

ATIVIDADE DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Eugenia klotzschiana* O. BERG CONTRA BIOFILMES DE *Candida* sp. ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

ACTIVITY OF THE ETHANOLIC AND HEXANIC EXTRACTS OF THE LEAVES OF *Eugenia klotzschiana* O. BERG
AGAINST BIOFILMS OF *Candida* sp. ISOLATED FROM THE ORAL CAVITY

DOI: 10.16891/2317-434X.v12.e4.a2024.pp4706-4722

Recebido em: 29.07.2024 | Aceito em: 02.12.2024

Charles Lima Ribeiro^{a*}, Maria José Barbaresco^a, Anielly Monteiro de Melo^a, Anna Laura Santana Chagas^a, Adriano Pereira Ramiro^b, Joelma Abadia Marciano de Paula^a, Josana de Castro Peixoto^a, Plínio Lázaro Faleiro Neves^a

**Universidade Estadual de Goiás – UEG, Anápolis – GO, Brasil^a
Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica, Anápolis – GO, Brasil^b
*E-mail: charles20lima@gmail.com**

RESUMO

Eugenia klotzschiana O. Berg é uma espécie endêmica do Cerrado, ameaçada de extinção e cuja potencialidade terapêutica ainda não está totalmente elucidada. Os poucos estudos descrevem atividades antioxidante, antiparasitária e antimicrobiana de óleos essenciais da planta contra microrganismos. Neste contexto, este pioneiro estudo avaliou a atividade dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *E. klotzschiana* contra leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis. O extrato etanólico foi caracterizado quimicamente e os principais compostos foram quantificados por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada com ensaios de microdiluição para a determinação da concentração mínima inibitória, da concentração mínima candidida e da concentração mínima da formação de biofilme. Os principais compostos identificados no extrato etanólico foram a catequina, epicatequina e rutina. As leveduras foram identificadas como *Candida albicans* e *Candida krusei*, e todas foram capazes de formar biofilme, sendo 4 identificadas como formadoras fortes, 2 como formadoras moderadas e a *C. albicans* ATCC 10231 como formadora fraca de biofilme. Os extratos apresentaram moderada atividade fungistática e baixa atividade fungicida, dependendo da concentração de cada extrato e da levedura, com inibição do crescimento entre 313 a 1250 µg mL⁻¹. Apesar dos extratos serem moderadamente ativos contra a maioria das leveduras, foram capazes de inibir a formação de biofilme em, ao menos 70% e na concentração de 1250 µg mL⁻¹ reduziram mais de 93% da formação de biofilme da maior formadora, a *C. krusei* Ck7. Os extratos demonstraram o potencial contra a formação de biofilme de *C. albicans* e *C. krusei*. Desta forma, estudos com *E. klotzschiana* necessitam ser ampliados a fim de que se identifique o potencial para o desenvolvimento de medicamentos.

Palavras-chave: Perinha do Cerrado; Fitoquímica; Biofilmes; Bioprodutos.

ABSTRACT

Eugenia klotzschiana O. Berg is an endemic species of the Cerrado (Brazilian savanna), threatened with extinction and whose therapeutic potential has not yet been fully elucidated. Few studies have described the antioxidant, antiparasitic and antimicrobial activities of the plant's essential oils against microorganisms. In this context, this pioneering study evaluated the activity of the hexanic and ethanolic extracts of the leaves of *E. klotzschiana* against yeasts of the genus *Candida* isolated from the oral cavity of healthy individuals. The ethanolic extract was chemically characterized, and the main compounds were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The antifungal activity of the extracts was evaluated using microdilution assays to determine the minimum inhibitory concentration, the minimum candidal concentration and the minimum concentration of biofilm formation. The main compounds identified in the ethanolic extract were catechin, epicatechin and rutin. The yeasts were identified as *Candida albicans* and *Candida krusei*, and all were capable of forming biofilm, 4 were identified as strong formers, 2 as moderate formers and *C. albicans* ATCC 10231 as weak biofilm former. The extracts showed moderate fungistatic activity and low fungicidal activity, depending on the concentration of each extract and the yeast, with growth inhibition between 313 and 1250 µg mL⁻¹. Although the extracts were moderately active against most yeasts, they were able to inhibit biofilm formation by at least 70% and at a concentration of 1250 µg mL⁻¹ they reduced biofilm formation by more than 93% for the biggest biofilm-former, *C. krusei* Ck7. The extracts demonstrated their potential against the biofilm formation of *C. albicans* and *C. krusei*. Thus, studies with *E. klotzschiana* are need to be expanded in order to identify the potential for drug development.

Keywords: Cerrado pear; Phytochemistry; Biofilms; Bioproducts.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é um importante bioma tropical sul-americano que possui uma diversificada flora na qual podem ser encontradas plantas com potencial terapêutico (FERREIRA *et al.*, 2022). Mas infelizmente, sua biodiversidade está ameaçada sob forte pressão antrópica com o risco de uma parcela de plantas com atividades medicinais serem extintas antes mesmo do seu estudo (SOARES; SILVA, 2020).

A espécie *Eugenia klotzschiana* O. Berg pertence à família Myrtaceae, é endêmica do Cerrado e possui maior distribuição na região sudeste deste bioma. As plantas possuem porte arbustivo e hábito de touceira, seu tamanho chega a aproximadamente 2 metros de altura e suas folhas são pilosas com filotaxia oposta e cruzada (RIBEIRO; SOUZA; PEIXOTO, 2023; RIBEIRO *et al.*, 2023). Apesar da atividade antioxidante ser característica das espécies de Myrtaceae (CARNEIRO *et al.*, 2019; RIBEIRO; PAULA; PEIXOTO, 2022) e de algumas espécies da família das Myrtaceae serem ativas contra *Candida* sp., existem poucos relatos sobre a atividade antimicrobiana e citotóxica da *E. klotzschiana* (KARPIŃSKI *et al.*, 2021; CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2017b). Especificamente, as folhas de *E. klotzschiana* possuem compostos com propriedades bioativas, tais como antraquinonas, saponinas, heterosídeos cardioativos, taninos, flavonoides (TAKAO; IMATOMI; GUALTIERI, 2015), além do expressivo conteúdo fenólico das folhas, seus frutos possuem ácido ascórbico, flavonoides, compostos fenólicos e carotenoides (CARNEIRO *et al.*, 2019).

As infecções por *C. albicans* são um grande desafio clínico quando são provocadas por leveduras associadas a biofilmes, pois essas estruturas protegem as leveduras das ações do sistema imunológico e de agentes antifúngicos (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; FANGMEI *et al.*, 2022).

Os biofilmes são formados pela associação comensal microbiana em superfícies bióticas e abióticas. A formação de biofilme microbiano é um fenômeno natural resultante de processos físicos, químicos e biológicos. Seu desenvolvimento é um processo dinâmico que envolve a adesão, o crescimento, a motilidade e a produção de exopolissacarídeos que propiciam um eficiente sistema de comunicação e defesa dos microrganismos em diversos ambientes (KASNOWSKI *et al.*, 2010; MENOITA *et al.*, 2012; APARNA; YADAV, 2008).

A investigação da ação inibitória da expressão de fatores de virulência por compostos de origem natural constitui uma importante ferramenta terapêutica complementar ao arsenal disponível de drogas convencionais (CEGELSKI *et al.*, 2008).

A emergência de candidíase é um problema médico significativo principalmente devido à sua característica multifatorial e a formação de biofilme (KAUR; NOBILE, 2023). Além disso, a resistência aos antimicrobianos é outro fator agravante que reforçam a necessidade de investigação de compostos antimicrobianos inovadores, notadamente os que atuam na inibição da formação de biofilme ou que atuem contra biofilmes pré-formados (FERNANDES *et al.*, 2015; DOMINGUES, 2018).

O uso de plantas como um método alternativo e de baixo custo na clínica odontológica, pode ser corroborado por estudos que demonstram a ação microbiana no controle de microrganismos associados a biofilmes (ALVES *et al.*, 2009; MELANDA, 2019). Nesse contexto, o presente estudo avalia a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Eugenia klotzschiana* contra leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e Preparação do Extrato

As folhas de *E. klotzschiana* foram coletadas na zona rural do município de Silvânia - GO, Brasil, nas coordenadas geográficas: -16.697976S, -48.63388W; -16.698048S, -48.633466W; -16.698009S, -48.633386W e altitude de 1020 m. A identificação botânica foi realizada pela equipe do Herbário da Universidade Estadual de Goiás, sob o número de tombo 14911.

