

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

FLAVIA EDUARDA VIDAL BARBOSA

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Curatella americana* L. (DILLENACEAE)
FRENTE À BACTÉRIA FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO**

Juazeiro do Norte – CE
2018

FLAVIA EDUARDA VIDAL BARBOSA

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Curatella americana* L. (DILLENACEAE)
FRENTE À BACTÉRIA FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Aracélio Viana Colares

Co-orientador: Victor Juno Alencar Fonseca

FLAVIA EDUARDA VIDAL BARBOSA

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Curatella americana* L. (DILLENACEAE)
FRENTE À BACTÉRIA FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO**

Artigo Científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Aracélio Viana Colares

Co-orientador: Victor Juno Alencar Fonseca

Data da Aprovação: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares

Prof^ª. Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues

Prof. Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Curatella americana* L. (DILLENIACEAE) FRENTE À BACTÉRIA FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO

FLAVIA EDUARDA VIDAL BARBOSA¹ VICTOR JUNO ALENCAR FONSECA²
ARACÉLIO VIANA COLARES³

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo obter o perfil fitoquímico e analisar o potencial antibacteriano do extrato etanólico das entrecascas de *Curatella americana* L. (EECa) sobre a linhagem de *Streptococcus mutans* (ATCC 00446), bactéria formadora de biofilme dentário. O perfil fitoquímico foi realizado por meio de HPLC (High performance liquid chromatography) e foram utilizados os métodos de microdiluição e modulação com clorexidina para determinação da atividade antimicrobiana. A atividade antiaderente do composto foi realizada através da indução do crescimento do biofilme em tubos de ensaio, para a leitura adicionou-se aos tubos três gotas do evidenciador após incubação por 24 horas em estufa. Os resultados demonstraram que a luteolina e epicatequina foram os compostos majoritários do EECa. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi de 512 µg/mL. No teste de modulação com clorexidina o extrato etanólico de *Curatella americana* L. apresentou resultado antagônico, ou seja, reduziu a ação do fármaco. Portanto, o extrato etanólico apesar de possuir compostos com possível ação antibacteriana não demonstra resultados frente a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*, fazendo-se necessário o desenvolvimento de estudos que elucidem melhor o papel destes na inibição bacteriana.

Palavras- chave: Biofilme, Extrato Etanólico, *Streptococcus mutans*.

PHYTOCHEMICAL PROFILE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF THE SAPWOOD OF *Curatella americana* L. (DILLENIACEAE) IN FRONT OF THE DENTARY BIOFILM FORMAT BACTERIA

ABSTRACT

The objective of the present study was to obtain the phytochemical profile and to analyze the antibacterial potential of *Curatella americana* L. (EECa) in the strains of *Streptococcus mutans* (ATCC 00446), dental biofilm forming bacteria. The phytochemical profile was performed using HPLC (High performance liquid chromatography) and the microdilution and modulation with chlorhexidine methods were used to determine the antimicrobial activity. The anti-adherent activity of the compound was performed by inducing the growth of the biofilm in test tubes, for reading three drops of the evidentiary were added to the tubes after incubation for 24 hours in an oven. The results demonstrated that luteolin and epicatechin were the major compounds of EECa. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract was 512 µg / mL. In the chlorhexidine modulation test the ethanol extract of *Curatella americana* L. present an antagonistic result, that is, it reduced the action of the drug. Therefore, the ethanolic extract in spite of having compounds with possible antibacterial action does not show results against the

¹Discente do curso de biomedicina, faahvidal@gmail.com, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, Ceará.

²Biomédico, victorjuno5@gmail.com, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio.

³ Docente do curso de biomedicina, aracelio@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, Ceará.

inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, making necessary the development of studies that better elucidate their role in the bacterial inhibition

Keywords: Biofilm, Ethanol Extract, *Streptococcus mutans*.

