

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/02/2026.



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



Ana Luíza Gorayb Pereira

**O efeito de Zerumbona sobre biofilme multiespécies formado sobre resina
acrílica**

Araraquara

2024



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



Ana Luíza Gorayb Pereira

**O efeito de Zerumbona sobre biofilme multiespécies formado sobre resina
acrílica**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral.

Orientadora: Ana Cláudia Pavarina
Coorientadora: Maria del Pilar Taboada

Araraquara

2024

P436e

Pereira, Ana Luíza Gorayb

O efeito de Zerumbona sobre biofilme multiespécies formado sobre resina acrílica / Ana Luíza Gorayb Pereira. -- Araraquara, 2024

88 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Cláudia Pavarina

Coorientadora: Maria del Pilar Taboada

1. Biofilmes. 2. Matriz Extracelular de Substâncias Poliméricas. 3. Fitoterapia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Luíza Gorayb Pereira

**O efeito de Zerumbona sobre biofilme multiespécies formado sobre resina
acrílica**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Prof^a. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador Prof^a. Dra. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador Prof^a. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda

Araraquara, 28 de fevereiro de 2024.

DADOS CURRICULARES

Ana Luíza Gorayb Pereira

NASCIMENTO: 22/01/1998 – Votuporanga – São Paulo.

FILIAÇÃO: Luis Henrique Modé Pereira

Gláucia Mara Gorayb Pereira

2016 – 2021 – Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2018 – 2019 – Iniciação Científica desenvolvida no Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, sendo bolsista PIBIC no projeto intitulado “Influência da fibrina rica em plaquetas e leucócitos na formação óssea após cirurgia de levantamento do assoalho do seio maxilar com osso bovino desproteínizado”.

2019 – 2020 – Iniciação Científica desenvolvida no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, sendo bolsista PIBIC no projeto intitulado “Efeito de dose sub-letal de Terapia Fotodinâmica sobre a susceptibilidade de *Candida albicans* à antifúngico”.

2020 – 2021 – Iniciação Científica desenvolvida no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, sendo bolsista PIBIC no projeto intitulado “Efeito do Zerumbona sobre a matriz extracelular de biofilmes de *Candida albicans*”.

2022 – Pós-graduação em Reabilitação Oral em andamento, nível mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedico este trabalho ao meu avô Laert, um professor que fez história em Votuporanga e meu grande inspirador. Ao meu avô Nasser, que se foi recentemente, mas que sempre esteve ao meu lado, me inspirou e me ensinou sobre postura, posicionamento e oratória. Às minhas avós Maria Helena e Tereza, professoras também, que me ensinaram a ler, escrever e a amar essa profissão. À minha mãe, Gláucia, que também já esteve à frente de uma sala de aula e quem mais me ensina sobre a vida. E ao meu pai, que apesar de não seguir a profissão, sempre amou aprender, me ver aprender e compartilhar conhecimentos, não somente sobre assuntos importantes, mas sobre a vida. Enfim, dedico este trabalho a todos e todas professores e professoras que passaram por minha vida e que, de alguma maneira, me fizeram querer chegar até aqui. No fim percebo que sempre estive rodeada de professores, e que se não foi o destino, foi a paixão que me fez escolher os caminhos que trilharam uma história em que hoje me torno um pouco mais professora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a cima de tudo, por minha vida e minha história. Agradeço pelo direcionamento, os aprendizados, as oportunidades e por todos os detalhes. *“Entregue ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão estabelecidos.”* (Provérbio 16:3).

Aos meus amados pais, Luis Henrique e Gláucia, que me permitem seguir meus sonhos e me ajudam a alçar meus voos. Sem o apoio e os ensinamentos de vocês nada disso seria possível. Obrigada por confiarem em mim e me incentivarem a ir sempre a diante. Vocês me deram força para seguir minha jornada. Todas as minhas conquistas e vitórias também são vossas.

À minha querida orientadora Ana Cláudia, por acreditar em meu potencial e compartilhar comigo tantos ensinamentos. Agradeço pelo carinho, atenção e seriedade na orientação. A admiro muito e me inspiro em seus passos para trilhar minha jornada. Sou muito grata pela oportunidade de aprender com você.