Após a coleta, as folhas foram secas à temperatura ambiente (25° C) no Laboratório de Pesquisa em Biodiversidade (LAPBIO) da Universidade Evangélica de Goiás, por 14 dias e moídas em um moinho de facas da marca Tecnal. O pó das folhas foi pesado e armazenado em recipientes de vidro âmbar, protegidos da luz e devidamente vedados e mantidos em temperatura ambiente.

A extração foi realizada com 250 g de folhas secas e trituradas com a técnica de maceração dinâmica a frio em 700 mL de hexano, para a obtenção do extrato hexânico das folhas de *E. klotzschiana* (EHEk) e do extrato etanólico das folhas de *E. klotzschiana* (EEEk)

com um intervalo de 72 h e uma proporção droga: solvente de 0,35 g/mL (m/v). Em seguida, cada extrato foi concentrado em pressão reduzida no rota- evaporador com 45° de inclinação, da marca Fisaton, modelo 802, série 2100262; banho-maria, marca Fisaton, modelo 553, série 628351; bomba hidrovácuo, marca Quimis, modelo Q355A2, série 15110566. Os extratos obtidos foram armazenados em freezer (-10° C) até sua utilização nos testes.

Identificação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram identificados com a comparação dos tempos de retenção (TR) e espectros na região do ultravioleta dos picos obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) de padrões analíticos Sigma (resveratrol, ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico, quercetina, catequina, epicatequina, rutina, campferol e apigenina) e das amostras (EHEk e EEEk) submetidos a condições analíticas idênticas. As eluições cromatográficas foram realizadas em equipamento CLAE Agilent Technologies 1260 Infinity II, software OpenLab CDS, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD modelo G7115A), injetor automático e coluna Agilent Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 (4.6x100 mm 2,7 µm), mantida em temperatura de 30° C. A fase móvel foi constituída por acetonitrilo (A) e solução aquosa de ácido acético a 0,2% (B), previamente filtrada em membrana PTFE de 0,45 µm e eluída em gradiente, com a seguinte sequência (A:B v/v): 0-5 min - 2:98, 5-8min - 5:95, 8-11 min - 20:80, 11-14 min - 25:75, 14-21 min - 40:60, 21-24 min - 80:20, 24-27 min - 90:10, 27-30 min - 5:95, 30-35min - 2:98. O fluxo da fase móvel foi mantido em 1 mL/min., o volume de injeção das amostras e padrões foi de 5 µL e os picos foram detectados em comprimentos de onda de 280 nm e 340 nm.

Para o preparo das amostras, a amostra EHEk foi solubilizada em metanol grau CLAE na proporção 0,5:10 (g/ml) e assistida em ultrassom (Ultronique mod. Q5.9/40A, frequência 40 kHz e potência 200W) por 15 minutos a 25 °C, sob o abrigo da luz. A amostra foi submetida à centrifugação 6000 rpm (IKA® mini G) por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro (PTFE) 0,45 µm (Pall Corporation Michigan, EUA) para vial âmbar.

A amostra EEEk, foi preparada em metanol grau HPLC na proporção 0,0445:10 (g/ml) e assistida em ultrassom (Ultronique mod. Q5.9/40A, frequência 40 kHz

e potência 200 W) por 15 minutos a 25°C, sob o abrigo da luz. A amostra foi centrifugada a 6000 rpm (IKA® mini G) por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro PTFE 0,45 µm. Os padrões analíticos resveratrol, ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico, quercetina, (+)-catequina, epicatequina, rutina, apigenina foram preparados a 0,2% (p/v) e o caempferol a 0,08% (p/v) em metanol grau CLAE, filtrados em filtro PTFE de 0,45 µm para frascos âmbar e injetados individualmente. Um frasco contendo a mistura de partes iguais de todos os padrões também foi preparado e injetado no CLAE-DAD.

Caracterização das Leveduras e Formação de Biofilme

Um total de sete leveduras foram utilizadas neste estudo: a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 e seis isolados da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás, Campus Central Anápolis (Comitê de Ética nº 3.604.978), das quais 2 foram *Candida albicans* (Ca2 e Ca4) e 4 *Candida krusei* (Ck7, Ck8, Ck11 e Ck12). Todas as leveduras pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Bioensaios do Centro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Goiás.

As amostras foram semeadas em ágar cromogênico CROMONEW CANDIDA, (Newprov) para a identificação conforme instruções do fabricante. A formação de biofilme foi avaliada com a detecção da biomassa total pelo método do cristal violeta descrito por Zayed *et al.* (2021), com algumas modificações. Os inóculos leveduriformes foram obtidos com a suspensão de colônias crescidas em solução fisiológica estéril (SFE) e ajuste da turbidez com a escala 0,5 de McFarland.

Posteriormente, foram transferidos 500 µL dos inóculos para tubos contendo 4500 µL de caldo infusão de cérebro e coração bovino adicionado de 2% de sacarose (BHIS), em seguida 200 µL dos inóculos foram transferidos asépticamente para poços de microplacas de poliestireno de fundo plano que foram incubadas a 35,5° C por 48 h.

Após a incubação, as microplacas foram processadas com a remoção do caldo com crescimento total e lavagem dos poços três vezes com água destilada em lavadora automática de microplacas Aquari® (MA 615, Brasil). Logo após, foram adicionados 200 µL de etanol 96° aos poços lavados e as microplacas foram incubadas a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. Em seguida, o etanol foi removido e as microplacas secas nas mesmas condições. Posteriormente, foram

adicionados 200 μL de 0,1% de cristal violeta em cada poço e a microplaca foi incubada por 20 min a TA, posteriormente o excesso do corante foi retirado com três lavagens com água destilada na lavadora automática de microplacas. As microplacas foram incubadas na posição invertida por 20 minutos a TA e a coloração dos biofilmes foi solubilizada pela adição de 200 μL de ácido acético glacial a 33% em cada poço por 20 minutos.

As leituras das densidades ópticas ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (BioTech EpochTM, USA). O valor médio das $\text{DO}_{600\text{nm}}$ obtidas nos poços controle não inoculados foi utilizado como referência para a classificação da formação de biofilme (ZAYED *et al.*, 2021).

Todas as leveduras foram testadas em triplicatas independentes totalizando 24 poços e os resultados obtidos foram organizados como médias e desvios padrão.

Atividade Antimicrobiana dos Extratos

As leveduras foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima candidida (CMC) dos extratos vegetais com adaptação do método preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para testes de susceptibilidade antimicrobiana (WAYNE, 2018).

A atividade antifúngica foi avaliada com a pesagem de 400 mg e a dissolução dos extratos em 20 mL de etanol absoluto. As concentrações testadas em microplacas de fundo redondo (Olen, China) foram de 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 e 78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As suspensões das leveduras foram preparadas com a dissolução de colônias isoladas típicas em SFE e a densidade dos inóculos foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland. Após o ajuste, foi realizada a diluição de 1:10 em BHIS e em seguida, 20 μL dos inóculos foram transferidos para os poços das microplacas.

A CMI foi determinada por meio da leitura visual da menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento leveduriforme, após incubação a 35,5° C por 48 h.

A CMC foi definida como a menor concentração dos extratos capaz de inibir a recuperação de leveduras viáveis após a transferência de 100 μL do caldo BHIS dos poços sem turvação detectável para placas com ágar CPS (BioMérieux, Brasil) após a incubação das a 35,5° C por 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes e os valores da CMI e CMC foram obtidos.

Atividade dos Extratos Contra a Formação de Biofilme (CMIB₅₀)

A análise da atividade das concentrações de 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78 e 39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos contra a formação de biofilme foi realizada em microplacas de fundo plano (Cral, Brasil) conforme descrito anteriormente no ensaio de biomassa total do biofilme (ZAYED *et al.*, 2021).

