

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Compostos Naturais com Capacidade de Inibir Biofilmes Leveduriformes:

uma Mini Revisão

Camila Hatwig

Porto Alegre, novembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Compostos Naturais com Capacidade de Inibir Biofilmes Leveduriformes:
uma Mini Revisão

Camila Hatwig

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Orientador

Porto Alegre, novembro de 2013.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da “Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada” apresentadas em anexo.

COMPOSTOS NATURAIS COM CAPACIDADE DE INIBIR BIOFILMES
LEVEDURIFORMES: UMA MINI REVISÃO
NATURAL COMPOUNDS CAPABLE OF INHIBITING YEAST BIOFILMS: A
MINI REVIEW

Camila Hatwig¹; Alexandre Meneghello Fuentefria²;

¹Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, UFRGS.

²Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Autor correspondente: Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Ipiranga 2752, Bairro Santana 90610-000 Porto Alegre, RS - Brasil

e-mail: alexmf77@gmail.com

Título resumido: Ação antibiofilme de compostos naturais

RESUMO – A necessidade de obter novas substâncias capazes de inibir a formação de biofilme por fungos leveduriformes é ressaltada pelo aumento da resistência apresentada por esses patógenos. As plantas, por sua vez, são fontes de grande diversidade de compostos que podem ser alvo de pesquisa de compostos antibiofilme. Desta forma, este estudo tem como objetivo reunir o conhecimento atual a respeito de substâncias naturais que possuam capacidade de inibição do biofilme leveduriforme, além de discutir quais os principais tipos de compostos que apresentam esta atividade, as espécies-alvo prevalentes e as metodologias mais utilizadas. Os óleos essenciais foram os compostos mais avaliados nos manuscritos e o biofilme de *Candida albicans* foi o alvo mais estudado. A metodologia mais encontrada foi a

que envolve microplacas de poliestireno seguida de leitura por método colorimétrico utilizando o reagente XTT. Os dados coletados e descritos neste estudo podem ser de grande valia para o delineamento de futuras pesquisas com compostos naturais e atividade antibiofilme.

PALAVRAS-CHAVE: biofilme; levedura; composto natural.

ABSTRACT - The need for new substances capable of inhibiting yeast based biofilm is emphasized by the increase in the resistance presented by these pathogens. Plants, in turn, are a source of a great diversity of potential antibiofilm agents. Thus, this study aims to bring together current knowledge about natural substances that present antibiofilm capacity against yeast, in addition to discussing the main types of compounds that exhibit this activity, the target species and the prevalent methodologies used. The essential oils were the most evaluated compounds on the manuscripts and *Candida albicans* biofilms prevailed among the species used. The most applied methodology was the one involving polystyrene microplates followed by a colorimetric assay using the XTT reagent. The data collected and described in this study may be valuable for the design of future studies with natural compounds and antibiofilm activity.

KEY WORDS: biofilm; yeast; natural compound.

INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades microbianas altamente estruturadas e hidratadas, constituídas por células sésseis incorporadas a uma matriz polimérica extracelular (Costerton et al., 1999). Em comparação com as células planctônicas (forma livre de desenvolvimento do microrganismo no hospedeiro ou material inerte), as células sésseis geralmente apresentam-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos e este aumento da resistência tem um impacto considerável no tratamento de infecções relacionadas a biofilme (Donlan & Costerton, 2002).

Em contraste com os dados da literatura que descrevem a formação do biofilme bacteriano, pouca relevância tem sido dada aos biofilmes fúngicos de importância clínica (O'Toole et al., 2000). Apesar de serem menos comuns, biofilmes fúngicos também são encontrados em dispositivos médico-hospitalares, como catéteres, implantes e próteses, sendo a *Candida albicans* o patógeno fúngico mais isolado de pacientes com infecções relacionadas a esses dispositivos (Douglas, 2003). Embora *C. albicans* seja o principal agente etiológico de candidíases, outras espécies de *Candida não-albicans* surgiram como relevantes causadoras de infecções fúngicas em indivíduos imunocomprometidos (Douglas, 2003).

