



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. Livia 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 partilhou 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)].

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do composto natural ZER na inibição ou erradicação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre uma superfície abiótica que simula a base de próteses dentárias.

A hipótese nula investigada foi que ZER apresenta efeitos sobre a viabilidade celular dos microrganismos e sobre os componentes do biofilme.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade de ZER em duas condições distintas: inibição da adesão de microrganismos e formação do biofilme pelo tratamento prévio das superfícies de adesão dos microrganismos; e a erradicação do biofilme maduro. A eficácia dos tratamentos foi avaliada por meio da determinação do efeito antimicrobiano pela contagem de colônias viáveis após o tratamento, bem como da determinação dos efeitos de ZER sobre componentes do biofilme.

Avaliar o efeito antimicrobiano do ZER na inibição da adesão de microrganismos e formação do biofilme misto sobre superfícies que permaneceram imersas por 8 h em soluções de ZER (256 µg/mL e 512 µg/mL) por meio da contagem de unidades formadoras de colônias;

Avaliar o efeito antimicrobiano de ZER na erradicação de biofilmes mistos maduros após o tratamento com ZER (256 µg/mL e 512 µg/mL) por meio da contagem de unidades formadoras de colônias;

Avaliar os efeitos do ZER na inibição da adesão e formação de biofilmes mistos por meio da avaliação dos componentes dos biofilmes [proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e solúveis em álcali (ASP), peso total e peso seco insolúvel, DNA extracelular (eDNA)];

Avaliar os efeitos do ZER sobre o biofilme misto por meio da avaliação dos componentes dos biofilmes [proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e solúveis em álcali (ASP), peso total e peso seco insolúvel, DNA extracelular (eDNA)].

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão de literatura estão elencados trabalhos científicos que corroboram para o tema do presente estudo, os quais estão apresentados de acordo com os principais assuntos abordados: biofilmes, antimicrobianos convencionais, uso de compostos naturais antimicrobianos.

3.1 Biofilmes

Flemming *et al.*³ (2007) discutiram sobre biofilmes e sua estruturação. Foi evidenciado que as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de biofilmes são biopolímeros de origem microbiana que englobam os microrganismos. As EPSs não são compostas somente por polissacarídeos, mas também por uma variedade de proteínas, glicoproteínas e glicolipídios e, em alguns casos, DNA extracelular (eDNA) e determinam a porosidade, a hidrofobicidade, a densidade, o teor de água, as propriedades de sorção e a estabilidade mecânica do biofilme. Esta matriz interage com o meio ambiente e, por meio de sua propriedade de sorção, proporciona a difusão de nutrientes captados para os microrganismos do biofilme e a adesão da estrutura às superfícies. Os biofilmes ainda garantem um ambiente propício para a transferência horizontal de genes, de maneira que ocorrem trocas de material genético já que as células são mantidas próximas umas das outras. Além disso, a presença de ácidos nucléicos no biofilme foi evidenciada, definidos como DNA extracelular (eDNA). A matriz extracelular é uma rede que fornece estabilidade mecânica por interações hidrofóbicas, reticulação por cátions multivalentes e emaranhados de biopolímeros na presença de eDNA. Dessa maneira, a estrutura possui um sistema altamente complexo que auxilia na integridade do biofilme, fornecendo características particulares.

Tsai¹⁶ *et al.* (2010) utilizaram micro arranjos de DNA para analisar isolados orofaríngeos de *Candida glabrata* que desenvolveram resistência a antifúngicos azólicos. O perfil transcricional revelou 19 genes regulados positivamente na maioria dos isolados resistentes em comparação com os seus isolados susceptíveis. Os sete isolados resistentes apresentaram regulação positiva de *C. glabrata* PDR1 (CgPDR1), um regulador transcricional mestre da rede de resistência a drogas pleiotrópicas (PDR), e os sete isolados resistentes mostraram uma regulação positiva de genes