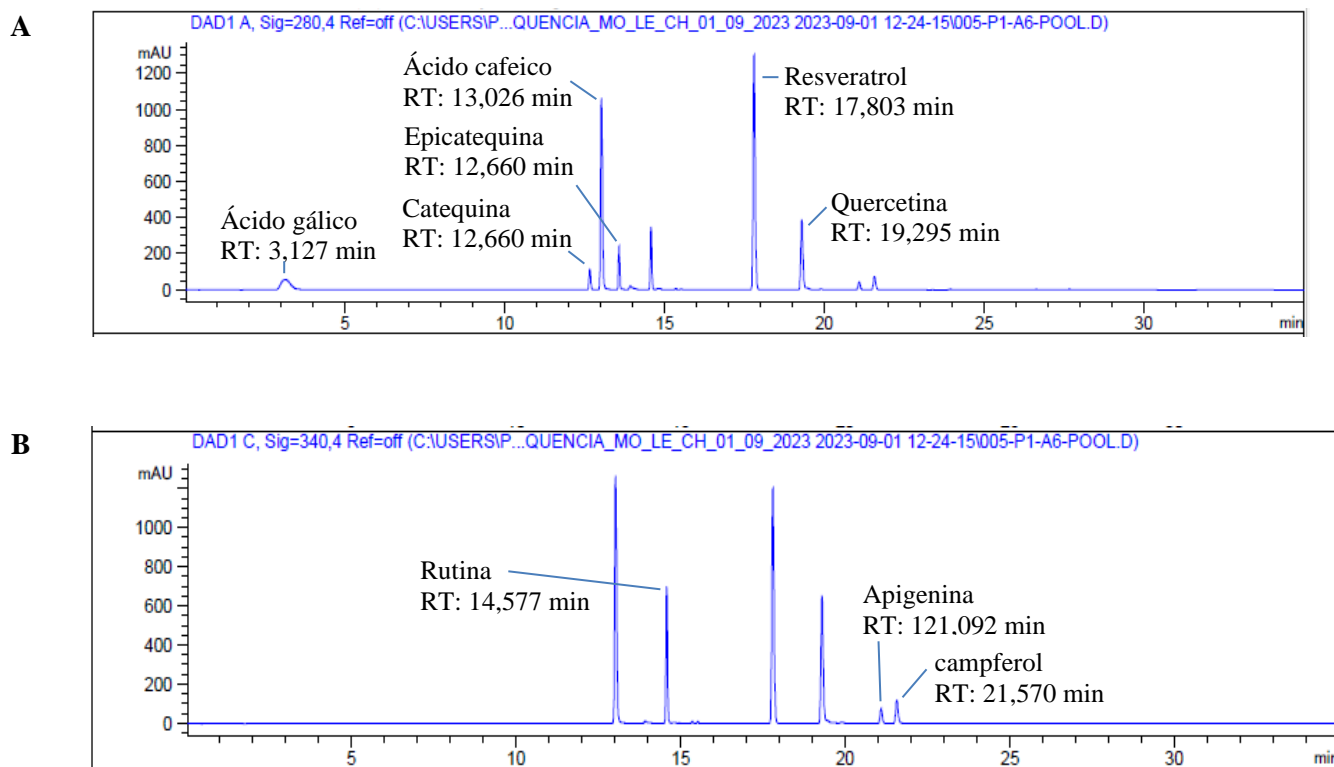
As $\text{DO}_{600\text{nm}}$ dos biofilmes expostos aos extratos foram comparadas com controles não tratados e as menores concentrações capazes de inibir ao menos 50% a formação de biofilme foram consideradas como CMIB₅₀ (Concentração Mínima Inibitória do Biofilme).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento dos Extratos e Identificação dos Compostos

As folhas de *E. klotzschiana* O. Berg, pulverizadas renderam 81,24 g, deste total foram obtidos 40,63 g (16,25%) de EHEk e 40,61 g (16,24%) de EEEk. Os cromatogramas por CLAE dos padrões analíticos e extrato etanólico detectados em 280 e 340 nm estão ilustrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1. Cromatogramas CLAE dos padrões analíticos. A- Cromatograma do pool em 280 nm, ácido gálico (3,127min), catequina (12,660min), ácido cafeico (13,026min), epicatequina (12,660min), resveratrol (17,803min), quercetina (19,295min). B- Cromatograma do pool em 340 nm. Rutina (14,577 min), apigenina (21,092 min), campferol (21,570 min). RT = Tempo de retenção. T = Tempo.



A comparação dos tempos de retenção (RT) e os máximos de absorção dos espectros de UV-Vis (Figura 3) dos picos dos padrões e das amostras permitiram a identificação de rutina (14,577 min e 14,574 min, catequina (12,660 min e 12,650 min) e epicatequina (12,660 min e 13,602 min) na amostra de EEEK. Para o extrato hexânico não foram identificados nenhum dos compostos analisados neste método, por se tratar de um

extrato com compostos predominantemente apolares (Figura 4). Triagens fitoquímicas prévias das folhas de *E. klotzschiana* O. Berg demonstraram a presença de antraquinonas, terpenos, flavonoides, saponinas e taninos (RIBEIRO *et al.*, 2023). Sendo assim, é provável que compostos terpênicos estejam presentes no extrato hexânico.

Figura 2. Cromatogramas CLAE do extrato etanólico. A- Cromatograma a 280 nm; Catequina (12,650 min) e epicatequina (13,602 min). B- Cromatograma a 340 nm, Rutina (14,574 min), RT = Tempo de retenção.

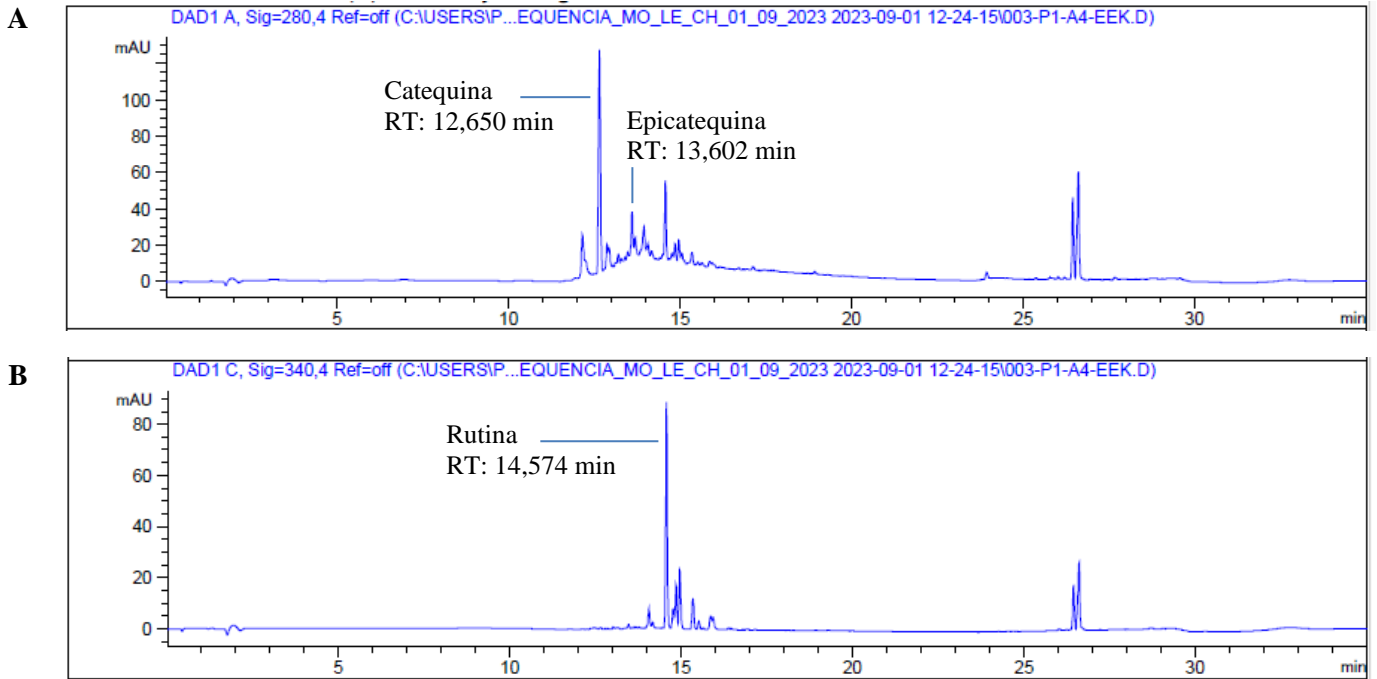


Figura 3. Espectros ultravioleta - UV comparativos de Catequina, Epicatequina e Rutina no extrato etanólico e padrão analítico. A- Catequina (padrão), B- Catequina (extrato etanólico), C- Epicatequina (padrão), D- Epicatequina (extrato etanólico), E- Rutina (padrão), F- Rutina (extrato etanólico).

