



II CONPESQ
Congresso de Pesquisa,
Pós-Graduação e Inovação

Os novos rumos da ciência pós-pandemia

12 a 16 de abril de 2021 Universidade Federal do Cariri - UFCA

**Potencial dos Extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* Mart.
(Rhamnaceae) na Erradicação de Biofilmes Bacterianos**

Camila Aparecida Pereira da Silva

camila.pereira@aluno.ufca.edu.br

Instituto de Formação de Educadores -IFE
Universidade Federal do Cariri-UFCA
BPI-Funcap

Juliete Bezerra Soares

juliete.soares@aluno.ufca.edu.br

Instituto de Formação de Educadores -IFE
Universidade Federal do Cariri-UFCA
BPI -Funcap

Sheyla Henrique Morais Santana

sheyla.henrique@aluno.ufca.edu.br

Instituto de Formação de Educadores -IFE
Universidade Federal do Cariri-UFCA
BPI- Funcap

Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro

jacqueline.andrade@aluno.ufca.edu.br

Instituto de Formação de Educadores -IFE
Universidade Federal do Cariri-UFCA
Orientadora

RESUMO: Biofilmes representam uma das principais formas de resistência microbiana, são reservatórios de infecção e estão associados a um crescente índice de mortalidade quando comparado a isolados da mesma espécie que não formam biofilme. *Ziziphus joazeiro* Mart. é uma planta endêmica da caatinga, bastante utilizado na higiene bucal, partes da casca e entrecasca do caule são trituradas e usadas na escovação dentária, as folhas são utilizadas na fabricação de xampu anticaspa, e na lavagem de utensílios. Frente a isso, este trabalho buscou verificar a ação do extrato aquoso das folhas de *Ziziphus joazeiro* na erradicação de biofilmes bacterianos, e compara-lo aos efeitos do extrato aquoso das cascas do caule e com drogas padrões convencionais. Os extratos aquosos das folhas e cascas do caule de *Z. joazeiro* foram produzidos por maceração com extração a frio. As linhagens bacterianas utilizadas foram; *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A leitura dos dados de erradicação foi realizada com absorbância de 570 nm. Como resultado ambos extratos de *Ziziphus joazeiro* apresentaram efeito inibitório contra espécies de bactérias analisadas, no entanto quando comparados, o extrato aquoso das cascas do caule apresentou um tratamento mais eficaz do que o extrato aquoso das folhas frente aos biofilmes, apresentando algumas inibições semelhantes à droga padrão utilizada. Conclui-se que os resultados apoiam o conhecimento etnofarmacológico da utilização das cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* pela comunidade, demonstrando dessa forma sua potencialidade em modificar a suscetibilidade na resistência microbiana.

Palavras-chave: Biofilmes bacteriano. Casca do caule. Etnoconhecimento.

ABSTRACT: Biofilms represent one of the main forms of microbial resistance, they are reservoirs of infection and are associated with an increasing mortality rate when compared to isolates of the same species that do not form biofilm. *Ziziphus joazeiro* Mart. is an endemic plant of the caatinga, widely used in oral hygiene, parts of the bark and stem bark are crushed and used in tooth brushing, the leaves are used in the manufacture of anti-dandruff shampoo, and in the washing of utensils. In view of this, this work sought to verify the action of the aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro* in the eradication of bacterial biofilms, and compares it to the effects of the aqueous extract of the stem bark and with conventional standard drugs. The aqueous extracts of the leaves and bark of the *Z. joazeiro* stem were produced by maceration with cold extraction. The bacterial strains used were; *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The eradication data was read with an absorbance of 570 nm. As a result, both extracts of *Ziziphus joazeiro* showed an inhibitory effect against analyzed species of bacteria, however, when compared, the aqueous extract of the stem barks showed a more effective treatment than the aqueous extract of the leaves against biofilms, presenting some inhibitions similar to the standard drug used. It is concluded that the results support the ethnopharmacological knowledge of the use of the bark of the stem of *Ziziphus joazeiro* by the community, thus demonstrating its potential to modify susceptibility in microbial resistance.

