



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



João Vinícius Menezes Noveletto

**Efeito do Zerumbona (*Zingiber zerumbet*) na inativação de biofilmes de
*Candida albicans***

Araraquara

2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



João Vinícius Menezes Noveletto

**Efeito do Zerumbona (*Zingiber zerumbet*) na inativação de biofilmes de
*Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

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

Araraquara

2023

N937e Noveletto, João Vinícius Menezes
Efeito do Zerumbona (Zingiber zerumbet) na inativação de
biofilmes de Candida albicans / João Vinícius Menezes
Noveletto. -- Araraquara, 2023
36 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia)
- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Odontologia, Araraquara
Orientadora: Ana Cláudia Pavarina

1. Candida albicans. 2. Biofilmes. 3. Matriz extracelular. 4.
Resistência a medicamentos. 5. Fluconazol. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

João Vinícius Menezes Noveletto

**Efeito do Zerumbona (*Zingiber zerumbet*) na inativação de biofilmes de
*Candida albicans***

Orientadora: Prof (a) Dr (a) Ana Cláudia Pavarina

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Janaina, meus mais sinceros agradecimentos, por sempre ser minha melhor amiga, mentora e exemplo de determinação, amor e sabedoria, e também por toda a confiança creditada em meu potencial, por sempre fazer seu melhor para que eu tivesse condições de me focar em meus estudos e em meu crescimento profissional.

Aos meus avós Sônia e José agradeço por todo o apoio e amor incondicional durante toda a vida, apoio qual em cada etapa foi essencial para que hoje eu pudesse estar realizando um sonho.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina por todo o acolhimento, orientação, conhecimento, preocupação e empenho para comigo, com este trabalho, sendo um grande exemplo profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Ms. César Augusto Abreu Pereira por todo o conhecimento e amizade que construímos, além de toda a paciência em ensinar com o máximo de sua dedicação.

Aos meus colegas de turma, que fizeram destes anos de graduação uma experiência mais enriquecedora e feliz, vou tê-los sempre comigo em minhas memórias.

Ao nosso diretor Edson Alves de Campos e a vice-diretora Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia por toda a dedicação em manter o bom andamento da instituição, por um empenho impar para com esta faculdade.

“O mistério da vida me causa a mais forte emoção. É o sentimento que suscita a beleza e a verdade, cria a arte e a ciência. Se alguém não conhece esta sensação ou não pode mais experimentar espanto ou surpresa, já é um morto-vivo e seus olhos se cegaram.”

Albert Einstein*

* Einstein A. Como vejo o mundo. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1981.

Noveletto JVM. Efeito do Zerumbona (*Zingiber zerumbet*) na inativação de biofilmes de *Candida albicans* [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Atualmente têm sido avaliadas novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas. As infecções fúngicas que acometem a cavidade bucal estão associadas aos biofilmes, que são estruturas complexas que se aderem a superfícies bióticas e abióticas e são envoltas por uma matriz extracelular (MEC). A MEC fornece proteção para os microrganismos contra os antifúngicos e sistema imunológico do hospedeiro e pode ocasionar o aumento da resistência das espécies e *Candida* aos antifúngicos. Neste contexto, a utilização de extratos vegetais representa uma alternativa viável devido aos fotoquímicos ativos presentes em sua composição. O composto Zerumbona (ZER), extraído da espécie *Zingiber zerumbet*, apresentou resultados promissores na inativação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, entretanto, não há informações sobre a ação do ZER sobre a MEC do biofilme de *Candida albicans*. Dessa forma, o presente estudo avaliou a eficácia da ZER na inativação de *C. albicans* resistente ao fluconazol (CaR) bem como seu efeito sobre a MEC dos biofilmes. Foram avaliados a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e a Curva de sobrevivência para determinação das concentrações e tempo de tratamento. Os biofilmes foram cultivados por 48 horas e, posteriormente, expostos ao ZER em concentrações de 128 e 256 µg/mL por um período de 5, 10 ou 20 minutos. O grupo controle não foi exposto ao ZER. A eficácia do tratamento foi avaliada por meio da viabilidade celular, da biomassa do biofilme (total e insolúvel), da quantificação dos componentes da MEC [polissacarídeos hidrossolúveis (WSP), polissacarídeos insolúveis (ASP), DNA extracelular (eDNA)] e de proteínas. O valor MIC foi de 64 µg/mL. A curva de sobrevivência e o valor de MFC foram coincidentes: 128 µg/mL. Foi observado a redução da viabilidade celular (36,99%), da biomassa insolúvel (13%), WSP (65%), ASP (10%), eDNA (23%) e das proteínas (18%). Portanto, podemos concluir que o ZER foi eficaz contra biofilmes de CaR, afetando tanto sua viabilidade celular, quanto os componentes da MEC do biofilme sendo uma alternativa promissora no tratamento de infecções fúngicas resistentes.

Palavras – chave: *Candida albicans*. Biofilmes. Matriz extracelular. Resistência a medicamentos. Fluconazol.

Noveletto JVM. Effect of Zerumbona (*Zingiber zerumbet*) on *Candida albicans* biofilm inactivation [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Currently, new therapeutic alternatives for the treatment of fungal infections have been researched. Fungal infections that affect the oral cavity are associated with biofilms, which are complex structures that adhere to biotic and abiotic surfaces and are surrounded by an extracellular matrix (ECM). The ECM provides protection for microorganisms against antifungals and the host's immune system and can lead to increased resistance of *Candida* spp. to antifungals. In this context, the use of plant extracts represents a viable alternative due to the active phytochemicals present in its composition. Zerumbona (ZER), extracted from the species *Zingiber zerumbet*, showed promising results in the inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria, however, there is no information about the action of ZER on the ECM of *Candida albicans* biofilm. Thus, the present study evaluated the effectiveness of ZER in the inactivation of fluconazole-resistant *Candida albicans* (CaR) as well as its effect on the ECM of biofilms. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicide Concentration (MFC) and the Survival Curve were evaluated to determine concentrations and treatment time. Biofilms were cultivated for 48 hours and subsequently exposed to ZER at concentrations of 128 and 256 µg/mL for 5, 10 and 20 minutes. The control group was cultured but not exposed to any substance. Treatment efficacy was evaluated by quantifying cell viability, biofilm biomass (total and insoluble), quantification of ECM components [water-soluble polysaccharides (WSP), insoluble polysaccharides (ASP), extracellular DNA (eDNA)] and of proteins. The MIC value was 64 µg/mL and the MFC was 128 µg/mL. A reduction in cell viability (36.99%), insoluble biomass (13%), WSP (65%), ASP (10%), eDNA (23%) and proteins (18%) was observed. Therefore, we can conclude that ZER was effective against CaR biofilms, affecting both its cell viability and the ECM components being a promising alternative in the treatment of resistant fungal infections.

Keywords: *Candida albicans*. Biofilms. . Extracellular matrix. . Drug resistance. Fluconazole.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
4 MATERIAL E MÉTODO.....	14
4.1 Preparo da Solução do ZER	14
4.2 Reativação e Inoculação dos Microrganismos.....	14
4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Mínima Concentração Fungicida (MCF) e Curva de Sobrevivência	14
4.4 Formação dos Biofilmes e Tratamento	15
4.5 Avaliação da Eficácia do ZER	16
4.5.1 Avaliação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) ...	17
4.5.2 Avaliação das proteínas	17
4.5.3 Avaliação do peso seco total.....	18
4.5.4 Avaliação dos polissacarídeos solúveis em água (WSP)	18
4.5.5 Avaliação dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)	19
4.5.5 Avaliação do eDNA.....	20
4.6 Análises Estatísticas.....	21
5 RESULTADOS.....	22
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade as infecções orais fúngicas são comuns, sendo a maioria causadas por microrganismos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans*¹ a espécie mais prevalente e patogênica. Esse fungo é dimórfico, apresenta caráter oportunista e está presente na cavidade bucal e em outros sítios do corpo humano em relação de comensalismo². Porém, *C. albicans* pode se tornar patogênica em decorrência de variações morfológicas e alterações no sistema imunológico do seu hospedeiro^{2,3}. O equilíbrio entre microrganismo e hospedeiro é altamente vulnerável a modificações na condição de saúde do indivíduo, como a imunossupressão causada por medicamentos ou infecções, o uso prolongado de antibióticos, problemas nutricionais e alterações de pH. Esses fatores predisõem a proliferação de *C. albicans* e a invasão dos tecidos do hospedeiro desencadeando a infecção.