À toda minha família, avós, tios, tias, primos e primas, por serem a base e o apoio para a vida. Agradeço por acreditarem e incentivarem meu sucesso profissional. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para que eu estivesse aqui.

Às minhas avós Maria Helena e Tereza, por me ensinarem desde criança que o conhecimento é uma dádiva.

Ao meu namorado Lucas, minha grande companhia da vida. Você torna os dias mais felizes e as dificuldades mais simples. Apesar da distância, esteve presente em todos os momentos e compartilhou comigo todos os anseios, medos e dificuldades. Me motivou nos momentos difíceis e vibrou comigo cada pequena vitória. Obrigada por todo amor.

Aos meus amigos e amigas de pós-graduação, que compartilharam comigo as dificuldades da vida acadêmica e que não hesitaram em oferecer apoio nos momentos difíceis. Juntos somos mais fortes.

Aos meus amigos e amigas de Araraquara, que estiveram presente nos mais diversos momentos e que tornaram a caminhada mais leve.

Aos meus amigos e amigas que vivem longe, e que, apesar da distância, estiveram presentes nessa caminhada sendo um grande apoio.

Ao meu grande amigo César, que me ensinou muito do que sei sobre a vida acadêmica e que compartilhou comigo, não só ensinamentos, mas também grandes momentos de felicidade e aflições. Ter sua ajuda em cada detalhe foi essencial para que eu cumprisse meus objetivos e desenvolvesse esse trabalho. Sou muito grata por nossos caminhos terem se cruzado. “Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos” (Sócrates).

À banca avaliadora de minha defesa de Mestrado, Professora Livia Nordi Dovigo e Professora Nara Hellen Campanha, professoras brilhantes e inspirações para minha vida profissional. Agradeço por todas as contribuições e por compartilharem seus ensinamentos nesse momento da minha formação.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara, e a todos os professores externos à casa, que, de alguma forma, fizeram parte da minha história, e que contribuíram para minha formação e para o amor que sinto pela vida acadêmica.

Aos professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, que estão presentes no dia a dia e que não hesitam em compartilhar conhecimentos. Vocês contribuem de forma substancial para a minha formação profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, que contribuem para o bom funcionamento da Instituição e que fazem parte do dia a dia. Trabalhar com pessoas tão boas torna a jornada mais prazerosa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, minha casa desde 2016. Admiro muito esta instituição que promove tanto conhecimento e permite que pesquisas tão necessárias sejam realizadas com condições adequadas. Os profissionais que aqui se formam levam consigo toda a grandeza que a Instituição carrega, e fazer parte desta casa é uma grande honra.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

*“Ah, se o mundo inteiro me pudesse ouvir
Tenho muito pra contar, dizer que aprendi
E, na vida, a gente tem que entender
Que um nasce pra sofrer enquanto o outro ri*

*Mas quem sofre sempre tem que procurar
Pelo menos vir a achar razão para viver
Ver na vida algum motivo pra sonhar
Ter um sonho todo azul, azul da cor do mar”*

Tim Maia*

* Maia T. Azul da cor do mar. *In*: Tim Maia. Romântico [CD]. Rio de Janeiro: Polygram/Philips; 1993.
Faixa 10

Pereira ALG O efeito de Zerumbona sobre biofilme multiespécies formado sobre resina acrílica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

