormente menores da comunidade, podendo apresentar como consequência, o desenvolvimento de uma doença na cavidade oral (MARSH, 2010; BOWEN, 2016)

A cárie dentária pode ser definida como uma doença biofilme-açúcar dependente em que ocorre uma mudança ecológica no ambiente do biofilme dentário, ocasionada e mantida pelo acesso frequente a carboidratos fermentáveis advindos da dieta (TENUTA; CURY, 2010; SHEIHAM; JAMES, 2015). A transição do ambiente promove a substituição de

microrganismos de baixa cariogenicidade por microrganismos de alta cariogenicidade, que são capazes de sobreviver em meio ácido, e de produzir ácidos, através desses carboidratos causando um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização, levando à perda de mineral nos tecidos duros dentários podendo resultar clinicamente em uma lesão cariiosa (FEJERSKOV; KIDD, 2008).

Apesar da prevalência de cárie ter diminuído em todo o mundo, essa doença ainda é um problema de saúde bucal entre crianças e adolescentes podendo ser encontrada frequentemente na prática clínica diária sendo considerada ainda, a principal responsável pela perda dentária entre adultos e idosos (BRASIL, 2012; MARCENES *et al.*, 2013).

Existem evidências consideráveis de que a presença de *Streptococcus mutans* esteja diretamente relacionada aos estágios iniciais da formação das lesões de cárie em humanos (LOESCHE, 1986; MATTOS-GRANER, KLEIN, SMITH, 2014). Isso se dá devido a sua presença em altos níveis imediatamente antes do surgimento das lesões, a sua habilidade em rapidamente degradar carboidratos fermentáveis promovendo a formação abundante de ácido, além da sua capacidade de tolerar ambientes com baixo pH. Adicionalmente, *S. mutans* tem alta afinidade pela superfície dentária mediada pela presença de adesinas e polissacarídeos extracelulares que contribuem para a sua patogenicidade (SENADHEERA *et al.*, 2005).

Além do que foi citado acima, os *S. mutans*, na presença de sacarose, passam a sintetizar enzimas GTFs (GtfB, GtfC e GtfD). As GTFs quebram a molécula de sacarose em glicose e frutose. A GtfB sintetiza principalmente glucano insolúvel em água, a GtfC sintetiza glucanos solúveis e insolúveis em água, e a GtfD sintetiza glucanos solúveis em água. Os glucanos sintetizados promovem adesão e coesão de células bacterianas, levando à formação de microcolônias e modulando os processos iniciais de formação de um biofilme cariogênico (KOO *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2014).

### **2.3 *Moringa oleifera* Lam.**

*Moringa oleifera* Lam. é uma planta originária da Índia, pertencente à família Moringaceae, composta por apenas um gênero (*Moringa*) e quatorze espécies. Trata-se de uma planta perene, de crescimento rápido que pode frutificar no seu primeiro ano de vida. Pode ser encontrada em diversos países tropicais de baixa altitude e se encontra amplamente distribuída nos países da Ásia, Oriente médio e da África, podendo ser encontrada também na América Central e América do Sul (SILVA *et al.*, 2018). No Brasil, essa espécie foi introduzida por volta de 1950, podendo ser encontrada na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão,



Piauí e Ceará e é conhecida também como “Lírio Branco” e “Quiabo de Quina” (SILVA *et al.*, 2018).

O uso dessa planta é bastante diversificado, sendo considerada uma das árvores cultivadas mais úteis para o ser humano, já que praticamente todas as suas partes (folhas, flores, frutos, caule, semente e raízes) podem ser utilizadas (SILVA *et al.*, 2018). No ramo alimentício e nutricional, suas folhas são uma grande fonte de nutrientes, destacando-se as vitaminas A, B, C e E, flavonoides, potássio (K<sup>+</sup>) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (ALMEIDA *et al.*, 2017). A partir de suas folhas, é desenvolvida uma farinha que é utilizada para combater a desnutrição, em especial das crianças. Além das folhas, também podem servir de alimento tanto as vagens verdes, que pode ser consumidas cozidas, como as sementes maduras, que podem ser torradas (CHAWLA; SAXENA; SESHADRI, 1988; SILVA *et al.*, 2018)

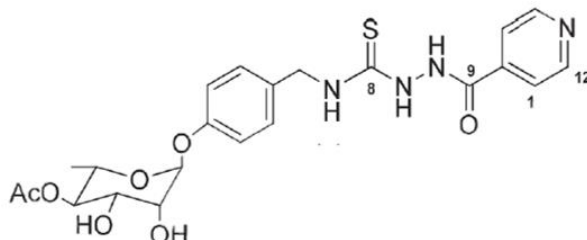
*Moringa oleifera* Lam. também possui uso industrial pois a partir de suas sementes, é obtido um óleo que é utilizado para lubrificação de relógios e outras máquinas, bem como na produção de perfumes (MORTON, 1991). Outro uso de *Moringa oleifera* Lam. é na purificação da água uma vez que suas sementes podem ser utilizadas como um coagulante natural, retirando a coloração e a turbidez da água e tornando-a viável pra consumo sem alterar o pH ou o sabor da mesma (MUNIZ; DUARTE; OLIVEIRA, 2015).

Como uso medicinal, *M. oleifera* Lam está relacionada a diversas atividades biológicas tais como apresentar potencial antiulcerativo, hipocolesterolêmica, hipotensora vascular, bradicárdica, antifúngica, antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, antiespasmódica, diurética, capacidade hepatoprotetora, antioxidante, hipoglicemiante, hipolipidêmica, anticancerígena e anti-hipertensiva (FERREIRA *et al.*, 2009; CHEENPRACHA *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2017).

Nas folhas, sementes, flores e frutos de *M. oleifera* Lam., são encontrados polissacarídeos fenólicos, os glucosinolatos, também chamados de glucomoringinas. Esses compostos sofrem hidrólise através da enzima mirosinase formando glucosinolatos, que são precursores de isotiocianatos (CHEENPRACHA *et al.*, 2010). Almeida e colaboradores, em 2017, avaliaram moléculas semissintéticas obtidas de um benzil-isotiocianato isolado da flor da *M.oleifera* Lam., dentre os quais se destaca o derivado *N*-[4-(4'-*O*-acetil- $\alpha$ -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida (**MC-D7**), cuja estrutura química pode ser observada na figura 4. Em seus estudos, eles observaram que o **MC-D7** apresentou resultados satisfatórios para ensaios de citotoxicidade contra as linhas celulares tumorais SF-295, HL-60, HCT-116 e PC-3. Posteriormente, foi observado que o mesmo,

reduziu a nocicepção e a inflamação induzida pela formalina na articulação temporomandibular (ATM) de ratos (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 4 – Estrutura química do *N*-[4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida (MC-D7).



Fonte: Almeida *et al.*, 2017.

Em relação à atividade antitumoral de *M. oleifera* Lam., existem alguns estudos *in vitro* na literatura avaliando esse potencial, e os resultados existentes sugerem que a mesma apresenta propriedades potencialmente anticancerígenas. Um dos primeiros estudos avaliando tal efeito, foi realizado com compostos obtidos a partir de um extrato etanólico desenvolvido a partir de sementes dessa planta, mostrando que os compostos de isotiocianato são potentes inibidores de tumor (GUEVARA *et al.*, 1999). Os extratos de diclorometano derivado de folhas da *Moringa oleifera* Lam. também apresentam atividade anticancerígena *in vitro* contra carcinoma hepatocelular humano, adenocarcinoma colorretal e adenocarcinoma de mama, sem efeitos tóxicos nos fibroblastos humanos (CHAROENSIN, 2014). Estas propriedades anticancerígenas podem ser atribuídas aos compostos bioativos presentes nestes extratos.

A atividade anti-inflamatória de *M. oleifera* Lam. foi relatada em alguns estudos, como o de CÁCERES *et al.*, (1992), em que foi utilizado extrato de raízes desta espécie., e foi observada uma redução do desenvolvimento de edema na pata de ratos, com resultados semelhantes aos obtidos pela fenilbutazona. Muitos compostos bioativos como a quercetina, outros flavonoides e ácidos fenólicos, parecem estar envolvidos na atividade anti-inflamatória desta planta (CÁCERES *et al.*, 1992).

Em relação ao efeito antimicrobiano dessa planta, vários estudos *in vitro* demonstraram atividade inibitória de extratos obtidos a partir de raízes, folhas, flores, vagens e sementes em bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*) (NIKKON *et al.*, 2003; BUKAR; UBA; OYEYI, 2010). Acredita-se que o potencial antimicrobiano dessa planta esteja associado ao biocomposto benzilisotiocianato, que inibe o crescimento bacteriano, interrompendo os

mecanismos de síntese de membrana e enzimas. Além disso, a atividade antibacteriana dos extratos de *Moringa oleifera* Lam. também é atribuída ao ácido gálico e aos taninos, saponinas, e compostos fenólicos, como os flavonoides, que têm atividade inibitória (PADLA *et al.*, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o efeito do composto **MC-D7** na inibição de aderência e de formação de biofilme por *Streptococcus mutans* UA159.