C. albicans é um fungo que dispõe de diversos mecanismos adaptativos para aumentar a sua sobrevivência, que são conhecidos como fatores de virulência, tais como, a capacidade de alteração fenotípica e a adaptação às condições do ambiente em relação a fatores como a presença de nutrientes, o pH e a temperatura^{3,4}. É importante ressaltar que estas mudanças influenciam diretamente o comportamento do microrganismo, ocasionando variações na sua adesão às superfícies, susceptibilidade a fármacos e ao sistema imunológico do hospedeiro⁴. A infecção na cavidade bucal provocada por *C. albicans* tem etiologia multifatorial e é caracterizada por áreas inflamadas e lesões eritematosas puntiformes comumente associadas com a utilização de próteses removíveis^{5,6}.

O desenvolvimento de *C. albicans* está associado a formação do biofilme, que é definido como uma microestrutura composta por um aglomerado de células que se aderem sobre uma superfície, biótica ou abiótica^{7,8}. À medida que os microrganismos se proliferam sintetizam uma matriz rica em carboidratos, proteínas e DNA extracelular chamada de matriz polimérica extracelular (MEC). Essa matriz tem como funções a proteção e manutenção das interações celulares e também promovem a resistência a fármacos por dificultar a difusão dos mesmos em seu interior^{7,8}. A MEC é um importante fator para a compreensão dos mecanismos de resistência dos fármacos aos antifúngicos uma vez que altera a capacidade de difusão de substâncias externas

para o meio interno, diminuindo a ação de fármacos além de representar uma barreira física propriamente dita⁷⁻⁹.

O tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. albicans* tem como base a utilização de agentes antifúngicos, os quais podem ser de atividade local, como a nistatina e o miconazol, ou sistêmica, como o fluconazol^{10,11}, sendo este último amplamente utilizado¹². Os agentes antifúngicos têm sido a principal escolha para tratar de infecções fúngicas na cavidade oral, mas devido ao crescente aumento da resistência a estes fármacos é necessário avaliar alternativas viáveis, seguras e acessíveis para a inativação dos microrganismos e tratamento das infecções¹³. Neste contexto, os fitoterápicos têm se mostrado efetivos contra diversos microrganismos, apresentando baixa toxicidade, custo acessível e características antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas e antineoplásicas^{13,14}.

O Zerumbona (ZER) é o princípio ativo obtido a partir da extração do gengibre-amargo originário da região sudeste da Ásia¹⁵, e que apresenta diversas características de interesse científico, como potencial citotóxico para células cancerígenas, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana^{16,17}. Foi relatado que o ZER apresentou baixa toxicidade em estudos in vivo e in vitro, além de ter um importante e promissor efeito analgésico e anti-inflamatório quando testado em camundongos e ratos pela via oral e via intraperitoneal¹⁸. Em um estudo recente, foi observado que o ZER atuou efetivamente sobre formação de biofilme de *C. albicans* susceptível ao fluconazol impedindo a formação de hifas, e interferiu na formação do biofilme¹⁹.

Embora a ação antimicrobiana do ZER contra *C. albicans* suscetível tenha sido avaliada anteriormente¹⁹⁻²¹ neste momento não há informações sobre seu efeito nos componentes da matriz extracelular do biofilme. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ZER em biofilmes de *C. albicans* resistente a fluconazol. Além disso, avaliamos a influência do ZER nos componentes da matriz extracelular: proteínas, polissacarídeos e eDNA.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do ZER na inativação de biofilmes de *C. albicans* resistente a fluconazol por meio da avaliação dos seguintes parâmetros: viabilidade celular, biomassa do biofilme (total e insolúvel), quantificação dos componentes da MEC [polissacarídeos hidrossolúveis (WSP), polissacarídeos insolúveis (ASP), DNA extracelular (eDNA)] e quantificação de proteínas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os microrganismos do gênero *Candida spp* foram citados pela primeira vez em 1842, pelo microbiologista e físico húngaro David Gruby^{22,23}, o qual correlacionou a ocorrência de uma infecção fúngica aos patógenos, os quais ainda estão presentes em infecções oculares, dermatológicas, vaginais e principalmente na cavidade oral, sendo a espécie mais comum *C. albicans*²³. A mucosa oral é um ambiente altamente atrativo para a colonização de *C. albicans*, visto que tenha uma alta disponibilidade de nutrientes e uma condição térmica favorável ao seu desenvolvimento^{24,25}. *C. albicans* apresenta relação de comensalismo com o hospedeiro, entretanto, pode se tornar um patógeno oportunista quando ocorre algum tipo de alteração no sistema imunológico do hospedeiro^{23,25}. Como fatores predisponentes para a infecção podemos citar deficiências no sistema imunológico do hospedeiro ocasionadas pelo uso de antibióticos de amplo espectro e/ou corticoides, indivíduos transplantados, imunossuprimidos por medicações, condições sistêmicas comprometidas por enfermidades que afetem a resposta defensiva do organismo do hospedeiro²⁴⁻²⁶.

Simões et al.²⁶ no ano de 2013, por meio de uma revisão sistemática, descreveram de maneira organizada as diversas infecções orais causadas por *Candida spp*, se atentando a suas formas clínicas e tratamentos, classificando-as em candidoses orais primárias e secundárias, e apontou a candidose pseudomembranosa como a forma mais comum da patologia e com predileção a indivíduos imunocomprometidos ou em desenvolvimento do sistema imunológico^{27,28}.

A candidose oral primária se subdivide em quatro diferentes grupos, sendo eles as formas: aguda, crônica, lesões associadas à *Candida* e lesões queratinizadas com infecção por *Candida*^{27,28}, e dentro destas subdivisões encontramos as lesões propriamente ditas, como a candidose pseudomembranosa e a estomatite protética, que são as infecções mais comuns. Embora essas lesões sejam provenientes de um mesmo agente etiológico acabam por manifestar aspectos clínicos variados, sendo a candidose pseudomembranosa caracterizada por placas raspáveis de coloração variada entre branco e amarelo-esverdeado, localizadas comumente em mucosa jugal e palato, enquanto a estomatite protética é dividida em três diferentes graus de acordo com a intensidade de expressão dos sintomas, e é caracterizada por uma área eritematosa de coloração avermelhada que está presente na região do palato que é coberta pela prótese^{29,30}. A candidose oral secundária é uma manifestação crônica da

infecção de forma mucocutânea, que acomete couro cabeludo, pele e mucosa, e sua apresentação clínica é similar a candidose eritematosa crônica, porém é menos frequente²⁶.

A estomatite protética é comum em indivíduos da terceira idade que fazem uso de prótese total, cerca de 65% são acometidos pela infecção, e diversos fatores podem ser considerado predisponentes, como a higienização inadequada da prótese, a manutenção da prótese na boca durante o período de sono, a diminuição gradual do sistema imune devido ao envelhecimento e traumas ocasionados pela desadaptação que ocorre devido a reabsorção dos rebordos^{31,32}.