Keywords: Bacterial biofilms. Stalk bark. Ethnocognition.

INTRODUÇÃO

Caracterizados por uma ou mais comunidades de células de microorganismos envolta de uma estrutura polimérica extracelular, os biofilmes são complexos de ecossistemas microbianos, que se aderem a diversas superfícies, bióticas ou abióticas (MESSI, 2013; CONDÒ et al., 2018). Estes ecossistemas representam reservatórios de infecção associados a um crescente índice de mortalidade quando comparado a isolados da mesma espécie que não formam biofilme (NAGY et al., 2018).

Essas comunidades representam uma das principais formas de resistência microbiana, devido às vantagens evolutivas que confere aos micro-organismos, principalmente proteção frente a condições extremas, como falta de nutrientes, alterações de pH e temperatura, presença de radicais livres e radiação ultravioleta, além da ação de antibióticos e até mesmo a ação do sistema imunológico do hospedeiro (CERCA; AZEVEDO,2012). O desenvolvimento de biofilmes configura-se como é uma preocupação crescente no campo da saúde, por causa das infecções persistentes ocasionadas, implicando cerca de 80% ou mais entre os casos de infecção microbianas (ALBANO et al., 2019).

Infecções bacterianas ocasionadas por proliferação de biofilme, como infecções crônicas, nosocomiais e relacionadas a dispositivos médicos, possuem resistência aumentada a antibióticos convencionais quando comparada a infecções por forma isolada (KHATOON et al., 2018). Dentre os mecanismos de resistência bacteriana suplementar, o biofilme proporciona alteração fisiológica em resposta a escassez, estimula a expressão de bomba de efluxo, realiza

quorum sensing, além de proporcionar um ambiente para interação e transferência de genes, contribuindo assim para disseminação de mecanismos de tolerância a diversos fármacos de interesse clínico (JIANG; LI, 2013).

Devido à elevada incidência de resistência a antimicrobianos, se dá a implementação de produtos naturais, já utilizados pela população, com foco terapêutico. Extratos oriundos de plantas são cada vez mais estudados e considerados como possíveis fontes de novos compostos com atividade antimicrobiana (BONA et al., 2014).

Levando em consideração pesquisas etnobiológicas, *Ziziphus joazeiro* Mart. é uma planta endêmica da caatinga, bastante utilizado como antisséptico bucal (LORENZI; MATOS, 2009), antimicótico (CRUZ et al., 2007); expectorante, e no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas (LORENZI, 2009). Sendo utilizado comumente pela população na higiene bucal e tratamento de gengivites. Por sua vez, as folhas são utilizadas na fabricação de xampu anticaspa e tônico capilar, como também na lavagem de utensílios (CAVALCANTI et al., 2011; DANTAS et al., 2014).

A cavidade bucal possui uma vasta e diversificada flora microbiana, formadas por bactérias e fungos, sendo comumente encontrados *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis* e leveduras tais como *Candida* spp. Ambos coexistem, interagem e crescem em biofilmes, que podem variar de uma simples placa dentária, a outras doenças orais como doença periodontal, infecções endodônticas, queilite angular e estomatite protética (DUTREIX et al., 2018).

Tanto as cascas do caule quanto as folhas de *Ziziphus joazeiro* possuem em sua caracterização fitoquímica a presença de saponinas, que em solução aquosa formam espuma persistente e abundante, sendo a responsável pela propriedade que faz com que cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* sejam utilizadas principalmente na escovação dentária pela população (DANTAS et al., 2014). Devido as aplicações na medicina tradicional da espécie *Ziziphus joazeiro* e a retirada contínua das cascas do caule pela população, se faz necessário à validação do uso de outra parte de *Z. joazeiro*, na busca de minimizar a utilização do caule, assim este trabalho, busca verificar a ação do extrato aquoso das folhas, contra a resistência microbiana, na erradicação de biofilmes bacterianos e comparar com os efeitos do extrato aquoso das cascas do caule e com gluconato de clorexidina, produto químico já utilizados na higienização bucal.