Uma ampla variedade de antifúngicos comerciais, pertencentes a diferentes classes e comumente utilizados na terapêutica, apresenta efeitos adversos, como nefrotoxicidade e intolerância gastrointestinal (Cannon et al., 2009; Odds et al., 2003). Além disso, resistência aos antifúngicos tem sido relatada, sendo mais comum para imidazóis e triazóis e menos frequente para polienos, alilaminas e equinocandinas, o que leva à sua progressiva ineficiência (Cannon et al., 2009). Por isso, há uma grande necessidade de prospectar novas substâncias antifúngicas de elevada atividade e baixa toxicidade. Recentemente, o interesse em utilizar plantas como fontes de agentes antimicrobianos têm crescido devido ao seu uso etnomedicinal e ao fato de uma grande parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, recorrer às plantas para o tratamento de doenças infecciosas e não-infecciosas (Cowan, 1999; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009; Bakkali et al., 2008).

A descoberta de agentes efetivos com atividade não somente contra microorganismos em sua forma planctônica, mas também contra biofilmes, representa uma importante fonte de pesquisa (Projan & Youngman, 2002). Diante do exposto, esse estudo objetiva reunir o atual conhecimento a respeito de substâncias naturais que possuam capacidade antibiofilme leveduriforme, além de discutir sobre os principais tipos de compostos apresentando esta atividade, as espécies-alvo prevalentes e as metodologias mais utilizadas.

O estudo consiste em uma revisão da literatura sobre substâncias naturais com capacidade antibiofilme leveduriforme publicada na base de dados PubMed. Os descritores utilizados foram “levedura”, “atividade” e “antibiofilme” (yeast, activity, antibiofilm), em associação. A seleção da literatura, que alcançou o número total de 17 referências, seguiu os seguintes critérios de inclusão previamente estabelecidos: (I) artigo científico com objetivos ou resultados relacionados a substâncias naturais e sua capacidade antibiofilme leveduriforme, (II) artigos científicos com publicação no período dos últimos vinte anos.

ATIVIDADE ANTIBIOFILME

O aumento da resistência dos microorganismos em relação a antibióticos e produtos sanitizantes incentiva a procura por novos agentes antimicrobianos que sejam efetivos e não levem ao desenvolvimento de cepas resistentes. A formação de biofilmes por microorganismos torna-os ainda mais difíceis de serem erradicados, pois estas estruturas são mais resistentes do que sua forma planctônica (Lewis, 2001).

A capacidade de uma substância atuar contra o biofilme fúngico pode ser avaliada através da inibição da formação do biofilme sobre uma superfície inerte e através de seu efeito inibitório (capacidade de remoção) sobre a biomassa fúngica pré-formada. A primeira forma de avaliação consiste em incubar o inóculo fúngico padronizado em presença de concentrações definidas da substância, verificando se esta é capaz de reduzir, ou até mesmo impedir, a formação do biofilme na superfície inerte. Já no segundo modo de avaliação, forma-se previamente o biofilme na superfície inerte e o mesmo é submetido a concentrações definidas da substância, verificando se ela é capaz de remover o biofilme pré-formado. A maior parte dos artigos analisados neste estudo evidencia a utilização de apenas uma das técnicas e uma minoria utiliza ambas.

Os óleos essenciais (OE) de limão, zimbro, manjerona e sálvia esclaréia demonstraram

inibir significativamente a formação do biofilme de *Pichia anomala*, uma levedura capaz de crescer sob condições ambientais extremas (pH muito ácido ou muito básico, baixa umidade, alta pressão osmótica e condições anaeróbicas) podendo ser um agente de deterioração de alimentos e que também já foi isolada em pacientes imunocomprometidos (Passoth et al., 2006). Foram utilizadas concentrações de 0,375µL/mL para OE de limão, 0,25µL/mL para OE de zimbros e manjerona, e 0,5µL/mL para sálvia esclaréia. O α -pineno e o terpinen-4-ol, componentes principais dos óleos essenciais de zimbros e manjerona, respectivamente, também apresentaram atividade antibiofilme na concentração de 0,5µL/mL. Portanto, estes óleos essenciais e seus componentes principais podem ser cabíveis de utilização como conservantes na indústria alimentícia.