Emami et al.³³ (2014) conduziram um estudo de meta-análise acerca da eficácia da terapia antifúngica e de outros métodos alternativos para o tratamento, e, a partir da coleta de estudos, foi realizada a randomização onde comparavam o efeito de métodos variados de desinfecção, fármacos antifúngicos, comparando ao placebo. Os autores obtiveram resultado expressivo e positivo para a utilização de métodos alternativos de desinfecção e de antifúngicos sistêmicos sobre o placebo. Entre os produtos usados como meio alternativo de desinfecção estavam a clorexidina, enxaguantes bucais, desinfecção por micro-ondas, terapia fotodinâmica e fitoterápicos. Além disso, foi concluído que a associação entre métodos alternativos e a prescrição de antifúngicos pode ser efetivo contra a infecção fúngica. Porém, foi relatado que após quatorze dias da interrupção da medicação foi observada recidiva da infecção, e devido a toxicidade apresentada pelos fármacos é necessário refletirmos sobre novas alternativas e possibilidades³⁴.

É de consenso na literatura científica atual o surgimento de microrganismos resistentes aos fármacos convencionais empregados para o tratamento das infecções, e para que possamos vislumbrar novas alternativas terapêuticas é necessário que entendamos os mecanismos desenvolvidos na tolerância do biofilme bem como na resistência das células de *C. albicans*³⁴. Além dos fatores comuns de virulência destes organismos, nota-se que a matriz extracelular (MEC) formada a partir da secreção de substâncias pelas células fúngicas ou pela captação de restos provenientes da lise celular³⁵, fornece ao biofilme características que favorecem a sobrevivências das células. A MEC atua como um scaffold fornecendo resistência à remoção do biofilme e evita a difusão de fármacos e/ou substâncias para o interior do biofilme. Além disso, a MEC proporciona maior estabilidade para o aglomerado celular por meio da

preservação da estrutura interna e da manutenção das interações das células com o meio externo ³⁶.

Panariello et al.³⁷ (2017) realizaram um estudo buscando analisar e compreender os efeitos da administração de fluconazol, enzimas hidrolíticas e das alterações genéticas em biofilmes de *C. albicans*, e constatou que o fluconazol reduziu a biomassa e os níveis de polissacarídeos solúveis em água (WSP) em biofilmes de *C. albicans* resistente a fluconazol, porém não alterou significativamente os níveis de eDNA e de proteínas dos mesmos.

A fitoterapia é a ciência que estuda os ativos fitoquímicos das mais diversas plantas, visando um efeito farmacológico como opção terapêutica³⁸. Ao correlacionar a ideia de fármacos e fitoterapia devemos pensar sobre as formas farmacêuticas a serem utilizadas, que no caso são as sólidas por meio de grânulos, cápsulas e fórmulas em pó, onde após o processamento do material realizam a secagem, e a líquida, por meio de óleos essenciais e xaropes³⁹.

Na odontologia muitos estudos têm sido realizados buscando alternativas para tratamentos anti-inflamatórios, antifúngicos e cicatrizantes^{40,41}. Um composto vegetal que tem ganhado destaque devido a suas propriedades foi o Zerumbona (ZER), ativo extraído do *Zingiber zerumbet*, planta proveniente do sudeste asiático, e também encontrada na região norte do Brasil⁴². A planta é muito utilizada na culinária e medicina, e, a partir do extrato obtido do caule, foi possível observar ação analgésica^{43,44}, anti-inflamatória, antimicrobiana e até mesmo antitumoral^{43,45}. O ZER apresentou capacidade de inibir a síntese de mediadores químicos inflamatórios e também a ação da enzima ciclooxygenase, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central⁴⁶.

Em 2019, Shin et al.⁴⁷ publicaram um estudo sobre os efeitos do Zerumbona sobre infecções por *C. albicans* e o *S. aureus*, analisando o crescimento de biofilmes únicos e polimicrobianos. Os resultados demonstraram a eficácia da substância na inibição dos biofilmes avaliados utilizando as concentrações de 64 µg/mL para *S. aureus* e 128 µg/mL para *C. albicans*. Além disso, foi observada redução significativa na biomassa do biofilme após o tratamento com ZER⁴⁷.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir se encontram destacados os materiais utilizados no presente estudo, tanto quanto as etapas e procedimentos realizados.

4.1 Preparo da Solução do ZER

A solução de ZER foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA. Para a realização dos experimentos a solução do ZER, o qual estava em sua forma cristalizada, foi preparada dissolvendo o composto em dimetil sulfóxido à 1%, em concentrações correspondentes de 4 à 1024 µg/mL¹⁹.

4.2 Reativação e Inoculação dos Microrganismos

Para a realização dos experimentos, a cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 90028; ATCC-American Type Culture Collection - Rockville, MD, USA), que estava armazenada a -80°C foi reativada. Para isso, a cepa foi descongelada e semeada em placas de Petri que continham o meio de cultura Sabourand Dextrose Ágar associado a cloranfenicol 50 mg/L, e então foi feita a incubação da amostra em uma estufa aquecida à 37°C durante 48 horas.

Para a formação da cultura inicial e obtenção do pré-inóculo, 5 colônias foram transferidas para tubos que continham 5 mL de Yeast Nitrogen Base com 100 mM de glicose e incubadas novamente 37°C durante 16 horas. Em seguida, foi transferido 0,5 mL da solução resultante do pré-inóculo para tubos que continham 9,5 mL de YNB diluídos em uma proporção de 1:20. O inóculo foi incubado em uma temperatura de 37°C até atingir a fase de maior crescimento (*mid-log*). Então a densidade óptica da cultura foi avaliada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm: OD_{540nm}: 0,55 ± 0,08. O inóculo foi ajustado a 10⁷ UFC/mL por meio da centrifugação e lavagem das células em solução de PBS⁴⁸.

4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Mínima Concentração Fungicida (MCF) e Curva de Sobrevivência

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) do ZER teve como propósito determinar os parâmetros a serem

utilizados para avaliação dos biofilmes. As avaliações de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) foram realizadas usando o método de microdiluição do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A3; 2008)⁴⁸. Para determinação do MIC a solução de estoque foi diluída em uma solução de DMSO a 1% nas concentrações que variaram de 4 à 1024 µg/mL. Para controle de contaminação, foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 (2x concentrado) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 µL de PBS (sem células ou agentes antifúngicos). Para controle livre de drogas, foi utilizado o inóculo diluído em RPMI 2x concentrado [$0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL)].

Para o teste de MIC, o inóculo ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL) e as diferentes concentrações de ZER testadas (variando de 4 a 1024 µg/mL) foram incubadas em placas de 96 poços (Corning Co., Corning, NY, EUA) com suspensão de células ajustada para obter uma concentração de inóculo equivalente a $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL em RPMI. Após incubação a 37°C por 24h, as placas foram visualmente observadas (pela presença ou ausência de crescimento) (CLSI, 2009) e a densidade óptica medida (OD_{492nm}) em leitor de placas (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom®). Após a incubação, 100 µL foram utilizados para diluição e semeadura em placas Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Além disso, a semeadura em SDA foi realizada em duplicata para obter a Concentração Mínima de Fungicida (MFC) e a curva de sobrevivência em diferentes tempos. Para a curva de sobrevivência, as placas foram incubadas (5, 10, 20, 30 minutos e 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas) e as colônias contadas para enumeração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). A MFC foi verificada após 24 horas de tratamento do biofilme com ZER. O MIC foi baseado na densidade de crescimento, e foram consideradas as menores concentrações que promoveram uma redução de 50% no crescimento em comparação com o controle de crescimento livre de droga. A MFC foi considerada a concentração mínima que resultou na ausência de crescimento de colônias fúngicas em placas de ágar após 24 horas.

4.4 Formação dos Biofilmes e Tratamento

O biofilme foi formado em placa de 24 orifícios (K12-024; Kasvi, China). Para isso, 1 mL do inóculo foi adicionado separadamente aos orifícios da placa e, posteriormente, 1 mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640; Sigma-

Aldrich) tamponado com ácido propano sulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) foi acrescentado. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação orbital por 90 minutos (75 rpm) para propiciar a adesão do microrganismo. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 1 mL de solução de PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄; pH 7,4) para remover as células não aderidas e 1 mL de RPMI tamponado (pH=7) foi adicionado novamente em cada orifício. Então as placas foram incubadas sob agitação orbital (75 rpm) a 37°C por 24 horas. Após a incubação, o meio RPMI foi removido por aspiração e foi adicionado 1 mL de RPMI fresco, e as placas foram incubadas novamente sob agitação (37°C/75 rpm) por mais 24h. Após 48h de formação do biofilme, o RPMI foi removido e os biofilmes foram lavados com PBS duas vezes⁴⁹. Então, os tratamentos foram realizados (n=12) em três grupos: 1- Grupo-controle: os biofilmes não receberam nenhum tratamento; 2- ZER-128: os biofilmes foram tratados com ZER na concentração de 128 µg/mL; e 3- ZER-256: os biofilmes foram tratados com ZER na concentração de 256 µg/mL. Em cada grupo experimental os tratamentos foram realizados por 5, 10 e 20 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três ocasiões distintas.