#### Objetivos Específicos

- Estabelecer se **MC-D7** apresenta efeito inibitório ou bactericida sobre suspensões de *S. mutans* UA159;
- Avaliar o efeito de **MC-D7**, na aderência inicial e na formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159 formados *in vitro* em placas de poliestireno e discos de hidroxiapatita.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Droga utilizada

A droga utilizada neste estudo foi o composto **MC-D7** (BR10 2016 030480 6), molécula semissintética derivada a partir do produto natural 4-[(4'-*O*-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato (**MC-1**), sintetizada no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica em parceria com o Laboratório de Fitoquímica, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob coordenação do professor Francisco Geraldo Barbosa. A droga foi diluída na concentração padrão inicial de 1 mg/mL em solução de NaCl (0,89%) contendo 1% de Tween 80. A partir dessa concentração padrão, foram feitas diluições seriadas de 0,9 a 0,0048 que foram utilizados nos ensaios experimentais. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos (número de cadastro A13AE61 – ANEXO A).

*4.1.1 Síntese do derivado MC-D7 (N-[4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida) a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]*

O produto natural 4-(4'-*O*-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato (**MC-1**) foi obtido a partir de flores de *Moringa oleifera* Lamarck (291 g) oriundas do horto de plantas medicinais Prof. José de Abreu Matos da UFC, Campus do Pici, que, após coletadas, foram secas em uma estufa a uma temperatura de 60 °C por 24h, para a total eliminação de água. Em seguida o material foi extraído com clorofórmio (1 L) durante 48h e o solvente foi removido sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, para a obtenção do respectivo extrato.

Após filtração, o solvente foi removido por vácuo produzindo 3,78 g de extrato de clorofórmio (MFC). O MFC foi submetido a cromatografia em coluna sobre coluna de sílica gel (70-270 Mesh), utilizando hexano (1,1 L), acetato de etilo (0,8 L) e metanol (0,5 L) como eluentes. A subfração eluída com acetato de etilo (1,97 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (70-270 Mesh) utilizando misturas de hexano/EtOAc com polaridade crescente. Este procedimento produziu uma subfração enriquecida com o composto 1 (862 mg), que foi submetido a cromatografia flash utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc (7:3 a 5:5) e proporcionou o composto puro (600 mg; 15,87% de rendimento). 4-(4'-*O*-acetil- $\alpha$ -L-ramnosiloxi)benzilisotiocianato (**MC-1**) (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Para a obtenção de *N*-[4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, o produto natural 4-[(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato foi colocado em um balão de fundo redondo 10mL e à ele foi adicionado 30,0 mg em 2 mL THF anidro e seguido da adição de 24 mg de isoniazida. A mistura da reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por Cromatografia em camada delgada. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em coluna. O rendimento do produto purificado foi de 78% (ALMEIDA *et al.*, 2017).

## 4.2 Cepa padrão e condições de cultura

A bactéria utilizada nesta pesquisa foi o *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC, Manassas, Virgínia, EUA). Para seu cultivo, 08 colônias obtidas a partir do crescimento de um estoque em BHI Ágar (Infusão de cérebro e coração), suplementado com 5% de sangue de carneiro estéril, foram inoculadas em 9 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) - (Difco, Detroit, Michigan, EUA) suplementado com extrato de levedura e 1mL de glicose a 10% por 18h, em estufa a 37°C, sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) (Forma™ 310 Direct-Heat, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA).

## 4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana em culturas planctônicas

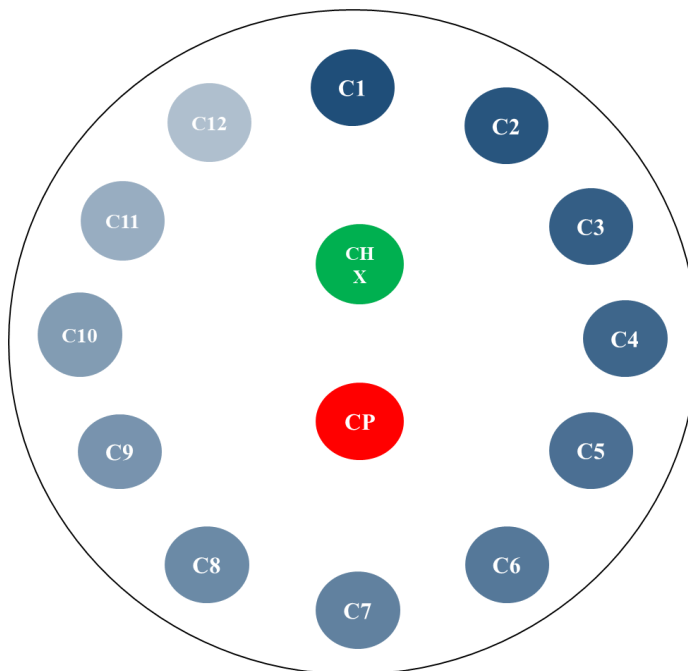
### 4.3.1 Método de difusão em Ágar

Para realização desse teste, o **MC-D7** foi diluído em solução de NaCl a 0,89% contendo 1% de Tween 80 nas concentrações abaixo: 1 mg/mL, 0,9 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,001 mg/mL. As concentrações citadas acima são representadas na figura 2 (C1 à C12). Foram utilizados discos de papel de filtro impregnados com 5  $\mu$ L de **MC-D7** em todas as concentrações citadas anteriormente.

Após as 18 horas de crescimento de *S. mutans* em caldo TSB com adição de extrato de levedura (EL), 1 mL foi colocado em placa de BHI Ágar sendo devidamente espalhada com o auxílio de uma alça Drigalsk descartável estéril. Em seguida, os discos de papel de filtro impregnados com o **MC-D7** nas concentrações citadas, foram posicionados na placa e incubados por 48h a 37° C, com atmosfera parcial de 5% de CO<sub>2</sub> (CLSI, 2014).

A atividade antibacteriana do **MC-D7** foi verificada pela comparação de suas zonas de inibição de crescimento tendo o Digluconato de Clorexidina 0,12% (CHX) como controle positivo e o diluente da substância teste como controle negativo.

Figura 5 – Esquema ilustrativo de teste de Difusão em Ágar.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3.2 Teste de microdiluição em caldo

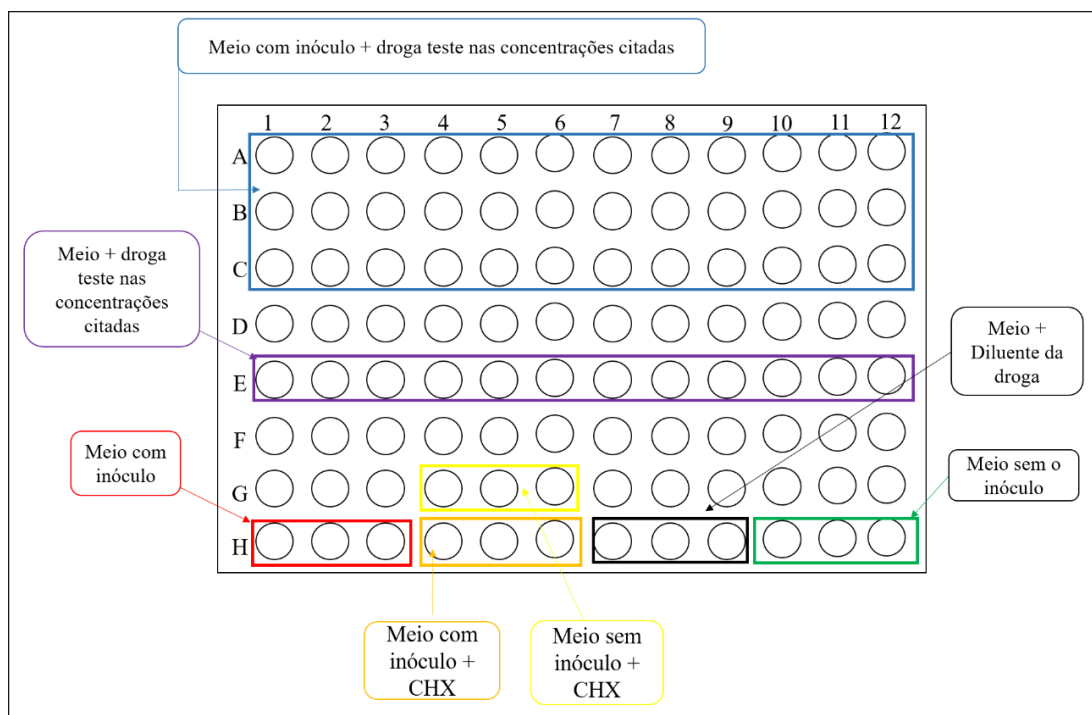
Após 18h de crescimento o caldo de cultura de *S. mutans* UA159 foi ajustado a fim de obter uma cultura na concentração de  $1-2 \times 10^6$  células. Esse cálculo foi obtido por espectrofotometria baseados nos dados prévios de uma curva de crescimento bacteriano para esse microrganismo (dados não apresentados) e o teste de microdiluição em caldo foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços de fundo em “U” (CLSI, 2014).