Cymbopogon citratus e *Syzygium aromaticum* e seus óleos essenciais têm sido utilizados há muito tempo em práticas tradicionais de diversas culturas, em especial a indiana (Carlini et al., 1986). Estes óleos apresentaram concentração inibitória mínima das células sésseis de *C. albicans* variando de 180-360µg/mL para *C. citratus* e de 200-400µg/mL para *S. aromaticum*. Estes valores foram comparados com dois antifúngicos comerciais, anfotericina B e fluconazol, que exibiram concentrações inibitórias variando de 16-64µg/mL para a anfotericina B e de 512- >1024µg/mL para o fluconazol. Os antifúngicos comerciais testados também foram menos efetivos na prevenção da formação do biofilme fúngico. Os resultados obtidos para os OEs foram, portanto, melhores que os encontrados para o fluconazol, validando o uso tradicional desses óleos na Índia como terapia efetiva. Outra substância que apresentou-se mais efetiva que o fluconazol frente a biofilmes pré-formados de *C. albicans* foi o óleo de eucalipto, que com uma concentração de 0,84% (v/v) foi capaz de reduzir em 80,87% o biofilme enquanto que para o fluconazol uma concentração de 72µg/mL exibiu uma redução de 78%.

O óleo essencial de *Thymbra capitata* foi avaliado quanto à sua atividade sobre

biofilmes pré-formados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, mostrando efeito evidente na concentração de 0,64µg/mL ao inibir 71,96% da biomassa do biofilme e tendo inibição maior que 60% sobre a atividade metabólica, ambos para *C. albicans*. Há estudos que relacionam a atividade deste OE com o seu componente principal, o carvacrol. Mas há vantagens em utilizar o OE ao invés de seus compostos isolados devido às atividades sinérgicas e complementares de seus componentes.

Em concentração de 15,6µg/mL, o diterpeno casbano, isolado do extrato etanólico do *Croton nepetaefolius*, diminuiu em mais de 50% a capacidade de formação de biofilme pelas leveduras testadas, sendo que para *Candida albicans* a concentração necessária para atingir a mesma redução foi de 62,5µg/mL. Já o α -pineno e o β -pineno, encontrados em óleos essenciais de diversas plantas, apresentaram 100% de inibição da formação de biofilme em concentrações de 3,125µg/mL e 374µg/mL, respectivamente.

O efeito inibitório do óleo essencial de *Boesenbergia pandurata* aparenta estar relacionado à dose. Em concentrações entre 4-32µg/mL, o OE exibiu 63-98% de inibição na formação de biofilme de *C. albicans*, enquanto essas mesmas concentrações mostraram-se menos efetivas contra biofilmes pré-formados. Concentrações inferiores a 2µg/mL tiveram praticamente nenhum efeito sobre biofilmes pré-formados. O óleo essencial de *Ocimum americanum L.*, em concentração de 3% (v/v) apresentou efeito antisséptico muito similar ao da clorexidina 0,2%, ambos frente a biofilmes pré-formados de *C. albicans*, atuando como um potente agente antimicrobiano capaz de desestruturar biofilmes existentes. Este óleo, na concentração de 3% (v/v), pode ser um componente benéfico para produtos de higiene oral, como pastas dentais, prevenindo contra bactérias cariogênicas e contra infecções por cândida, sendo o seu uso dependente do custo, odor e sabor.

Alguns óleos essenciais e seus componentes majoritários apresentam grande volatilidade e conseqüente instabilidade, limitando sua aplicação. Uma alternativa que vem

sendo estudada é a estabilização destas substâncias com nanomateriais. Um exemplo é o óleo essencial de *Eugenia carryophyllata* que foi estabilizado com nanopartículas na superfície de catéteres, resultando na formação de uma película. Na ausência de nanopartículas, o OE não apresentou efeito antibiofilme significativo devido à rápida volatilização de seus compostos ativos, sendo a contagem final de células de biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* uma variação de 10^3 a 10^6 ufc/cm². Já na presença de nanopartículas, ocorreu uma drástica diminuição na quantidade final de células, ficando abaixo de 10^3 ufc/cm². Outro exemplo é o terpinen-4-ol, componente majoritário do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, que é volátil e hidrofóbico, sendo a imobilização em uma nanopartícula lipídica a solução para sua estabilização e aplicabilidade como agente antibiofilme.