1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais não é decorrente dos conhecimentos da sociedade do século XXI, registros históricos demonstram que a humanidade, a mais de dois mil anos antes de Cristo, já possuía o hábito de utilizar ervas com finalidades terapêuticas. Apesar deste fato, o seu uso diante das enfermidades não se encontra obsoleto, sendo muitas as ocasiões nas quais observa-se a aplicação destas como forma de tratamento (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; FRANÇA et al., 2008).

Devido ao baixo custo das plantas medicinais e por demonstrarem baixos efeitos colaterais em relação aos fármacos comercializados atualmente, acabam sendo mais utilizadas para o tratamento de enfermidades, principalmente as ocasionadas por bactérias. Muitos estudos demonstram que algumas substâncias presentes nestas são capazes de inibir o desenvolvimento das infecções causadas por esses microrganismos (ALMEIDA et al., 2009; SARAIVA, 2012).

Contudo, os microrganismos são capazes de se adaptar e evadir dos efeitos antimicrobianos, seja de origem medicamentosa ou orgânica. Um dos mecanismos de defesa mais bem-sucedidos são os biofilmes, definidos pela adesão bacteriana a uma superfície, sequenciada de uma proliferação com formação de camadas celulares dentro de uma matriz de exopolissacarídeo (COSTA et al., 2016; OLIVEIRA; BRUGNETRA; PICCOLI, 2010).

Uma das bactérias que possui a capacidade de gerar biofilmes é *Streptococcus mutans*, fortemente associada a cárie dentária, esta é classificada como sendo uma espécie Gram positiva em forma de coco, pertencente ao gênero *Streptococcus* do grupo A. Esta bactéria possui a habilidade de metabolizar a sacarose e produzir substâncias que favoreçam o seu crescimento a partir da inibição de outras espécies (KLEIN, 2003; LEMOS et al., 2013).

Nesse sentido, pesquisas realizadas com os metabolitos secundários produzidos por plantas medicinais, demonstram que estes são capazes de inibir o desenvolvimento bacteriano de várias formas. Estudos desenvolvidos com vegetais presentes na região da Caatinga brasileira, como *Vinca minor* L., *A.cearensis* e *H.martiana*, apontam que muitas ervas tem apresentado resultados promissores contra a formação de biofilmes, visto que em sua composição observa-se a presença de antimicrobianos como taninos, quinonas, alcaloides e etc (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003; MALAFAIA, 2016).

Fazendo parte deste bioma encontra-se, também, *Curatella americana* L. que é uma angiosperma pertencente a família Dilleniaceae localizada nas regiões de Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica, sendo conhecida popularmente como “lixreira”. Estudos demonstram que esta planta possui em sua composição química substâncias como flavonoides e terpenos, que são conhecidos por possuírem atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral e analgésica (HENRIQUES; ALMEIDA, 2013; JUNIOR, 2013).

Atividades desenvolvidas com esta espécie apontam que o seu uso frente a cepas bacterianas do gênero *Staphylococcus* demonstram eficientes resultados, porém apesar deste fato ainda não foram registrados estudos que comprovem a eficácia desta espécie contra a capacidade de gerar biofilmes das bactérias que detém este mecanismo.

Desta forma, com este estudo buscou-se analisar o potencial antibacteriano do extrato etanólico das entrecasas de *Curatella americana* L. sobre a bactéria *Streptococcus mutans*.

2 METODOLOGIA

2.1 TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho foi de natureza experimental, com abordagem qualitativa e quantitativa.

2.2 LOCAIS DA PESQUISA

A caracterização química e preparo do extrato foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Todos os testes de atividade antibacteriana, modulatória e de biofilmes foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e Bioquímica do Centro Universitário Leão Sampaio, no município de Juazeiro do Norte – CE.

2.3 PERÍODO

As atividades foram realizadas durante o período de setembro a outubro de 2018.

