

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o  
texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir de  
*25/07/2027.*



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**César Augusto Abreu Pereira**

**Efeito antibiofilme e citotoxicidade de *Zingiber zerumbet* associado à terapia  
fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans***

**Araraquara**

**2025**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**César Augusto Abreu Pereira**

**Efeito antibiofilme e citotoxicidade de *Zingiber zerumbet* associado à terapia  
fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara para exame de defesa de doutorado, fazendo parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de Reabilitação Oral.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

**Araraquara**

**2025**

P436e

Pereira, César Augusto Abreu

Efeito antibiofilme e citotoxicidade de Zingiber zerumbet associado à terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* / César Augusto Abreu Pereira. -- Araraquara, 2025

175 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Claudia Pavarina

1. Biofilmes. 2. *Candida albicans*. 3. Fotoquimioterapia. 4. Sesquiterpenos monocíclicos. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

**César Augusto Abreu Pereira**

**Efeito antibiofilme e citotoxicidade de *Zingiber zerumbet* associado à terapia  
fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans***

**Comissão julgadora**

**Defesa para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, na área de  
Reabilitação Oral**

Presidente e orientadora: Profa. Dra Ana Claudia Pavarina

2º Examinador Janaina Habib Jorge

3º Examinador Luciana Salles Branco de Almeida

4º Examinador Andrea Dias Neves Lago

Araraquara, 25 de julho de 2025.

## DADOS CURRICULARES

### César Augusto Abreu Pereira

NASCIMENTO: 16/09/1994 – São Luís – Maranhão

FILIAÇÃO: Elismar Abreu Pereira e Vicente Muniz Pereira Filho

**2013 - 2018** – Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

**2014-2016** – Bolsista no projeto de extensão “Promoção de Saúde Bucal às Gestantes da Maternidade Marly Sarney”.

**2015** – Bolsista PIBIC-V no projeto “Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de óleo essencial extraído da *Citrus bergamia risso* em modelo animal de osteoartrite”.

**2016** – Bolsista PIBIC-V no projeto “Avaliação de um método de estimativa de idade pela mineralização dentária dos terceiros molares”.

**2016-2018** – Monitor da clínica IV (Prótese Fixa e Endodontia) da UFMA.

**2019–2025** - Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II.

**2019- 2021** – Título de mestre em Reabilitação Oral; Bolsista FAPESP de mestrado no projeto “Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes a fluconazol”.

**2021-2025** - Pós-graduação em Odontologia, área de prótese, nível de doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP; Bolsista FAPEMA de doutorado no projeto “Efeito antibiofilme e citotoxicidade de *Zingiber zerumbet* associado à terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans*”.

**2024-2024** – Pós-graduação, nível de especialização, em Estatística Aplicada, pela Faculdade de Minas Gerais -FACUVALE.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vicente Muniz e Elismar Abreu, por todo investimento, dedicação e esforços para que eu pudesse estudar e ter no conhecimento meu maior aliado. Obrigado por celebrarem comigo cada conquista realizada e por sempre acreditarem e confiarem em cada nova jornada que me proponho a realizar. Vocês são meu porto-seguro, meu maior exemplo e minha eterna gratidão. **“Aquilo que está escrito no coração não necessita de agendas porque a gente não esquece. O que a memória ama fica eterno – Rubem Alves”**.

Aos meus queridos sobrinhos Pedro Ryan e Maria Isis, que são a alegria e o futuro da minha família. Foi bastante difícil estar fisicamente longe de vocês e de não poder acompanhar de perto essa fase tão gostosa que é a infância.

Às minhas irmãs Tanuza e Thaynan Abreu pelo incentivo, apoio e orgulho que transmitem sentir com a minha jornada acadêmica. Que maravilhoso é poder olhar para trás e ver o quanto caminhamos e alcançamos objetivos que desejávamos desde criança.

Às famílias Borges Pereira (por parte de pai) e Rêgo Abreu (por parte de mãe) por toda torcida, carinho e amizade. Obrigado a cada um que contribuiu para este momento. Me sinto orgulhoso de ser o primeiro membro de ambas as famílias a sagrar-se doutor.

À minha orientadora Ana Claudia Pavarina, pelos valiosos ensinamentos que levarei por toda a minha vida. Obrigado pela confiança, parceria, credibilidade e oportunidade que a mim foi dada. Espero ter correspondido a essa oportunidade. Obrigado também pelos conselhos, ensinamentos sobre a vida e sobre a docência. A sua orientação foi fundamental para que todas as etapas deste estudo fossem cuidadosamente planejadas e executadas. Obrigado pelas tardes de terça, em que ficávamos na clínica da graduação, onde pude continuar a exercer meu lado clínico, sempre aprendendo como melhorar a cada dia. Por fim, foram seis anos muito especiais, cheio de desafios, mas que, com a sua ajuda, foram mais leves e seguros. Espero que a nossa parceria perpetue por muitos anos ainda. Sou muito grato por toda a história que construímos juntos. **“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não podem dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria – Paulo Freire”**.

À minha duplinha tão querida Ana Luiza Gorayb, pela amizade e parceria nas mais diversas áreas da minha vida. Desde a sua iniciação científica até o início do seu doutorado estive presente, aprendendo, admirando e celebrando cada uma das suas conquistas. Que possamos caminhar juntos nos nossos planos e com a amizade e carinho de sempre.

À Claudia Jordão, a pessoa mais alto astral que tive a felicidade de encontrar na pós graduação. Obrigado por toda ajuda, atenção e carinho que você sempre teve por mim. Agradeço também as boas horas de riso, os áudios e figurinhas de whats app, e por sermos os ombros e ouvidos um do outro. Admiro você imensamente.

À Paula Barbugli e Sarah Annunzio pelo apoio no cultivo de células e pela amizade e suporte. Vocês são profissionais que admiro muito e que guardarei com muito carinho no meu coração.

À professora Rosana Casanovas pela longa parceria e amizade. Obrigado pela confiança incondicional que você deposita em mim. Que possamos continuar produzindo juntos. Você tem um parceiro e amigo para a vida toda. **“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes – Cora Coralina”**.

À professora Luciana Salles Branco de Almeida por ser uma grande referência para mim. Obrigado por me apresentar o mundo dos óleos essenciais, por me dar a oportunidade e o prazer de ser seu aluno de iniciação científica. Esteja certa que, ao escolher um composto de óleo essencial para estudar, me baseei nas suas pesquisas e na sua sabedoria sobre a farmacologia que eu também tanto admiro. A senhora é inspiradora! **“A base de toda conquista é o professor. A fonte de sabedoria, um bom professor. Em cada descoberta, cada invenção. Todo bom começo tem um bom professor - Max Haetinger”**.

À professora Andrea Dias Neves Lago pela competência, seriedade e carisma. Obrigado por amar o laser e fazer com que os seus alunos o amem também. Foi muito importante para a minha formação e caminhada na pós-graduação já possuir familiaridade com o laser, acreditando e comprovando a sua eficácia. Gratidão eterna.” **Acreditar no invisível é reconhecer que a fé, a esperança e o amor são forças poderosas que muitas vezes transcendem a nossa capacidade de ver e tocar. É confiar no que não se pode provar, mas que se sente profundamente no coração – autor desconhecido”**.

Às professoras Livia Nordi Dovigo e Juliana Campos por serem uma ponte entre mim e a estatística. A semente que vocês plantaram em mim germinou e continua se desenvolvendo. Obrigado por tantos ensinamentos. **“A estatística é a gramática da ciência - Karl Pearson”**.

À professora Maria Aurea Lira Feitosa por todo carinho e confiança. Obrigado por todas as orações e torcida pelo meu sucesso. Seus ensinamentos me ajudam diariamente. **“Portanto, assim como vocês receberam Cristo Jesus, o Senhor, continuem a viver nele, enraizados e edificados nele, firmados na fé, como foram ensinados, transbordando de gratidão - Colossenses 2:6-7”**.

À professora Janaina Habib Jorge pela alegria, leveza e dedicação em ensinar. Obrigado por acompanhar este trabalho nas fases de qualificação e defesa. Sua contribuição para este momento foi significativa. **“A sabedoria consiste em compreender que o tempo dedicado ao trabalho nunca é perdido - Ralph Waldo Emerson”**.