METODOLOGIA

As Folhas e cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart., foram coletadas no mês de fevereiro de 2017, no Sítio Ipueiras, localizado na zona rural do município de Brejo Santo, sul do Ceará, Brasil, no sopé da Chapada do Araripe. Um exemplar da espécie foi depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob o nº13.346 e identificada como *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae).

Os extratos aquosos das folhas e cascas do caule de *Z. joazeiro* (EAFZJ e EACCZJ) foram produzidos por maceração com extração a frio (MATOS, 2009). Folhas frescas foram cortadas e as cascas do caule passaram por secagem em temperatura ambiente e trituradas em moinho mecânico. Posteriormente ambos foram adicionados em água destilada e estéril. Acondicionados em recipiente protegido da ação da luz e o do ar, e após 72h foram filtrados, congelados e levados ao liofilizador (-60°C).

Foram utilizadas seis linhagens bacterianas, *Streptococcus mutans* INCQS 00446 (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* INCQS 00018 (ATCC 14506), *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016 (ATCC 12228), obtidas a partir da Coleção de micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS), Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - INCQS, Rio de Janeiro, RJ. E as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 259223 obtidas do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os ensaios químicos analisaram de forma qualitativa a presença de metabolitos secundários. O método baseado em Matos (2002) avaliou a presença de fenóis, taninos, flavonóides, alcalóides, esteroides. Para verificação de esteróides e/ou triterpenóides, o teste Liebermann - Burchard foi pelo método adaptado de Campbell e Shawn (2005).

Para realização dos testes, cada amostra foi subcultivada em meio BHI ágar e incubadas a 37 °C por 24 horas, após esse período foi retirado uma pequena quantidade de células e diluídas em NaCl 0,85%, e ajustado em espectrofotômetro (600 nm), para uma concentração de 5×10^5 CFU/mL (5×10^4 CFU / μ L well). A solução dos produtos foi preparada através da diluição de 20mg e 2mg de cada extrato, as concentrações testes variaram de 2mg/mL a 0.2mg/mL. O gluconato de clorexidina a 12% (Kley) foi utilizado como antibiofilme padrão de referência. Para a produção de biofilme, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços. Foi adicionado 20 μ L de NaCl 0,85%, 20 μ L do inóculo bacteriano e 160 μ L do meio de crescimento caldo infusão cérebro-coração (BHI) em uma cada poço e então incubada por 24 h

a 37 °C. Após a incubação o conteúdo foi removido e a placa lavada três vezes com solução salina a 0,85% estéril e o biofilme foi fixado incubando a 55 °C por 1h.

A formação de biofilme pelos isolados de *E. faecalis* será avaliada em placas de microtitulação, pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al. (2007) em diferentes meios de cultura e superfícies de formação. A partir das leituras de densidade óptica (OD), será determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (ODa) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (ODc). As amostras serão classificadas como fortemente ($4x\ ODc < ODa$), moderadamente ($2x\ ODc < ODa \leq 4x\ ODc$) e fracamente ($ODc < ODa \leq 2x\ ODc$) formadoras de biofilme. Os isolados que apresentarem valores de absorbância igual ou inferior ao controle serão classificados como não produtores de biofilme.

Após o preparo do biofilme, 20 µL das concentrações dos extratos e do gluconato de clorexidina foram adicionados na placa de microtitulação junto a 20 µL da bactéria e 160 µL do meio de crescimento caldo infusão cérebro-coração (BHI). A placa foi incubada por 24 h a 37 °C, após a incubação o conteúdo foi removido e a placa lavada três vezes com solução salina a 0,85%, incubada a 55 °C por 1 h, e então corado com CV a 0,4 % por 15 min. Posteriormente, lavado três vezes com salina e eluído em etanol (100%). A leitura foi realizada com absorbância de 570 nm.