Como pode-se observar na tabela 1, tem-se dado relevância para os óleos essenciais nos estudos de capacidade antibiofilme, sendo que sua utilização foi descrita em 10 dos 17 artigos analisados. Óleos essenciais são misturas naturais complexas obtidas de plantas e que podem conter até 60 componentes em diferentes concentrações. São caracterizados por sua volatilidade, odor forte e por serem obtidos principalmente através de processo de destilação (Bakkali et al., 2008). Há um crescente interesse na utilização dos óleos essenciais como conservantes naturais pela indústria alimentícia (Burt, 2004). Além disso, possuem baixa toxicidade e degradam rapidamente na água e no solo, não prejudicando o meio ambiente. A vantagem na utilização do óleo essencial e não de seus compostos isolados está na concepção de que a atividade dos principais componentes é modulada pelos compostos que estão em minoria, ocorrendo uma atividade sinérgica e complementar (Bakkali et al., 2008). Apesar de apresentarem muitas vantagens em seu emprego, os óleos essenciais são insolúveis em água, causando problemas no estudo de suas propriedades farmacológicas e biológicas. Para superar esse problema, os pesquisadores têm utilizado vários solventes na diluição desses óleos como,

por exemplo, acetona, etanol, metanol, DMSO e também tensoativos. Outros desafios são a complexidade química de sua composição e a volatilidade de constituintes que devem ser utilizados em pequenas quantidades (Lahlou, 2004). Os compostos menos testados nos artigos analisados são os extratos brutos, provavelmente devido a necessidade de identificação das substâncias isoladas, para fins de conhecimento do potencial toxicológico do composto.

Biofilmes de *Candida* spp. representam um mecanismo de virulência que protege a levedura contra a resposta imune do hospedeiro e de agentes antifúngicos (Donlan & Costerton, 2002). *C. albicans* é o patógeno fúngico responsável pela maior parte das infecções nosocomiais (Ramage et al., 2005). Por esse motivo, a grande maioria dos estudos testa suas substâncias somente frente à *C. albicans*. Embora este seja o agente etiológico predominante em candidíases, outras espécies de *Candida*, que tendem a ser menos susceptíveis aos antifúngicos comumente utilizados, como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*, emergiram como importantes patógenos oportunistas (Jabra-Rizk, 2004). Apenas 3 artigos analisados utilizaram outras espécies de *Candida* como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* em seus testes com biofilme.

PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBIOFILME

A prospecção de substâncias antibiofilme é realizada baseando-se em metodologias descritas na literatura. Uma das metodologias aplicadas nos artigos analisados, envolve o emprego de microplacas de poliestireno, onde o biofilme será formado e a capacidade da substância em removê-lo ou de impedir sua formação será revelada por método colorimétrico. O método colorimétrico mais utilizado nos artigos é o que utiliza o XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida), que envolve uma reação de redução deste reagente, sendo diretamente proporcional à atividade metabólica do biofilme. O segundo método mais utilizado tem como reagente o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazólio), que também sofre redução e, como terceiro método, encontra-se o cristal violeta, que avalia o efeito sobre a biomassa total do biofilme. O teste envolvendo a utilização de microplacas de poliestireno tem como vantagens a rapidez, o baixo custo, facilidade de execução, precisão e reprodutibilidade, sendo o mais encontrado nos artigos analisados (Ramage et al., 2001).