Aos professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese e da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr por todo ensinamento transmitido e que contribuíram de forma substancial para a minha formação profissional.

Aos professores da Universidade Federal do Maranhão – UFMA por terem construído todo alicerce da minha trajetória acadêmica. Agradeço e utilizo valiosos conhecimentos transmitidos. **“Viver é lutar! A vida é combate, que aos fracos abate, aos fortes, aos bravos, só pode exaltar – Gonçalves Dias”**.

À República A Rocha, minha casa, minha família durante todo o doutorado. Obrigado pela amizade, horas de riso, aprendizado e acolhimento. Vocês me ensinam diariamente sobre tudo e sou muito feliz em ter escrito essa história na companhia de todos vocês. **“Prefiro caminhar com um amigo no escuro, que sozinho na luz - Helen Keller”**.

Aos meus amigos da vida, que apesar da ausência, continuam com o mesmo carinho e amizade de sempre, em especial à Beatriz Nogueira, Celso Afonso Rodrigues, Rodolfo Rêgo, Jessika Katarine, Lucas Portela, Vinicius Henrique, Juliana Cerini, Julia Jerez, Vinicius Ahid, Giuliana Santos e Isadora, Julyana Cunha, Lídia Machado, Glenda Serra, Priscila Santos, Gabriel Magalhães.

Às queridas bibliotecárias, representadas pela Ana Cristina Jorge, que são extremamente eficientes e fraternas.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP por promover o conhecimento e abrir as portas para que pesquisas tão necessárias sejam realizadas com condições adequadas para que possamos devolver à comunidade científica resultados confiáveis. Agradeço todos os funcionários que fazem parte dessa grande instituição.

À FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico do Estado do Maranhão (Processo nº 190480/2021) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Há sempre duas faces na mesma moeda

Cara: um herói.

Coroa: um tirano.

Algo mudou, bem sei;

A ambição mudou de traje,

A guerra, de veículo,

O poder, de método.

O mundo girou muito

Mas o homem mudou pouco

Porém repetir uma história

É nossa profissão, e nossa forma de luta.

Assim, vamos contar de novo

De maneira bem clara

E eis nossa razão:

Ainda não acreditamos que no final

O bem sempre triunfa.

Mas já começamos a crer, emocionados,

Que, no fim, o mal nem sempre vence.

O mais difícil da luta

É descobrir o lado em que lutar.

Pereira CAA. Efeito antibiofilme e citotoxicidade de *Zingiber zerumbet* associado à terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

## RESUMO

O objetivo desta tese foi avaliar a atividade antibiofilme e a biocompatibilidade da Zerumbona (ZER) combinada com a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD) sobre biofilmes de *C. albicans* suscetíveis (CaS; ATCC 90028), resistentes ao fluconazol (CaR; ATCC 96901; isolados clínicos resistentes HIV+ - R14 e R70), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para isso, foram realizados quatro estudos: **1-** foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração fungicida mínima (CFM) do ZER e a curva de sobrevivência (CS) de CaS e CaR na presença do ZER. Além disso, biofilmes de 48 h foram expostos ao ZER (128 e 256 µg/mL) por 5, 10 e 20 min (n=12). Como controle, um grupo não recebeu tratamento; **2-** o ZER (256µg/mL), o Photodithazine® [PDZ (P); 200 mg/L] e a luz LED [(L); 660nm; 50 J/cm<sup>2</sup>] foram utilizados no tratamento de biofilmes de isolados clínicos (CaS, CaR, R14 e R70), de forma isolada ou em associação, originando 8 grupos de tratamento (P+L+, P-L+, P+L-, P-L-, ZER+P-L-, ZER+P+L+, ZER+P+L- e ZER+P-L+; n=12); **3-** foram investigados o efeito antifúngico, a biocompatibilidade e a ação resposta inflamatória do ZER combinado à TFD usando um modelo de cocultura tridimensional (3D) infectado com CaS ou CaR). Para isso, tecidos de queratinócitos orais (NOK-si) e fibroblastos gengivais humanos (FGH) foram tratados com ZER (256 ou 512 µg/mL) e TFD [PDZ (200 mg/L) e luz LED (660 nm; 50 J/cm<sup>2</sup>; 44,5 mW/cm<sup>2</sup>)], individualmente ou em combinação. Os controles foram Nistatina (250 µg/mL), meio de cultura (DMEM) e um controle de indução de morte celular (Triton 0,9%). **4-** Investigou o uso TFD com uma mistura de ZER e PDZ para inativar biofilmes de bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) e fungos (CaS e CaR). Biofilmes foram cultivados por 48 horas e submetidos tratamentos com: 1-ZER (256 µg/mL); 2-PDZ (200 µg/mL); 3-PDZ+LED; 4-ZER+PDZ+LED; 5- MIX (ZER+PDZ)+LED. O grupo controle não recebeu tratamento. Os parâmetros de irradiação utilizados foram: LED (660 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 min). A segurança do tratamento foi avaliada testando sua toxicidade em modelo 2D de células orais (FGH e Nok-si). Análises de High-performance liquid chromatography (HPLC) e Espectrometria de Massas (ES) e Espectro de Absorbância (EA) foram realizadas para verificar se a mistura ZER+PDZ não sofreu alterações moleculares. Nos estudos 1 e 2, a eficácia dos tratamentos foi avaliada através da população microbiana (UFC/mL), quantificação das biomassas (total e insolúvel) e dos componentes da matriz extracelular (polissacarídeos solúveis em água (WSP), polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), proteínas e DNA extracelular (eDNA). Os dados foram submetidos ao teste de variância ANOVA [two-way (estudo 1), three-way (estudo 2) e one-way (estudos 3 e 4)] e  $\alpha$  de 5%. Portanto, ZER foi eficaz contra biofilmes de CaR e CaS e perturbou a matriz extracelular. No estudo 1, a CIM e o valor de MFC coincidiram para CaS (256 µg/mL) e CaR (128 µg/mL). ZER a 256 µg/mL reduziu a viabilidade celular em 38,51% para CaS e em 36,99% para CaR, também reduziu a biomassa total (57%), biomassa insolúvel (45%), WSP (65%), proteínas (18%) e eDNA (78%) de CaS. Para CaR observou-se a redução da biomassa insolúvel (13%), proteínas (18%), WSP (65%), ASP (10%) e eDNA (23%). No estudo 2, a associação de ZER com TFD provocou redução dos componentes do biofilme de todas as cepas avaliadas (CaS, CaR, R14 e R70). Em média, houve a redução da viabilidade celular em 2,01 log<sub>10</sub> (30%), da biomassa total (30%) e insolúvel (33%) das proteínas totais (15%), além dos componentes da MEC:

proteínas insolúveis (24%), WSP (68%), ASP (26%) e eDNA (60%). No estudo 3, em modelo de cocultura não infectado, o tratamento de ZER (256 µg/mL) + TFD exibiu baixa citotoxicidade por alamarBlue™, com redução da viabilidade celular abaixo de 18%. No modelo 3D infectado, ZER (256 µg/mL) + aPDT resultou em um dano celular de 7,41% para CaS e 9,43% para o CaR, medido pela liberação de Lactato Desidrogenase (LDH). As reduções nas colônias viáveis do biofilme foram de 2,36 log<sub>10</sub> para CaS e 2,15 log<sub>10</sub> para CaR. Imagens por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM) apoiaram esses achados, indicando que ZER + aPDT inibiu a penetração da infecção. Além disso, ZER combinado com TFD reduziu as respostas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) induzidas pela infecção por *C. albicans*. No estudo 4, tanto o grupo ZER+PDZ+LED quanto o grupo MIX (ZER+PDZ)+LED mostraram a maior redução estatisticamente significativa em UFC/mL comparado ao controle ( $p \leq 0,011$ ) em todas as cepas avaliadas, sem diferença significativa entre eles ( $p \geq 0,218$ ). A redução observada foi de 2,74, 2,89, 2,45 e 2,07 log<sub>10</sub> para *S. aureus*, *E. coli*, CaS e CaR, respectivamente. A redução da viabilidade celular em NOK-si e FGH não excedeu 17%. Análises de EA, HPLC e ES confirmaram que as características do PDZ permaneceram inalteradas ao ser misturado com ZER. O tratamento com ZER+TFD aumentou a eficácia do tratamento fotodinâmico contra CaS e CaR representando uma abordagem antifúngica promissora. Em modelos de cocultura 3D, o tratamento com ZER foi considerado não citotóxico. Análises de AS, HPLC e MS confirmaram que as características do PDZ permaneceram inalteradas ao ser misturado com ZER, reduzindo o tempo de aplicação e potencializando o efeito do tratamento fotodinâmico antimicrobiano independentemente das características da cepa (fúngica ou bacteriana). Portanto, a sua segurança e eficácia de ZER em combinação com TFD foi observada contra biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, sendo uma alternativa promissora para controle e inativação de biofilmes.