A

B

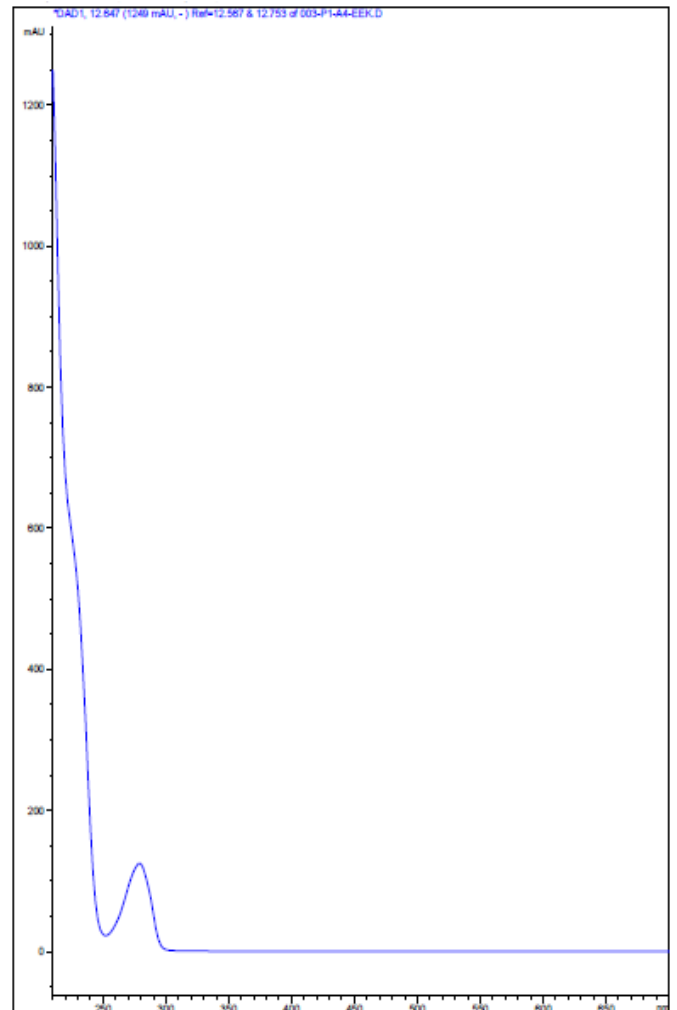
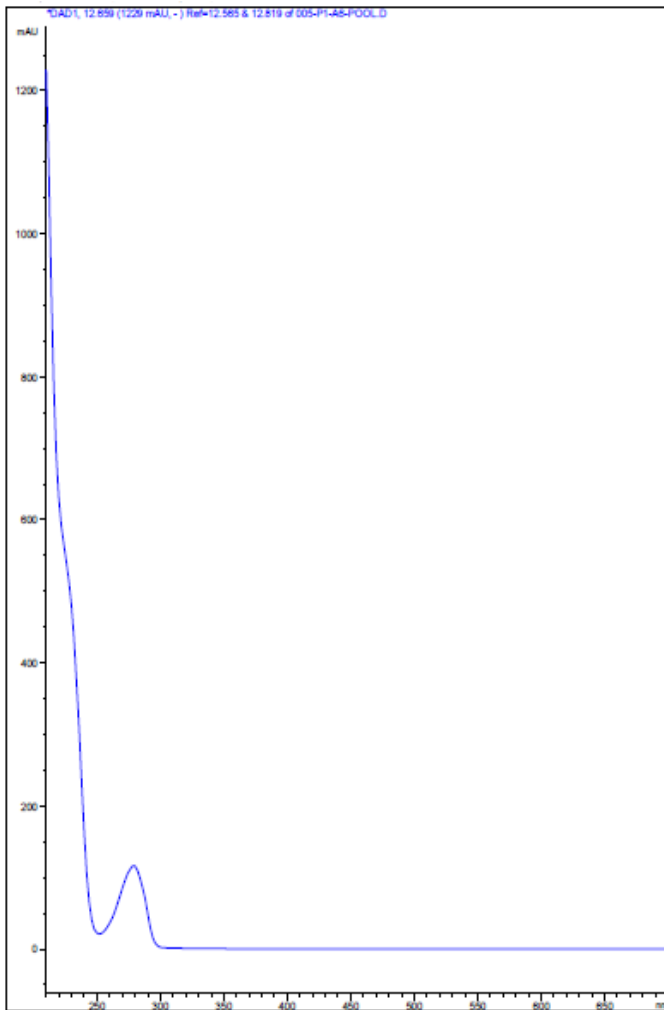
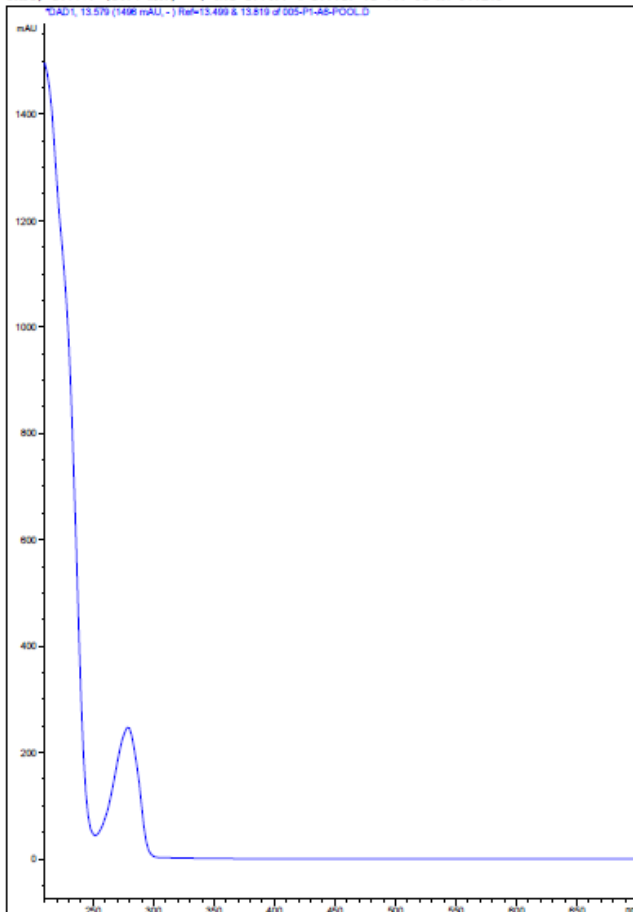


Figura 3. Continuação.