A análise estatística, foi realizada no *software Graphpad Prism*, v. 5.0. Os dados foram obtidos através da média aritmética das absorbâncias obtidas de cada produto para cada bactéria em até 8 replicatas. Posteriormente analisados por ANOVA de uma via ($P < 0.05$; $*P < 0.1$; $****P < 0.0001$), com o teste post hoc de Tukey. Cada variável foi comparada ao controle de crescimento de biofilme e ao gluconato de clorexidina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção dos extratos aquosos das folhas e cascas do caule, apresentaram um rendimento de 9,51% e 8,54% respectivamente.

A caracterização fitoquímica dos extratos EAFZJ e EACCZJ, evidenciou a presença de algumas classes de metabolitos secundários comuns a ambos como os flavonóides, esteróides e saponinas. Em particular, no EAFZJ foi evidenciado fenóis, taninos condensados e alcalóides.

Analises fitoquímicas de trabalhos realizados com extratos das folhas, cascas e entrecascas de *Ziziphus joazeiro*, destacam a presença de flavonoides, alcaloides, esteroides, taninos, saponinas, hidratos de carbono e celulose (FUMAGALI et al., 2008; SILVA et al.,

2011; MELO et al., 2012; DANTAS et al., 2014; BRITO et al., 2015).

Diversos compostos fenólicos, como flavonoides, taninos e saponinas apresentam atividade antimicrobiana, além de atuarem como inibidores da formação e da biomassa de biofilmes fúngicos e bacterianos (XING et al., 2012; BORGES et al., 2013).

Os prováveis mecanismos de ação pelos quais os metabolitos secundários realizam ação antimicrobiana e antibiofilme, são listados como traumas na membrana citoplasmática, bloqueio de enzimas efetivas no metabolismo celular e inibição da agregação microbiana (CUSHNIE; LAMB, 2011).

A tabela 1 e a figura 1, apresentam a capacidade de formação de biofilme pelas cepas bacterianas, dentre as cepas, *Escherichia coli* apresentou uma formação de biofilme mínima, sendo assim eliminada dos testes de tratamento.

Tabela. 1. Avaliação da formação de biofilme bacteriano por densidade óptica (570 nm)

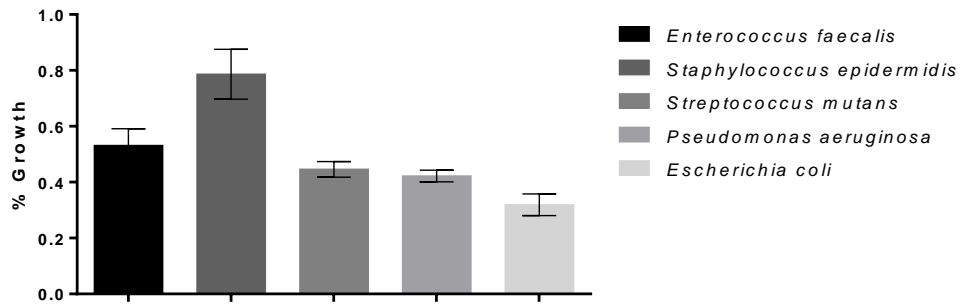
Isolados clínicos	Formação de biofilme
<i>Streptococcus mutans</i> INCQS 00446 (ATCC 25175)	Moderado
<i>Enterococcus faecalis</i> INCQS 00018 (ATCC 14506)	Moderado
<i>Staphylococcus epidermidis</i> INCQS 00016 (ATCC 12228)	Forte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Moderado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 259223	Fraca

*INCQS – Instituto Brasileiro de Controle de Qualidade em Saúde

Fonte: Dados da pesquisa.