**Palavras chave:** Biofilmes. *Candida albicans*. *Escherichia coli*. Fotoquimioterapia. Sesquiterpenos monocíclicos. *Staphylococcus aureus*.

Pereira CAA. Antibiofilm effect and cytotoxicity of *Zingiber zerumbet* associated with photodynamic therapy in *Candida albicans* biofilms [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the antibiofilm activity and biocompatibility of Zerumbone (ZER) combined with Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) on biofilms of susceptible *C. albicans* (CaS; ATCC 90028), fluconazole-resistant *C. albicans* (CaR; ATCC 96901; resistant clinical isolates HIV+ - R14 and R70), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Escherichia coli* (ATCC 25922). For this purpose, four studies were conducted: 1- the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum fungicidal concentration (MFC) of ZER, and the survival curve (SC) of CaS and CaR in the presence of ZER were determined. In addition, 48-hour biofilms were exposed to ZER (128 and 256 µg/mL) for 5, 10, and 20 min (n=12). As a control, one group received no treatment; 2- ZER (256 µg/mL), Photodithazine® [PDZ (P); 200 mg/L] and LED light [(L); 660 nm; 50 J/cm<sup>2</sup>] were used in the treatment of biofilms of clinical isolates (CaS, CaR, R14, and R70), either alone or in association, resulting in 8 treatment groups (P+L+, P-L+, P+L-, P-L-, ZER+P-L-, ZER+P+L+, ZER+P+L- and ZER+P-L+; n=12); 3- the antifungal effect, biocompatibility, and inflammatory response action of ZER combined with aPDT were investigated using a three-dimensional (3D) co-culture model infected with CaS or CaR. For this, oral keratinocyte tissues (NOK-si) and human gingival fibroblasts (HGF) were treated with ZER (256 or 512 µg/mL) and aPDT [PDZ (200 mg/L) and LED light (660 nm; 50 J/cm<sup>2</sup>; 44.5 mW/cm<sup>2</sup>)], individually or in combination. The controls were Nystatin (250 µg/mL), culture medium (DMEM), and a cell death induction control (0.9% Triton). 4- the use of aPDT with a mixture of ZER and PDZ was investigated to inactivate biofilms of bacteria (*S. aureus* and *E. coli*) and fungi (CaS and CaR). Biofilms were cultured for 48 hours and subjected to treatments with: 1-ZER (256 µg/mL); 2-PDZ (200 µg/mL); 3-PDZ+LED; 4-ZER+PDZ+LED; 5- MIX (ZER+PDZ)+LED. The control group received no treatment. The irradiation parameters used were: LED (660 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 min). The safety of the treatment was evaluated by testing its toxicity in a 2D oral cell model (HGF and Nok-si). Analyses of High-performance liquid chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry (MS) and Absorbance Spectrum (AS) were performed to verify if the ZER+PDZ mixture did not undergo molecular alterations. In studies 1 and 2, the efficacy of the treatments was evaluated through the microbial population (CFU/mL), quantification of biomass (total and insoluble) and the components of the extracellular matrix (water-soluble polysaccharides (WSP), alkali-soluble polysaccharides (ASP), proteins, and extracellular DNA (eDNA)). The data were submitted to the ANOVA variance test [two-way (study 1), three-way (study 2) and one-way (studies 3 and 4)] with  $\alpha$  of 5%. Therefore, ZER was effective against CaR and CaS biofilms and disrupted the extracellular matrix. In study 1, the MIC and MFC values coincided for CaS (256 µg/mL) and CaR (128 µg/mL). ZER at 256 µg/mL reduced cell viability by 38.51% for CaS and 36.99% for CaR, also reducing total biomass (57%), insoluble biomass (45%), WSP (65%), proteins (18%) and eDNA (78%) of CaS. For CaR, a reduction in insoluble biomass (13%), proteins (18%), WSP (65%), ASP (10%) and eDNA (23%) was observed. In study 2, the association of ZER with aPDT caused a reduction in the biofilm components of all evaluated strains (CaS, CaR, R14, and R70). On average, there was a reduction in cell viability of 2.01 log<sub>10</sub> (30%), total (30%) and insoluble (33%) biomass, total proteins (15%), as well as MEC components: insoluble proteins (24%), WSP (68%), ASP (26%) and eDNA (60%). In

study 3, in an uninfected co-culture model, ZER (256 µg/mL) + aPDT treatment exhibited low cytotoxicity by alamarBlue™, with a reduction in cell viability below 18%. In the infected 3D model, ZER (256 µg/mL) + aPDT resulted in cell damage of 7.41% for CaS and 9.43% for CaR, measured by Lactate Dehydrogenase (LDH) release. The reductions in viable biofilm colonies were 2.36 log<sub>10</sub> for CaS and 2.15 log<sub>10</sub> for CaR. Images from a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) supported these findings, indicating that ZER + aPDT inhibited the penetration of the infection. In addition, ZER combined with aPDT reduced the pro-inflammatory responses (IL-6 and IL-8) induced by *C. albicans* infection. In study 4, both the ZER+PDZ+LED group and the MIX (ZER+PDZ)+LED group showed the most statistically significant reduction in CFU/mL compared to the control ( $p \leq 0.011$ ) in all strains evaluated, with no significant difference between them ( $p \geq 0.218$ ). The observed reduction was 2.74, 2.89, 2.45, and 2.07 log<sub>10</sub> for *S. aureus*, *E. coli*, CaS, and CaR, respectively. The reduction in cell viability in NOK-si and HGF did not exceed 17%. AS, HPLC, and MS analyses confirmed that the characteristics of PDZ remained unchanged when mixed with ZER. Treatment with ZER+aPDT increased the efficacy of photodynamic treatment against CaS and CaR, representing a promising antifungal approach. In 3D co-culture models, ZER treatment was considered non-cytotoxic. AS, HPLC, and MS analyses confirmed that the characteristics of PDZ remained unchanged when mixed with ZER, reducing application time and enhancing the effect of antimicrobial photodynamic treatment regardless of the characteristics of the strain (fungal or bacterial). Therefore, the safety and efficacy of ZER in combination with aPDT were observed against biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, and *E. coli*, making it a promising alternative for biofilm control and inactivation.

**Keywords:** Biofilms. *Candida albicans*. *Escherichia coli*. Photochemotherapy. Monocyclic Sesquiterpenes. *Staphylococcus aureus*.