A cavidade oral é colonizada por fungos e bactérias que formam biofilmes polimicrobianos. Existe uma relação simbiótica entre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* que permite a formação de biofilmes mais robustos, tanto *in vitro* como *in vivo*. O uso de substâncias naturais para o controle de biofilmes é promissor, diante da resistência antimicrobiana a fármacos convencionais. O Zerumbona (ZER) demonstrou potencial na redução de componentes de biofilmes simples de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da ZER (256 e 512 ug/mL) no desenvolvimento e na erradicação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre discos de resina acrílica. A eficácia do tratamento foi avaliada por meio da contagem de colônias viáveis e análise dos componentes do biofilme [proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e solúveis em álcali (ASP), peso total e peso seco insolúvel, DNA extracelular (eDNA)]. Discos de resina acrílica termicamente ativada foram fabricados e padronizados com rugosidade entre 2,7 e 3,7 μm (n=120). Para avaliar a eficácia da ZER na inibição da adesão e formação do biofilme, os discos foram imersos por 8 h nas soluções de ZER e, posteriormente, foi formado o biofilme de 48 h (n=60). Para avaliar a eficácia do ZER na erradicação do biofilme, os discos com biofilmes de 48 h, foram imersos por 20 min na solução (n=60). Como controle foram utilizadas as soluções de Clorexidina (CLX) e Nistatina (NYS). Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo teste ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey (dados homoscedásticos) e pós-teste de Games-Howell (heterocedásticos) ($\alpha=0,05$). Os resultados comprovam a eficácia de ZER na redução de colônias viáveis de *C. albicans* e dos componentes do biofilme, em ambas condições avaliadas (ensaio de inibição de adesão e formação de biofilme e ensaio de erradicação dos biofilmes maduros). Os biofilmes formados sobre superfície previamente tratada com ZER 512 ug/mL apresentaram redução na viabilidade celular de *C. albicans* (5,07 $\log_{10}$) ($p<0,001$), mas o mesmo não pôde ser observado sobre *S. mutans* ($p=1,000$). Os biofilmes formados sobre a superfície tratada com ZER 512 ug/mL apresentaram redução nas proteínas insolúveis (37%) ($p<0,001$), WSP (13,75%) ($p<0,001$), ASP (46,96%) ($p<0,001$) e eDNA (11,47%) ($p\leq 0,008$). A viabilidade celular dos biofilmes maduros tratados com ZER 512 ug/mL também foi reduzida para *C. albicans* (1,49 $\log_{10}$) ($p\leq 0,001$), mas não foi possível observar atividade sobre *S. mutans* ($p=1,000$). Os componentes do biofilme foram consideravelmente reduzidos após o tratamento com ZER 512 ug/mL, com destaque para proteínas solúveis (20,35%) ($p\leq 0,001$), WSP (20,49%) ($p<0,001$), ASP (51,11%) ($p<0,001$) e eDNA (33,38%) ($p<0,001$). ZER reduziu a viabilidade celular de *C. albicans* em biofilmes mistos, bem como a biomassa e os componentes do biofilme, com destaque para proteínas (solúveis e insolúveis), polissacarídeos (ASP e WSP) e eDNA.

Palavras – chave: Biofilmes. Matriz Extracelular de Substâncias Poliméricas. Fitoterapia.

Pereira ALG. The effect of Zerumbone on multispecies biofilm formed on acrylic resin [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

The oral cavity is colonized by fungi and bacteria that form polymicrobial biofilms. There is a symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* that allows the formation of more robust biofilms, both in vitro and in vivo. The use of natural substances to control biofilms is promising, given antimicrobial resistance to conventional drugs. Zerumbone (ZER) demonstrated potential in reducing simple biofilm components of *C. albicans* susceptible and resistant to fluconazole. The present study aimed to evaluate the influence of ZER (256 and 512 µg/mL) on the development and eradication of mixed biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* formed on acrylic resin discs. Treatment efficacy was assessed by counting viable colonies and analyzing biofilm components [soluble and insoluble proteins, water-soluble (WSP) and alkali-soluble (ASP) polysaccharides, total weight and insoluble dry weight, extracellular DNA (eDNA)]. Thermally activated acrylic resin discs were manufactured and standardized with roughness between 2.7 and 3.7 µm (n=120). To evaluate the effectiveness of ZER in preventing biofilm formation, the discs were immersed for 8 h in ZER solutions and, subsequently, biofilm was formed for 48 h (n=60). Data presented a normal distribution and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test (homoscedastic data) and Games-Howell post hoc test (heteroscedastic data) ($\alpha=0.05$). The results confirm the efficacy of ZER in reducing viable colonies of *C. albicans* and biofilm components under both evaluated conditions (adhesion inhibition and biofilm formation assay and mature biofilm eradication assay). Biofilms formed on surfaces pre-treated with ZER 512 µg/mL showed a reduction in the cellular viability of *C. albicans* (5.07 log₁₀) ($p<0.001$), but this was not observed for *S. mutans* ($p=1.000$). Biofilms formed on surfaces treated with ZER 512 µg/mL exhibited a reduction in insoluble proteins (37%) ($p<0.001$), WSP (13.75%) ($p<0.001$), ASP (46.96%) ($p<0.001$), and eDNA (11.47%) ($p\leq 0.008$). The cellular viability of mature biofilms treated with ZER 512 µg/mL was also reduced for *C. albicans* (1.49 log₁₀) ($p\leq 0.001$), but no activity was observed for *S. mutans* ($p=1.000$). Biofilm components were significantly reduced after treatment with ZER 512 µg/mL, notably soluble proteins (20.35%) ($p\leq 0.001$), WSP (20.49%) ($p<0.001$), ASP (51.11%) ($p<0.001$), and eDNA (33.38%) ($p<0.001$). ZER reduced the cellular viability of *C. albicans* in mixed biofilms, as well as the biomass and biofilm components, especially proteins (soluble and insoluble), polysaccharides (ASP and WSP), and eDNA.