A capacidade de formação de biofilme bacteriano é determinada pelas particularidades de cada espécie, e por uma variedade de fatores do local de adesão (FOSTER et al., 2014). Dentre as cepas bacterianas de relevância clínica formadoras de biofilme, Albano et al. (2018) citam *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, como espécies com alta capacidade de proliferação em dispositivos médicos e em desenvolvimento de biofilmes.

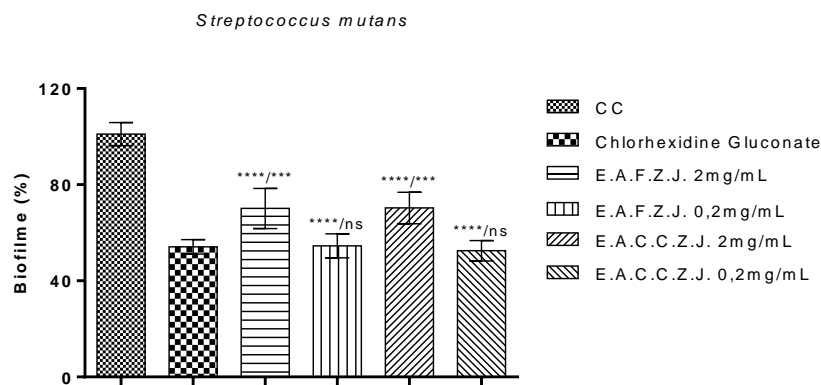
Figura 1- Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas por (%) de crescimento



Fonte: Dados da pesquisa.

Na erradicação do biofilme formados por *Streptococcus mutans* (Figura 2) é possível verificar que em todas concentrações utilizadas os extratos apresentaram uma porcentagem de crescimento de biofilme bem abaixo do controle de crescimento. O tratamento com o EAFZJ e o EACCZJ, na concentração de 0.2 mg/ml inibiu 46.4% e 48.5%, respectivamente, da massa de biofilme, apresentando uma ação semelhante e até melhor do que o gluconato de clorexidina, com uma inibição de 46.8%.

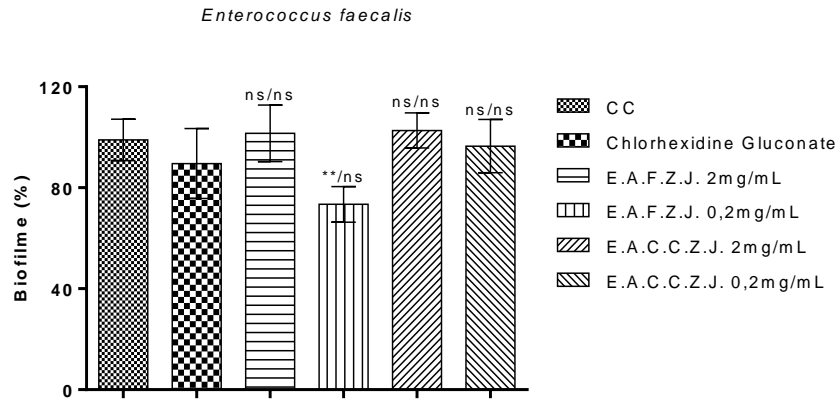
Figura 2- Erradicação do biofilme de *Streptococcus mutans* por extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* em comparação com o gluconato de clorexidina a 12%



Fonte: Dados da pesquisa.

Frente a biofilmes de *Enterococcus faecalis* (Figura 3) a concentração de 0,2 mg/ml do EAFZJ foi a única que apresentou uma redução da biomassa no tratamento em relação ao controle de crescimento, no entanto sua inibição não foi significativa, quando comparada a clorexidina.