O método colorimétrico que envolve a redução do XTT foi o mais empregado nos artigos analisados. Sua redução leva à formação de um produto solúvel em água que pode ser facilmente quantificado sem necessitar de etapas adicionais como centrifugação, remoção do meio, uso de solventes orgânicos e sonicação (De Logu et al., 2001). As etapas citadas anteriormente são necessárias quando a redução do MTT é empregada como método colorimétrico, aumentando, assim, o tempo para a realização do ensaio, sendo uma desvantagem quando comparado ao XTT. Os ensaios envolvendo a redução do XTT e do MTT são rápidos, acessíveis, confiáveis e não necessitam utilização de radioisótopos, além de serem realizados com equipamentos laboratoriais comuns (De Logu et al., 2001). Como método menos aplicado nos artigos está o cristal violeta. Sua menor utilização pode estar relacionada ao fato de que as células coradas não correspondem ao número de células viáveis e, muitas vezes, todas as células aderidas são coradas, incluindo as mortas, ressaltando a inespecificidade desta coloração (Chiba et al., 1998).

A outra metodologia aplicada nos artigos analisados envolve a utilização de corpos de prova, como catéteres, onde o biofilme será formado e a substância teste agirá sobre ele. As células que ainda ficarem aderidas após a exposição à substância serão retiradas do corpo de prova por processo de sonicação e cultivadas em ágar para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (ufc/mL), sendo uma forma de quantificação da ação da substância sobre o biofilme fúngico. Esta metodologia é muito menos aplicada nos estudos devido à menor facilidade de execução, à necessidade de emprego de outros equipamentos e ao

envolvimento de mais etapas na execução.

PRODUTOS COMERCIALIZADOS

No mercado já são encontrados produtos com capacidade antibiofilme. Muitos têm como função a desinfecção de ambientes e materiais, mas outras finalidades também são encontradas. StrixNB™ é um aditivo colocado na água dos cães, que ajuda na manutenção da higiene oral devido à sua atividade removedora de biofilme (Kane Biotech, 2013). Com a mesma finalidade, mas destinado a humanos, o EXXCL Oral Blue® rompe a matriz do biofilme contribuindo para uma cavidade bucal mais saudável (Biofilm Innovations Group, LLC, 2013). Existem também produtos destinados à indústria alimentícia, onde os processadores de alimentos são propícios à formação de biofilme. O Zep Microsolve™ Desinfectant Cleaner tem como proposta eliminar o biofilme formado em equipamentos industriais, sendo também aplicável em paredes e no piso (Zep Superior Solutions, 2012). É importante ressaltar que nenhum dos produtos citados é advindo de substâncias naturais, sendo esta uma fonte inovadora a ser amplamente estudada e pesquisada.

CONCLUSÃO

Levando em consideração a problemática da resistência dos biofilmes fúngicos aos antimicrobianos disponíveis para terapia, é clara a necessidade de novas substâncias com capacidade antibiofilme e as plantas podem ser uma rica fonte de novos protótipos medicamentosos. Os óleos essenciais foram os compostos mais testados nos artigos analisados neste estudo, tendo vantagem em relação à utilização de seus constituintes isolados devido ao fato de haver um sinergismo entre as atividades dos constituintes presentes em maior quantidade e dos que estão em minoria.

Os compostos naturais foram testados frente a biofilmes de *C. albicans* e *C. não-*

albicans, mas a espécie-alvo utilizada na maior parte dos artigos foi a *C. albicans*, principalmente devido ao fato de ser o patógeno responsável pela grande maioria das infecções nosocomiais, sendo o agente etiológico predominante em candidíases.

A metodologia de eleição para a verificação da atividade antibiofilme dos compostos naturais foi a que utiliza microplacas de poliestireno, acrescida de leitura pelo método colorimétrico do XTT. É uma metodologia rápida, de baixo custo, fácil de ser executada, precisa e reprodutível.

Os dados coletados e descritos neste estudo podem ser de grande valia para futuras pesquisas que utilizem compostos naturais como possíveis antimicrobianos com atividade antibiofilme. A partir dele, pode-se ter uma base de quais compostos são mais testados, quais as metodologias mais aplicadas e qual a espécie-alvo predominante, norteando as pesquisas que envolvem a prospecção de novas moléculas ou compostos com ação inibidora ou removedora do biofilme leveduriforme.

REFERÊNCIAS

Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*. 2008; 165(1):13-9.