Após os tratamentos, os biofilmes foram lavados três vezes com NaCl esterilizado (0,89%). Posteriormente, 2 mL de NaCl 0,89% foram adicionados a cada orifício, e os biofilmes foram cuidadosamente removidos do fundo de cada orifício utilizando uma ponta de pipeta e transferidos para um microtubo esterilizado.

4.5 Avaliação da Eficácia do ZER

Posteriormente aos tratamentos dos biofilmes com ZER, os mesmos foram lavados três vezes com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,89% devidamente esterilizada, e então foram adicionados 2 mL de NaCl 0,89% nos poços e os biofilmes foram transferidos para microtubos estéreis. Então os microtubos foram submetidos à sonicação durante 30 segundos a uma potência de 7 watts em 190 joules⁵⁰.

Em seguida, para realizar a quantificação da biomassa total e das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) retirou-se uma alíquota de 0,1 mL da suspensão para cada análise. Subsequentemente, a suspensão restante (1,8 mL) foi centrifugada por 10 minutos em 5.500 × g sob a temperatura de 4°C, e então as partículas sobrenadantes foram retiradas para posterior utilização nas análises dos

componentes da MEC: WSP, eDNA e proteínas⁴⁹, em quantidades de 1 mL, 0,650 mL e 0,150 mL, respectivamente.

O pellet resultante (componentes insolúveis da MEC) foi ressuspenso em 1 mL de água Mili-Q, e foi utilizado para análise da biomassa insolúvel (0,8 mL), proteínas insolúveis 0,05 mL e polissacarídeos insolúveis em álcali (0,95 mL; ASP)⁴⁹.

4.5.1 Avaliação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Para avaliar as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) aplicamos as diluições em microtubos estéreis, os quais continham uma solução de 900 µL de NaCl na concentração de 0,89%. Após a aplicação foi realizado o plaqueamento em meios de SDA com cloranfenicol, utilizando 25 µL das diluições, em duplicata.

Os meios de cultura foram incubados durante 48 horas para o crescimento dos microrganismos, e então, foi realizada a contagem. O valor médio foi obtido a partir da média dos valores provenientes da contagem entre a amostra inicial e sua duplicata.

4.5.2 Avaliação das proteínas

As proteínas avaliadas foram divididas em solúveis e insolúveis. Para quantificar as proteínas solúveis foi realizada a diluição de uma porção de 15 µL da suspensão do biofilme, em seguida, esta porção foi dividida em três porções de 5 µL, e para a quantificação foi utilizado o reagente Azul de Coomassie G-250, seguindo o método de Bradford⁵¹.

Em seguida foi necessário realizar diluições seriadas de albumina proveniente de soro bovino (BSA), com o propósito de obter a curva de padronização para aplicar o método de Bradford⁵¹.

Após obter a curva padrão, foram adicionadas porções de 5 µL em uma placa de 96 orifícios, na proporção de três porções para cada ponto da curva e amostra para posterior análise. Então foi adicionado 250 µL do reagente de Azul de Coomassie, e a placa foi levada a incubação sob condições de agitação orbital à 75 rpm, em uma temperatura de 37°C por um período de vinte minutos. A placa então foi levada ao espectrofotômetro, onde observou-se as absorbâncias à 595 nm e os dados obtidos

foram convertidos para as concentrações das proteínas, usando a equação da reta gerada, onde a inclinação 0,020 -0,026; R^2 próximo de 1.

As proteínas insolúveis foram quantificadas a partir de um microtubo, onde foi adicionado 50 μ L da diluição, 200 μ L de água Milli-Q e 100 μ L de esferas de vidro. Após o preparo as amostras foram levadas ao beadbeater, por três vezes durante períodos de trinta segundos, e foram aquecidas sob as condições de agitação durante sessenta minutos, a uma temperatura de 100 °C, e uma força centrífuga de 100 xg.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 10.000 xg por minuto, e o sobrenadante resultante foi alocado em um microtubo estéril. Após este processo uma porção de 15 μ L da diluição foi dividida em três porções de 5 μ L para propiciar a quantificação das proteínas insolúveis pelo método de Bradford⁵¹.

4.5.3 Avaliação do peso seco total

Utilizando 100 μ L de cada amostra em conjunto com 100 μ L da solução de NaCl a 0,89% utilizada em cada ocasião realizamos a pipetagem em porções de papel alumínio, os quais foram anteriormente rotulados e pesados. Estas amostras passaram por um processo de secagem em um forno a uma temperatura de 100°C. Após a secagem as amostras foram pesadas novamente, e o peso seco total foi calculado a partir da diferença entre o peso inicial e o final, descontando o valor correspondente a solução de NaCl a 0,89%, assim, a resultante da equação foi considerada o valor do peso seco total.

4.5.4 Avaliação dos polissacarídeos solúveis em água (WSP)

Para avaliar o WSP utilizamos uma porção de 1 mL do sobrenadante da amostra, este foi homogeneizado, e posteriormente, transferido para um tubo falcon com capacidade de 15 mL. Neste mesmo tubo foi adicionado 2,5 mL de etanol 95%. Após a adição no tubo, o líquido foi novamente homogeneizado, e então armazenado em um freezer a uma temperatura de -20 °C por um período de dezoito horas, para que permitisse a precipitação dos WSPs.

Após a precipitação, as amostras foram retiradas do freezer, novamente homogeneizadas e centrifugas durante vinte minutos, sob condições de 9.500 xg de força e a temperatura de 4 °C. Em seguida houve o descarte do sobrenadante, e as

amostras passaram por um processo de lavagem por três vezes com etanol 75% gelado.

Após a lavagem as amostras foram agitadas por meio do vórtex, centrifugadas e novamente houve o descarte do sobrenadante. Finalizadas as lavagens o precipitado foi submetido a um processo de secagem ao ar, e posteriormente foi ressuspensão em 0,25 mL de água e homogeneizado.

Por fim, as amostras foram avaliadas por meio da quantificação de carboidratos totais pelo método fenol-ácido sulfúrico⁵² dentro de uma capela de exaustão. A avaliação foi feita por meio de tubos de vidro de 13 mm, os quais continham 200 µL de cada amostra, sendo três por amostra, onde foram adicionados 200 µL de fenol a 5%, e então foram delicadamente agitados. Após a movimentação foram adicionados 1 mL de ácido sulfúrico em cada um dos tubos, os quais foram novamente agitados, e após vinte minutos as amostras foram submetidas a análise no espectrofotômetro (490nm).

Os dados provenientes da leitura foram convertidos em concentrações de polissacarídeos por meio da equação de reta gerada (slope 0,048 – 0,051; R² próximo de 1).

4.5.5 Avaliação dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

Uma porção de 0,95 mL da suspensão de biofilme de CaR foi colocada em gelo, para que fosse resfriada, após o processo foi realizada a centrifugação da amostra durante dez minutos, a uma temperatura de 4 °C sob 13.000 xg de força.

Posteriormente a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e descartado, e o precipitado foi submetido a secagem por um período de três horas em um concentrador de amostras.

Os precipitados secos foram pesados em uma balança de precisão para determinar o peso seco dos polissacarídeos insolúveis em água. Nos respectivos tubos foram adicionados 300 µL de NaOH na proporção de 300:1 mg do peso seco.