alvo CgPDR1. Além disso, quatro mutações ocorreram no domínio regulador (L280P, L344S, G348A e S391L) e uma no domínio de ativação (G943S), enquanto duas mutações (N764I e R772I) ocorreram em uma região indefinida. A associação de resistência ao azol e as mutações CgPDR1 foi investigada no mesmo contexto genético, introduzindo as sequências CgPDR1 de um isolado sensível e cinco isolados resistentes em uma cepa hiper suscetível a azol (cepa Cgpd1) por meio de transformação integrativa. No entanto, apesar dos antecedentes genéticos idênticos, a regulação positiva dos genes alvo CgPDR1 e CgPDR1 variou, independentemente das localizações dos domínios em que ocorreram as mutações. Os autores sugeriram que as mutações em CgPDR1 contribuíram para a resistência clínica aos azóis, mas diferentes mutações também apresentaram graus de impacto nos genes alvo de CgPDR1.

Da Silva *et al.*³⁸ (2012) avaliaram o efeito da exposição de biofilmes de *C. albicans* ao fluconazol ou à nistatina, a partir da análise da matriz de polissacarídeos extracelulares. A cepa referência de *C. albicans* (ATCC 90028) foi submetida ao teste de mínima concentração inibitória (MIC) com fluconazol ou nistatina. Para os testes, espécimes de resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA) foram confeccionados de acordo com as recomendações do fabricante e tiveram sua rugosidade de superfície padronizada. Em seguida, os biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos na superfície dos espécimes durante 48 h, e então os biofilmes foram expostos a fluconazol ou nistatina nas concentrações de MIC, 10 x MIC ou 100 x MIC, por 24 h. Foi avaliada a atividade metabólica dos biofilmes pelo teste XTT, e a produção de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis, bem como dos polissacarídeos intracelulares pelo método fenol-ácido sulfúrico. Além disso, microscopia confocal a laser foi utilizada para caracterizar a arquitetura dos biofilmes e proporção de células vivas e mortas. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que a presença do fluconazol ou nistatina em concentrações maiores que o MIC resultou em uma redução significativa da atividade metabólica. A presença de nistatina não alterou a matriz de polissacarídeos extracelulares em todas as concentrações investigadas ($p > 0.05$). A arquitetura dos biofilmes não foi afetada por ambos os agentes antifúngicos, em qualquer concentração testada ($p > 0.05$). Os autores sugerem concentrações maiores que MIC de fluconazol e nistatina reduziram a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*; no entanto, tais concentrações não alteraram a matriz de polissacarídeos extracelulares nem a arquitetura dos biofilmes.

Taff *et al.*⁴⁰ (2014) relataram que a resistência de *Candida* em relação à atividade de fármacos, como os poliênicos e azóis, está relacionada à matriz extracelular dos biofilmes. β - glucanos e DNA extracelular presentes no biofilme são os principais responsáveis pela resistência do biofilme a diferentes antifúngicos. Durante a fase inicial de formação dos biofilmes de *Candida*, as bombas de efluxo aumentam sua atividade e, dessa forma, colaboram para o aumento da resistência microbiana, e à medida que o biofilme amadurece, as bombas de efluxo diminuem a sua atividade e mecanismos mais específicos passam a desempenhar maior função na resistência. Em biofilmes maduros, a produção da matriz extracelular contendo β -1,3 glucano é a principal característica que dificulta a penetração dos antimicrobianos. Os polímeros participam do sequestro de antifúngicos, como fluconazol, anfotericina B, nistatina e flucitosina. Os autores sugerem que os fármacos direcionados ao ergosterol possuem eficácia limitada, como os azóis e poliênicos, já que a matriz extracelular desempenha maior função na resistência microbiana.