C



D

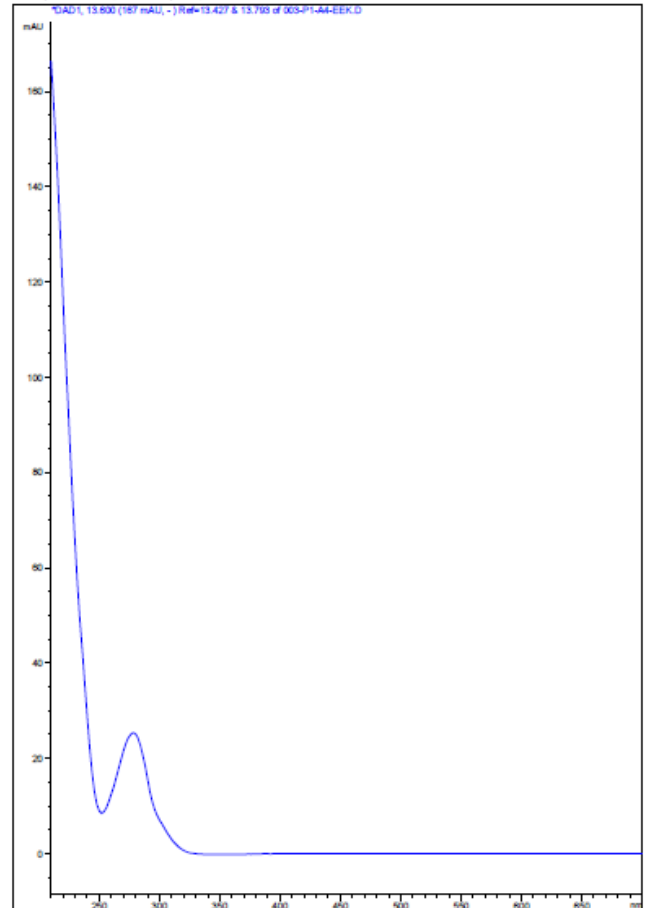
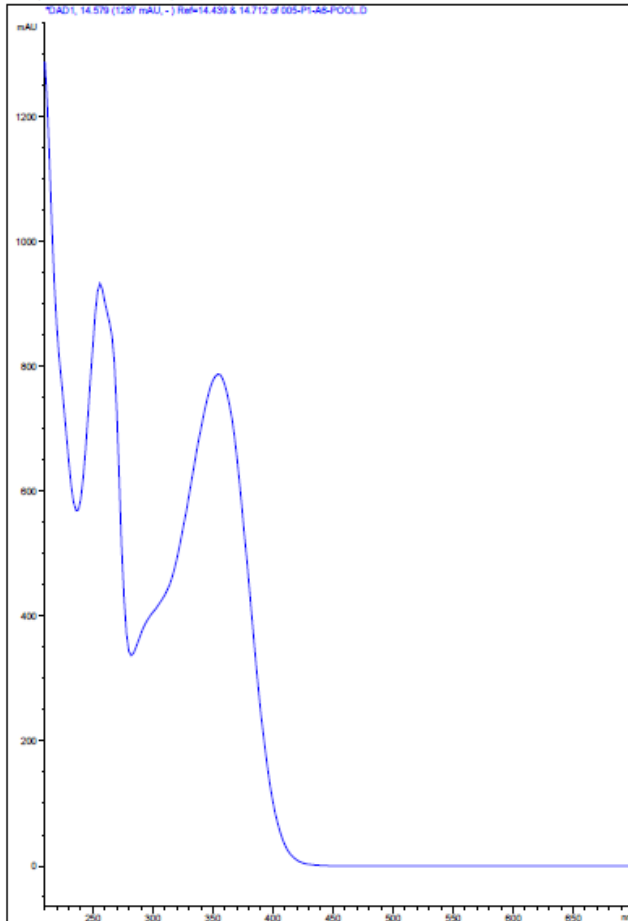


Figura 3. Continuação.

E



F

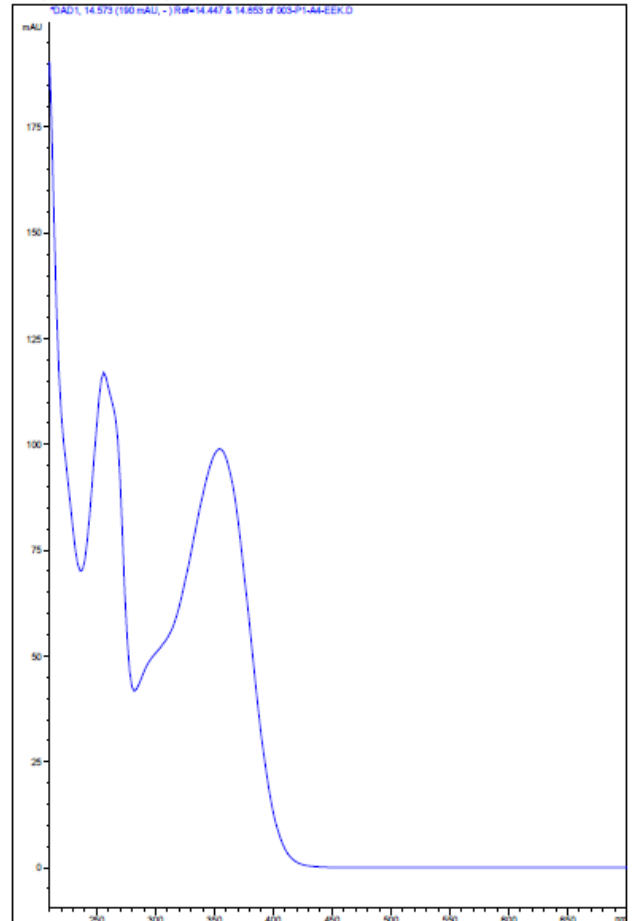
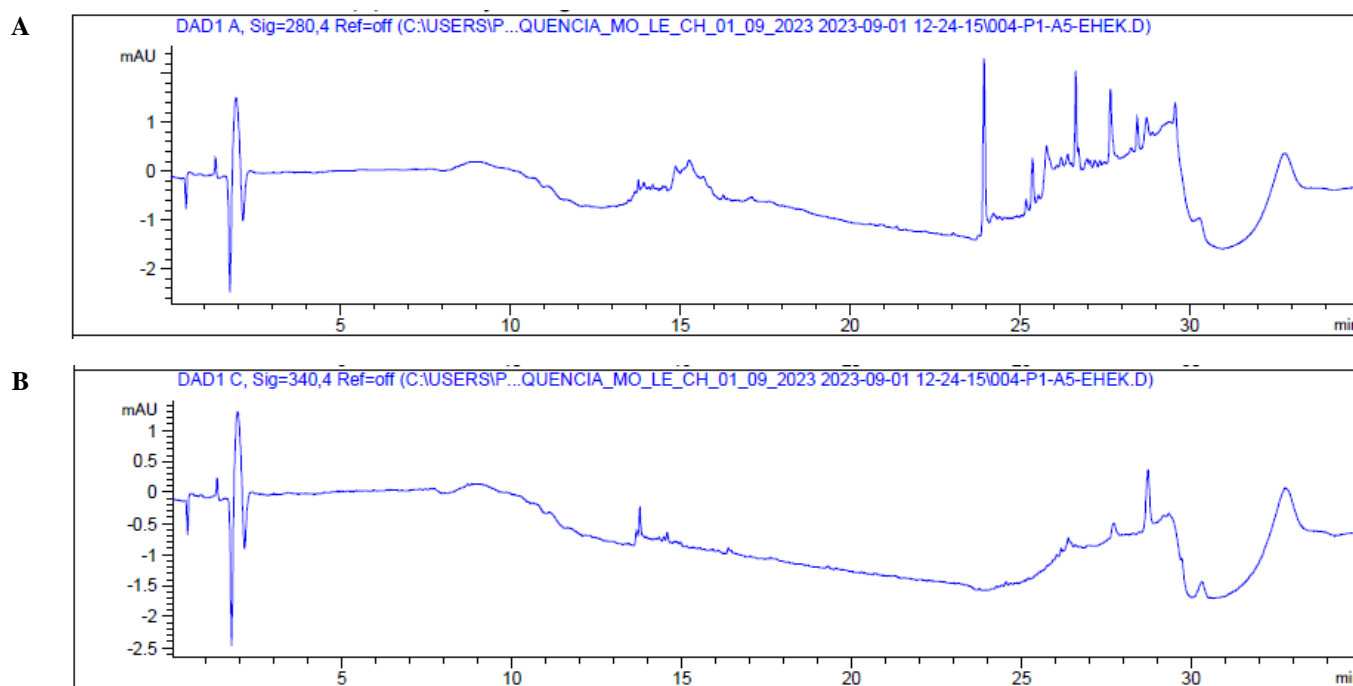


Figura 4. Cromatogramas do extrato hexânico nos comprimentos de onda de 280 e 340 nm.



As catequinas e epicatequinas são polifenóis, flavonoides que possuem atividades antioxidante, antitumoral, antiviral e anti-inflamatória (SANTOS; RODRIGUES, 2017; COSTA *et al.*, 2021).