Os microtubos passaram por um processo de incubação em banho seco, por um período de duas horas a uma temperatura de 37° C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a uma força de 13.000 xg, durante dez minutos a uma temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes resultantes do processo foram coletados

com uma pipeta a transferidos para microtubos com 2 mL de capacidade, permanecendo somente o precipitado.

Novamente adicionamos a solução de NaOH na proporção de 300:1 mg de peso seco para tubos os quais continham o precipitado. Os respectivos tubos foram agitados por meio do vórtex e então submetidos a um processo de extração do ASP, assim como foi realizado na etapa anterior para a extração do WSP, passando por incubação, centrifugação por dez minutos a 13.000 xg, transferência do sobrenadante para um microtubo de 2 mL de capacidade.

Foi realizada a ressuspensão dos precipitados em NaOH, centrifugando-os por dez minutos, a uma temperatura de 4 °C sob 13.000 xg de força, transferindo então os sobrenadantes resultantes para seus respectivos microtubos.

Após finalizar a etapa de extração do ASP, foram adicionadas três porções de etanol 95% resfriado e as amostras foram levadas ao freezer na temperatura de -20°C por um período de no mínimo 18 horas. Em seguida, os tubos foram retirados do resfriamento e houve a precipitação do ASP, estes tubos foram centrifugados por vinte minutos em uma temperatura de 4°C a 9.500 xg de força.

A centrifugação ocasionou em um corpo sobrenadante, o qual foi descartado e as amostras lavadas com etanol 75% resfriado por três vezes, assim como foi realizado com o WSP. As amostras foram levadas para secagem por meio do ar e ressuspensas em NaOH, no mesmo volume da extração original.

Para compensar o volume perdido das amostras durante seu processamento foi adicionado água Mili-Q até completar 200 µL, e então as amostras estavam prontas para quantificação, onde utilizamos o método fenol-ácido sulfúrico⁵².

4.5.6 Avaliação do eDNA

A avaliação do eDNA foi feita seguindo a metodologia de Rice et al.⁵³ (2007), onde a um volume de 0,65 mL adicionamos um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, nas proporções de 25:24:1, respectivamente, e então homogeneizamos as soluções, de maneira delicada, cerca de trinta vezes em movimentos repetidos de ida e volta.

Após homogeneizar corretamente as soluções, submetemos as mesmas à centrifugação (13.000 xg) durante vinte minutos a uma temperatura de 4°C e então transferimos o líquido para microtubos de 2 mL.

Adicionamos então uma alíquota de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente, e novamente submetemos a amostra a centrifugação nas mesmas condições citadas no parágrafo anterior, contanto também com a transferência para um microtubo de 1,5 mL.

Após a transferência as amostras foram misturadas com soluções de etanol 99% e acetato de sódio, três volumes e um décimo de volume, respectivamente, e logo, armazenadas a -20 °C por um período de dezoito horas.

Posteriormente ao período necessário, as amostras foram removidas da refrigeração, onde o eDNA foi precipitado com o etanol e foi coletado para centrifugação por vinte minutos, a 13.000 xg de força e 4°C. Dada a centrifugação as amostras foram lavadas três vezes com etanol 70% resfriado, e postas para secagem ao ar.

Em seguida, as amostras secas foram dissolvidas em 20 µL de solução tampão TE, e a quantificação foi realizada a partir da análise no nano espectrofotômetro 260nm.

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas com o software IBM SPSS Statistics (versão 29, Chicago, IL, EUA) e adotou-se o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Foram utilizados os testes de Levene e Shapiro-Wilk para avaliar a homoscedasticidade e normalidade, respectivamente, para cada grupo das variáveis dependentes. Assim, após atendidos a esses pressupostos, os dados foram submetidos a ANOVA dois fatores, seguida da verificação de possível interação entre os fatores, com o pós-teste de Bonferroni.

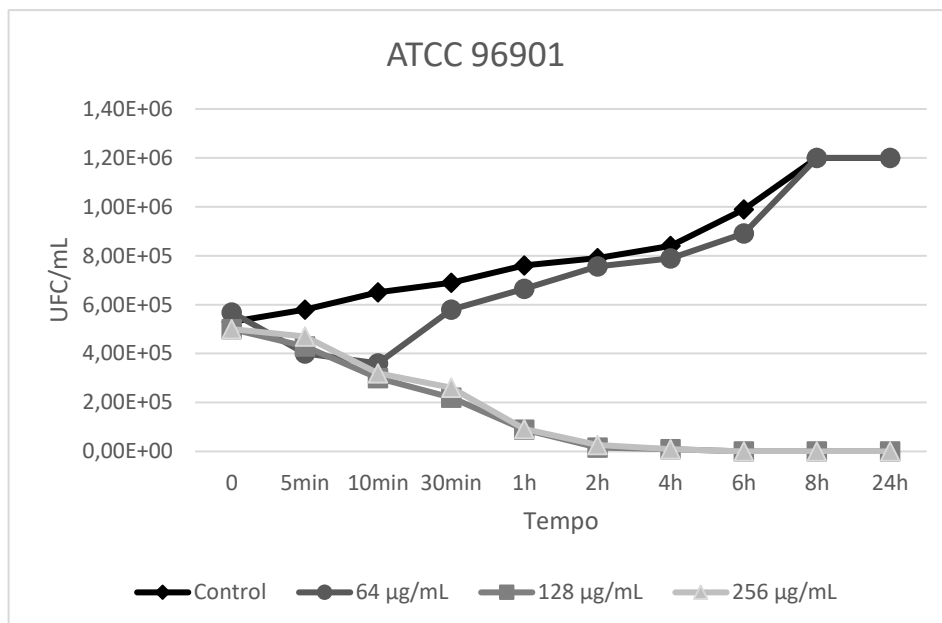
5 RESULTADOS

Para que fosse possível avaliar a CIM foi necessário realizar a leitura da densidade óptica da cepa de *C. albicans*, onde o valor obtido foi de 64 µg/mL. A partir da realização de três ocasiões não dependentes e as respectivas leituras de seus valores médios de OD_{492nm}, foi possível averiguar que o valor médio para as amostras correspondentes ao controle positivo, grupo livre de tratamentos com ZER para *C. albicans* resistente foi de 0,686±0,081. O grupo correspondente ao tratamento com ZER 64 µg/mL foi tido como a menor concentração com a capacidade de reduzir 50% da OD_{492nm} com valores de 0,301±0,036.

As amostras tratadas com ZER a 64 µg/mL apresentaram uma redução no número de colônias viáveis após 10 minutos de tratamento, com um percentual de 55,31% de redução, entretanto após este período foi possível observar um aumento no número de colônias viáveis. Logo, a MCF foi a concentração de ZER 128 µg/mL, escolhida como conduta para os experimentos seguintes, já que prosseguiu com um percentual de 99% de redução nos outros tempos.

A amostra tratada com ZER a 256 µg/mL apresentou uma redução de 99% no número de colônias viáveis quando comparado ao inóculo inicial em um período de 2 horas após a exposição (Figura 1). A concentração de ZER de 128 µg/mL se comportou de forma semelhante à de 256 µg/mL.

Figura 1 – Contagem dos valores médios de colônias viáveis (UFC/mL) de *C. albicans* após o tratamento com diferentes concentrações de ZER e tempos de tratamento



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados relacionados a viabilidade celular e caracterização da MEC após os tratamentos, podem ser observados na Tabela 1.

Em análise da quantificação de unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) apresentou interação ($p < 0,001$) entre o tempo e a concentração de ZER utilizada. Foi observado que o tratamento com ZER nas concentrações de 128 e 256 µg/mL impediu o crescimento estatisticamente significativo de CaR nos tempos avaliados ($p = 1,00$). Porém a amostra tratada com ZER 256 µg/mL apresentou redução significativa na viabilidade celular em relação a ZER 128 µg/mL, sendo também estatisticamente diferente do grupo controle ($p \leq 0,001$). O grupo de 128 µg/mL também apresentou resultados estatisticamente diferentes do grupo controle ($p < 0,001$).