Para o referido teste, foram realizadas diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações finais (0,25 a 0,0024 mg/mL). Cada poço da placa foi preenchido com 100  $\mu$ L do meio de cultivo adicionado de bactéria na proporção de 1:20 e 100  $\mu$ L do **MC-D7** nas diferentes concentrações testadas. Poços contendo 100  $\mu$ L meio de cultivo sem bactéria e 100  $\mu$ L de **MC-D7** nas diferentes concentrações foram utilizados como controles. Adicionalmente, foram feitos controles positivos e negativos do crescimento bacteriano

utilizando respectivamente meios de cultivos inoculados e não inoculados. O esquema da placa preparada pode ser visualizado na figura 6.

As placas foram incubadas a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 24 h. Após incubação, foi realizada a medida de turbidez de cada poço com o auxílio do espectrofotômetro (Biotrak II Place, American Biosciences, Cambridge, Inglaterra) a 620 nm. Foi considerado a CIM (Concentração Mínima Inibitória), a menor concentração de **MC-D7** capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano (CLSI,2014). Após a medição feita com o espectrofotômetro, os poços que apresentaram inibição foram plaqueados, a fim de obter a CBM (Concentração Bactericida Mínima).

Figura 6 – Esquema ilustrativo do teste de Microdiluição em caldo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência e da formação de biofilme por *S. mutans*

Para a avaliação do efeito do **MC-D7** sobre a aderência inicial e sobre a formação de biofilme de *S. mutans* UA159, foram testadas as concentrações de 0,5 mg/mL, 0,45 mg/mL e 0,4 mg/mL de **MC-D7** pelo método de coloração do biofilme de 24h com cristal de violeta. Esse ensaio foi realizado tendo como substrato placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.



#### 4.4.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram distribuídos de acordo com o quadro 1.

Quadro 1 – Descrição dos grupos experimentais utilizados para o teste de CV.

Código	Descrição
C1	MC-D7 na concentração de 0,5 mg/mL
C2	MC-D7 na concentração de 0,45 mg/mL
C3	MC-D7 na concentração de 0,4 mg/mL
CHX	Digluconato de Clorexidina 0,12% - Controle positivo
TWEEN	Tween 80 (1%) e Solução salina 0,89% - Diluente da droga
ST	Não foi tratado com nenhuma droga - Controle negativo

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4.2 Formação da película adquirida

A película adquirida foi formada a partir de saliva humana clarificada diluída em tampão de adsorção. A saliva foi coletada de 1 doador saudável (em jejum de 12 h e sem escovar os dentes) por estimulação com filme flexível (Parafilm M® Pechiney Plastic Packaging, Akron, Ohio, EUA). O tampão de adsorção (KCl 50 mM, KPO<sub>4</sub> 1,0 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,0 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,1 mM, pH = 6,5) foi adicionado à saliva na proporção de 1:1 e o fluoreto de fenilmetilsulfônico – PMSF, na proporção de 1:1000. Após leve agitação, a solução foi clarificada por centrifugação (Centrífuga refrigerada - NT 815, Novatécnica, Piracicaba, SP, Brasil) a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4°C e filtrada a vácuo com um filtro de poro 0,22 µm (Stericup Millipore, St. Louis, MO, EUA) (DUARTE *et al.*, 2006).

#### 4.4.3 MC-D7 na inibição de aderência de *S. mutans*

Para avaliação do efeito do MC-D7 sobre a inibição da aderência de *S. mutans* à película adquirida, a droga foi adicionada durante a etapa de formação da película adquirida. Para tanto, a saliva artificial foi adicionada juntamente com os diferentes compostos testados (C1, C2, C3, TWEEN e CHX) na proporção de 1:1 em um volume final de 200 µL. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa durante 1h a 37°C sobre uma mesa agitadora orbital (Te-145 Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Decorrido o tempo de formação da película adquirida, os poços foram esvaziados por pipetagem e inoculados com caldo TSB contendo extrato de

levedura e sacarose a 10% adicionados de *S. mutans* de maneira que a concentração final nos poços era de  $1-2 \times 10^6$  células bacterianas. As placas foram então incubadas por 24h, em estufa a 37°C, sob pressão parcial de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4.4 MC-D7 na inibição de formação de biofilme por *S. mutans*

Para avaliação do efeito do **MC-D7** sobre a inibição da formação de biofilmes de *S. mutans in vitro*, a droga foi adicionada após a etapa de formação da película adquirida. Para tanto, a película adquirida foi formada pela adição de 200 uL de saliva artificial nos poços da placa de poliestireno e incubação em estufa durante 1h a 37 °C sobre uma mesa agitadora orbital (Te-145 Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Decorrido o tempo de formação da película adquirida, os poços foram esvaziados por pipetagem e inoculados com 100 uL dos compostos testados (C1, C2, C3, TWEEN e CHX) e 100 uL do caldo TSB contendo extrato de levedura e sacarose a 10% adicionados de *S. mutans* de maneira que a concentração final nos poços era de  $1-2 \times 10^6$  células bacterianas. As placas foram então incubadas por 24h, em estufa a 37 °C, sob pressão parcial de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4.5 Quantificação da biomassa pelo método de Coloração com Violeta de Cristal

O método de quantificação por coloração com Cristal Violeta foi realizado de acordo com a metodologia descrita por O'Toole e Kolter, 1998, com algumas modificações. Após as 24 horas de incubação a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril e em seguida foi adicionado 200 µL de álcool metílico P.A a fim de fixar o biofilme. Após a retirada do álcool, 200 µL de cristal violeta a 0,1% foram adicionados por 10 minutos. Esse processo foi realizado para permitir uma quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração com cristal violeta. Em seguida, o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada, sob temperatura ambiente, para secagem. Para a dissolução do corante preso ao biofilme, foram adicionados 200 µL de ácido acético 33% por 10 minutos. A suspensão obtida foi transferida para outra placa de 96 poços estéril, e a medida da absorbância de cada poço foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro (Biotrak II Place, American Biosciences, Cambridge, Inglaterra) à 590 nm.

### 4.5 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência de *S. mutans* em hidroxiapatita

#### 4.5.1 Preparo dos espécimes

Discos de hidroxiapatita (63,58 mm<sup>2</sup>) foram utilizados como substrato para a aderência das bactérias nesta etapa a fim de simular uma situação mais próxima à da encontrada na cavidade bucal dos humanos. Para suporte desses discos, foram confeccionados dispositivos de aço inoxidável a fim de simular as forças de gravidade encontradas nos biofilmes dentais. Antes dos testes, os discos de Hidroxiapatita (HA) foram submetidos a um banho ultrassônico durante 10 minutos para remover o pó de hidroxiapatita e em seguida foram autoclavados a 121 °C, durante 15 minutos. Os grupos experimentais desta etapa estão descritos no quadro 2.

Quadro 2 – Descrição dos grupos experimentais utilizados para avaliação da aderência inicial sobre biofilmes de *S. mutans* formados sobre discos de HA.

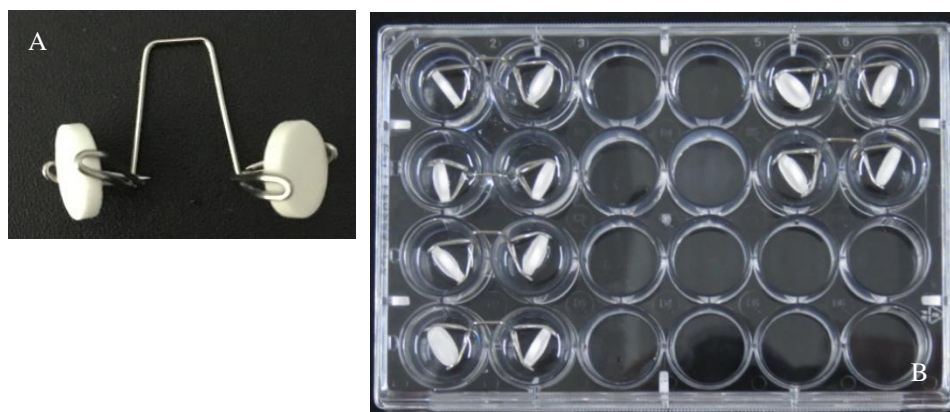
<b>Código</b>	<b>Descrição</b>
<b>C1</b>	<b>MC-D7</b> na concentração de 0,5 mg/mL
<b>C2</b>	<b>MC-D7</b> na concentração de 0,25 mg/mL
<b>CHX</b>	Digluconato de Clorexidina 0,12% - Controle positivo
<b>TWEEN</b>	Tween 80 (1%) e Solução salina 0,89% - Diluente da droga
<b>ST</b>	Não será tratado com nenhuma droga - Controle negativo

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5.2 Formação da película adquirida sobre discos de Hidroxiapatita

A saliva artificial foi formada como descrito anteriormente. Para a formação da película adquirida foram utilizadas placas de poliestireno de 24 poços e os discos de HA foram posicionados verticalmente com a ajuda de um dispositivo metálico (Figura 7). Para avaliação do efeito do **MC-D7** sobre a aderência inicial do *S. mutans*, a saliva foi adicionada juntamente aos compostos testados (C1, C2, CHX e TWEEN) na proporção de 1:1 totalizando 2 mL de líquido em cada poço a fim de garantir que toda a superfície do disco de HA ficasse imerso. Para o grupo ST, foi adicionado apenas saliva. Em seguida, a placa foi incubada em estufa durante 1h a 37°C sobre uma mesa agitadora orbital, imediatamente antes da inoculação das amostras.