2.4 MATERIAL VEGETAL

As entrecascas de *Curatella americana* foram coletadas num enclave de Cerrado localizado em área core de Caatinga, município de Lavras da Mangabeira, mesorregião do Centro-Sul do Ceará, Nordeste do Brasil, sob as seguintes coordenadas geográficas: 06° 72' 2432" S e 38° 97' 7396" W. Foi coletado o material botânico e confeccionadas exsiccatas que foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, e que está sendo aguardando a identificação final.

2.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato etanólico foi obtido a partir de previa seleção, secagem em estufa a 60 °C, pesagem e submissão à maceração com etanol PA por sete dias. Após este período foi feita a filtração e a concentração do extrato, destilando todo o solvente da solução em evaporador rotativo sob pressão reduzida (40 rpm a 60 °C) e depois em banho-maria a 60 °C, obtendo-se os extratos brutos (MATOS, 1997).

2.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Curatella americana* L. (Dilleniaceae)

Para análise da composição química do Extrato Etanólico de *Curatella americana* L. (EECa) cumpriu-se o método descrito por Waczuk et al. (2015). O extrato de *C.americana* foi injetado na coluna de fase reversa Phenomenex C₁₈ (4,6 mm x 250 mm) com enchimento de 5 µm de diâmetro. A fase móvel foi com água Milli-Q, com pH 2,0, 1% de ácido fosfórico e metanol. Foi utilizado uma concentração de 10 mg/mL do extrato, a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min, com volume de injeção de 50 µL. A amostra e a fase móvel foram filtradas por meio de filtro de membrana de 0,45 µm e em seguida, desgaseificado por banho de ultrassons antes da utilização. As soluções *stock* de referências padrões foram preparados em metanol: água (1:1, v/v) e em concentrações que irão variar de 0,030 a 0,500 mg/mL. Os picos foram confirmados por cromatografia de comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

2.7 PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL

Para a efetuação dos testes primeiramente realizou-se o preparo de uma solução inicial, onde o extrato etanólico foi solubilizado em Dimetilsulfóxido a 3%. Em seguida, as soluções foram diluídas em água destilada atingindo concentração de 1024µg/mL, onde foram realizadas diluições seriadas 1:2 durante o teste de microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato variando de 512 a 1µg/mL.

2.8 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados durante as atividades foram, *Brain Heart Infusion* – BHI ágar, BHI caldo e BHI sacarosado, todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

2.9 MICRORGANISMO

O microrganismo empregado foi a cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* (ATCC 00446). A linhagem foi mantida em BHI Agar. Em seguida suspensa em tubo de ensaio com salina 0,9% para obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

2.10 ENSAIOS ANTIBACTERIANO E MODULADOR

A Concentração mínima inibitória (CIM) foi determinada utilizando um ensaio de microdiluição. Antes do inóculo bacteriano, foram adicionados 100 µL de caldo BHI e amostras do extrato etanólico (100 µL) que foram diluídas em série, dando concentrações finais de 512-4 µg/mL. Após isto um inóculo de 10 µL da suspensão bacteriana (10^5 UFC / mL) foi acrescentado nos 96 poços utilizados da placa de microdiluição, não sendo adicionado o microrganismo apenas nos controles negativos (MANN; MARKHAN, 1998).

A modulação foi realizada seguindo o método de Coutinho *et al* (2008) com a solução do extrato em adição da clorexidina, onde utilizou-se a CIM/8, resultando em uma concentração inicial de 64 µg/mL. Assim como na CIM, foram primeiramente distribuídos 100 µL de uma solução contendo caldo BHI, inóculo e extrato, em seguida 100 µL da

clorexidina foram adicionados os quais foram diluídos seriadamente na placa de microdiluição.

2.11 ENSAIOS DE BIOFILME

Para os testes envolvendo biofilme, foram utilizados tubos de ensaio contendo 2,5 mL de BHI sacarosado, 0,5 mL do inóculo bacteriano e 0,5 mL da solução preparada do EECa. Todos os tubos utilizados foram incubados em estufa com uma inclinação de 30° a uma temperatura de 37° C durante vinte e quatro horas. Após este período foi realizada a leitura dos mesmos com adição de 2 gotas do evidenciador de placa (Eviform®, São Paulo-SP, Brasil). Os testes foram realizados em duplicata.