Os resultados de peso seco total mostraram que não houve interação entre o tempo e a concentração avaliada ($p = 0,066$). Os tratamentos avaliados não alteraram os valores de peso seco total do biofilme CaR ($p \geq 0,089$).

Em seguida, os fatores foram avaliados separadamente e a concentração de ZER apresentou interação ($p < 0,001$). O grupo ZER-256 apresentou redução significativa dos valores de biomassa insolúvel e foi diferente dos demais grupos

($p \leq 0,033$) em todos os tempos avaliados. Para CaR o grupo ZER-256 apresentou a maior redução para peso insolúvel e foi diferente dos demais grupos ($p \leq 0,001$).

Ao avaliar os níveis de proteínas solúveis, foi observado que houve interação entre os fatores de tratamento para CaR ($p \leq 0,001$). Para a CaR, nos tempos de 10 e 20 min os grupos tratados com as duas concentrações de ZER foram estatisticamente semelhantes ($p = 1,000$) entre si e apresentaram redução significativa ($p \leq 0,001$) em relação ao grupo controle.

Em relação aos resultados de proteínas insolúveis, foi observada interação entre os fatores de tratamento para CaR ($p = 0,049$). Para CaR não foi observada diferença entre os grupos quando os fatores de tratamento foram avaliados isoladamente ($p \geq 0,053$).

Para os níveis de WSP foi observada interação entre os fatores de tratamento ($p = 0,040$). Para CaR os grupos foram semelhantes entre si nos tempos avaliados ($p \geq 0,079$), tendo o grupo ZER-256 apresentado a maior redução de WSP, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,001$).

Ao avaliar os níveis de ASP após os tratamentos, foi observado que houve interação entre os fatores de tratamento ($p = 0,021$). Após 5 min de incubação, os três grupos avaliados se comportaram de maneira estatisticamente semelhante ($p \geq 0,079$). Nos tempos de 10 e 20 min observou-se que o grupo ZER-256 apresentou redução nos níveis de ASP, sendo estatisticamente diferente do grupo controle ($p = 0,037$).

Na quantificação do eDNA foi observada interação entre os fatores de tratamento para CaR ($p = 0,002$). O grupo ZER-256 foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p \leq 0,013$ para CaR), apresentando redução nos níveis de eDNA em todos os tempos avaliados. O grupo ZER-128 foi estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,032$), entretanto apresentou redução de eDNA em menor escala em relação ao grupo ZER-256.

Tabela 1 – Valores correspondentes aos parâmetros utilizados na avaliação da cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol – médias e desvios-padrão. Comparação entre as diferentes concentrações em relação aos diferentes tempos de análise

Componente	Grupos	5 minutos		10 minutos		20 minutos	
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
UFC/mL	Controle	4,91E+06 ^{Aa}	5,13E+05	4,97E+06 ^{Aa}	3,92E+05	4,85E+06 ^{Aa}	5,02E+05
	128µl	2,63E+06 ^{Ab}	1,37E+05	2,27E+06 ^{Bb}	2,05E+05	2,51E+06 ^{Cb}	2,27E+05
	256µl	1,61E+06 ^{Ac}	2,52E+05	1,07E+06 ^{Bc}	1,72E+05	5,73E+05 ^{Cc}	3,94E+04
Peso Total (mg)	Controle	4,967 ^{Aa}	0,496	5,000 ^{Aa}	0,572	5,033 ^{Aa}	0,450
	128µl	4,950 ^{Aa}	0,444	4,900 ^{Aa}	0,357	4,950 ^{Aa}	0,683
	256µl	4,900 ^{Aa}	0,463	5,000 ^{Aa}	0,621	4,967 ^{Aa}	0,558
Peso Insolúvel (mg)	Controle	1,211 ^{Aa}	0,066	1,196 ^{Aa}	0,049	1,179 ^{Aa}	0,073
	128µl	1,131 ^{Ab}	0,071	1,123 ^{Ab}	0,057	1,131 ^{Aa}	0,045
	256µl	1,108 ^{Ab}	0,049	1,069 ^{ABb}	0,050	1,016 ^{Bb}	0,054
Proteínas Solúveis (mg)	Controle	0,024 ^{Aa}	0,001	0,026 ^{Aa}	0,002	0,025 ^{Aa}	0,002
	128µl	0,024 ^{Aa}	0,001	0,022 ^{Bb}	0,001	0,021 ^{Bb}	0,001
	256µl	0,024 ^{Aa}	0,002	0,021 ^{Bb}	0,001	0,021 ^{Bb}	0,001
Proteínas Insolúveis (mg)	Controle	0,010 ^{Aa}	0,001	0,010 ^{Aa}	0,001	0,010 ^{Aa}	0,001
	128µl	0,010 ^{Aa}	0,000	0,010 ^{Aa}	0,001	0,010 ^{Aa}	0,001
	256µl	0,010 ^{Aa}	0,001	0,010 ^{Aa}	0,001	0,010 ^{Aa}	0,001
WSP (µg)	Controle	0,090 ^{Aa}	0,009	0,093 ^{Aa}	0,014	0,092 ^{Aa}	0,004
	128µl	0,084 ^{Ab}	0,006	0,072 ^{Ab}	0,017	0,070 ^{Ab}	0,017
	256µl	0,053 ^{Ac}	0,003	0,053 ^{Ac}	0,002	0,051 ^{Ac}	0,001
ASP (µg)	Controle	0,098 ^{Aa}	0,005	0,098 ^{Aa}	0,005	0,099 ^{Aa}	0,004
	128µl	0,096 ^{Aa}	0,005	0,096 ^{Aab}	0,004	0,095 ^{Ab}	0,002
	256µl	0,096 ^{Aa}	0,004	0,094 ^{Ab}	0,003	0,089 ^{Bc}	0,002
eDNA (ng)	Controle	61,571 ^{Aa}	3,387	61,523 ^{Aa}	3,473	60,940 ^{Aa}	2,715
	128µl	59,119 ^{Aa}	3,596	58,000 ^{Ab}	4,478	55,003 ^{Bb}	3,251
	256µl	55,320 ^{Ab}	2,976	51,889 ^{Bc}	2,324	46,708 ^{Cc}	3,143

Letras maiúsculas correspondem a comparação entre os tempos (linhas), letras minúsculas correspondem a comparação entre as concentrações (colunas). Letras desiguais indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Os compostos químicos naturais com biomoléculas ativas com ação antimicrobiana têm se tornado uma alternativa promissora para a inativação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais⁵⁴. O ZER é uma substância proveniente do rizoma do *Zingiber zerumbet*, e demonstrou eficácia na inativação de bactérias gram-positivas, gram-negativas e de biofilmes de *C. albicans*^{19,21,55}. Entretanto, ainda não foi avaliado o efeito do ZER sobre a matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* resistente ao fluconazol. Dessa forma, o presente estudo avaliou a eficácia do ZER na redução da viabilidade de biofilme de CaR, bem como sua ação sobre a matriz extracelular do biofilme.

Os resultados obtidos a partir do MIC demonstraram forte atividade antifúngica do ZER contra CaR com MIC de 64 µg/mL. Esses resultados corroboram com estudo anterior que detectou MIC na faixa de 64-128 µg/mL para cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SA1199B, ATCC25923, XU212, RN4220 e EMRSA15) e 250 µg/mL para *Streptococcus mutans*⁵⁶. Atualmente não existe uma padronização que defina o potencial antimicrobiano dos compostos extraídos de rizomas de plantas em relação a CIM, porém Sartoratto et al.⁵⁷ criaram uma classificação que dividiu os compostos em três níveis: baixa atividade – CIM ≥ 1500 µg/mL, atividade moderada – CIM ≤ 1499 µg/mL à ≥ 501 µg/mL, e alta atividade – CIM ≤ 500 µg/mL. Seguindo o parâmetro citado anteriormente o ZER apresenta alta atividade antimicrobiana contra a CaR, visto que a CIM constatada foi de 64 µg/mL. Esses resultados se justificam uma vez que o ZER apresenta uma ampla variedade de atividades biológicas com alto potencial terapêutico e atividade antimicrobiana^{21,58-60}.