Alviano WS, Mendonça-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padron T, Rodrigues ML, Bolognese AM, Alviano CS, Souza MM. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(2):101-5.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2):446-75.

Biofilm Innovations Group, LLC. EXXCL Oral Blue®. Oral Health Care Products [Internet]. 2013 [cited 2013 November 5]. Available from: <http://www.exxcloralblue.com/pros.html>.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94(3):223-53.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(2):291-321.

Carlini EA, Contar JdDP, Silva-Filho AR, da Silveira-Filho NG, Frochtengarten ML, Bueno OF. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J Ethnopharmacol.* 1986; 17(1):37-64.

Carneiro VA, Santos HS, Arruda FV, Bandeira PN, Albuquerque MR, Pereira MO, Henriques M, Cavada BS, Teixeira EH. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules.* 2011; 16(1):190-201.

Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and Crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol in Vitro.* 1998; 12(3):251-8.

Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(5):1159-62.

Costerton JW, Stewart PS, Greenber EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418):1318-22.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(4):564-82.

da Silva AC, Lopes PM, de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of *alpha*-pinene and *beta*-pinene enantiomers. *Molecules.* 2012; 17(6):6305-16.

De Logu A, Uda P, Pellerano ML, Pusceddu MC, Saddi B, Schivo ML. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of mycobacterium tuberculosis to rifampin, isoniazid and streptomycin in liquid medium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20(1):33-9.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):167-93.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11(1):30-6.

Grumezescu AM, Chifiriuc MC, Saviuc C, Grumezescu V, Hristu R, Mihaiescu DE, Stanciu GA, Andronesu E. Hybrid nanomaterial for stabilizing the antibiofilm activity of *Eugenia carryophyllata* essential oil. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2012; 11(4):360-5.

Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(6):1219-25.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(1):14-9.

Kane Biotech. StrixNB™ Oral Care Water Additive [Internet]. 2013 [cited 2013 November 5]. Available from: <http://www.kanebiotech.com/strix.html>.

Kerekes EB, Deak E, Tako M, Tserennadmid R, Petkovits T, Vagvolgyi C, Krisch J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2013; 115(4):933-42.

Khan MS, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140(2):416-23.

Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.* 2004; 18(6):435-48.

Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4):999-1007.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:49-79.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agentes: mechanism of action. *Trends Microbiol.* 2003; 11(6):272-9.

Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, Palmeira-de-Oliveira R, Silva-Dias A, Salgueiro L, Cavaleiro C, Pina-Vaz C, Martinez-de-Oliveira J, Queiroz JÁ, Rodrigues AG. The anti-Candida activity of *Thymbra capitata* essencial oil: effect upon pre-formed biofilm. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140(2):379-83.

Passoth V, Fredlund E, Druvefors UA, Schnurer J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(1):3-13.

Projan SJ, Youngman PJ. Antimicrobials: new solutions badly needed. *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5(5):463-5.

Rajput SB, Karuppayil SM. Beta-asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Phytomedicine.* 2013; 20(2):139-42.

Rajput SB, Shinde RB, Routh MM, Karuppayil SM. Anti-Candida properties of asaronaldehyde of *Acorus gramineus* rhizome and three structural isomers. *Chin Med.* 2013; 8(1):18.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: na update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(4):633-8.

Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(9):2475-9.

Schillaci D, Arizza V, Dayton T, Camarda L, Di Stefano V. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 47(5):433-8.

Stanciuc AM, Gaspar A, Moldovan L, Saviuc C, Popa M, Marutescu L. In vitro antimicrobial activity of Romanian medicinal plants hydroalcoholic extracts on planktonic and adhered cells. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2011; 70(1):11-4.

Sun LM, Zhang CL, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(24):6150-6.

Taweechaisupapong S, Singhara S, Lertsatitthanakorn P, Khunkitti W. Antimicrobial effects of *Boesenbergia pandurata* and *Piper sarmentosum* leaf extracts on planktonic cells and biofilm of oral pathogens. *Pak J Pharm Sci*. 2010; 23(2):224-31.

Thaweboon S, Thaweboon B. In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009; 40(5):1025-33.

Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009; 16(2-3):97-110.

Zep ® Superior Solutions. Zep Microsolve Disinfectant Cleaner [Internet]. 2012 [cited 2013 November 5]. Available from: http://www.zep.com/Zep_Search/default1.aspx?search=microsolve+disinfectant&num=10&match=Exact&country=U.

Tabela 1. Compostos naturais com ação antibiofilme, espécies-alvo e substratos utilizados nos artigos analisados.

Nome comum	Nome científico	Composto	Classe	Espécie(s) alvo(s)	Substrato	Referência
Japanese sweet flag	<i>Acorus gramineus</i>	2,4,5 – trimetoxibenzaldeído	Produto isolado	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Rajput et al., 2013)
Sálvia Esclareia	<i>Salvia sclarea</i>	Óleo essencial / Linalol	Óleo essencial / terpeno	<i>Pichia anomala</i>	Microplaca	(Kerekes et al., 2013)
Zimbro	<i>Juniperus communis</i>	Óleo essencial / α -pineno	Óleo essencial / terpeno	<i>Pichia anomala</i>	Microplaca	(Kerekes et al., 2013)
Limão	<i>Citrus lemon</i>	Óleo essencial / Limoneno	Óleo essencial / terpeno	<i>Pichia anomala</i>	Microplaca	(Kerekes et al., 2013)
Manjerona	<i>Origanum majorana</i>	Óleo essencial / terpinen-4-ol	Óleo essencial / terpeno	<i>Pichia anomala</i>	Microplaca	(Kerekes et al., 2013)
Cálamo Aromático	<i>Acorus calamus</i>	β -asarona	Produto isolado	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Rajput & Karuppayil, 2013)
Cravo	<i>Eugenia carryophyllata</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida tropicalis</i>	Cateter	(Grumezesco et al., 2012)
Capim limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida tropicalis</i>	Microplaca	(Khan & Ahmad, 2012)
Cravinho	<i>Syzygium aromaticum</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida tropicalis</i>	Microplaca	(Khan & Ahmad, 2012)
Tomilho-de-creta	<i>Thymbra capitata</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida guilliermondii</i>	Microplaca	(Palmeira-de-Oliveira et al., 2012)
Hamamélis	<i>Hamamelis virginiana</i>	Hamamelitannin	Tanino	<i>Candida albicans</i>	Cateter	(Cobrado et al., 2012)
Árvore-do-chá	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpinen-4-ol	Terpeno	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Sun et al., 2012)
Pinheiro	<i>Pinus L.</i>	α -pineno/ β -pineno	Terpeno	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(da Silva et al., 2012)
Marmeleiro sabiá	<i>Croton nepetaefolius</i>	Diterpeno casbano	Terpeno	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i>	Microplaca	(Carneiro et al., 2011)
Arnica	<i>Arnica montana</i>	Solução hidro alcoólica	Extrato bruto	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Stanciuc et al., 2011)
Absinto	<i>Artemisia absinthium</i>	Solução hidro alcoólica	Extrato bruto	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Stanciuc et al., 2011)
Urtiga	<i>Urtica dioica</i>	Solução hidro alcoólica	Extrato bruto	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Stanciuc et al., 2011)
Fingerroot, Chinese ginger	<i>Boesenbergia pandurata</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Taweechaisupapong et al., 2010)
Manjerição branco	<i>Ocimum americanum L.</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Thaweboon & Thaweboon, 2009)
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	Óleo essencial/1,8-cineole	Óleo essencial / terpeno	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Hendry et al., 2009)
	<i>Boswellia rivae</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Schillaci et al., 2008)
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Agarval et al., 2008)
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Agarval et al., 2008)
Palmarosa	<i>Cymbopogon martinii</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Agarval et al., 2008)
Cravo	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Óleo essencial	Óleo essencial	<i>Candida albicans</i>	Microplaca	(Agarval et al., 2008)
Sacaca	<i>Croton cajucara Benth</i>	Óleo essencial / Linalol	Óleo essencial / terpeno	<i>Candida albicans</i>	Discos de celulose	(Alviano et al., 2005)