Keywords: Biofilms. Extracellular Polymeric Substance Matrix. Phytotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Biofilmes	14
3.2 Antimicrobianos Convencionais	22
3.3 Terapias Alternativas para a Inativação de Microrganismos e /ou Biofilmes	24
3.4 Uso de Compostos Naturais Medicinais para a Inativação de Microrganismos e /ou Biofilmes	25
4 MATERIAL E MÉTODO.....	34
4.1 Material	34
4.1.1 Materiais de consumo.....	34
4.1.2 Instrumentais	36
4.1.3 Equipamentos.....	36
4.2 Método.....	37
4.2.1 Confecção e padronização dos corpos de prova de resina acrílica	40
4.2.2 Preparo das soluções de tratamento	41
4.2.3 Cultivo dos microrganismos	42
4.2.4 Tratamento dos biofilmes.....	42
4.2.4.1 Efeito do ZER na inibição da adesão e formação de biofilmes mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	42
4.2.4.1 Efeito do ZER na erradicação de biofilmes maduros formados sobre os discos de resina	45
4.2.5 Avaliação da eficácia do tratamento.....	45
4.2.5.1 Avaliação viabilidade celular dos microrganismos e dos componentes do biofilme	46
4.2.5.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	46

4.2.5.3	Análise do peso seco total	49
4.2.5.4	Quantificação de proteínas Solúveis	49
4.2.5.5	Quantificação de proteínas Insolúveis	50
4.2.5.6	Análise dos polissacarídeos solúveis em água (WSP)	50
4.2.5.7	Análise do peso seco insolúvel e dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)	51
4.2.5.7.1	Peso seco insolúvel	51
4.2.5.7.2	Polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)	52
4.2.5.8	Análise do DNA extracelular (eDNA)	53
4.2.6	Análises estatísticas	54
5	RESULTADO	55
5.1	Porcentagem de Redução	55
5.1.1	Viabilidade celular	55
5.1.2	Componentes do biofilme	56
5.2	Inibição da Adesão e Formação de Biofilme	57
5.2.1	Viabilidade celular dos microrganismos	57
5.2.2	Componentes do biofilme	58
5.3	Inativação de Biofilmes Maduros	63
5.3.1	Viabilidade celular dos microrganismos	63
5.3.2	Componentes do biofilme	64
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral possui uma microbiota complexa e diversificada, composta por fungos, bactérias, vírus e protozoários¹. Estes microrganismos coexistem em equilíbrio em estruturas organizadas denominadas biofilmes. Nos biofilmes, os microrganismos permanecem englobados por uma matriz polimérica extracelular que contribui para a sua preservação e para manutenção das interações entre as células, a superfície e o meio ambiente^{2,3}. A coexistência dos microrganismos neste microambiente tem grande repercussão clínica, visto que estão relacionados a diversas infecções microbianas, principalmente àquelas associadas a dispositivos médicos, como cateteres e próteses. Além disso, os biofilmes têm implicação direta na redução da ação e eficácia dos fármacos utilizados em tratamentos antimicrobianos convencionais^{4,5}.