Ao analisar a viabilidade celular de CaR foi possível constatar que o ZER desempenhou importante atividade antifúngica uma vez que o ZER na concentração de 256 µg/mL, promoveu redução de 50% e 95% na viabilidade celular em tempos de 20 minutos e 2 horas, respectivamente. Além disso, biofilmes tratados com ZER apresentaram redução na viabilidade em função da concentração utilizada e do tempo de exposição sendo de ~37% na concentração de 256 µg/mL e de ~17% na concentração de 128 µg/mL. Um estudo de Shin et al.¹⁹ avaliaram três diferentes cepas de *C. albicans* susceptíveis ao fluconazol (ATCC 14053 e dois isolados clínicos) e observou que o ZER na concentração de 64 µg/mL foi capaz de inibir em 82% a

formação de biofilme de ambas as cepas, além de causar a diminuição significativa do metabolismo do biofilme em concentração igual ou superior à 128 µg/mL. Além disso, o ZER inibiu a adesão das células às superfícies e a maturação de biofilmes pré-formados de maneira dose-dependente^{19,55}.

A biomassa do biofilme compreende os componentes solúveis e insolúveis da matriz extracelular bem como as células do biofilme⁵⁵. No presente estudo os tratamentos avaliados não alteraram a biomassa total do biofilme de CaR. Em estudo anterior, utilizando marcadores específicos para Microscopia Confocal a Laser, foi observado que o ZER a partir da concentração de 64 µg/mL promoveu redução na biomassa total e na densidade celular de biofilmes mistos de *C. albicans* susceptível ao fluconazol (ATCC 14053) e *S. aureus* (ATCC 14053)⁵⁵. Além disso, o ZER a 128 µg/mL provocou degradação da estrutura do biofilme misto, comparado com o controle⁵⁵. Os dados relativos à biomassa insolúvel demonstraram que ZER à 256 µg/mL promoveu redução de 13% após 20 minutos de tratamento. Resultados semelhantes foram observados em tratamentos com antifúngicos convencionais, como Nistatina e Anfotericina B, com redução da biomassa insolúvel dos biofilmes de *C. albicans* de maneira dose-dependente⁶¹.

As células de *C. albicans* que estão presentes no biofilme apresentam fenótipos alterados e são mais resistentes aos antifúngicos, tornando a sua inativação mais difícil. A matriz extracelular do biofilme consiste em uma extensa matriz de biomoléculas funcionais, como exopolissacarídeos, (β -glucanas, α -mananas), ácidos nucléicos (eDNA), proteínas, lipídios e outras biomoléculas. Os biofilmes fúngicos são estruturados por meio de interações do complexo manano-glucano (MGCx), onde há a interação entre DNA extracelular (eDNA) e exopolissacarídeos (EPS) do tipo β -glucanos (ASPs) e α -mananas (WSPs)⁶².

Os ASPs são polissacarídeos insolúveis em água, como os β -1,3-glucanos, mas solúveis em álcali, enquanto os WSPs são polissacarídeos solúveis em água. Um estudo de Nett et al.⁶³ (2010) relatou que a presença de ASPs na parede celular do fungo promoveu um aumento da resistência aos antifúngicos em relação as células planctônicas desprovidas de ASP. Karygianni et al.⁶⁴ (2020) publicou um estudo onde foi observado que a presença de β -1,3-glucanos na MEC impede a penetração de fármacos no interior do biofilme, fazendo com que o medicamento não tenha contato com a célula-alvo. Quando os biofilmes já estão estabelecidos, as abordagens que podem reduzir as macromoléculas do complexo manano-glucano podem

desestruturar e enfraquecer a estrutura do biofilme e potencializar a morte antimicrobiana. Considerando a organização estrutural da matriz extracelular do biofilme, os resultados do presente estudo foram muito promissores, uma vez que o ZER reduziu os polissacarídeos (WSP e ASP) e o DNA extracelular (eDNA) da matriz extracelular de *C. albicans* resistente ao fluconazol. Os resultados demonstraram que o ZER a 256 µg/mL reduziu a quantidade de WSPs nos biofilmes de CaR em 50% em todos os tempos de aplicação avaliados. Além disso, foi observada redução de aproximadamente 10% na quantidade de ASPs após 20 minutos de aplicação.

Além dos polissacarídeos (ASPs e WSPs), o complexo MGCx é formado por moléculas de DNA extracelular (eDNA), de forma que esses componentes estão interligados e participam da manutenção estrutural do biofilme⁶⁵. No biofilme de *C. albicans*, os polissacarídeos (β -1,3 glucano) e o eDNA têm demonstrado contribuir para a tolerância aos antifúngicos uma vez que impedem a penetração das drogas^{7,66}. No presente estudo o óleo essencial de ZER reduziu o eDNA presente nos biofilmes de *C. albicans* resistente ao fluconazol em aproximadamente 23%. A redução de eDNA promovida por ZER pode estar relacionada ao enfraquecimento da matriz dos biofilmes de *C. albicans*, uma vez que o eDNA desempenha funções essenciais na formação do biofilme, atuando na manutenção da integridade estrutural e induzindo a transição morfológica de levedura para hifas durante o desenvolvimento do biofilme⁶⁷.

As proteínas são componentes presentes em grande quantidade no biofilme e podem ser divididas em solúveis e insolúveis em água⁶⁴. No presente estudo não foi observada a redução das proteínas solúveis nos biofilmes de CaR. Por outro lado, para o grupo ZER-256, foi observado redução de aproximadamente 15% das proteínas insolúveis no biofilme de CaR após 20 minutos de exposição. Estudos sugerem que as proteínas apresentam um mecanismo de ação similar a um sistema digestivo na matriz, onde teria o papel de digerir biopolímeros extracelulares como fonte de energia⁶⁴.

De modo geral o ZER tem um potencial promissor, pois teve efeito tanto sobre biofilmes isolados de *C. albicans* resistente ao fluconazol, quanto em biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus* como observado por Shin et al.⁴⁷. O composto também apresentou baixa citotoxicidade em células de mamíferos, fator relevante para o aceite da substância como alternativa terapêutica no futuro⁶⁸. Como observado neste trabalho científico o ZER reduziu componentes essenciais da MEC de biofilmes de

CaR, como as de WSP, ASP e eDNA. Dessa forma, o ZER pode ser considerado uma alternativa promissora para inativação de biofilmes mistos.

7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que o Zerumbona (ZER) foi eficaz na inativação de biofilmes de *C. albicans* resistente ao fluconazol reduzindo a viabilidade do biofilme. Além disso, atuou na matriz extracelular do biofilme reduzindo componentes importantes da MEC como polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP) e DNA extracelular (eDNA).

REFERÊNCIAS*

1. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. Annu Rev of Microbiol. 2015; 69(1): 71-92.
2. Vieira AJH, Santos JI. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. Rev Bras Anal Clin. 2017; 49(3): 235-9.
3. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016; 18(5): 310-21.
4. Marsh PD. Infecções fúngicas bucais. In: Marsh PD, Lewis MAO, Rogers H, Williams DW, Wilson M. Marsh & Martin, microbiologia oral. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018. p. 174-88.
5. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L et al. *Candida*-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011; 16(2): 139-43.
6. Cubera K. Denture stomatitis: definition, etiology, classification and treatment. Przegl Lek. 2013; 70(11): 947-9.
7. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. Mycopathologia. 2009; 169(5): 323-31.
8. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11(1): 30-6.
9. Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol. 1994; 32(9): 2092-8.
10. Casalnuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2004; 8(2): 69-77.
11. Budtz-Jørgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. Antimicrob agents chemother. 1988; 32(12): 1859-63.