## Lista de abreviaturas e siglas

$\alpha$	Nível de significância
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro(s)
$\mu\text{M}$	Micromolar
3D	Tridimensional
aPDT	Antimicrobial Photodynamic Therapy
ANOVA	Análise de variância (Analysis of variance)
AS	Espectroscopia de Absorbância
ASP	Alkali-Soluble Polysaccharides (Polissacarídeos Solúveis em Álcali)
ATCC	American Type Culture Collection
CaR	<i>Candida albicans</i> resistente ao fluconazol
CaS	<i>Candida albicans</i> susceptível ao fluconazol
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CFU/mL	Colony Forming Units per milliliter
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (Microscopia Confocal de Varredura a Laser)
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
$\text{CO}_2$	Carbon Dioxide (Dióxido de Carbono)
CS	Curva de Sobrevivência
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Densidade Óptica

EA	Espectro de Absorbância (usado no resumo, padronizar para AS)
ECM	Extracellular Matrix (Matriz Extracelular)
eDNA	Extracelular DNA
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
ES	Espectrometria de Massas (usado no resumo, padronizar para MS)
ESI-MS	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
et al	e outros (et alii)
FAPEMA	Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino)
Fig	Figura
FGH	Fibroblastos Gengivais Humanos
FOAr	Faculdade de Odontologia de Araraquara
g/L	Gramas por litro
h	Hora(s)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HGF	Human Gingival Fibroblasts
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
IL	Interleucina
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio Monobásico
LED	Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz )
LDH	Lactato Desidrogenase
Log <sub>10</sub>	Logaritmo na base 10
M	Molar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno)
MEC	Matriz Extracelular

Mg	Miligrama
MGCx	Mannan-Glucan Complex (Complexo Manano-Glucano)
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)
min	Minuto(s)
MIX	Mistura (de ZER+PDZ)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatt por centímetro quadrado
n	Número de amostras
NaCl	Cloreto de Sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio Dibásico
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina)
NaOH	Hidróxido de Sódio
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B (Fator Nuclear kappa B)
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NOK-si	Queratinócitos Orais Imortalizados
OD	Optical Density (Densidade Óptica)
OPC	Candidose Orofaringea
p	Nível de significância estatística (valor p)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PDZ	Photodithazine®
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Propidium Iodide (Iodeto de Propídio)
PIBIC-V	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - Voluntário
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SDA	Dextrose Sabouraud Ágar
SFB	Soro Fetal Bovino
TFA	Ácido Trifluoroacético

TFD	Terapia Fotodinâmica (usado no resumo, padronizar para aPDT)
TSA	Ágar Tryptic Soy
TSB	Caldo Tryptic Soy
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
UK	Reino Unido (United Kingdom)
V/V	Volume por volume
WSP	Water-Soluble Polysaccharides (Polissacarídeos Solúveis em Água)
YNB	Meio Yeast Nitrogen Base
ZER	Zerumbona

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3 PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Publicação 2 .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3 Publicação 3 .....</b>	<b>75</b>
<b>3.4 Publicação 4.....</b>	<b>105</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>128</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>142</b>
<b>APÊNDICE A – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>153</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies fúngicas com ação patogênica presentes na cavidade oral, *Candida albicans* é a mais prevalente, provocando infecções nosocomiais em todo o mundo, podendo levar a morte<sup>1,2</sup>. Essas infecções podem ser leves (pele e mucosa) ou infecções invasivas graves (sistêmica), principalmente em indivíduos imunologicamente comprometidos<sup>3,4</sup>. As manifestações clínicas orais associadas à infecção de *C. albicans* consistem na presença de lesões mucocutâneas superficiais (Candidose Orofaríngea -OPC). O uso de próteses favorece as infecções orais por ocasionar microtraumas contínuos e aumento do tempo de contato com microrganismos. Tanto próteses totais quanto parciais têm substratos em que microrganismos possuem a capacidade de adesão, especialmente espécies de *Candida*<sup>5</sup>.

*Candida albicans* é classificada como uma levedura polimórfica do tipo diplóide que está naturalmente presente nas superfícies da pele e da mucosa, pertencendo a microbiota humana normal<sup>6</sup>. Entretanto, por ser um microrganismo comensal oportunista, tem um considerável potencial patogênico e pode causar infecções em condições adversas, como imunidade comprometida, presença de uma doença sistêmica, pacientes com dispositivos implantados ou que estão fazendo o uso de antibióticos de amplo espectro<sup>7,8</sup>.

As infecções causadas por *C. albicans* estão associadas à sua capacidade de formar biofilmes complexos que se aderem em superfícies bióticas, como pele e mucosa, e superfícies abióticas como próteses, implantes e cateteres<sup>2</sup>. O biofilme é definido como uma microestrutura de células aderidas a uma superfície e incorporadas por uma matriz extracelular polimérica (MEC) auto secretada<sup>1,2</sup>. A formação de biofilmes de *C. albicans* acontece por meio da transição morfológica de leveduras para hifas e pseudohifas, com remodelação do comportamento fenotípico e mudanças na expressão gênica<sup>9</sup>. O biofilme de *C. albicans* tem sua formação realizada em quatro estágios, que se inicia com a adesão de leveduras de *C. albicans* a uma superfície (estágio 1), em seguida ocorre a formação de uma comunidade microbiana composta por diversas colônias e a secreção de substâncias poliméricas extracelulares para produção da MEC (estágio 2). Após a completa formação da MEC (estágio 3), o biofilme é considerado maduro e ocorre a dispersão de células do biofilme (estágio 4) para colonizar novas superfícies<sup>1,2,9</sup>.

A resistência antifúngica é definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após aplicação do tratamento antimicrobiano<sup>10,11</sup>. A transição morfológica de *C. albicans* é um fator determinante para o aumento de sua virulência e patogenicidade<sup>12</sup>, uma vez que essa transformação ajuda os fungos a evadir-se da fagocitose induzida por macrófagos, propiciando grande potencial para a penetração e invasão de tecidos do hospedeiro, causando danos mais severos a saúde<sup>13</sup>. Após estabelecidos, os biofilmes de *C. albicans* são altamente tolerantes à terapia antifúngica convencional e servem como um reservatório para a reincidência de infecções por meio de células que se dispersam para colonizar novos substratos, possuindo um relevante impacto clínico através de uma correlação positiva entre a formação do biofilme, aumento da virulência e maior taxa de mortalidade do paciente<sup>1,9</sup>.

Outro fator determinante para a resistência do biofilme às terapias antifúngicas convencionais é a presença da MEC do biofilme, formada por polímeros extracelulares, carboidratos, lipídios e DNA extracelular (eDNA), envolvidos na manutenção da estrutura do biofilme<sup>14</sup>. Estruturalmente, a MEC do biofilme de *C. albicans* possui um complexo denominado manano-glucano (MGCx) composto por três polissacarídeos ( $\alpha$ -1,6-manano e  $\beta$ -1,6- e  $\beta$ -1,3-glucanos)<sup>15</sup>. Esses polissacarídeos se reúnem extracelularmente para formar um complexo capaz de impedir a ação antifúngica dos medicamentos por meio do sequestro de drogas<sup>16</sup>. Os  $\alpha$ -1,6-manano são os polissacarídeos mais presentes na MEC e estão frequentemente ligados aos  $\beta$ -1,3-glucanos, que são os polissacarídeos que contribuem significativamente para a resistência do biofilme às drogas antifúngicas, impedindo o seu contato com as células-alvo<sup>17,18</sup>. As células de *C. albicans* no biofilme liberam mais  $\beta$ -1,3-glucanos na MEC do que as células planctônicas, sendo um fator importante para o aumento da resistência às terapias convencionais em biofilmes<sup>19</sup>. Além dos polissacarídeos, o eDNA desempenha função essencial na adesão do biofilme ao substrato<sup>7,19</sup>. O eDNA também induz a transição morfológica das células fúngicas de levedura para hifas durante o desenvolvimento do biofilme<sup>20</sup> e proporciona proteção extra contra a ação de antifúngicos<sup>20,21</sup>, aumentando a severidade das infecções fúngicas<sup>22</sup>.

O biofilme maduro possui a sua biomassa aumentada com células de levedura, hifas, pseudo-hifas e a presença da MEC completamente formada, representando uma grande proporção do biofilme<sup>1</sup>. As hifas presentes nos biofilmes de *C. albicans*

são responsáveis pela integridade estrutural e fornecem suporte necessário para a fixação de mais células de levedura, pseudo-hifas e outras hifas, assim como bactérias em biofilmes multiespécies<sup>1,23</sup>. *C. albicans* frequentemente atua como um arcabouço, facilitando a adesão e o crescimento de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup>. Essas interações podem ser sinérgicas, aumentando tanto a resistência antimicrobiana quanto a virulência do biofilme<sup>24</sup>. Dessa forma, a resistência e a tolerância dos biofilmes às drogas convencionais são de origem multifatorial, sendo atribuída à presença da MEC, regulação das bombas de efluxo de drogas e presença de células persistentes<sup>25</sup>.