A rutina é um composto da classe dos flavonoides, flavonol glicosídico com atividades antioxidantes, anti-inflamatória e anticarcinogênica (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

Caracterização das cepas

As leveduras foram identificadas como *Candida albicans* (Ca2, Ca4 e Ca ATCC 10231) e como *Candida krusei* (Ck7, Ck8, Ck11 e Ck12). Embora a espécie *C.*

albicans seja a causa mais comum de infecções fúngicas neste gênero, a incidência de outras espécies agrupadas como *Candidas* não *albicans* (CNa) tem aumentado e atualmente são reconhecidas como agentes emergentes, principalmente em pacientes com patologias imunodepressoras como a AIDS e o uso de fármacos imunossupressores (JAMIU *et al.*, 2021; REICHART *et al.*, 2002).

Na tabela 1 são apresentados os resultados da formação de biofilme. Todas as leveduras estudadas foram capazes de formar biofilme, 4 foram identificadas como formadoras fortes (Ca4, Ck7, Ck8 e Ck11), 2 como formadoras moderadas (Ca2 e Ck12) e a Ca ATCC 10231 foi identificada como formadora fraca de biofilme.

Tabela 1. Densidade Óptica a 600nm dos biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei* detectadas pelo método do cristal violeta.

Cepas	DO _{600nm}		
	MED	DP	Classificação
Ca2	0,626	0,179	Moderada
Ca4	1,422	0,492	Forte
Ck7	2,811	0,361	Forte
Ck8	1,044	0,175	Forte
Ck11	2,005	0,688	Forte
Ck12	0,433	0,104	Moderada
CaATCC	0,232	0,082	Fraca
CNI	0,075	0,007	-

Legenda: DO_{600nm} - Densidade Óptica a 600nm, MED - Média, DP - Desvio Padrão, Ca - *Candida albicans*, Ck - *Candida krusei*, CaATCC - *C. albicans* ATCC 10231, CNI - Controle Não Inoculado.

As leveduras do gênero *Candida* possuem habilidade de formação de biofilme e de formação de comunidades densamente compactadas de células aderidas entre si e superfícies (GULATI; NOBILE, 2016; BARROS *et al.*, 2020). Em nossas condições, todas as leveduras foram capazes de formar biofilme, embora a *C. albicans* ATCC 10231 tenha sido identificada como formadora fraca.

A capacidade de *Candida* sp. em aderir às superfícies bucais e formar biofilmes é bem reconhecida (DUARTE *et al.*, 2022) e o seu diagnóstico e tratamento têm sido um desafio clínico devido a sua resistência (MOHAMMAD; YASHOOA; MUSTAFÁ, 2023), visto que as doenças bucais com maior prevalência possuem relação com a perda da homeostase microbiana, disbiose bucal e formação de biofilme (MILIA; SARDELLITTI; EICK, 2023).

C. albicans é o principal agente patogênico das infecções fúngicas provocadas por leveduras do gênero *Candida*, entretanto outras espécies não albicans têm

ganhado destaque ao longo do tempo no perfil epidemiológico das infecções fúngicas, inclusive sendo identificadas como patógenos multirresistentes as terapias antifúngicas convencionais (JAMIU *et al.*, 2021).

Atividade Antimicrobiana dos Extratos

O extrato hexânico das folhas de *E. klotzschiana* apresentou CMI de 313 $\mu\text{g mL}^{-1}$ resistente ao EHEk foi a Ck11 que foi inibida com 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação à atividade candidida do EHEk, a CaATCC foi a mais sensível com CMC = CMI e a mais resistente contra Ck8 e Ck12 e de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra Ca2, Ca4, Ck7, CaATCC. A levedura mais e foi a Ck11 com CMC > 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O extrato etanólico inibiu todas as leveduras com 313 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exceto a Ck11 que foi inibida com 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A atividade candidida do EEEk foi observada com concentrações a partir de 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2)

Tabela 2. Concentrações inibitória, candidida e inibitória da formação de biofilmes dos extratos das folhas de *E. klotzschiana* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) contra *C. albicans* e *C. krusei*.

	EHEk			EEEk		
	CMI	CMC	CMIB ₅₀	CMI	CMC	CMIB ₅₀
Ca2	625	> 2500	156	313	> 625	1250
Ca4	625	2500	1250	313	> 1250	625
Ck7	625	> 2500	78	313	> 2500	78
Ck8	313	1250	625	313	1250	625
Ck11	1250	> 10000	625	1250	> 1250	625
Ck12	313	1250	78	313	> 625	313
CaATCC	625	625	625	313	> 625	> 5000

Legendas: EHEk - Extrato Hexânico de *Eugenia klotzschiana*, EEEk - Extrato Etanólico de *Eugenia klotzschiana*, CMI - Concentração Mínima Inibitória, CMC - Concentração Mínima Candidida, CMIB₅₀ - Concentração Mínima Inibitória de ao menos 50% do Biofilme, Ca - *Candida albicans*, Ck - *Candida krusei* e CaATCC - *C. albicans* ATCC 10231.

Extratos vegetais com CMI < 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados como muito ativos, com 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com atividade antimicrobiana moderada, 500 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com atividade fraca e acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como inativos (HOLETZ *et al.*, 2002). De acordo com esse critério, ambos extratos apresentaram atividade antifúngica moderada, exceto contra Ck11.

Em outros trabalhos foi encontrado que o extrato da folha de *Eugenia uniflora* foi ativo contra *C. albicans* com CMI > 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e contra *C. krusei* com CMI = 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HOLETZ *et al.*, 2002). O óleo essencial das folhas de *E. uniflora* foi ativo contra *C. albicans* com CMI = 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 8192 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. krusei*. O extrato de *Eugenia involucrata* apresentou CMI > 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Candida albicans* e outras espécies de candidas não albicans (KUBIÇA *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, os extratos apresentaram moderada atividade fungistática e baixa atividade fungicida, dependendo da concentração de cada extrato e da levedura. Especificamente, os resultados para EEEk podem estar relacionados a presença de compostos majoritários, como a catequina, epicatequina e a rutina.

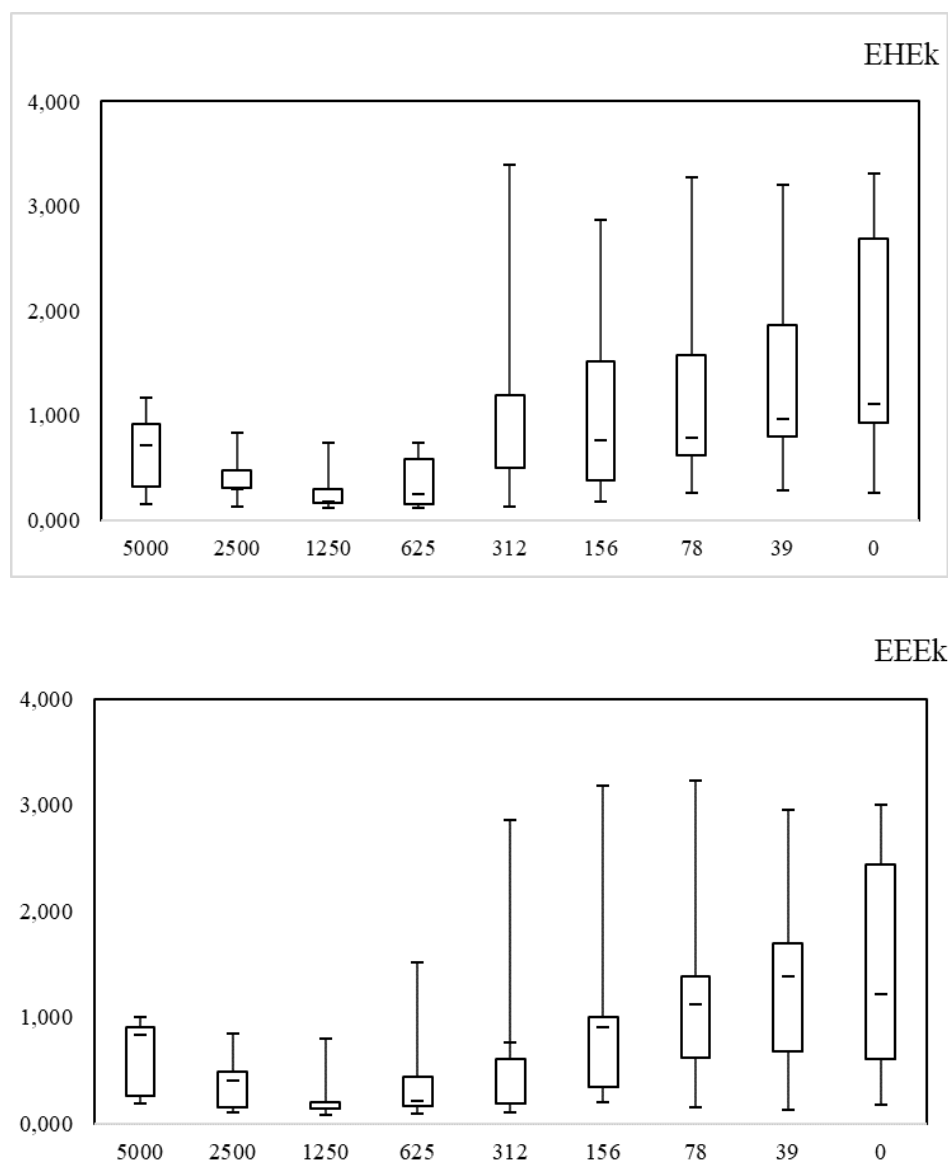
Além disso, saponinas e flavonoides foram identificados previamente nas folhas de *E. klotzschiana* O. Berg (RIBEIRO *et al.*, 2023).