Candida albicans é uma espécie fúngica que mantém uma relação comensal com o hospedeiro, de modo que fatores locais, sistêmicos e ambientais podem promover alterações na homeostase que permitem que estes microrganismos se tornem patogênicos oportunistas, principalmente em pacientes imunossuprimidos, desencadeando infecções^{6,7}. Os fatores de virulência de *C. albicans* estão associados à sua transição morfológica entre levedura, pseudo-hifas e hifas e, principalmente, à capacidade de formação de biofilmes e à resistência às defesas do hospedeiro e a fármacos convencionais⁷. A presença de *C. albicans* em biofilmes mistos aumenta a expressão de genes associados à sua alteração morfológica o que reflete no aumento da virulência⁸.

Streptococcus mutans é uma bactéria anaeróbica, facultativa, Gram-positiva, com propriedades acidogênicas e acidúricas, considerado o principal microrganismo associado à doença cárie⁹. Devido à sua capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares, *S. mutans* é um grande contribuinte para a formação de biofilmes patogênicos e apresenta alta prevalência no biofilme dental¹⁰.

Ao compreender a ampla variedade de espécies que colonizam a cavidade bucal, a presença de biofilmes multiespécies é uma realidade a ser abordada. As interações entre as espécies que ocorrem neste ambiente podem ser sinérgicas, ou seja, de benefício mútuo, de maneira que a presença de um determinado microrganismo pode potencializar a adesão e retenção de outros¹¹. A relação simbiótica entre *S. mutans* e *C. albicans* permite a formação de biofilmes mais

robustos e com alto nível de virulência, tanto *in vitro* como *in vivo*, de maneira que as infecções causadas por estas espécies, quando estão associadas, podem se tornar mais graves¹². Além disso, na presença de sacarose, ocorre a produção de glucanos pelas células bacterianas, o que promove maior adesão de colônias viáveis à microestrutura do biofilme, além de aumentar a adesão fúngica às superfícies bióticas e abióticas¹³. Espécies de *Candida* (principalmente *C. albicans*) têm sido observadas em maior quantidade na cavidade oral de crianças com cárie prevalente, em comparação a crianças livres de cárie, determinando a potencial atividade cariogênica do fungo e interação com *S. mutans*¹⁴.

A matriz extracelular dos biofilmes microbianos é composta principalmente por polissacarídeos e DNA extracelular, responsáveis pela manutenção da estrutura do biofilme^{15,16}. β -1,3-glucanos, presentes na matriz extracelular, desempenham papel fundamental para a resistência do biofilme aos antifúngicos convencionais, uma vez que são capazes de reduzir o efeito do fármaco sobre os patógenos, resultando na persistência ou progressão da infecção^{16,17}. Considerando os aspectos enumerados, o manejo clínico de infecções causadas por biofilmes tem se tornado cada vez mais difícil devido à susceptibilidade reduzida aos tratamentos convencionais, sendo assim, a necessidade de terapias medicamentosas alternativas se torna importante^{18,19}.

Neste contexto, as propriedades antimicrobianas dos agentes naturais podem ser consideradas como um recurso valioso^{20,21}. Estudos demonstram que substâncias naturais podem interferir na aderência de microrganismos nas superfícies dentais, bem como inibir o crescimento microbiano^{22,23}. Os óleos essenciais extraídos das plantas são reconhecidos por suas atividades analgésica, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, anticancerígena, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica²⁴. Em geral, as propriedades antimicrobianas das substâncias naturais estão relacionadas com suas interações com as células, podendo afetar a membrana celular de bactérias e fungos e torná-los mais permeáveis aos fármacos²⁵⁻²⁷.

Zerumbona (ZER) é um sesquiterpênico monocíclico isolado do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* Smith. Estudos demonstraram o potencial farmacológico variado que esta substância apresenta, como propriedades antineoplásicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antipiréticas, além de antibacterianas e antifúngicas²⁸⁻³³. ZER apresentou atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos presentes na cavidade oral, entre os quais *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacteroides fragilis*,

Acinetobacter baumannii, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*³⁴⁻³⁹. Além disso, ZER não apresentou efeitos citotóxicos substanciais às células de linhagens de mamíferos³⁸. Em um estudo prévio desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, ZER demonstrou seu potencial em atuar na redução de componentes importantes da matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol tratados com diferentes concentrações do composto³⁹.