Os principais antifúngicos convencionais utilizados para tratamento e controle de infecções de *C. albicans* são de três classes: polienos, azóis e equinocandinas<sup>26</sup>. A nistatina é um polieno de uso tópico de grande prescrição no mundo, sendo o fármaco de primeira escolha para tratamento da OPC<sup>5,27,28</sup>, entretanto o fator diluente da saliva e movimentos estomatognáticos podem comprometer a sua ação, levando-a a doses subterapêuticas e não eliminando em sua totalidade as espécies de *C. albicans*<sup>27</sup>. A anfotericina B é outro polieno, administrado sistemicamente, e tem efeito fungicida a partir da sua aglomeração extra membranosa e formação de poros, exercendo efeitos fungicidas ao extrair ergosterol de bicamadas lipídicas, possuindo eficácia de amplo espectro<sup>29,30</sup>. A principal desvantagem da anfotericina B é a sua toxicidade, especialmente nos rins, podendo causar efeitos adversos e descontinuação do tratamento, o que pode levar a uma resistência adquirida devido a exposição de microrganismos ao antifúngico em doses subterapêuticas<sup>30</sup>.

Os antifúngicos azólicos, como o fluconazol e o itraconazol, são caracterizados por uma boa biodisponibilidade oral e o seu efeito fungicida se dá a partir da destruição da membrana celular do fungo, entretanto possuem eficácia inconstante, a depender da espécie fúngica, e o seu uso prolongado pode ocasionar resistência<sup>26,31</sup>. Os azóis podem causar efeitos hepatotóxicos e também inibir as enzimas CYP450 humanas, podendo desencadear diversas interações medicamentosas<sup>27</sup>. As equinocandinas são idênticas no seu espectro de eficácia e inibem a biossíntese da parede celular, bloqueando a síntese de  $\beta$ -1,3-glucanos<sup>32</sup>. As equinocandinas são geralmente bem toleradas e têm menor potencial de interação com outros medicamentos. Os biofilmes de *C. albicans* em próteses dentárias parecem representar um nicho único de infecção, pois apresentam resistência às equinocandinas ao contrário de cateteres, por exemplo<sup>33</sup>. De modo geral, *C. albicans* tem se mostrado cada vez menos

susceptível aos antifúngicos convencionais, com características de resistência intrínseca (primária) e/ou adquirida (secundária)<sup>34</sup>.

Diante da resistência dos biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos convencionais<sup>37</sup>, novas alternativas têm sido avaliadas, e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) tem sido sugerida para controle e inativação de biofilmes<sup>36</sup>. A TFD consiste na excitação de um agente fotossensibilizante (FS) por uma fonte de luz, em sua banda de absorção, na presença de oxigênio, formando espécies reativas de oxigênio (ROS) que provocam a inativação celular por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II)<sup>37</sup>. As ROS apresentam instabilidade reativa não específica com moléculas orgânicas e podem causar diversos danos irreversíveis nas células-alvo, como promover a lise da membrana e a inativação de proteínas<sup>38</sup>. Portanto, qualquer macromolécula celular pode ser considerada como alvo para a TFD e, como o FS é aplicado externamente à célula, a membrana celular é considerada o alvo inicial<sup>36,37</sup>. Além disso, as células fúngicas, devido à alta exposição ao oxigênio singlete em um tempo relativamente curto, não conseguem desenvolver resistência a TFD<sup>39</sup>.

Os FS são definidos como substâncias com a capacidade de absorver luz a partir de um comprimento de onda específico, desencadeando reações fotoquímicas e fotofísicas<sup>40</sup>. Assim como outras moléculas com propriedades antifúngicas utilizadas como drogas, algumas características e condições são fundamentais para a escolha do FS para mediar a TFD, como alto grau de pureza química, alta absorção na faixa visível, boa penetrabilidade para gerar ROS em camadas mais profundas, estabilidade à temperatura ambiente, efeito fotossensível apenas na presença de um determinado comprimento de onda, alta fotoestabilidade e baixa toxicidade, permanecendo ativo após a exposição da fonte de luz sem causar danos a células e tecidos adjacentes a região alvo<sup>40,41</sup>.

As porfirinas e as fenotiazinas são os FSs predominantemente utilizados na TFD<sup>39</sup>. Uma segunda geração de FSs têm sido utilizadas na TFD, como as clorinas, que são porfirinas com características hidrofílicas reduzidas, possuindo forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro fotomagnético<sup>41</sup>. O Photodithazine® (PDZ) é um FS da família das clorinas, formado a partir da redução de um anel de porfirina pirrol, sendo uma clorina e6 de segunda geração, obtido a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*. O PDZ é solúvel em água, apresenta

atividade antimicrobiana na faixa de 630–660 nm do espectro de luz visível e alto rendimento quântico de formação de ROS<sup>42</sup>.

Anteriormente, foi relatado que a aplicação da TFD mediada pelo PDZ promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a TFD<sup>43</sup>. No mesmo estudo, em modelo de biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans*, quando tratados com 125 mg/L de PDZ e irradiados com luz LED (37,5 J/cm<sup>2</sup>), foi constatada uma redução de 0,9 Log<sub>10</sub> para biofilmes de *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log<sub>10</sub> (UFC/mL) para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente, sendo essa redução menor quando comparada a apresentada em espécies planctônicas<sup>43</sup>. Ao utilizar o PDZ na concentração de 100 mg/L associado à luz LED (37,5 J/cm<sup>2</sup>), foi observada a redução de 1,01 Log<sub>10</sub> em *C. albicans* susceptível a fluconazol e de 0,81 log<sub>10</sub> para *C. albicans* resistente a fluconazol<sup>44</sup>. Quando o PDZ foi aplicado a 150 mg/L e associado a uma dose de luz de 37,5 J/cm<sup>2</sup>, a redução na viabilidade celular de *C. albicans* susceptível a fluconazol foi de 1,2 log<sub>10</sub><sup>45</sup>. Em outro estudo, foi relatado que o PDZ a 200 mg/L associado a uma dose de luz de 50 J/cm<sup>2</sup> provocou uma redução de 1,32 log<sub>10</sub> na viabilidade celular de *C. albicans* susceptível a fluconazol<sup>46</sup>. Em modelo murino de candidose que avaliou a eficácia da TFD, mediada pelo PDZ, na inativação de cepas de referência e de isolados clínicos de *C. albicans* susceptível a fluconazol foi observado que a TFD provocou a redução de 1,15 log<sub>10</sub> para biofilmes de isolados clínicos e 1,96 log<sub>10</sub>, para biofilmes de cepas de referência<sup>47</sup>. Hidalgo et al.<sup>48</sup>, em modelo murino de candidose, utilizaram uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901) para o estabelecimento da infecção, realizando o tratamento com TFD e/ou nistatina. Os animais tratados com TFD ou nistatina isoladamente apresentaram redução da viabilidade celular estatisticamente semelhantes, com redução de 1,3 e 1,1 log<sub>10</sub>, respectivamente. Quando as terapias foram associadas, a redução da viabilidade celular foi de 2,6 e 2,1 log<sub>10</sub> para nistatina+TFD e TFD+nistatina, respectivamente<sup>48</sup>. Entretanto, a penetração do fotossensibilizador em biofilmes é dificultada pela presença da MEC, o que impede um maior efeito antimicrobiano da TFD<sup>46</sup>. Isso acontece devido ao fato do oxigênio singlete e dos radicais hidroxila possuírem meia-vida bastante curta, onde apenas as moléculas e estruturas mais próximas a área de aplicação do FS ou de exposição a luz são efetivamente alcançadas<sup>46</sup>.

Outra limitação dos tratamentos fotodinâmicos está relacionada às diferenças na composição da parede celular entre diferentes microrganismos em biofilmes polimicrobianos, uma vez que bactérias Gram-positivas, por exemplo, são mais suscetíveis à TFD do que bactérias Gram-negativas<sup>49</sup>. A característica da parede celular, portanto, pode fazer com que o fotossensibilizador seja sequestrado pelos polissacarídeos da MEC, o que impede a sua penetração em camadas mais profundas do biofilme<sup>50</sup>. Nesse sentido, alguns compostos como Dextranase, DNase e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram testados como agentes desestruturadores da MEC de biofilmes de *C. albicans*, com a finalidade de facilitar a posterior aplicação de abordagens antifúngicas, como a TFD<sup>46,51,52</sup>.