Atividade Antibiofilme dos Extratos

Ambos extratos foram capazes de inibir a formação de biofilme por *C. albicans* e *C. krusei* com CMIB₅₀ entre 78 e 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exceto contra CaATCC cuja formação de biofilme não foi inibida por EEEk, mesmo na concentração mais alta testada (CMIB₅₀ > 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 2). As leveduras mais sensíveis foram a Ck7 e Ck12 com CMIB₅₀ = 78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EHEk e Ck7 com CMIB₅₀ = 78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EEEk. Curiosamente, a Ck7 é a maior formadora de biofilme e uma das mais sensíveis à atividade dos extratos de EHEk e EEEk.

No gráfico 1 é apresentado o impacto de cada concentração dos extratos na formação de biofilme das leveduras. A atividade inibitória da formação de biofilme pelos extratos foi concentração-dependente, com a maior atividade dos extratos detectada entre 312 e 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 5. DO_{600nm} dos biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei* expostos a concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Eugenia klotzschiana*.



Legenda: EHEk - Extrato Hexânico de *E. klotzschiana*, EEEk - Extrato Etanólico de *E. klotzschiana*.

A concentração de 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi a que mais inibiu a formação de biofilme das leveduras, ambos extratos foram capazes de inibir ao menos 70% da formação de biofilme das formadoras fortes. Notadamente, ainda que os extratos não tenham apresentado atividades com baixas concentrações, foram ativos contra a formação de biofilmes fúngicos. Adicionalmente, os extratos etanólico e hexânico das folhas de *E. klotzschiana* a 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram capazes

de reduzir, respectivamente, 94,34% e 93,53% da formação de biofilme pela maior formadora, a *C. krusei* Ck7.

Embora as triagens de produtos naturais com atividade antimicrobiana sejam mais direcionadas para compostos com atividade microbicida e menos esforço seja direcionado para compostos que atuam contra biofilme (GILBERT-GIRARD *et al.*, 2021), trabalhos prévios detectaram que a formação de biofilme por

Candida albicans ATCC 10231 foi reduzida em mais de 99% por óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* Blume em $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf em $6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. além disso, *Allium sativum* L. a $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu em 99,9% a formação de biofilme de *Candida albicans* ATCC 14053 (GUIMARÃES *et al.*, 2021).

As catequinas são ativas contra biofilme de *Alcaligenes faecalis* (LAHIRI *et al.*, 2021). No entanto, quanto à atividade das catequinas contra o biofilme de *Candida* sp., existe divergência na literatura. Haghghi, Mohammadi, Fahardi (2011) encontraram maior atividade antibiofilme do composto comparado ao fluconazol contra *C. albicans* enquanto Alves *et al.* (2014) não encontraram a mesma atividade. A epicatequina combinada com a teaflavina apresentou potencial contra infecções causadas por *C. albicans* (BETTS *et al.*, 2013).

A rutina demonstrou ampla capacidade antimicrobiana e além disso, foi capaz de inibir biofilme bacteriano em cateteres urinários com a redução da biomassa e redução da viabilidade celular, mesmo em concentrações subinibitórias (IVANOV *et al.*, 2022). Contudo, a rutina esteve entre os compostos naturais com menor atividade contra a formação de biofilme de *C. albicans* em trabalhos prévios e esse fato pode estar relacionado à sua maior lipofilicidade, pois o aumento da lipofilicidade pode reduzir a capacidade de passagem pela membrana fúngica (IVANOV *et al.*, 2020).

Entre os compostos ativos contra biofilmes detectados em espécies da família das Myrtaceae, encontram-se o eugenol, timol, linalol, galato de epigallocatequina, mentol, saponina, citral, curcumina, cânfora, mentol, carnosol, cumarina, carvacrol, cineol, canfeno, eucaliptol, cinamaldeído, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, geraniol, citronelol, limoneno, piperina, β -pineno (SHARIAT *et al.*, 2022) e algumas classes de metabólitos secundários como os terpenoides, alcaloides, polifenol, saponina, flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides, naftoquinona (SINGLA; DUBEY, 2019).

A atividade antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *E. klotzschiana* está possivelmente relacionada à presença de compostos majoritários ativos como a

catequina, epicatequina e rutina. Os flavonoides representam uma classe de compostos naturais que podem ser empregados no tratamento da candidíase oral. A catequina e a epicatequina foram descritas como ativas contra o crescimento e formação de biofilme de *C. albicans* por meio da inibição da atividade proteossômica da levedura (NGUYEN *et al.*, 2021).

CONCLUSÃO

Os principais compostos identificados no extrato etanólico foram a catequina, a epicatequina e a rutina. Esses compostos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, o que pode contribuir para a atividade dos extratos contra as leveduras.

Apesar dos extratos terem apresentado atividade antifúngica moderada dependendo da concentração e da levedura testada, foram eficazes contra a formação de biofilme por *C. albicans* e *C. krusei*, com CMIB₅₀ entre 78 e $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$. As leveduras mais sensíveis à atividade dos extratos foram Ck7 e Ck12, com CMIB de $78 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cabe destacar que a levedura *C. krusei* Ck7 foi identificada como a maior formadora de biofilme e teve sua formação de biofilme fortemente reduzida pelos extratos etanólico e hexânico.

Nosso trabalho é o primeiro relato da atividade antibiofilme dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Eugenia klotzschiana* contra *Candida albicans* e *Candida krusei* isoladas da cavidade bucal. Os extratos apresentaram atividade fungistática moderada e ação fungicida discreta, contudo foram ativos contra a formação de biofilme e foram capazes de inibir em mais de 90% a formação de biofilme na maior formadora.

Portanto, nossos resultados demonstraram o potencial dos extratos das folhas de *E. klotzschiana* como agentes com atividade antibiofilme e reforçam a importância de se investigar compostos naturais que possam atuar na inibição da formação de biofilmes e de se ampliar os estudos para validar o potencial terapêutico da de *E. klotzschiana*, especialmente em um contexto de resistência antimicrobiana crescente.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. T.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future**

Microbiology, v. 9, n. 2, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.147>.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais

brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, mar-abr, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000200028>.

APARNA, M.S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, dez., 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000600016>.

BARROS, P.P.; ROSSONI, R.D.; SOUZA, C.M.; SCORZONI, L.; FENLEY, J.C.; JUNQUEIRA, J.C. *Candida* Biofilms: An update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. **Mycopathologia**, v. 185, p.415-424, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00445-w>.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutina-estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2009.

BETTS, J.W.; WAREHAM, D.W.; HASWELL, S.J.; KELLY, S.M. Antifungal synergy of theaflavin and epicatechin combinations against *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, n.3, p.1322-1326, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1303.03010>.