Figura 7 – Imagem ilustrativa de dispositivo metálico e disco de hidroxiapatita utilizado no experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A) Suporte de aço com disco de Hidroxiapatita posicionado. B) Discos de Hidroxiapatita posicionado na placa de 24 poços.

#### 4.5.3 Formação dos biofilmes *in vitro* sobre discos de HA

Para a inoculação dos discos foi utilizado 100  $\mu$ L de um caldo de cultura de *S. mutans* UA159 com 18h de crescimento, 45 mL de meio de cultivo (TSB + EL) e 5mL de sacarose a 10%. Esse caldo foi agitado e 2 mL da suspensão foram adicionados a uma nova placa de 24 poços estéril. Foram feitos controles de contaminação do experimento não inoculados. Decorrido o tempo de formação da película adquirida, os discos foram transferidos para essa nova placa contendo meio de cultivo e bactéria. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 5 dias em repouso. A cada 24h o meio de cultivo foi trocado sem adição de novo inóculo. As placas foram retiradas da estufa após 24h, 48h ou 120h de formação do biofilme. Os discos de todos os grupos foram lavados 3 vezes em solução de NaCl a 0,89%, a fim de remover o biofilme fracamente aderido e em seguida foram coletados com espátulas plásticas descartáveis estéreis para subsequente análise.

#### 4.5.4 Análise da composição microbiana dos biofilmes

Para a contagem microbiológica, as amostras dos biofilmes formados foram coletados em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,89%. O biofilme foi dispenso em sonicador (Sonicador Digital Sonifer™ 450, 50/60Hz, 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 série decimal de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 e plaqueadas em placas de BHI Ágar. Em seguida, foram incubadas na

temperatura de 37 °C, por 48 horas, em atmosfera parcial de 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido o tempo de incubação, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada, e o número de UFC/mg de peso seco de biofilme foi estabelecido após a determinação do peso seco de cada amostra (DUARTE *et al.*, 2006).

#### 4.5.5 Determinação do peso seco do biofilme

Para a determinação do peso seco do biofilme de cada tratamento, etanol a -20°C foi adicionado à amostra (3 vezes do volume do puro), e estes foram armazenados na geladeira -20°C por 18h. No dia seguinte, foi realizada a centrifugação (3500 rpm durante 10 minutos a 4°C), os sobrenadantes foram descartados, e os “pellets” resultantes foram lavados com 1 mL de etanol frio e transferidos para microtubos de 1,5 mL pré-pesados (um para cada unidade experimental). Em seguida, o conteúdo foi novamente centrifugado, o excesso de álcool foi cuidadosamente removido por pipetagem, e os microtubos foram colocados em uma dessecadora a vácuo por 48h após o que, foram pesados novamente (DUARTE *et al.*, 2006).

#### 4.6 Análise estatística

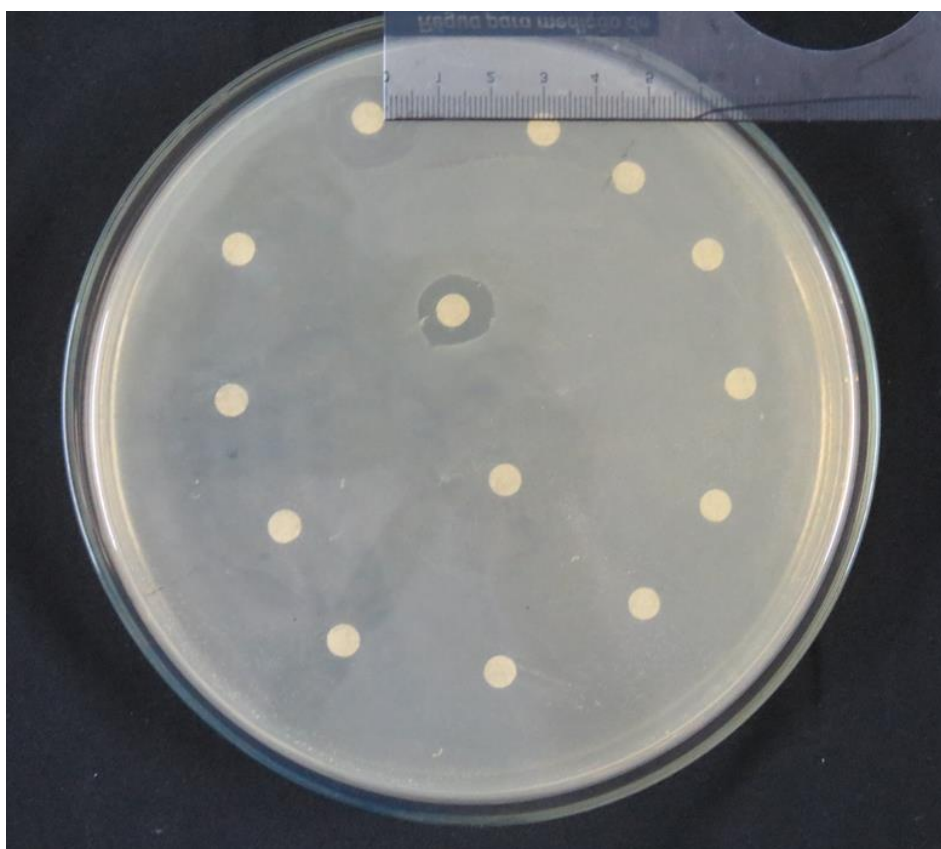
Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows). As unidades formadoras de colônias (UFC) para as análises de biofilme após 24h, 48h e 120h de formação foram transformadas em UFC log<sub>10</sub>, com o objetivo de reduzir a heterogeneidade de variância. A distribuição de normalidade foi verificada no teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. Para a análise de diferenças entre os grupos foi realizado teste de ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana em culturas planctônicas

Para o teste de difusão em Ágar, foi observada a formação de halo apenas para a concentração de 1 mg/mL do **MC-D7**, que apresentou um halo de 9 mm, porém o halo se apresentava translúcido e difuso demonstrando um efeito antimicrobiano insipiente, e para o digluconato de clorexidina a 0,12%, foi observado um halo de 7 mm, como observado na figura 8:

Figura 8 - Método de difusão em disco tratado com **MC-D7** e digluconato de clorexidina 0,12%.



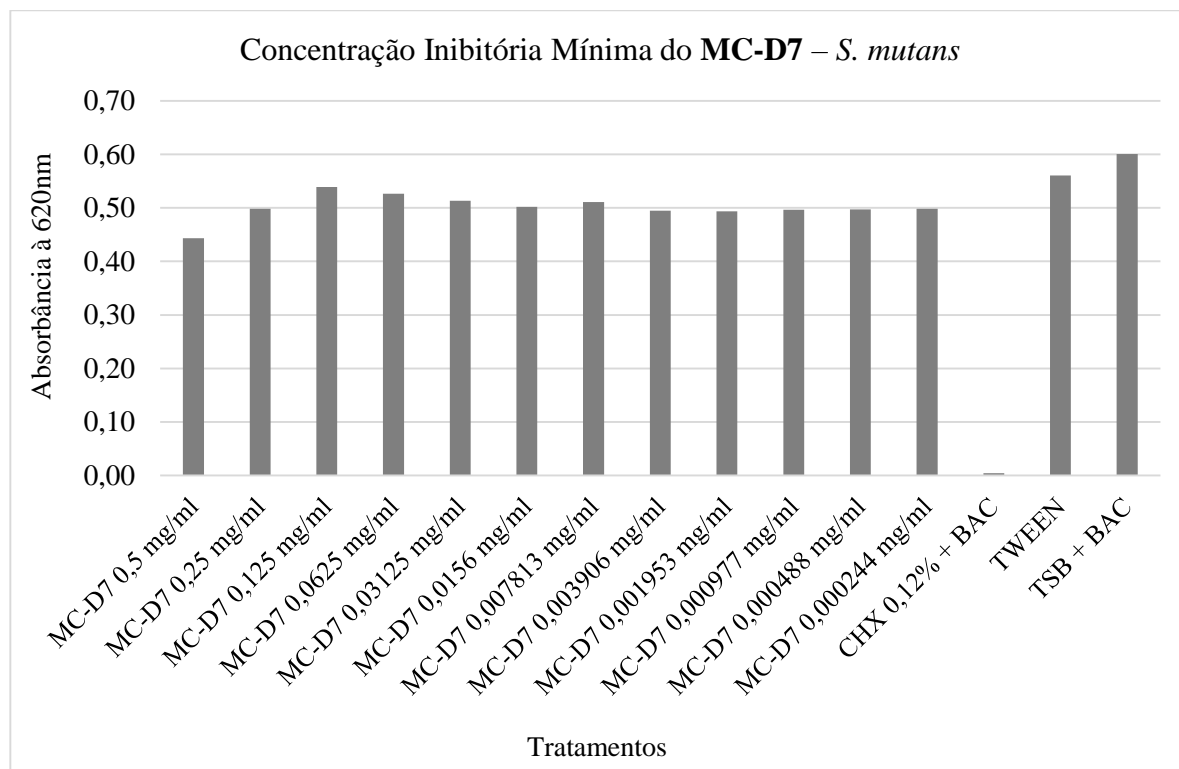
Fonte: Elaborada pelo autor.