Na busca por novos compostos que atuem como agente desestruturador da MEC e que ainda possam contribuir para a indução de formação de ROS, o Zerumbone (ZER) foi considerado uma alternativa promissora por possuir essas características relatadas em estudos anteriores<sup>53-55</sup>. O ZER (2,6,9,9-tetrametil-(2E,6E,10E)-cycloundeca-2,6,10-trien-1-ona) é um composto sesquiterpeno monocíclico (C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O) altamente volátil encontrado em grandes quantidades no rizoma do gengibre comestível selvagem da espécie *Zingiber zerumbet* (L.)<sup>56</sup>. O principal composto bioativo encontrado no extrato etanólico e/ou óleo essencial de *Z. zerumbet* é o ZER<sup>57</sup>. O ZER foi isolado pela primeira vez do óleo volátil essencial de rizomas de *Z. zerumbet* em 1956<sup>58</sup>, enquanto sua estrutura química foi determinada em 1960 e mais tarde caracterizada por ressonância magnética e raio-X<sup>59</sup>. O ZER possui três ligações duplas, duas conjugadas e uma isolada, bem como grupo carbonila conjugado duplo na estrutura do anel de 11 membranas<sup>60</sup>. Foi relatado que a aplicação de ZER pode estar relacionada com a redução no conteúdo de ergosterol em *C. albicans*, que é o principal componente de esterol que atua na fluidez e integridade de filamentos fúngicos, sendo também responsável pelo bom funcionamento celular, mantendo o fluxo e a bioatividade de muitas outras enzimas regulatórias ligadas à membrana<sup>53</sup>. O ZER possui ação na indução e controle de formação de ROS, produzidas por diversas vias metabólicas (mitocôndrias, óxido nítrico sintase, NADPH, oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase e enzimas)<sup>54</sup>. Em modelo de células tumorais, foi observado que o aumento da concentração de ROS intracelular provocou maior expressão de proteínas antioxidantes com finalidade de desintoxicação, sugerindo que o aumento nos níveis de ROS pode desestabilizar a função celular por meio de estresse oxidativo<sup>61</sup>. Também foi observado que após o

tratamento com ZER, houve aumento no nível de ROS, ocasionando uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial e consequente indução de apoptose celular<sup>62,63</sup>.

A nível celular, ROS atuam como sinalizadores moleculares que regulam diversos processos fisiológicos, entretanto podem provocar uma série de respostas inflamatórias em níveis elevados<sup>64</sup>. A produção de citocinas pró-inflamatórias é induzida pelo estresse oxidativo causado por ROS em níveis tóxicos, uma vez que ativam a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)<sup>65</sup>. Dessa forma, é necessário avaliar a biocompatibilidade da terapia de combinação entre ZER e TFD para verificar se ROS gerados nessa terapia de combinação também podem afetar as células de mamíferos<sup>64,66</sup>.

Em modelo de avaliação de citotoxicidade em monocamada, o ZER na concentração de 100 µg/mL não foi considerado citotóxico em células de mamíferos Vero<sup>67</sup>, células fibroblásticas NIH/3T3<sup>68</sup> e em células hepáticas<sup>69</sup>. Para TFD, também em modelo de monocamada, utilizando fontes de luz de faixa visível (48 mW/cm<sup>2</sup>) e na faixa invisível (152 mW cm<sup>2</sup>) com irradiação total de 200 mW/cm<sup>2</sup>, não foi observada atividade citotóxica em exposições a células de queratinócitos por 5, 10 ou 20 min<sup>70</sup>.

Apesar dos modelos de cultura celular em monocamada ainda serem bastante utilizados para avaliar a citotoxicidade de compostos e novas estratégias terapêuticas, eles possuem como desvantagem o fato de não reproduzir fielmente o dinamismo e a complexidade dos tecidos *in vivo*, podendo induzir a resultados inconsistentes, pois é um modelo em que as células são condicionadas em uma superfície rígida, plana e artificial<sup>71</sup>. Outra desvantagem é a falta de diversidade nos tipos de células na cultura, uma vez que um maior número de linhagens celulares pode reproduzir com mais fidelidade as características dos tecidos, produzindo resultados mais confiáveis em ensaios *in vitro*<sup>72</sup>. Desta forma, modelos de tecidos orais 3D têm sido utilizados para avaliar a citotoxicidade de diversos compostos em tecidos, assegurando a confiabilidade dos resultados<sup>71,73</sup>. Não há, até o presente momento, relatos de estudos que avaliaram a citotoxicidade do ZER em modelo de cocultura 3D com células de linhagem humana ou a citotoxicidade da associação de ZER com a TFD.

O ZER possui eficácia comprovada na inativação de microrganismos presentes na cavidade bucal<sup>67,74</sup> e também induz a formação de ROS<sup>54</sup>, componente necessário para a TFD realizar a sua atividade antimicrobiana<sup>37</sup>. Diante do exposto, o objetivo

deste estudo foi avaliar: 1- a concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), curva de sobrevivência (CS), eficácia antimicrobiana e atuação na MEC do ZER sobre biofilmes de *C. albicans* susceptíveis e resistentes; 2- o efeito do ZER combinado com a TFD sobre a viabilidade celular e os componentes da MEC de biofilmes de *C. albicans* de cepas de referência e de dois isolados clínicos resistentes; 3- o efeito citotóxico da associação entre ZER e a TFD sobre células humanas em um modelo de cocultura tridimensional (3D) não infectado e infectado por *C. albicans*; 4- o potencial da TFD mediada por uma mistura de ZER com PDZ (para otimização do tempo de aplicação) na inativação de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*.

## 5 CONCLUSÃO

Estudo 1: A exposição de biofilmes maduros de *C. albicans* ao ZER 256 µg/mL reduziu a viabilidade celular, biomassa, proteínas insolúveis e componentes da MEC (WSP, ASP e eDNA).

Estudo 2: O tratamento de biofilmes de *C. albicans* com ZER 256 µg/mL associado a TFD reduziu significativamente a viabilidade celular, a biomassa, proteínas, e os componentes da MEC (WSP, ASP e eDNA). Dessa forma, o ZER pode ser utilizado de forma sinérgica com a TFD com objetivo de aumentar a penetração do agente fotossensibilizante e da fonte de luz, potencializando o efeito antimicrobiano do tratamento fotodinâmico.

Estudo 3: O tratamento com ZER 256 µg/mL associado a TFD em modelo de cocultura 3D infectados com *C. albicans* foi considerado biocompatível. Além disso, também impediu uma maior penetração da infecção em camadas mais profundas do tecido, reduzindo as respostas inflamatórias (IL-6 e IL-8).

Estudo 4: A mistura de ZER 256 µg/mL com PDZ mediando o tratamento fotodinâmico foi eficaz contra biofilmes de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* suscetível e *C. albicans* resistente ao fluconazol. Essa mistura apresentou os mesmos efeitos positivos de quando as substâncias foram aplicadas separadamente, e o tempo de aplicação foi otimizado.

## REFERÊNCIAS\*

1. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol*. 2021; 47(1): 91-111.
2. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69: 71-92.
3. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, et al. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transpl Infect Dis*. 2016; 18(6): 921-31.
4. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4: 18026.
5. Rai A, Misra SR, Panda S, Sokolowski G, Mishra L, Das R, et al. Nystatin effectiveness in oral candidiasis treatment: a systematic review & meta-analysis of clinical trials. *Life (Basel)*. 2022; 12(11): 1677.
6. Pendleton KM, Huffnagle GB, Dickson RP. The significance of *Candida* in the human respiratory tract: our evolving understanding. *Pathog Dis*. 2017; 75(3): ftx029.
7. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, et al. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi (Basel)*. 2021; 7(2): 79.
8. Parambath S, Dao A, Kim HY, et al. *Candida albicans*-A systematic review to inform the world health organization fungal priority pathogens list. *Med Mycol*. 2024; 62(6): myae045.
9. Rajendran R, May A, Sherry L, et al. Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. *Sci Rep*. 2016; 6: 35436.
10. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 25(7): 792-8.
11. Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol*. 2014; 11: 65-71.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Li Y, Shan M, Yan M, Huankai Y, Yao H, Wang Y, et al. Anticandidal Activity of Kalopanaxsaponin A: effect on proliferation, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2844.
13. Olivier FAB, Hilsenstein V, Weerasinghe H, Weerasinghe H, Weir A, Hughes S, et al. The escape of *Candida albicans* from macrophages is enabled by the fungal toxin candidalysin and two host cell death pathways. *Cell Rep.* 2022; 40(12): 111374.
14. Li W, Wang JJ, Qian H, Tan L, Zhang Z, Liu H, et al. Insights into the Role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol.* 2020; 11: 813.
15. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* 2014; 5(4): e01333-14.
16. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog.* 2016; 12(9): e1005828.
17. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Jauregui DM, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *J Fungi (Basel).* 2017; 3(1): 14.
18. Dominguez E, Zarnowski R, Sanchez H, et al. Conservation and divergence in the *Candida* Species biofilm matrix mannan-glucan complex structure, function, and genetic control. *mBio.* 2018; 9(2): e00451-18.
19. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis.* 2010; 202(1): 171-5.
20. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol.* 2017; 122(2): 321-30.
21. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010; 169(5): 323-31.
22. Sapaar B, Nur A, Hirota K, et al. Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. *J Appl Microbiol.* 2014; 116(6): 1531-42.

23. Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(9): 3914-22.
24. Aghili SS, Jahangirnia A, Alam M. The effect of photodynamic therapy in controlling the oral biofilm: A comprehensive overview. *J Basic Microbiol.* 2023; 63(1): 1319–47.
25. Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2023; 71: 102237.
26. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis.* 2017; 216(3): S445-51.
27. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016; 10: 1161-71.
28. Bassi RC, Boriollo MFG. Amphotericin B, fluconazole, and nystatin as development inhibitors of *Candida albicans* biofilms on a dental prosthesis relined material: Analytical models in vitro. *J Prosthet Dent.* 2022; 127(2): 320-330.
29. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Tuttle MD, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol.* 2014; 10(5): 400-6.
30. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive fungal infection. *Dtsch Arztebl Int.* 2019; 116(16): 271-8.
31. Popp C, Hampe IAI, Hertlein T, Ohlsen K, Rogers PD, Morschhäuser J. Competitive fitness of fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(7): e00584-17.
32. Katragkou A, Roilides E, Walsh TJ. Role of echinocandins in fungal biofilm-related disease: vascular catheter-related infections, immunomodulation, and mucosal surfaces. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(6): S622-29.
33. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun.* 2010; 78(9): 3650-9.
34. Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host antifungal. *Microorganisms.* 2020; 8(2): 154.

35. Fang J, Huang B, Ding Z. Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: a bayesian network meta-analysis. *J Prosthet Dent.* 2021; 125(2): 257-65.
36. Al-Qahtani MA. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in disinfection of *Candida* biofilms on acrylic dentures: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022; 40: 102980.
37. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance?. *Drug Dev Res.* 2019; 80(1): 48-67.
38. Piksa M, Lian C, Samuel IC, Pawlik KJ, Samuel IDW, Matczyszyn K. The role of the light source in antimicrobial photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 2023; 52(5): 1697-722.
39. Ziental D, Mlynarczyk DT, Czarczynska-Goslinska B, Lewandowski K, Sobotta L. Photosensitizers mediated photodynamic inactivation against fungi. *Nanomaterials (Basel).* 2021; 11(11): 2883.
40. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018; 106: 1098-107.
41. Jao Y, Ding SJ, Chen CC. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of oral infections: a systematic review. *J Dent Sci.* 2023; 18(4): 1453-66.
42. Souza BMN, Pinto JG, Pereira AHC, Miñán AG, Ferreira-Strixino J. Efficiency of antimicrobial photodynamic therapy with Photodithazine® on MSSA and MRSA strains. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10(7): 869.
43. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling.* 2013; 29(9): 1057-67.
44. Alves F, de Oliveira Mima EG, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(4): 815-826.
45. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(7): 1319-28.
46. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27: 124-31.

47. Alves F, Carmello JC, Mima EGO, Costa CAS, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Med Mycol.* 2019; 57(5): 609-17.
48. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, Costa CAS, Mima EGO et al. Antimicrobial photodynamic therapy in combination with nystatin in the treatment of experimental oral candidiasis induced by *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019; 12(3): pii: E140.
49. Fontana LC, Pinto JG, Magalhães JA, et al. Comparison of the photodynamic effect of two chlorins, photodithazine and fotoenticine, in gliosarcoma cells. *Photochem.* 2022; 2(1): 165-80.
50. Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2013; 8(1):108–20.
51. Viana de Sousa T, Carolina Jordão C, Augusto Abreu-Pereira C, Pereira ALG, Barbugli PA, Klein MI, et al. Hydrogen peroxide enhances the efficacy of photodynamic therapy against *Candida albicans* biofilms. *Biofouling.* 2023; 39(1): 94-109.
52. Abreu-Pereira CA, Klein MI, Lobo CIV, Gorayb Pereira AL, Jordão CC, Pavarina AC. DNase enhances photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *Oral Dis.* 2023; 29(4): 1855-67.
53. Deepika, Singh A, Chaudhari AK, Das S, Dubey NK. *Zingiber zerumbet* L. essential oil-based chitosan nanoemulsion as an efficient green preservative against fungi and aflatoxin B<sub>1</sub>contamination. *J Food Sci.* 2021; 86(1): 149-60.
54. Grivennikova VG, Kozlovsky VS, Vinogradov AD. Respiratory complex II: ROS production and the kinetics of ubiquinone reduction. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017; 1858(2): 109-17.
55. Shin DS, Eom YB. Zerumbone inhibits *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth. *Can J Microbiol.* 2019; 65(10): 713-21.
56. Ibáñez MD, Sánchez-Ballester NM, Blázquez MA. Healthy Zerumbone: From natural sources to strategies to improve its bioavailability and oral administration. *Plants (Basel).* 2022; 12(1): 5.
57. Akhtar NMY, Jantan I, Arshad L, Haque MA. Standardized ethanol extract, essential oil and zerumbone of *Zingiber zerumbet* rhizome suppress phagocytic activity of human neutrophils. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19(1): 331.

58. Dev, S. Studies in sesquiterpenes—XVI: Zerumbone, a monocyclic sesquiterpene ketone. *Tetrahedron*. 1960; 8(3): 171-80.
59. Dorman, DE, & Roberts, JD. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of some pentose and hexose aldopyranoses. *J. Am. Chem. Soc.* 1970; 92(5): 1355-61.
60. Kitayama T, Okamoto T, Hill RK, Kawai Y, Takahashi S, Yonemori, et al. Chemistry of zerumbone. 1. simplified isolation, conjugate addition reactions, and a unique ring contracting transannular reaction of its dibromide. *J Org Chem*. 1999; 64(8): 2667-72.
61. Bachi A, Dalle-Donne I, Scaloni A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chem Rev*. 2013; 113(1): 596-698.
62. Jalili-Nik M, Sadeghi MM, Mohtashami E, Mollazadeh H, Afshari AR, Sahebkar A. Zerumbone promotes cytotoxicity in human malignant glioblastoma cells through reactive oxygen species (ROS) Generation. *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020: 3237983.
63. Girisa S, Shabnam B, Monisha J, et al. Potential of Zerumbone as an anti-cancer agent. *Molecules*. 2019; 24(4): 734.
64. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griending KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ Res*. 2018; 122(6): 877-902.
65. Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H. Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(1): 205-18.
66. Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022; 23(7): 499-515.
67. Moreira da Silva T, Pinheiro CD, Puccinelli Orlandi P, Pinheiro CC, Soares Pontes G. Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) smith: a potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):301.
68. Memari F, Mirzavi F, Jalili-Nik M, Afshari AR, Ghorbani A, Soukhtanloo M. Tumor-Inhibitory effects of zerumbone against HT-29 human colorectal cancer cells. *Int J Toxicol*. 2022; 41(5): 402-11.