CARNEIRO, N.S.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; EGEEA, M.B.; *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160652>.

CARNEIRO, N.S.; ALVES, C.C.F.; CAGNIN, C.; BELISARIO, C.M.; SILVA, M.A.P.; *et al.* *Eugenia Klotzschiana* O. Berg fruits as new sources of nutrients: Determination of their bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019170562>.

CARNEIRO, N. S.; ALVES, J. N.; ALVES, C. C. F.; ESPARANDIM, V.R. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): Composição química e

atividades tripanocida e citotóxica *in vitro*. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160652>.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 28, fev., 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>.

CEGELSKI, L; MARSHAL, G. R.; ELDRIDGE, G.R.; HULTGREN, S. J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature** 6: 17-27, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038%2Fnrmicro1818>.

COSTA, M.C.B.; RODRIGUES, L.A.R.L.; CRISÓSTOMO, J.M.; FARIAS, L.M.; *et al.* Efeito da suplementação de catequinas na perda de peso em indivíduos obesos: uma Revisão Sistemática. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13185>.

DOMINGUES, N. 62f. Avaliação de extratos de plantas medicinais em biofilmes multiespécie de *Candida albicans* com *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tese (Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista- Unesp), 2018.

DUARTE, R. F.; SEABRA, C. L.; ROCHA, S.; HENRIQUES, M.; SAMPAIO, P.; *et al.* Metabolic profile of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* interactions within dual-species biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 98, n. 4, abr., 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac031>.

FANGMEI, F.; LIU, Y.; LIU, Y. Q.; LV, R.; SUN, W.; *et al.* *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 60, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106673>.

FERNANDES, R. A.; MONTEIRO, D. R.; ARIAS, L. S.; FERNANDES, G. L.; DELBEM, A. C. B.; *et al.* O-029 Análises do efeito do farnesol na formação de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. **Archives of Health Investigation**, v.4, n.1, 2015.

FERREIRA, L. K. N.; PEDROSO, N. A.; OLIVEIRA, J.R.; ANTIQUEIRA, L.M.O.R. Plantas Medicinais do Cerrado dos Campos Gerais. **Biodiversidade Brasileira Revista Científica**, v. 12, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.37002/biodiversidadebrasileira.v12i1.1676>.

GIRARD, S. G.; REIGADA, I.; SAVIJOKI, K.; KAUALUOMA, J.; FALLARERO, A. Screening of natural compounds identifies ferutin as an antibacterial and anti-biofilm compound. **Biofouling**, v. 37, n. 7, p. 791-807, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1971655>.

GUIMARÃES, R.; MILHO, C.; LIBERAL, A.; SILVA, J.; FONSECA, C.; *et al.* Antibiofilm potential of medicinal plants against *Candida* spp. oral biofilms: A Review. **Antibiotics**, v. 10., n. 9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091142>.

GULATI, M.; NOBILE, C.J.; *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 301-321, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>.

HAGHIGHI, F.; MOHAMMADI, S.H.R.; FARHADI, Z. The effect of catechin on fungal biofilm formation of standard susceptible and resistant strains of *Candida albicans*. **Armaghane-danesh**, v. 16, n. 4, 2011.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; *et al.* Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.

IVANOV, M.; KANNAN, A.; STOJKOVIĆ, D. S.; GLAMOČLIJA, J.; CALHELHA, R. C.; *et al.* Flavones, Flavonols, and Glycosylated Derivatives—Impact on *Candida albicans* Growth and Virulence, Expression of CDR1 and ERG11, Cytotoxicity. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14010027>.

IVANOV, M.; NOVOCIC, K.; MALESEVIC, M.; DINIC, M.; STOJKOVIC, D.; JOVICIC, B.; SOKOVIC, M. Polyphenols as inhibitors of antibiotic resistant bacteria - Mechanisms underlying rutin interference with

bacterial virulence. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15030385>.

JAMIU, A. T.; ALBERTYN, J.; SEBOLAI, O.M.; POHL, C.H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, jan., p.14-30, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa031>.

KARPIŃSKI, T. M.; OŻAROWSKI, M.; SEREMAK-MROZIKIEWICZ, A.; WOLSKI, H.; ADAMCZAK, A. Plant preparations and compounds with activities against biofilms formed by *Candida* spp. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7050360>.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 15, jul., 2010.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, fev., 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237>.

KUBIÇA, T. F.; FORTES, T. A.; SILVA, L. L.; GINDRI, A. L.; ALVES, S. H.; *et al.* Avaliação da suscetibilidade de *Candida* spp frente ao extrato etanólico de *Eugenia involucrata* DC. **Multiciência online**, v. 4, n. 7, 2019.

LAHIRI, D.; NAG, M.; DUTTA, B.; MUKHERJEE, I.; GOSH, S.; DEY, A.; BANERJEE, R.; RAY, R. R. Catechin as the most efficient bioactive compound from *Azadirachta indica* with antibiofilm and anti-quorum sensing activities against dental biofilm: an in vitro and in silico study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.193, p.1617–1630, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03511-1>.

LUBIAN, C. T.; TEIXEIRA, J. M.; LUND, R. G.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (*Asteraceae*) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, abr., 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000200006>.

MELANDA, H. C. C. 73f. **Biofilmes e plantas medicinais**: Evidência científica. Dissertação (Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra), 2019.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. Biofilms: Knowing the Entity. **Journal of Aging & Innovation**, v. 1, n. 2, p. 23-32, 2012.

MILIA, E. P.; SARDELLITTI, L.; EICK, S. Antimicrobial efficiency of *Pistacia lentiscus* L. derivatives against oral biofilm-associated diseases - A narrative review. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061378>.

MOHAMMAD, K. A.; YASHOOA, R. K.; MUSTAFÁ, S. A. Incidence of *Candida* species biofilms in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy treatment. **BioMed Target Journal**, v. 1, n. 1, jun., p. 18-23, 2023. DOI: <https://doi.org/10.59786/bmtj.114>.

NEWPROV PRODUTOS PARA LABORATÓRIO LTDA. Bula: **Cromonew Candida**. Paraná, 16 jun., 2022.

NGUYEN, W.; GRIGORI, L.; JUST, E.; SANTOS, C.; SELEEM, D. The in vivo anti-*Candida albicans* activity of flavonoids. **Journal of Oral Biosciences**, n. 63, n. 2, jun., 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.03.004>.

REICHART, P. A.; SAMARANAYAKE, L. P.; SAMARANAYAKE, Y. H.; GROTE, M.; POW, E.; CHEUNG, B. High oral prevalence of *Candida krusei* in leprosy patients in Northern Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 4479-4485, dec., 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.12.4479-4485.2002>.

RIBEIRO, C. L.; PAULA, J. A. M.; PEIXOTO, J. C. Propriedades farmacológicas de espécies dos gêneros: *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium* –Myrtaceae-, típicas do Cerrado: Uma revisão de escopo. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30356>.

RIBEIRO, C. L.; PEREIRA, M. J.; RAMIRO, A. P.; MARTINS, J. L. R.; NAVES, P. L. F.; PEIXOTO, J. C. Estudos botânico, fitoquímico e de atividades biológicas das folhas de *Eugenia klotzschiana* O. Berg. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**,

v. 12, n. 1, p.47-64, jan./jun., 2023. DOI: <https://doi.org/10.31668/revsap.v12i1>.

RIBEIRO, C. L.; SOUZA, J. M. F.; PEIXOTO, J. C. Distribuição Geográfica de Táxons da Família Myrtaceae de Ocorrência no Cerrado. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 12, n. 1, p. 199-209, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2023v12i1.p199-209>.

SANTOS; D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: Um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, set.-dez. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35>.

SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K. Molecules and metabolites from natural products as inhibitors of biofilm in *Candida* spp. pathogens. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174%2F1568026619666191025154834>.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões foliares de espécies de Myrtaceae do Cerrado (Savana Brasileira). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.03314>.

WAYNE, P. A. Clinical and laboratory standards institute: performance standards for antimicrobial susceptibility testing: informational supplement, M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, 2018.

ZAYED, S. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASHEM, A. M.; SALEH, S. E. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. **AMB Expr**, v. 11, n. 73, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01232-6>.