2.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos com a CIM e modulação foram distribuídos em planilha utilizando software *Microsoft Excel*®2010 e em gráficos usando o programa *GraphPadPrism* 7.04. Os resultados foram comparados através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias geométricas foi realizada de acordo com teste de Bonferroni sendo considerado significativo quando $p < 0,001$.

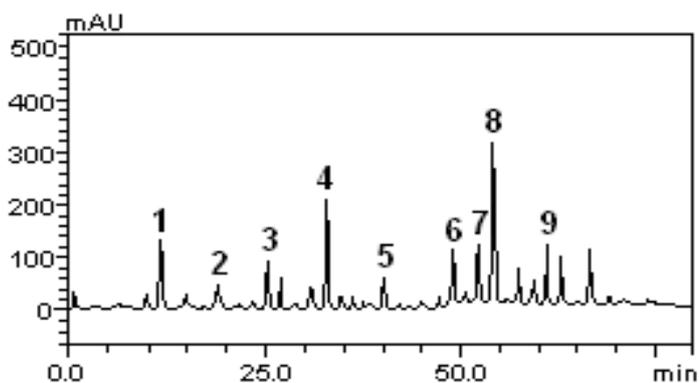
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do extrato etanólico de *Curatella americana* L. (EECa) revela que este possui em sua composição química diversas substâncias com possíveis atividades antibacterianas como ácidos fenólicos, ácidos gálicos e flavonoides (ANDRADE, 2008). Em pesquisas desenvolvidas com esta espécie por Henriques e Almeida (2013) foi possível, também, a identificação de constituintes como taninos, açúcares redutores, saponinas, depsídeos e depsídonas, esteroides, triterpenoides e alcaloides, compostos que conhecidamente possuem atividade anti-inflamatória.

Através do método de cromatografia líquida de alta eficiência, no presente estudo, foi possível detectar e quantificar, como demonstrado no Gráfico 1 que no EECa estão presentes ácidos fenólicos ácido gálico, ácido cafeico, flavonoides epicatequina, rutina, quercitrina, quercetina, luteolina, apigenina. Sendo assim é possível observar que o produto apresenta uma

maior quantidade de luteolina (pico 8), epicatequina (pico 4) e ácido gálico (pico 1), substâncias que apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana e etc.

Gráfico 1: Constituição fitoquímica do EECa



Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência representativo do extrato etanólico de lixeira. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido cafeico (pico 3), epicatequina (pico 4), rutina (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7), luteolina (pico 8), Apigenina (pico 9).

Fonte: Primária.

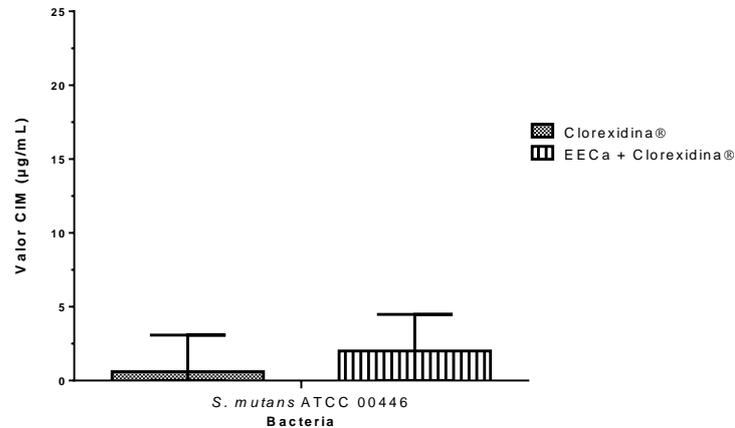
Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EECa, foi possível observar que frente a linhagem de *Streptococcus mutans* (ATCC 00446) o produto não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas, enquanto que com a clorexidina, fármaco utilizado comercialmente no combate de biofilmes dentários, apresentou inibição da espécie até a concentração de 0,000234375% como representado na tabela 1.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de *Curatella americana* frente a cepa de *Streptococcus mutans* formadora de biofilme dentário.