O halo formado para a concentração de 1 mg/mL do **MC-D7** (halo superior) foi de 9 mm e para o digluconato de clorexidina (halo central), foi de 7 mm. O segundo disco central representa o grupo sem tratamento e nos demais discos, estão as demais concentrações do **MC-D7**, onde não foi observado inibição bacteriana.

Para a avaliação do efeito antimicrobiano sobre o crescimento planctônico, o **MC-D7** não apresentou efeito bacteriostático e/ou bactericida para *S. mutans* nas concentrações testadas. Todos os poços contendo o **MC-D7** apresentaram turvação. Após a medição com espectrofotômetro, foi observado uma pequena inibição numérica do crescimento de *S. mutans* para a concentração de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL (Figura 9) mas após o plaqueamento dos

poços foi observado crescimento bacteriano nas duas concentrações mencionadas, demonstrando que a droga não apresenta efeito bactericida (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico do efeito inibitório do **MC-D7** após 24h de crescimento de *S. mutans*, testado em diferentes concentrações.

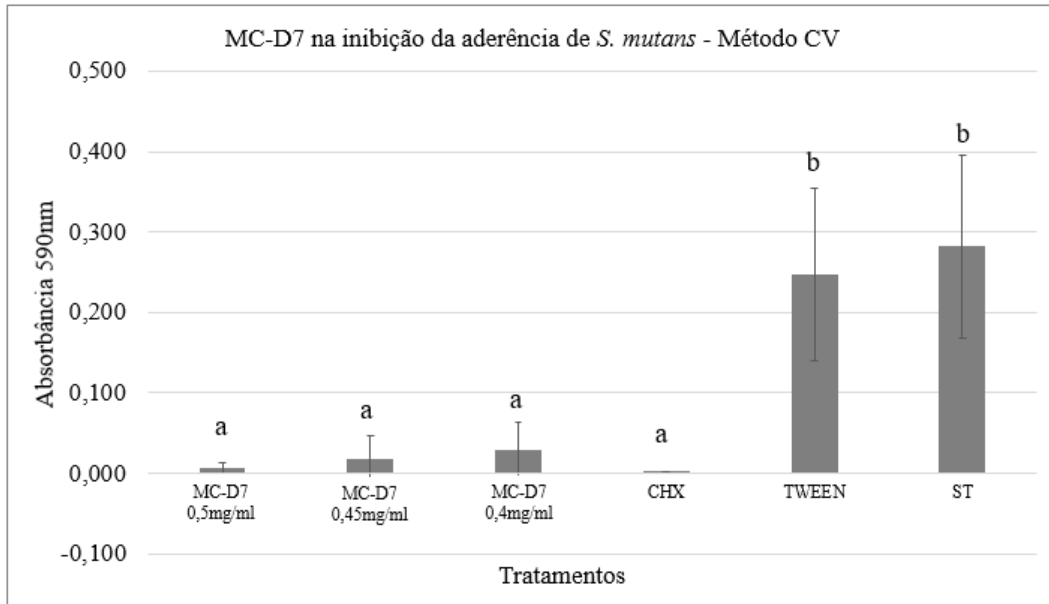


Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência e da formação de biofilme por *S. mutans*

Nos ensaios de atividade biológica sobre a formação de biofilmes de *S. mutans*, avaliados pelo método de coloração com cristal violeta, a droga testada demonstrou interferência significativa na inibição da aderência de biofilme com 24 h de formação (Figura 10), apresentando resultados similares aos encontrados pelo grupo CHX. Por outro lado, na avaliação da formação de biofilme, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 11).

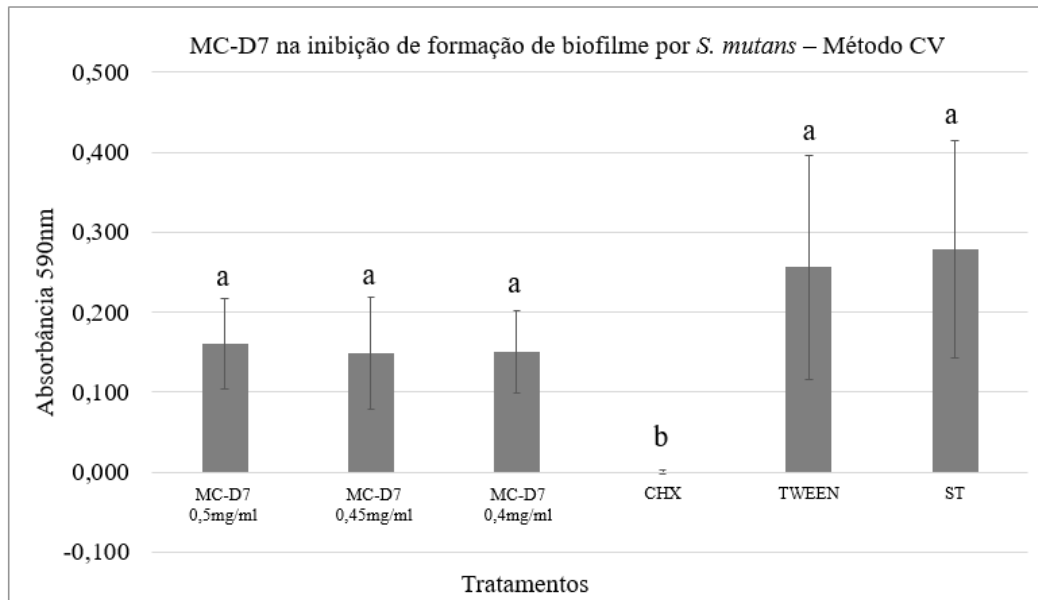
Figura 10 – Gráfico da atividade do **MC-D7** na inibição de aderência de *S. mutans* após 24h de formação de biofilme, pelo método de coloração com CV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Figura 11 – Gráfico da atividade do **MC-D7** na inibição de formação de biofilme de *S. mutans* após 24h de formação, pelo método de coloração com CV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

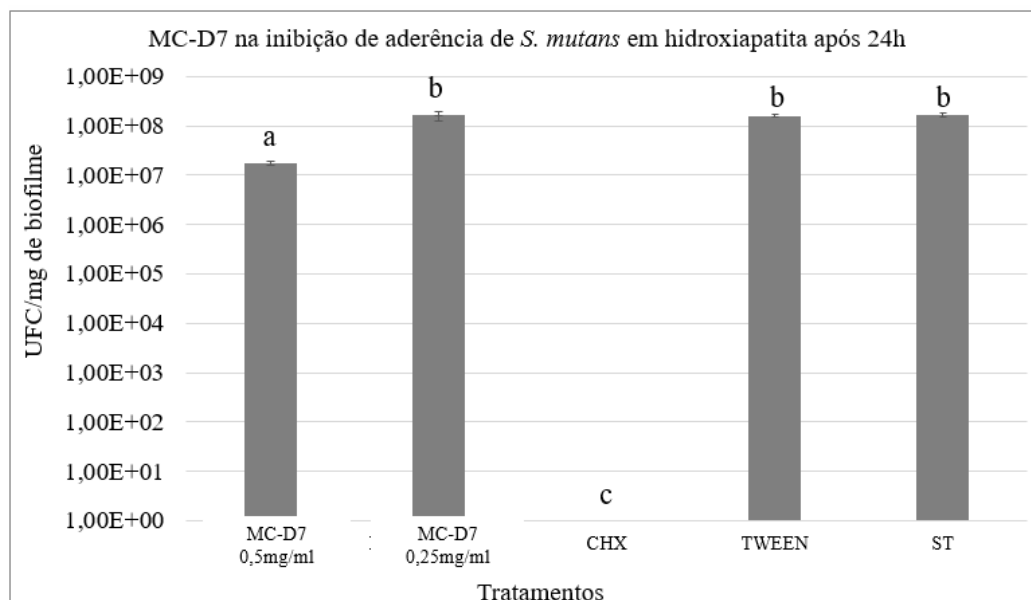
Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



### 5.3 Avaliação da atividade do MC-D7 na inibição de aderência de *S. mutans* em hidroxiapatita

Para a avaliação da atividade do **MC-D7** na inibição de aderência de *S. mutans* com 24h, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ST, TWEEN e **MC-D7** 0,25 mg/mL. Além disso, como esperado, o tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% inibiu completamente a formação de biofilme de *S. mutans* no modelo testado. O tratamento com **MC-D7** na concentração de 0,5 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes, quando comparado com os grupos ST, TWEEN e **MC-D7** 0,25 mg/mL e diferiu estatisticamente do grupo CHX.