* 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. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012; 148(1-2): 126-38.
13. Rosa C, Câmara SG, Béria JU. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. *Cien Saúde Colet*. 2011; 16(1): 311-8.
14. Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*. 2009; 38(3): 184-91
15. Offei-Oknye R, Patterson J, Walker LT, Verghese M. Processing effects on phytochemical content and antioxidative potential of ginger *Zingiber officale*. *Food chem*. 2015; 6(05): 445-51.
16. Machado, DSP. Estudo farmacológico dos extratos bruto e hidroalcoólico do gengibre amargo (*Zingiber zerumbet* L. Smith) da região amazônica para o encapsulamento funcional [tese de doutorado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2014.
17. Pinheiro CDF. Bioprospecção do sesquiterpeno zerumbona para o tratamento de infecções cutâneas [tese de mestrado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2017.
18. Pinheiro, CCS. Processo de obtenção e avaliação do potencial analgésico, anti-inflamatório, toxicidade pré-clínica de zerumbona obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet* L. Smith [tese de doutorado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2009.
19. Da-Seul Shin, Yong-Bin Eom. Zerumbone inhibits *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth. *Can J Microbio*. 2019; 65(10): 713-21.
20. Hamza H, Hertiani T, Pratiwi SUT, Nuryastuti T, Gani AP. Antibiofilm studies of zerumbone against polymicrobial biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Int J Pharm Res*. 2020; 12(1): 1307-14.
21. Hamid A, Lee LS, Karim SR, Jufri NF. Hepatoprotective effects of zerumbone against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *Malays J Med Sci*. 2018; 25(2): 64-71.
22. Homei A, Worboys M. Fungal disease in Britain and the United States 1850–2000: mycoses and modernity. Basingstoke: Palgrave Macmillan, 2013.
23. Cardoso JAO. Agentes infecciosos de importância na odontologia: leveduras do gênero candida. In: Cardoso JAO. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p. 148-166.
24. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab*. 2010; 46(3): 225-234.

25. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922): 455-9.
26. Simões RJ, Fonseca P, Figueiral MH. Infecções por *Candida spp* na cavidade oral. *Odontol Clin Cient*. 2013; 12(1): 19-22.
27. Shin-Yu Lu. Oral candidosis: pathophysiology and best practice for diagnosis, classification and successful management. *J Fungi*. 2021; 7(7): 555-80.
28. Tarçın BG. Oral candidosis: etiology, clinical manifestations, diagnosis and management. *J Inst Health Sci*. 2011; 1(2): 140-8.
29. Feitosa MAL. Manejo clínico da estomatite protética: como tratar e prevenir. São Luís: Ed. Universidade Federal do Maranhão; 2020.
30. Neville BW. Infecções causadas por fungos e protozoários. *In*: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi CA. Atlas de patologia oral e maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2021. p. 125-38.
31. Regezi JA. Condições ulcerativas: infecções fúngicas. *In*: Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Patologia oral: correlações clinicopatológicas. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. p. 35-8.
32. Bukhari MA, Algahtani MA, Alsuwailem FA, Alogaiel RM, Almubarak SH, Alqahtani SS et al. Epidemiology, etiology, and treatment of denture stomatitis. *Int J Community Med Public Health*. 2022; 9(2): 981-6.
33. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent*. 2014; 42(2): 99-106.
34. Yan Wang. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*. 2015; 6(4): 307-308.
35. Panariello BHD, Costa CAGA, Pavarina AC, Santiago SL, Duarte S. Advances and challenges in oral biofilm control. *Curr Oral Health Rep*. 2017; 4(1): 29-33.
36. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(12): 383-92.
37. Panariello BHD. Influência de alterações genéticas, do fluconazol e de enzimas hidrolíticas na matriz extracelular de biofilmes de *Candida* susceptível e resistente a fluconazol [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.
38. Balliana RCS. Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos bucais em *Candida albicans* [tese de mestrado]. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2012.
39. Bohneberger G, Machado MA, Debiasi MM, Dirschnabel AJ, Ramos G de O. Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los? *Braz J Hea Rev*. 2019; 2(4): 3504-17.

40. Fernandes AV. Efeitos do uso tópico de *Calendula officinalis* na cicatrização de feridas em mucosa palatina: estudo histológico em ratos [tese de mestrado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia UNESP; 2003.
41. Paiva LCA, Ribeiro RA, Pereira JV, Oliveira NMC. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (unha de gato) sobre candidose oral. Rev Bras Farmac. 2009; 19(2): 423-8.
42. Zappi DC, Filardi FLR, Leitman P, Souza VC, Walter BMT, Pirani JR et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia. 2015; 66(4): 1085-113.
43. Koga AY, Beltrame FL, Pereira AV. Several aspects of *Zingiber zerumbet*: a review. Rev Bras Farmac. 2016; 26(3): 385-91.
44. Somchit MN, Mak JHM, Bustamam AA, Adam Y, Zakaria ZA, Zuraini A et al. Zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet* inhibits inflammation and pain in rats. J Med Plant Res. 2012; 6(2): 177-80.
45. Girisa S, Shabnam B, Monisha J, Fan L, Halim CE, Arfuso F et al. Potential of zerumbone as an anti-cancer agent. Molecules. 2019; 24(4): 734-50.
46. Zakaria ZA, Mohamad AS, Chear CT, Wong YY, Israf DA, Sulaiman MR. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Zingiber zerumbet* methanol extract in experimental model systems. Med Princ Pract. 2010; 19(4): 287-94.
47. Da-Seul Shin, Yong-Bin Eom. Efficacy of zerumbone against dual-species biofilms of *Candida Albicans* and *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog. 2019; 137(1): 103768.
48. Wayne PA. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). 3. ed. New York: CLSI Document M44-A2, 2009.
49. 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(1): 124-31.
50. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T et al. The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. Appl Environ Microbiol. 2018; 84(5): 02264-17.
51. 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.
52. 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.
53. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc Nat Acad Sci U S A. 2007; 104(19): 8113-8.

54. Freire JCP, Nóbrega MTC, Oliveira Junior JK, Freire SCP, Dias-Ribeiro E. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre candidose oral: uma revisão de literatura. *Salusvita*. 2016; 35(4): 537-46.
55. Hye-Rim Kim, Da-Seul Shin, Hye-in Jang, Yong-Bin Eom. Anti-biofilm and anti-virulence effects of zerumbone against *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*. 2020; 166(8): 717-26.
56. Kader MG, Habib MR, Nikkon F, Yeasmin T, Rahid MA, Rahman MM et al. Zederona dos rizomas de *Zingier zerumbet* e sua atividade anti-estafilocócica. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Arom*. 2010; 9(1): 63-8.
57. 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(1): 275-80.
58. Tan JW, Israf DA, Tham CL. Major bioactive compounds in essential oils extracted from the rhizomes of *Zingiber zerumbet* (L) Smith: a mini-review on the anti-allergic and immunomodulatory Properties. *Front Pharmacol*. 2018; 20(9): 652.
59. Wayne Young Liu, Thing-Fong Tzeng, I-Min Liu. Healing potential of zerumbone ointment on experimental full-thickness excision cutaneous wounds in rat. *J tissue Viability*. 2017; 26(3): 202-7.
60. Baby S, Dan M, Thaha ARM, Johnson AJ, Kurup R, Balakrishnapillaia P et al. High content of zerumbone in volatile oils of *Zingiber zerumbet* from southern India and Malaysia. *Flavour Frag J*. 2009; 24(1): 301-8.
61. Bassi RC, Boriollo M. 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): 320-30.
62. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Rev Microbiol*. 2016; 14(9): 563-75.
63. Nett EJ, 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.
64. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol*. 2020; 28(8): 668-81.
65. Li Wei, Wang Jing Jing, Qian Hui, Tan Ling, Zhang Zhaohuan, Liu Haiquan et al. Insights Into the role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol*. 2020; 11(813): 1-14.
66. Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J Bacteriol*. 2007; 189(22): 7945-7.

67. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. J Appl Microbiol. 2016; 122(2): 321-30.
68. 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.