Composto	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
	<i>S. mutans</i> ATCC 00446
EECa	$>512 \pm 0.088$
Clorexidina®	$0,023 \pm 0.047$

A partir dos resultados da modulação observa-se que o produto vegetal reduziu a ação do fármaco testado, visto que só foi observada inibição do crescimento bacteriano até a concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico e 0,001875% da clorexidina, representados no Gráfico 2.

Gráfico 2: Atividade moduladora do extrato etanólico de *Curatella americana* L. (EECa) com clorexidina®, frente a cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 00446)



Fonte: Primária.

Segundo estudos realizados com esta espécie por Junior (2013), apesar de deter fitoconstituintes com possíveis atividades bactericidas, a utilização do extrato etanólico da mesma não demonstra eficiente resultado frente a cepas microbianas como *Staphylococcus aureus*. Deste mesmo modo, pesquisas envolvendo *Mycobacterium fortuitum* elucidam, também, que o uso do extrato das cascas de *Curatella americana* L. não é capaz de inibir o crescimento bacteriano, somente observa-se algum resultado de inibição quando se realiza a associação deste com os antibióticos comerciais (ARANTES et al., 2005).

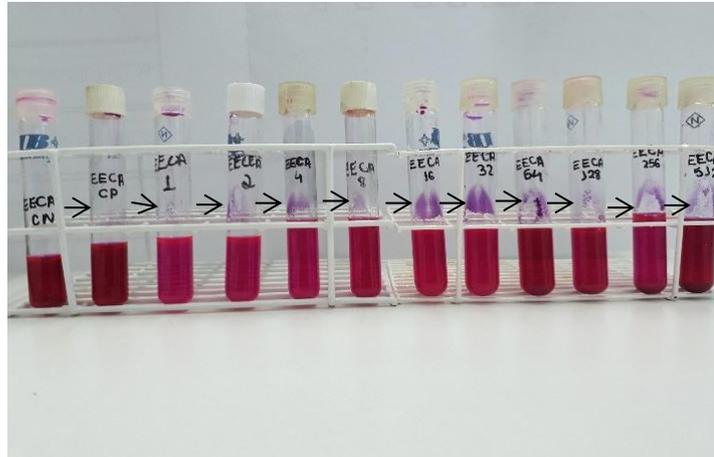
Pesquisas que envolveram o uso de óleos e extratos etanólicos frente a diferentes cepas bacterianas demonstram que o uso de óleos essenciais é mais eficaz do que o de extratos e isto se atribui ao fato de que os compostos químicos que estão presentes naqueles são pertencentes às diferentes classes químicas, o que lhes permite uma abrangência maior diante de microrganismos (DUARTE, 2006).

Além da importância do tipo de composto utilizado, Fabris (2017) cita que fatores como as cepas testadas, o local e a época de coleta da planta, a forma de preparação dos extratos, a quantidade testada do produto vegetal e se estes provém de partes diferentes da planta são situações importantes para avaliação da eficácia do mesmo, podendo assim ocorrer resultados diferentes dos esperados.

Seguindo os resultados observados na CIM e na modulação, também não houve a inibição da formação do biofilme bacteriano por parte do EECa, pois em todas as

concentrações testadas do produto a bactéria conseguiu aderir ao vidro, que foi demonstrada a partir da adição do evidenciador de placa bacteriana na parede dos tubos de ensaio, onde todo material aderido adquiri uma coloração rosada, como representado na Figura 1.