Embora a ação antimicrobiana da ZER tenha sido estabelecida anteriormente em biofilmes simples de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol³⁹, a ação da substância em biofilmes multiespécies formado por *C. albicans* e *S. mutans* ainda não foi investigada. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do ZER sobre a formação e na erradicação de biofilmes mistos (*C. albicans* resistentes ao fluconazol (CaR) e *S. mutans*) formados sobre discos de resinas acrílicas. A eficácia dos tratamentos foi avaliada por meio da contagem das unidades formadoras de colônias e quantificação dos componentes do biofilme [proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e solúveis em álcali (ASP), peso total e peso seco insolúvel, DNA extracelular (eDNA)].

7 CONCLUSÃO

O ensaio de adesão e formação do biofilme demonstrou que a imersão de corpos de prova de resina acrílica em ZER (256 µg/mL e 512 µg/ mL) por 8h reduziu a contagem de unidades formadoras de colônias de + do biofilme misto. Além disso, foi observado redução nos componentes do biofilme ASP, WSP, eDNA, proteínas solúveis e insolúveis.

O tratamento dos biofilmes maduros de 48 h formados sobre os corpos de prova de resina acrílica com ZER (256 µg/mL e 512 µg/ mL) por 20 minutos promoveu redução na contagem de unidades formadoras de colônias de *C. albicans* do biofilme misto. Além disso, foi observado redução nos componentes do biofilme ASP, WSP, eDNA e proteínas solúveis.

Referências*

- 1- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1): 137-43.
- 2- Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008; 18(14): 1017-24.
- 3- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J Bacteriol.* 2007; 189(22): 7945–7.
- 4- Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(2): 255–67.
- 5- Andes DR, Nett JE. Analysis of *Candida* Antifungal Resistance Using Animal Infection Models. *Methods Mol Biol.* 2023; 2658: 225-38.
- 6- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(11): 685-702.
- 7- Talapko J, Juzbašić M, Matijević T. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi (Basel).* 2021; 7(2): 79.
- 8- Ellepola K, Truong T, Liu Y. Multi-omics Analyses Reveal Synergistic Carbohydrate Metabolism in *Streptococcus mutans*-*Candida albicans* Mixed-Species Biofilms. *Infect Immun.* 2019; 87(10): e00339-19.
- 9- de Sousa DL, Lima RA, Zanin IC, Klein MI, Janal MN, Duarte S. Effect of Twice-Daily Blue Light Treatment on Matrix-Rich Biofilm Development. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0131941
- 10- Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192(12): 3024-32.
- 11- Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLoS Pathog.* 2018; 14(1): e1006719.
- 12- Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH, Koo H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. *Infection and immunity.* 2014; 82(5): 1968–81.
- 13- Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, Ambatipudi KS, Rosalen PL, Bauserman R, Waugh RE, Koo H. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Applied and environmental microbiology.* 2011; 77(18): 6357–67.

* 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>

- 14- de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida spp.* in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006; 51(11): 1024-8.
- 15- Klein MI, Hwang G, Santos PH, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. Front Cell Infect Microbiol. 2015; 5(10).
- 16- Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. Trends Microbiol. 2020; 28(8): 668-81.
- 17- Tsai HF, Sammons LR, Zhang X. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(8): 3308-17.
- 18- Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. J Appl Microbiol. 2021; 131(1): 11-22.
- 19- 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): 257-265.
- 20- Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review. Curr Drug Metab. 2018; 19(13): 1100-10.
- 21- Morad HOJ, Wild AM, Wiehr S, et al. Pre-clinical Imaging of Invasive Candidiasis Using ImmunoPET/MR. Front Microbiol. 2018; 9: 1996.
- 22- Furiga A, Lonvaud-Funel A, Dorignac G, Badet C. In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. J Appl Microbiol. 2008; 105(5): 1470-6.
- 23- Machado AC, Oliveira RC. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). Rev bras plantas med. 2014; 16(2): 283–9.
- 24- Bona E, Cantamessa S, Pavan M. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents?. J Appl Microbiol. 2016; 121(6): 1530-45.
- 25- Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. Food Chem. 2017; 220: 1-8.
- 26- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. Food Control. 2015; 54: 111-9.
- 27- Khorshidian N, Yousefi M, Khanniri E, Mortazavian AM. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2018; 45: 62-72.
- 28- Abdul AB, Abdelwahab AS, Al-Zubairi AS, Elhassan MM, Murali SM. Anticancer and Antimicrobial Activities of Zerumbone from the Rhizomes of *Zingiber zerumbet*. Int J Pharmacol. 2008; 4: 301-304.