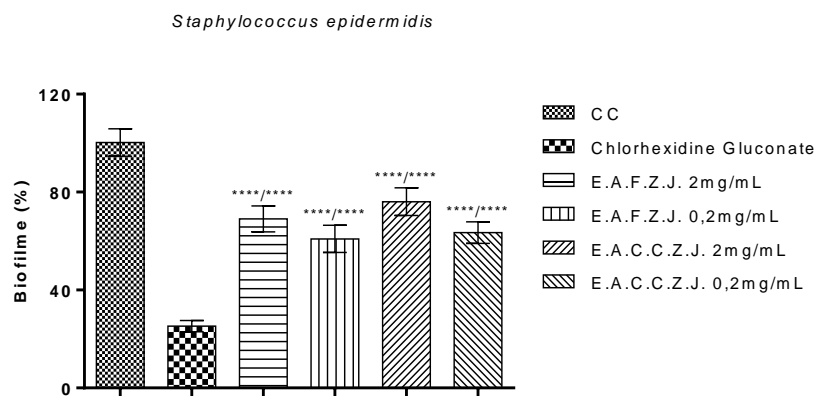
Figura 3- Erradicação do biofilme de *Enterococcus faecalis* por extratos aquosos de *Ziziphos joazeiro* em comparação com o gluconato de clorexidina a 12%



Fonte: Dados da pesquisa

O tratamento do biofilme do gênero *Staphylococcus* (Figura 4), apresentou efeito inibitório significativo da ação dos extratos frente aos biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*, quando comparado com o controle de crescimento, as concentrações de 0.2 mg/ml dos EAFZJ e EACCZJ, inibiram 40% e 36.5%, respectivamente, da massa de biofilme. Entretanto, não apresentaram resultado relevante, quando colocados a droga padrão de referência, o gluconato de clorexidina, que inibiu 74.5% a formação de biofilme.

Figura 4- Erradicação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* por extratos aquosos de *Ziziphos joazeiro* em comparação com o gluconato de clorexidina a 12%

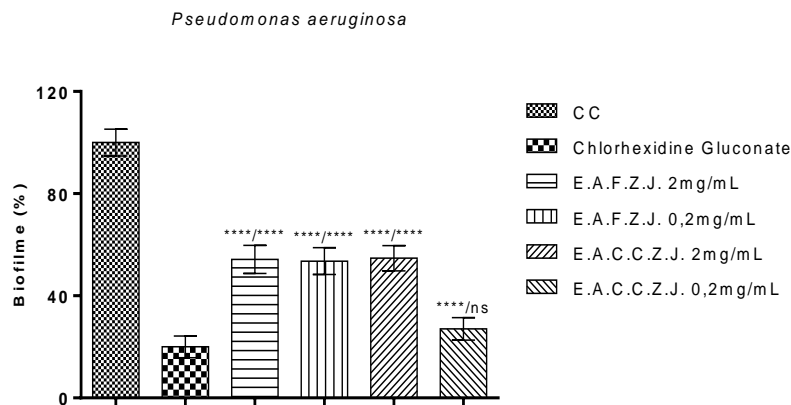


Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados da influência dos extratos na formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* são apresentados na figura 5. Todas as concentrações dos extratos utilizadas no tratamento, apresentaram resultados significativos frente ao controle positivo, as concentrações de 2 mg/ml dos EAFZJ e EACCZJ inibiram 45.8% e 45.3%, já nas concentrações de 0.2 mg/ml,

a inibição foi de 46.4% e 73% do biofilme. A inibição do EACCZJ na massa de biofilme se aproximou da inibição do gluconato de clorexidina, que apresentou uma redução de 80%.

Figura 5- Erradicação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* por extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* em comparação ao gluconato de clorexidina a 12%



Fonte: Dados da pesquisa.

CONCLUSÃO

Este estudo apontou resultados que apoiam o conhecimento etnofarmacológico da utilização de *Ziziphus joazeiro* pela comunidade. Observou-se resultados positivos na inibição de biofilmes bacterianos. Em comparação, o Extrato aquosos das cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* apresentou um tratamento mais eficaz do que o extrato aquosos das folhas frente aos biofilmes, apresentando algumas inibições semelhantes às drogas padrões utilizadas.