Figura 12 - Resultado microbiológico do tratamento com **MC-D7** na inibição da aderência de *S. mutans* após 24h de formação de biofilme.

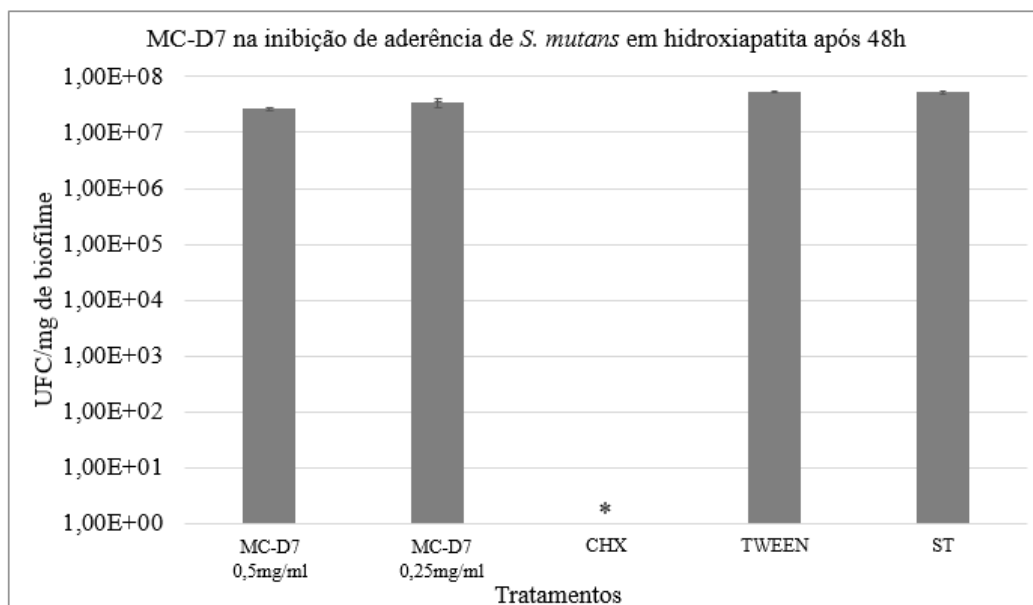


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Para a avaliação da atividade do **MC-D7** na inibição de aderência de *S. mutans*, formados sobre discos de hidroxiapatita, com 48h e 120h, não houve diferença significativa entre os grupos ST, TWEEN, **MC-D7** 0,5 mg/mL, e 0,25 mg/mL, e o tratamento diário com digluconato de clorexidina 0,12% inibiu completamente a formação de biofilme de *S. mutans* no modelo testado (Figuras 13 e 14).

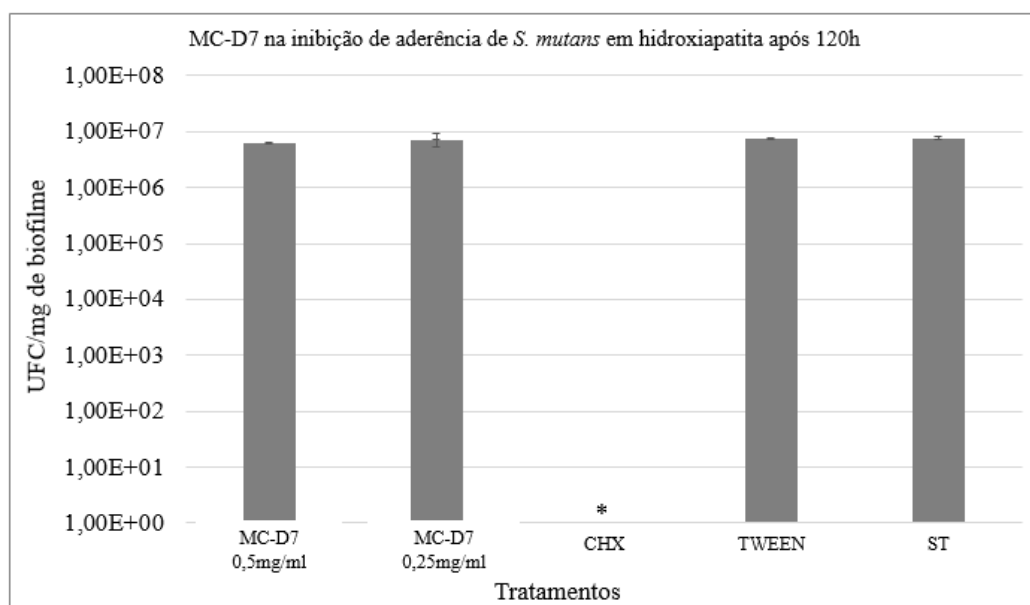
Figura 13 - Resultado microbiológico do tratamento com **MC-D7** na inibição da aderência de *S. mutans* após 48h de formação de biofilme.



Fonte: Elaborado pelo autor.

\* - valor de  $p < 0,01$ .

Figura 14 - Resultado microbiológico do tratamento com **MC-D7** na inibição da aderência de *S. mutans* após 120h de formação de biofilme.



Fonte: Elaborado pelo autor.

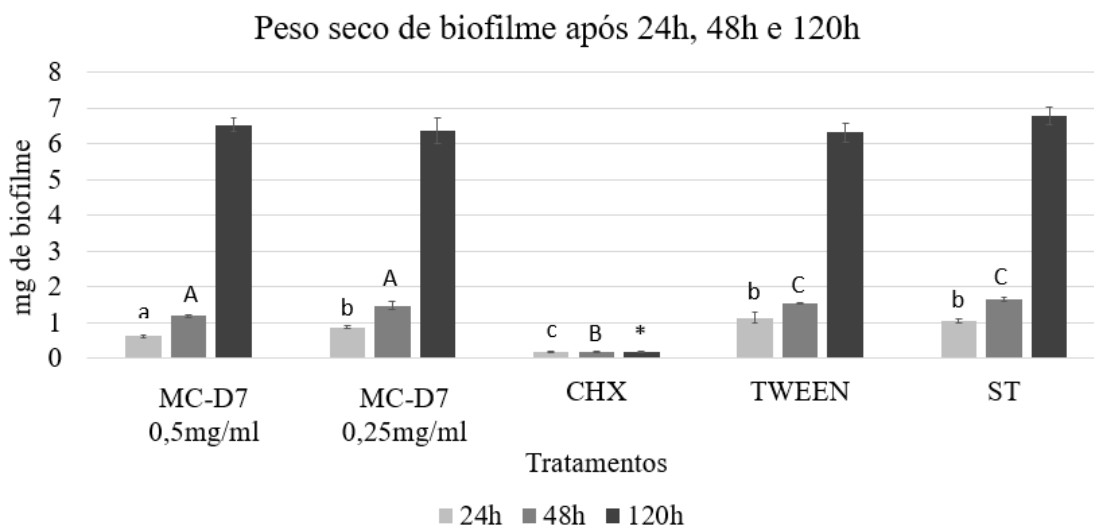
\* - valor de  $p < 0,01$ .

## 5.4 Peso seco do biofilme

Os valores do peso seco de biofilme de *S. mutans* após 24, 48 e 120 horas de formação estão demonstrados na figura 15. O tratamento com **MC-D7** durante a formação da película adquirida promoveu redução estatisticamente significativa no peso seco do biofilme formado após 24h, quando a concentração de 0,5 mg/mL foi utilizada, diferindo dos grupos **MC-D7** 0,25 mg/mL, TWEEN e ST. O grupo tratado com digluconato de clorexidina 0,12% apresentou a menor quantidade de biofilme formado, diferindo de todos os grupos.

O peso seco de biofilme formado sobre discos de hidroxiapatita com 48h de formação, não foi alterado pela presença do **MC-D7** na concentração de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL mas ambos diferiram dos outros grupos controles. Os grupos TWEEN e ST não diferiram estatisticamente, e o grupo tratado com CHX apresentou o menor peso seco, diferindo dos demais. Já, após 120h de formação de biofilme apenas o grupo tratado com digluconato de clorexidina 0,12% apresentou uma redução significativa no peso seco do biofilme formado e os grupos **MC-D7** 0,5 mg/mL, **MC-D7** 0,25 mg/mL, TWEEN e ST não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Figura 15 – Quantidade de peso seco de biofilme formado após 24, 48 e 120 horas de formação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Letras minúsculas representam diferenças estatísticas dentro do tempo de 24h. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas dentro do tempo de 48h.