69. Jyothilakshmi M, Jyothis M, Narayanan GN, Latha MS. Antidermatophytic and Protease-inhibiting Activities of Zerumbone: a natural sesquiterpene from the rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex J.E; Smith. *Pharmacogn Mag.* 2017; 13(49): 2-6.
70. Solarte DLG, Rau SJ, Hellwig E, Vach K, Al-Ahmad A. Antimicrobial behavior and cytotoxicity of indocyanine green in combination with visible light and water-filtered infrared a radiation against periodontal bacteria and subgingival biofilm. *Biomedicines.* 2022; 10(5): 956.
71. Juarez-Moreno K, Chávez-García D, Hirata G, Vazquez-Duhalt R. Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles. *Toxicol In Vitro.* 2022; 85: 105461.
72. Malhão F, Ramos AA, Macedo AC, Rocha E. Cytotoxicity of seaweed compounds, alone or combined to reference drugs, against breast cell lines cultured in 2D and 3D. *Toxics.* 2021; 9(2): 24.
73. Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol.* 2006; 122(3): 372-81.
74. Shin DS, Eom YB. Efficacy of zerumbone against dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog.* 2019; 137: 103768.
75. Haneef J, Shaharyar M, Husain A, et al. Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants. *Drug Test Anal.* 2013; 5(8) :607-13.
76. Solimini R, Busardò FP, Rotolo MC, et al. Hepatotoxicity associated to synthetic cannabinoids use. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017; 21(1): 1-6.
77. Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, Korach KS. essential oils and health. *Yale J Biol Med.* 2020; 93(2): 291-305.
78. Alves DDN, Ferreira AR, Duarte ABS, Melo AKV, de Sousa DP, de Castro RD. Breakpoints for the classification of anti-*candida* compounds in antifungal screening. *Biomed Res Int.* 2021; 2021: 6653311.
79. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004; 35: 275-80.

80. Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol.* 2008; 115(1): 140-6.
81. Lee JH, Kim YG, Choi P, Ham J, Park JG, Lee J. Antibiofilm and antivirulence activities of 6-gingerol and 6-shogaol against *Candida albicans* due to hyphal inhibition. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 299.
82. Orsi CF, Borghi E, Colombari B, Neglia RG, Quaglino D, Ardizzoni A, et al. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (HWP1) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. *Microb Pathog.* 2014; 69(70): 20-7.
83. Gorayb Pereira AL, Augusto Abreu Pereira C, Dias LM, Jorge JH, Pavarina AC. Zerumbone disrupts mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* on acrylic resin. *Biofouling.* 2025; 41(1): 52-67.
84. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11: 119.
85. Albaayit SFA, Maharjan R, Abdullah R, Noor MM. Evaluation of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* property of zerumbone. *J Appl Biomed.* 2022; 20(1): 22-36.
86. Carmello JC, Alves F, Mima EGO, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species using Photodythazine®. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 17: 194-9.
87. Ferreira J, Menezes PF, Kurachi C, et al. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Phys.Lett.* 2008; 5(2): 156-61.
88. Pereira de Lima Carvalho D, Guerra Pinto J, Di Paula Costa Sorge, C, et al. Study of photodynamic therapy in the control of isolated microorganisms from infected wounds—an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(1): 113-20.
89. Da Silva GR, Pereira AHC, Pinto JG, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. Internalization of the PDZ and its photodynamic effect on the growth of ATCC and clinical strains of *E. coli* and *S. aureus*. *Laser Phys.* 2016; 26(9): 095603.
90. Vilela SFG, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AOC. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

- biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. Arch.Oral Biol. 2012; 57(6): 704-10.
91. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, Wilson M. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. BMC microbiology. 2009; 9(1): 1-8.
  92. Cattò C, de Vincenti L, Borgonovo G, et al. Sub-lethal concentrations of *Perilla frutescens* essential oils affect phytopathogenic fungal biofilms. J Environ Manage. 2019; 245: 264-72.
  93. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EGO. Fungistatic action of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal agents. Microorganisms. 2020; 8(7): 980.
  94. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. J Appl Microbiol. 2021; 131(1): 11-22.
  95. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. Proc Natl Acad Sci USA. 2015; 112(13): 4092-7.
  96. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(2): 510-20.
  97. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. PLoS Pathog. 2012; 8(8): e1002848.
  98. Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, Reinicke EL, Sanchez H, Andes DR. Role of matrix  $\beta$ -1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans* *Candida* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(4):1918-20.
  99. Xie Z, Thompson A, Sobue T, Kashleva H, Xu H, Vasilakos J, et al. *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. J Infect Dis. 2012; 206(12): 1936-45.
  100. Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, et al. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. BMC Microbiol. 2014; 14: 303.
  101. Witchley JN, Basso P, Brimacombe CA, Abon NV, Noble SM. Recording of DNA-binding events reveals the importance of a repurposed *Candida albicans* regulatory network for gut commensalism. Cell Host Microbe. 2021; 29(6): 1002-13.e9.

102. Nett JE, Andes DR. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6(1): 21.
103. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*. 2007; 189(22): 7945-7.
104. Heredia MY, Andes D. Production and isolation of the *Candida species* biofilm extracellular matrix. *Methods Mol Biol*. 2022; 2542: 257-68.
105. Alves F, Carmello JC, Alonso GC, Mima EGO, Bagnato VS, Pavarina AC. A randomized clinical trial evaluating Photodithazine-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy as a treatment for denture stomatitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 32: 102041.
106. Zhou G, Loppnow H, Groth T. A macrophage/fibroblast co-culture system using a cell migration chamber to study inflammatory effects of biomaterials. *Acta Biomater*. 2015; 26(1): 54-63.
107. Mountcastle SE, Cox SC, Sammons RL, Jabbari S, Shelton RM, Kuehne SA. A review of co-culture models to study the oral microenvironment and disease. *J Oral Microbiol*. 2020; 12(1): 1773122.
108. Pimentel BNADS, Marin-Dett FH, Assis M, Barbugli PA, Longo E, Vergani CE. Antifungal activity and biocompatibility of  $\alpha$ -AgVO<sub>3</sub>,  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, and  $\beta$ -Ag<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> using a three-dimensional coculture model of the oral mucosa. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022; 10(1): 826123.
109. De Carvalho Dias K, de Sousa DL, Barbugli PA, Cerri PS, Salih VM, Vergani CE. Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. *J Microbiol Methods*. 2018; 152(1): 52-60.
110. Richardson JP, Moyes DL, Ho J, Naglik JR. *Candida* innate immunity at the mucosa. *Semin Cell Dev Biol*. 2019; 89(1): 58-70.
111. Nishikawa Y, Tomotake Y, Kawano H, Naruishi K, Kido JI, Hiroshima Y, Yumoto H. Effects of candidalysin derived from *Candida albicans* on the expression of pro-inflammatory mediators in human gingival fibroblasts. *Int J Mol Sci*.
112. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(1): 885-91.

113. Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Tedesco AC. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J J Photochem Photobiol B*. 2010; 101(3): 348-54.
114. Da Cruz Andrade PV, Euzebio Alves VT, de Carvalho VF, De Franco Rodrigues M, Pannuti CM, Holzhausen M, Conde MC. Photodynamic therapy decrease immune-inflammatory mediators levels during periodontal maintenance. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(1): 9-17.
115. Michel MC, Staskin D. Study designs for evaluation of combination treatment: focus on individual patient benefit. *Biomedicines*. 2022; 10(2): 270.
116. Dos Santos Vitorio G, de Almeida RMS, Pinto JG, Fontana LC, Ferreira-Strixino J. Analysis of the effects of Photodynamic therapy with Photodithazine on the treatment of 9l/lacZ cells, in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021; 34(1): 102233.
117. Tan LKS, How CW, Low LE, Ong BH, Loh JS, Lim SY, Foo JB. Magnetic-guided targeted delivery of zerumbone/SPION co-loaded in nanostructured lipid carrier into breast cancer cells. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2023; 87(1): 104830.
118. De Freitas LM, Lorenzón EN, Santos-Filho NA, Zago LHDP, Uliana MP, De Oliveira KT, Fontana CR. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 4212.
119. Kim HR, Rhee KJ, Eom YB. Anti-biofilm and antimicrobial effects of zerumbone against *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe*. 2019; 57: 99-106.
120. Kim HR, Shin DS, Jang HI, Eom YB. Anti-biofilm and anti-virulence effects of zerumbone against *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology (Reading)*. 2020; 166(8): 717-26.