Figura 1: Resultado dos biofilmes com *Streptococcus mutans*



EECA: Extrato Etanólico de *Curatella americana* L.; CP: Meio mais inoculo; CN: Apenas meio.

Todo material aderido a parede do tubo representam biofilmes bacterianos, como demonstrado pelas setas. Não sendo observado apenas no controle negativo.

Fonte: Primária.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os observados em uma pesquisa realizada por Teixeira (2012), onde utilizou-se o extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* Linn., planta que possui em sua composição química a presença de flavonoides, taninos e dentre outros compostos com ação antibacteriana, e através de uma metodologia distinta foi possível concluir que esta também não obteve efeito positivo frente a biofilmes de *Streptococcus mutans*.

4 CONCLUSÃO

A partir dos dados analisados é possível aobservar, portanto, que apesar de apresentar em sua composição química compostos que conhecidamente possuem atividades antimicrobianas, o uso do extrato etanólico das entrecascas de *Curatella americana* L. não demonstra ação frente a bactéria *Streptococcus mutans*, fato que pode ser atribuído a associação entre compostos, fazendo-se necessário o desenvolvimento de estudos que expliquem de forma ampla o processo de inibição bacteriana e o papel destes compostos na atividade.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 16, n. Supl, 2006.
- ALMEIDA, N. F. L. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Viçosa – MG. **Revista brasileira de farmacologia**. v.90, n.4, 2009.
- ANDRADE, L. S. Estudo do potencial mutagênico e antimutagênico de *Curatella americana* L. **Revista de biologia neotropical**. v. 5, n. 1, 2008.
- ARANTES, V.P. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra Mycobacterium fortuitum. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.26, n. 3, 2005.
- COSTA, K. A. D. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 71, n. 2, 2016.
- COUTINHO, H.D.M.et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant Escherichia coli by Mentha arvensis L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**. v.54, 2008.
- DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. **Plantas con acción antimicrobiana**. **Revista española de quimioterapia**. V. 16, n. 4, 2003.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multicêntrica**. v.1, n. 7, 2006.
- FABRIS, R. C. **Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos hidroalcoolicos das folhas Myracrodruon urundeuva All.e Qualea grandiflora Mart. Sobre Streptococcus mutans e Lactobacillus casei**. Tese (Doutorado, Faculdade de odontologia de Bauru) Universidade de São Paulo, 2017.
- FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**. v. 61, n. 2, 2008.
- HENRIQUES, S. V. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Identificação do caráter medicinal da espécie Curatella americana por meio das folhas. **Estação Científica (UNIFAP)**. v. 3, n. 2, 2013.
- JUNIOR, J. F. L. **Avaliação da atividade microbicida de extratos vegetais sobre Staphylococcus aureus isolados de mastite bovina**. Dissertação (Mestrado, Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos) Universidade de São Paulo, 2013.
- KLEIN, M. I. **Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de Streptococcus mutans e de Streptococcus sobrinus: estudo longitudinal em crianças**. Dissertação (Mestrado, Universidade estadual de Campinas) Faculdade de odontologia de Piracicaba, 2003.
- LE MOS, J. A. et al. Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm?. **Microbiology society**. v. 159, n. 3, 2013.

MALAFAIA, C. B. **Formação de biofilme, atividade antibiofilme de extratos vegetais e avaliação de metodos de extração de proteínas em fitobactérias.** Tese (Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

MANN, C. M.; MARKHAN J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied Microbiology.** v.84, 1998.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, V. F.; PICCOLE, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** v.69, n. 3, 2010.

SARAIVA, R. M. C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente á bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas.** Dissertação (Mestrado, programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas) Universidade Federal Do Pará, 2012.

TEIXEIRA, L. **Avaliação do uso do extrato de Alecrim de jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do biofilme dental.** Trabalho de conclusão de Curso (Curso de odontologia) Universidade Federal do Paraná, 2012.

WACZUK, E.P. et al. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology research.** vol.4,2015.