- 29- Sidahmed HM, Hashim NM, Abdulla MA, et al. Antisecretory, gastroprotective, antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activity of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. PLoS One. 2015; 10(3): e0121060.
- 30- Sulaiman MR, Tengku Mohamad TA, Shaik Mossadeq WM. Antinociceptive activity of the essential oil of *Zingiber zerumbet*. Planta Med. 2010; 76(2): 107-12.
- 31- Prakash RO Kumar RK Rabinarayan A Kumar MS. Pharmacognostical and phytochemical studies of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith rhizome. Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 2011; 2: 698-703
- 32- Kalantari K, Moniri M, Boroumand Moghaddam A. A Review of the Biomedical Applications of Zerumbone and the Techniques for Its Extraction from Ginger Rhizomes. Molecules. 2017; 22(10): 1645.
- 33- Shin DS, Eom YB. Zerumbone inhibits *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth. Can J Microbiol. 2019; 65(10): 713-21.
- 34- Liu WY, Tzeng TF, Liu IM. Healing potential of zerumbone ointment on experimental full-thickness excision cutaneous wounds in rat. J Tissue Viability. 2017; 26(3): 202-7.
- 35- Shin DS, Eom YB. Efficacy of zerumbone against dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog. 2019; 137: 103768.
- 36- Kim D, Liu Y, Benhamou RI, Sanchez H, Simón-Soro Á, Li Y, Hwang G, Fridman M, Andes DR, Koo H. Bacterial-derived exopolysaccharides enhance antifungal drug tolerance in a cross-kingdom oral biofilm. The ISME Jour. 2018; 12(6): 1427–42.
- 37- 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.
- 38- da Silva WJ, Gonçalves LM, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Exopolysaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. Braz Dent J. 2012; 23(6): 716-722.
- 39- Abreu-Pereira CA, Pereira ALG, Noveletto JVM, Jordão CC, Pavarina AC. Zerumbone disturbs the extracellular matrix of fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. J Fungi. 2023; 9(5), 576.
- 40- Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. Future Microbiol. 2013; 8(10): 1325-37.
- 41- Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. mBio. 2014; 5(4): e01333-14.
- 42- Nett JE, Andes DR. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. J Fungi (Basel). 2020; 6(1): 21.
- 43- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. J. Dente. Res. 2006; 85: 878-87.

- 44- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*. 2009; 14(7): 2535-54.
- 45- Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014; 78(3): 510-43.
- 46- Klein MI, Hwang G, Santos PH, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5(10).
- 47- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(9): 623-33.
- 48- Xiao J, Klein MI, Falsetta ML. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog*. 2012; 8(4): e1002623.
- 49- Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16(1): 19-31.
- 50- Khoury ZH, Vila T, Puthran TR. The Role of *Candida albicans* Secreted Polysaccharides in Augmenting *Streptococcus mutans* Adherence and Mixed Biofilm Formation: In vitro and in vivo Studies. *Front Microbiol*. 2020; 11: 307.
- 51- Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob agen and chemother*. 2004; 48(5): 1461–8.
- 52- Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz T, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014; 13: 41.
- 53- Xiao G, Chen Z, Lv X. Chlorhexidine-based body washing for colonization and infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*: an updated meta-analysis. *Infect Drug Resist*. 2018; 11: 1473-81.
- 54- Bassi RC, Boriollo MFG. Amphotericin B, fluconazole, and nystatin as development inhibitors of *Candida albicans* biofilms on a dental prosthesis reline material: Analytical models in vitro. *J Prosthet Dent*. 2022; 127(2): 320-30.
- 55- Alomeir N, Zeng Y, Fadaak A, Wu TT, Malmstrom H, Xiao J. Effect of Nystatin on *Candida albicans* - *Streptococcus mutans* duo-species biofilms. *Arch Oral Biol*. 2023; 145: 105582.
- 56- 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.
- 57- 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.