\* Valor de  $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

Como a adesão bacteriana à película adquirida é um dos estágios primários da formação da placa dental, que pode levar ao desenvolvimento de lesões cáries, é razoável supor que evitar a adesão bacteriana à película e/ou inibir a formação do biofilme, seria um bom método para prevenir essa doença nos estágios iniciais.

Atualmente, o digluconato de clorexidina 0,12% é amplamente utilizado na odontologia devido ao seu potencial antimicrobiano e antiplaca, e é considerado padrão-ouro como antisséptico bucal. No entanto, tem sido observado na literatura que o mesmo apresenta efeitos adversos tais como alteração na coloração dos elementos dentários, restaurações, próteses e língua, formação de cálculo supragengival, perda do paladar, queimaduras no tecido mole, dor, xerostomia, e gosto residual desagradável na boca (PEGORARO *et al.*, 2014). Devido a esses efeitos adversos do digluconato de clorexidina, cada vez mais tem surgido o interesse de desenvolver substâncias que sejam capazes de substituir o uso da mesma.

No presente estudo, foi avaliado o efeito de um derivado semissintético obtido de *Moringa oleifera* Lam. na inibição da aderência de *S.*, quando utilizado no momento da formação da película adquirida; e na inibição de formação do biofilme, quando utilizado após a formação da mesma, e foi observado que o **MC-D7** apresentou um efeito inibitório na aderência de *S. mutans* em placas de poliestireno e discos de hidroxiapatita, com 24h de formação de biofilme.

Estudos disponíveis na literatura já demonstraram que o **MC-D7** apresenta efeito antitumoral, anti-inflamatório e antinociceptivo (ALMEIDA *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2018), e este é o primeiro estudo *in vitro* que avalia seu efeito na inibição de aderência e na inibição de formação de biofilmes por *Streptococcus mutans*, formados *in vitro*. A grande parte dos estudos encontrados na literatura que avaliam o efeito antimicrobiano de *M. oleifera* Lam. contra *S. mutans*, utilizam o método de Difusão em Ágar (AMABYE, TADESSE, 2016; ELGAMILY *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2014), mesmo método utilizado neste estudo.

Patel e colaboradores (2014) e Amabye e Tadesse (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano de extratos etanólicos derivados de folhas de *M. oleifera* Lam., nas concentrações de 50 mg/mL e 60 mg/mL, sobre cepas de *S. mutans* e ambos observaram um halo de inibição de 6 mm, confirmando o que foi encontrado no presente estudo, onde foi observado um halo de inibição quando o **MC-D7** foi utilizado na concentração de 0,5 mg/mL, demonstrando um possível efeito inibitório do derivado de *Moringa oleifera* Lam.. Elgamily e colaboradores (2016) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos produzidos a partir de

folhas da *Moringa oleifera* Lam., na concentração de 100 mg/mL e de um enxaguante e creme dental desenvolvidos a partir desses extratos contra *S. mutans*, utilizando o método de difusão em Ágar e também observaram um potencial antimicrobiano dessas substâncias. Apesar dos resultados encontrados utilizando extratos derivados da *Moringa oleifera* Lam., a sazonalidade é um fator que deve ser levado em consideração quando do uso dos mesmos, visto que condições encontradas em um determinado momento podem ser alteradas por fatores externos como a temperatura, altitude, época estacional, podendo ocasionar mudanças em suas propriedades, (PINTO; BERTOLUCCI, 2002).

O teste de coloração com cristal violeta é indicativo da formação de biofilme. Quando o **MC-D7** foi utilizado durante a formação da película adquirida, foi observado uma redução significativa na formação de biofilme de *S. mutans* após 24h, nas concentrações de **MC-D7** testadas de 0,5 mg/mL, 0,45 mg/mL e 0,4 mg/mL. Essa redução foi similar à do digluconato de clorexidina 0,12%, demonstrando um potencial antiplaca dessa droga, possivelmente por bloqueio dos sítios de ligação das moléculas presentes na película adquirida. Padla e colaboradores (2012) também avaliaram em seus estudos, o efeito antimicrobiano de 2 compostos obtidos a partir de isotiocianatos presentes na *M. oleifera* Lam. Os resultados encontrados demonstraram efeito sobre todas as bactérias Gram-positivas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus. epidermidis*, *Bacillus subtilis*) na menor concentração inibitória de 1 mg/mL por meio do teste de difusão em Ágar, tendo uma boa atividade antimicrobiana contra *S. aureus* confirmada através do teste de microdiluição em caldo, boa a moderada atividade contra *S. epidermidis*, e moderada atividade contra *B. subtilis*. No entanto, para os testes de Concentração Bactericida Mínima, foi observada a necessidade de uma maior concentração dos compostos para que o efeito bactericida ocorresse, o que corrobora com os achados em nosso estudo uma vez que o efeito antimicrobiano do **MC-D7** parece ser dose dependente e não foi encontrado nas concentrações testadas (PADLA *et al.*, 2012).

Moura e colaboradores (2017) avaliaram o potencial antibiofilme de uma lectina extraída de sementes da *M. oleifera* Lam. (WSMoL), contra biofilmes de *Serratia marcescens* e *Bacillus* sp. Com seus resultados, esses autores observaram que o WSMoL foi capaz de controlar a formação de biofilme de *S. marcescens* na concentração de 2,6 µg/mL e evitou a formação de biofilme de *Bacillus* sp em concentração maior, bem como foi capaz de romper biofilmes pré-formados de *Bacillus* sp e penetrar nos biofilmes de *S. marcescens*.

No presente estudo, discos de hidroxiapatita foram utilizados como substrato para aderência de *S. mutans*, a fim de simular uma situação similar à encontrada na cavidade bucal. Os suportes metálicos foram utilizados para simular as forças da gravidade enfrentadas pelas bactérias presentes nos biofilmes dentais humanos. Para esse substrato, foi observado uma pequena redução na viabilidade microbiana com 24h de formação, o que não ocorreu após 48h e 120h de formação, quando um biofilme mais complexo já estava estabelecido. O efeito observado nas primeiras horas da formação do biofilme sugere que o **MC-D7** parece necessitar da manutenção constante da concentração da droga para que o efeito desejado pudesse acontecer, o que não ocorreu em nosso estudo. Novos estudos com tratamentos diários dos biofilmes com **MC-D7** podem alcançar resultados ainda mais promissores.

Dufour, Stahl e Baysse (2015) mencionaram a possibilidade dos isotiocianatos exercerem papel de proteção nas plantas contra agressões externas, servindo como bactericida e fungicida, exercendo essa função por meio de inibição de transcrição gênica e respiração celular e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim preservando a vida da planta.

Nesse estudo, houve uma redução significativa da quantidade de peso seco de biofilme de *S. mutans* formado sobre discos de hidroxiapatita, após 24h do tratamento com **MC-D7**, demonstrando que a droga utilizada apresentou uma ação antiplaca que pode ser empregada na elaboração de produtos odontológicos tais como enxaguatórios bucais.

O uso de produtos naturais para esse fim seria uma alternativa viável devido à grande quantidade e diversidade disponível dos mesmos na natureza, também por seu baixo custo, acessibilidade e fácil manipulação. Porém, apesar da crença popular de que os produtos naturais não causam efeitos colaterais, deve-se ter cuidado com a quantidade utilizada do produto *in natura* (BALBINO; DIAS, 2010). No caso do **MC-D7**, o fato de se tratar de um composto semissintético derivado de um produto natural puro, apresentando seus componentes sempre na mesma concentração, esse risco pode ser minimizado. Dessa forma, nos parâmetros testados o **MC-D7** apresentou efeito inibitório na aderência de *S. mutans* nos dois substrato testados, sendo necessário outros estudos utilizando maiores concentrações da droga a fim de confirmar seu efeito antimicrobiano.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo *in vitro* podemos concluir que:

- O **MC-D7** não apresentou efeito antimicrobiano em culturas de *S. mutans* nas concentrações testadas;
- O **MC-D7** na concentração de 0,5 mg/mL apresentou efeito na inibição de aderência de *S. mutans* a placas de poliestireno e discos de hidroxiapatita durante a formação dos biofilmes de 24h.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, 2005.
- ALMEIDA, D. K. C.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, M. C. F. De; MAFEZOLI, J.; MATTOS, M. C. De; MOURA, A. F.; FILHO, M. O. M.; BARBOSA, F. G. 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.
- AMABYE, T. G.; TADESSE, F. M. Phytochemical and Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Available in the Market of Mekelle. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research Phytochemical**, v. 2, n. 1, p. 2–5, 2016.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M.. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. **Lasers in Medical Science**, p. 629–635, 2014.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância : um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 3310–3319, 2010.
- BOWEN, W. H. Dental caries – not just holes in teeth ! A perspective. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 228–233, 2016.
- BRASIL. **Projeto SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Resultados Principais**. Brasília, 2012.
- BUKAR, A.; UBA, A.; OYEYI, T.. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some food - borne microorganisms. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 43–48, 2010.
- CÁCERES, A.; SARAVIA, A.; RIZZO, S.; ZABALA, L.; LEON, E. De; NAVE, F. Pharmacologic properties of *Moringa Oleifera*. 2: Screening antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 233–237, 1992.
- CHAROENSIN, S. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 7, p. 318–325, 2014.
- CHAWLA, S.; SAXENA, A.; SESHADRI, S. *In-vitro* Availability of Iron in Various Green Leafy Vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 46, n. 1, p. 125–127, 1988.
- CHEENPRACHA, S.; PARK, E.; YOSHIDA, W. Y.; BARIT, C.; WALL, M.; PEZZUTO, J. M.; CHANG, L. C. Bioorganic & Medicinal Chemistry Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 6598–6602, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.057>>.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S24, 34(1). 2014.
- COLBY, S. M.; RUSSELL, R. R. B. Sugar metabolism by mutans streptococci. **Journal of**



**Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 83, n. 1, p. 80–88, 1997.

COSTA, A. L. P. da; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública : uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45–57, 2017.