No entanto é valido ressaltar que o EAFZJ apresentou erradicação significativa nas menores concentrações, demonstrando assim sua potencialidade em modificar a suscetibilidade na resistência microbiana. No mais, há a necessidade de ensaios referentes a investigações dos mecanismos de ação dos referidos extratos sobre os biofilmes.

AGRADECIMENTOS

À Funcap pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho, e as instituições - Universidade Regional do Cariri – URCA e Universidade Federal do Cariri –UFCA.

REFERÊNCIAS

- ALBANO, M et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*, 2019; 126: 231-238. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401018316061> Acesso: 24 mar. 2021
- BONA, E.A.M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 2014; 81:218-225. Disponível em : <https://www.scielo.br/pdf/aib/v81n3/1808-1657-aib-81-03-00218.pdf> Acesso em: 24 mar.2021.
- BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 2013; 19:256- 265. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/mdr.2012.0244> Acesso: 25 mar. 2021
- BRITO, S.M. et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 2015; 1:185-191. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0308814614015933?token=F293964DBB323006D12BE02F25439061FD7931A2A1473B32750FA2ACD1A2E826040D7A0160B81A412F24470639D1C4C0&originRegion=us-east-1&originCreation=20210430175738> Acesso: 23 mar. 2021
- CAVALCANTI, M.T. et al. Obtenção da farinha do fruto do juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) e Teor de caracterização físico- química. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 2011; 6: 220-224. Disponível em: <https://gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/656/560> Acesso: 22 mar. 2021
- CERCA, N; AZEVEDO, N. F. *Biofilmes na saúde, no meio ambiente, na indústria*. Braga, Porto: Publindústria, 2012.
- CONDÒ, C et al. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. *Natural Product Research*, 2018; 13:1-8. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2018.1490904> Acesso: 22 mar.2021
- CRUZ, M.C.S et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Jornal of Ethnopharmacol*, 2007; 111:409-412. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874106006349> acesso: 20 mar. 2021

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial agents*, 2011; 38:99-107. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857911001300?via%3Dihub>

Acesso: 25.mar 2021

DANTAS, F.C.P. et al. *Ziziphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae: características biogeoquímicas e importância no bioma Caatinga. *Revista principia* 2014; 25: 51-57.

Disponível em: <https://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/view/172> Acesso: 24 mar.2021

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 2014;12:49-62.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3161.pdf?origin=ppub> Acesso: 25 mar. 2021

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista brasileira farmacognosia*, 2008; 18: 627-641. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n4/v18n4a22.pdf> Acesso: 20 mar. 2021

JIANG, T; LI, M. Quorum sensing inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 2013; 7:867-894.

KHATOON, Z. et al. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 2018; 12:10-67. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6312881/pdf/main.pdf> acesso: 22 mar. 2021.

LORENZI, H. E. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa – São Paulo: Instituto Plantarum, 2009.

MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 3. ed. Fortaleza, CE: Editora UFC, 2009.

MELO, M.S.F. et al. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Ziziphus joazeiro* Mart. *Rev Universidade do Vale Verde*, 2012; 10:43-51. Disponível em:

<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/670> Acesso: 22 mar.2021

MESSI, P. *Biofilm formation, development and relevance*. editors Biofilm in bioengineering. Hauppauge, New York: Nova Science, 2013.

NAGY, F. et al. Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Medical Mycology* 2018; 0: 1–9. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/57/5/573/5136507?redirectedFrom=fulltext> Acesso: 23 mar. 2021

SILVA, T.C.D.L. et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada*, 2011; 32:193-199. Disponível em: <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/344/342> Acesso: 25 mar. 2021

XING, M. et al. Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. *Letters Applied Microbiology*, 2012; 54:47 Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1472-765X.2012.03233.x> Acesso: 22. Mar