- 58- 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.
- 59- Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. Biofouling. 2013; 29(1): 87-96.
- 60- Solimini R, Busardò FP, Rotolo MC. Hepatotoxicity associated to synthetic cannabinoids use. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017; 21(1): 1-6.
- 61- Cattò C, de Vincenti L, Borgonovo G. Sub-lethal concentrations of *Perilla frutescens* essential oils affect phytopathogenic fungal biofilms. J Environ Manage. 2019; 245: 264-72.
- 62- 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.
- 63- Lobo CIV, Lopes ACUA, Klein MI. Compounds with Distinct Targets Present Diverse Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and Combinations of Compounds Potentiate Their Effect. J Fungi (Basel). 2021; 7(5): 340.
- 64- Choonharuandej S, Srithavaj T, Thummawanit S. Fungicidal and inhibitory efficacy of cinnamon and lemongrass essential oils on *Candida albicans* biofilm established on acrylic resin: An in vitro study. J Prosthet Dent. 2021; 125(4): 707.e1-707.e6.
- 65- Dos Santos DDL, Besegato JF, de Melo PBG, et al. Effect of curcumin-encapsulated Pluronic® F-127 over duo-species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Lasers Med Sci. 2022; 37(3): 1775-86.
- 66- Ribeiro SM, Bueno PCP, Cavalheiro AJ, Klein MI. Effect of Extracts, Fractions, and Isolated Molecules of *Casearia sylvestris* to Control *Streptococcus mutans* Cariogenic Biofilm. Antibiotics (Basel). 2023; 12(2): 329.
- 67- Girisa S, Shabnam B, Monisha J, et al. Potential of Zerumbone as an Anti-Cancer Agent. Molecules. 2019; 24(4): 734.
- 68- Woo HJ, Yang JY, Lee P, Kim JB, Kim SH. Zerumbone Inhibits *Helicobacter pylori* Urease Activity. Molecules. 2021 ;26(9): 2663.
- 69- Tojima M, Katanasaka Y, Sunagawa Y, Hasegawa K, Morimoto T. The Natural Product Zerumbone Suppresses Pressure Overload-Induced Cardiac Dysfunction by Inhibiting Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. Eur Cardiol. 2021; 16: e70.
- 70- 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.
- 71- Alsaffar RM, Ali A, Rashid SM, et al. Zerumbone Protects Rats from Collagen-Induced Arthritis by Inhibiting Oxidative Outbursts and Inflammatory Cytokine Levels. ACS Omega. 2023; 8(3): 2982-91.
- 72- Urla C, Stagno MJ, Fuchs J, Warmann SW, Schmid E. Anticancer bioactivity of zerumbone on pediatric rhabdomyosarcoma cells. J Cancer Res Clin Oncol. 2023; 149(7): 3313-23.

- 73- Tonon C, Francisconi CS, Huacho RM, Correia PMF, Bordini MF, Sardi EAO, Cássia J, Spolidorio PDM. Atividade antifúngica do a-terpinen sobre *Candida albicans*. Rev Estomat Hered. 2019; 29(2): 107-14.
- 74- Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. J Oral Microbiol. 2018; 10(1): 1476644.
- 75- Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a relined resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. J Prosthet Dent. 2014; 112(6): 1523-9.
- 76- Marin LM, Xiao Y, Cury JA, Siqueira WL. Modulation of *Streptococcus mutans* Adherence to Hydroxyapatite by Engineered Salivary Peptides. Microorganisms. 2022; 10(2): 223.
- 77- Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, et al. The Inoculation Method Could Impact the Outcome of Microbiological Experiments. Appl Environ Microbiol. 2018; 84(5): e02264-17.
- 78- Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. Nat Rev Microbiol. 2017;15(12):740-755.
- 79- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 7(72): 248-54.
- 80- Paramonova E, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. Microbiology (Reading). 2009; 155(6): 1997-2003.
- 81- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28(5): 350-6.
- 82- Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(19): 8113-8.
- 83- de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos Hde F. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. J Prosthodont. 2012; 21(1): 2-6.