DE FREITAS, M. T. M.; SOARES, T. T.; ARAGÃO, M. G. B.; LIMA, R. A.; DUARTE, S.; ZANIN, I. C. J. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 5, p. 239–245, 2017. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2016.4108>>.

DEWHIRST, F. E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B. J.; TANNER, A. C. R.; YU, W.; LAKSHMANAN, A.; WADE, W. G. The Human Oral Microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010.

DOS SANTOS, A. O.; DO VAL, D. R.; DA SILVEIRA, F. D.; GOMES, F. I. F.; FREITAS, H. C.; DE ASSIS, E. L.; DE ALMEIDA, D. K. C.; DA SILVA, I. I. C.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J.; DA SILVA, M. R.; DE CASTRO BRITO, G. A.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE PAULO TEIXERA PINTO, V. de P. T.; FILHO, G. C.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V. 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.; GREGOIRE, S.; SINGH, A. P.; VORSA, N.; SCHAICH, K.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. v. 257, p. 50–56, 2006.

DUFOUR, V.; STAHL, M.; BAYSSE, C. The antibacterial properties of Isothiocyanates. **Microbiology Papers**, v. 191, n. 2, p. 229–243, 2015.

ELGAMILY, H.; MOUSSA, A.; ELBORAEY, A.; EL-SAYED, H.; AL-MOGHAZY, M.; ABDALLA, A. Microbiological Assessment of *Moringa oleifera* Extracts and Its Incorporation in Novel Dental Remedies against Some Oral Pathogens. **Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 585–590, 2016.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. A. M.. **Dental caries: the disease and its clinical management**. 2<sup>a</sup> edition. Oxford. Blackwell Munksgaard, p 209-230, 2008.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. N. A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 207–216, 2009.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>>.

GUEVARA, A. P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. An antitumor promoter

- from *Moringa oleifera* Lam.. **Mutation Research**, v. 440, n. 2, p. 181–188, 1999.
- KLEIN, M. I.; HWANG, G.; SANTOS, P. H. S.; CAMPANELLA, O. H.; KOO, H. *Streptococcus mutans* derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1–8, 2015.
- KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 7, p. 471–480, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2381>>.
- KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. . The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 12, p. 1065–1073, 2013.
- KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I.; JEON, J. G. Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms □. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3024–3032, 2010.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus* in Human Dental Decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353–380, 1986.
- MARCENES, W.; KASSEBAUM, N.; BERNABÉ, E.; FLAXMAN, A.; NAGHAVI, M.; LOPEZ, A.; MURRAY, C. J. L. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010 : A Systematic Analysis. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 592–597, 2013.
- MARSH, P. D. MICROBIAL ECOLOGY OF DENTAL PLAQUE. 1994.
- MARSH, P. D. M i c r o b i o l o g y of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. **Dental Clinics of NA**, v. 54, n. 3, p. 441–454, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002>>.
- MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Dental plaque as a bio fi lm and a microbial community — Implications for treatment. **Journal of Oral Biosciences**, v. 57, n. 4, p. 185–191, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2015.08.002>>.
- MATTOS-GRANER, R. O.; KLEIN, M. I.; SMITH, D. J. Lessons Learned from Clinical Studies : Roles of Mutans Streptococci in the Pathogenesis of Dental Caries Lessons Learned from Clinical Studies : Roles of Mutans Streptococci in the Pathogenesis of Dental Caries. **Current Oral Health Reports**, v. 1, n. 1, p. 70–78, 2014.
- MORALEZ, A. P.; CALDAS, C. De volta à era pré-antibiótica: a busca emergencial por novos arcabouços. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 14–16, 2010.
- MORTON, J. F. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) - A boon to Amd lands? **Economic Botanic**, v. 45, n. 1929, p. 318–333, 1991.
- MOURA, M. C.; TRENTIN, D. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PRIMON-BARROS, M.; XAVIER, A. S.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, P. M. G.; MACEDO, A. J.; COELHO, L. C. B. B. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus sp* .: antibacterial , antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861–874, 2017.
- MUNIZ, G. L.; DUARTE, F. V.; OLIVEIRA, S. B. De. Uso de sementes de *Moringa oleifera* na remoção da turbidez de água para abastecimento Use of *Moringa oleifera* seeds for the removal of turbidity of water supply. **Revista Ambiental Água**, v. 10, n. 2, p. 454–463, 2015.

- NGUYEN, P. T. M.; FALSETTA, M. L.; HWANG, G.; GONZALEZ-BEGNE, M.; KOO, H. a-Mangostin Disrupts the Development of *Streptococcus mutans* Biofilms and Facilitates Its Mechanical Removal. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. 111–116, 2014.
- NIKKON, F.; SAUD, Z. A.; RAHMAN, M. H.; HAQUE, E. In vitro Antimicrobial Activity of the Compound Isolated from Chloroform Extract of *Moringa oleifera* Lam . **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 22, p. 1888–1890, 2003.
- 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.
- PADLA, E. P.; SOLIS, L. T.; LEVIDA, R. M.; SHEN, C. Antimicrobial Isothiocyanates from the Seeds of *Moringa oleifera* Lam . **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 67, n. 11–12, p. 557–564, 2012.
- PATEL, N.; PATEL, P.; PATEL, D.; DESAI, S.; MESHARAM, D. Phytochemical analysis and antibacterial activity of Moringa. **International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 29–36, 2014.
- PEGORARO, J.; SILVESTRI, L.; CARA, G.; STEFENON, L.; MOZZINI, C. B. Efeitos adversos do gluconato Materiais e Métodos. **Journal Oral Investigations**, v. 3, n. 1, p. 33–37, 2014.
- PHILIP, N.; SUNEJA, B.; WALSH, L. Beyond *Streptococcus mutans* : clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. **Brit**, v. 224, n. 3, p. 219–225, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.81>>.
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/Faepe, 2002.
- PUBCHEM. **Pubchem substance database**. 2008. "<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>"
- 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.
- SENADHEERA, M. D.; GUGGENHEIM, B.; SPATAFORA, G. A.; HUANG, Y. C.; CHOI, J.; HUNG, D. C. I.; TREGLOWN, J. S.; GOODMAN, S. D.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. A VicRK Signal Transduction System in *Streptococcus mutans* Affects gtfBCD , gbpB , and ftf Expression , Biofilm Formation , and Genetic Competence Development. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 12, p. 4064–4076, 2005.
- SHEIHAM, A.; JAMES, W. P. T. Diet and Dental Caries : The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 94, n. 10, p. 1341–1347, 2015.
- SILVA, G. F. da; SANTANA, M. de F. S. de; LIMA, A. K. V. de O.; BERGAMASCO, R.; PAIVA, P. M. G.; SANT'ANNA, M. C. S. de; SERAFINI, M. R.; BERY, C. C. de S. de. **Potencialidades da Moringa oleifera Lam**. 2018
- SVENSATER, G.; WELIN, J.; WILKINS, J. C.; BEIGHTON, D.; HAMILTON, I. R.. Protein expression by planktonic and biofilm cell of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n.1, p. 139-146, 2001.
- TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. Fluoride : its role in dentistry! Understanding dental caries

and the fluoride effect. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 1, p. 9–17, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Traditional Medicine Strategy, p. 1–76; 2013.

## ANEXO A – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO NO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso  
Cadastro nº A13AE61

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A13AE61  
Usuário: Universidade Federal do Ceará  
CPF/CNPJ: 07.272.636/0001-31  
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
Finalidade do Acesso: Pesquisa

### Espécie

Moringa Oleifera

Título da Atividade: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DOS ANÁLOGOS MC-D7, MC-D9 E MC-H, DERIVADOS DA MORINGA OLEIFERA LAM

### Equipe

Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos	Universidade Federal do Ceará
Francisco Geraldo Barbosa	Universidade Federal do Ceará
Mirna Marques Bezerra	Universidade Federal do Ceará
Helliada Vasconcelos Chaves	Universidade Federal do Ceará
Maria Tayara Marques de Freitas	Universidade Federal do Ceará
Jair Mafezoli	Universidade Federal do Ceará

Data do Cadastro: 06/11/2018 21:33:06  
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:08 de 20/02/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - SISGEN