Zarnowski *et al.*⁴¹ (2014), analisaram a matriz de biofilmes de *Candida albicans*, tanto *in vitro* quanto em um modelo clínico em animais, a fim de investigar a função dos componentes da matriz e o impacto na resistência aos medicamentos. Foram descobertos componentes de cada uma das classes macromoleculares (55% de proteína, 25% de carboidrato, 15% de lipídio e 5% de ácido nucleico) na matriz de biofilme de *C. albicans*. Três polissacarídeos individuais foram identificados, sendo os polissacarídeos mais abundantes os α -1,2 α -1,6-mananos ramificados (87%) associados com β -1,6-glucanos não ramificados (13%), os quais se arranjam em um complexo denominado manano-glucano (MGCx). Os lipídios da matriz consistiam em glicerolipídios neutros (89.1%), glicerolipídios polares (10.4%) e esfingolipídios (0.5%). A análise do ácido nucleico da matriz identificou a presença de DNA extracelular, (principalmente sequências não codificantes). Proteínas e polissacarídeos também estavam presentes na matriz de biofilme *in vivo*, sendo clinicamente relevante. A análise proteômica da matriz funcional revelou 458 atividades distintas nos biofilmes. Os autores sugerem que as células do biofilme vivem imersas em uma matriz autoproduzida formada por uma mistura de biopolímeros extracelulares, os quais não são caracterizados. Dessa forma, a virulência da *Candida* está associada à sua capacidade de formar biofilmes e, uma vez estabelecidas, as infecções por biofilme são de difícil controle.

Nett e Andes⁴² (2020) publicaram uma revisão de literatura que relatou como a matriz extracelular do biofilme contribui para a patogenicidade dos microrganismos aderidos na estrutura, sugerindo seu papel na promoção da tolerância e resistência a antifúngicos. Os autores sugerem que a produção de matriz extracelular é fundamental para fornecer essa característica, apresentando alguns estudos que definem os polissacarídeos da matriz como componentes importantes envolvidos na tolerância e resistência a fármacos. A matriz é formada por uma variedade de biomoléculas, entre elas estão proteínas (55%), carboidratos (25%), lipídios (15%) e DNA (5%). Os autores sugerem que a presença dos polissacarídeos do biofilme contribui para a resistência de *Candida*, pois a formação de um complexo fármaco-polissacarídeo, provavelmente por meio de interações não covalentes, impede a total eficiência de substâncias microbianas. Por fim, afirmam que esses estudos podem revelar novas estratégias para combater a infecção promovida por biofilmes.

Pereira *et al.*¹⁸ (2021) desenvolveram uma revisão que forneceu um panorama sobre *C. albicans* em relação à produção de biofilmes, o uso antifúngicos utilizados no combate às infecções causadas pelo fungo e os mecanismos de resistência a esses medicamentos. Os autores sugerem que a capacidade de alterar a morfologia e formar biofilmes é fundamental para a patogênese da *C. albicans*, sendo que a maioria das infecções por este patógeno está associada à formação de biofilmes nas superfícies dos hospedeiros ou dispositivos médicos. Neste caso, os biofilmes formados por *C. albicans* tornam-se tolerantes à terapia antimicrobiana com agentes terapêuticos comumente utilizados. Dessa forma, os autores sugerem a importância de pesquisas voltadas à prevenção e controle dessas comunidades microbianas clínicas, diante da crescente resistência microbiana.

Paes Leme *et al.*⁴³ (2006) avaliaram a diversidade genotípica de *S. mutans* identificados no biofilme dental formado *in vivo* na presença de sacarose, assim como a capacidade acidogênica e acidúrica desses genótipos. Voluntários participaram do estudo e bochecharam água destilada ou solução de sacarose 8x/dia durante 3 dias. *S. mutans* foram isolados da saliva e do biofilme dental e genotipados por PCR com primers-arbitrários. A maioria dos voluntários apresentou apenas 1 genótipo na saliva, que foram detectados em quase todas as amostras de biofilme em altas proporções. Genótipos isolados somente na presença de sacarose mostraram-se mais acidogênicos do que aqueles genótipos isolados apenas na presença de água. Genótipos de biofilmes formados na presença de sacarose foram mais acidúricos

após 30 e 60 min de incubação em pH 2,8 e 5,0, respectivamente. Os resultados apresentados no estudo sugerem que biofilmes formados sob condição de alto desafio cariogênico podem apresentar genótipos de *S. mutans* mais acidúricos e mais acidogênicos.

Vu *et al.*⁴⁴ (2009) realizaram uma revisão da literatura visando o papel das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) na aderência e fixação bacteriana, seguida pela formação de biofilme. Os autores sugerem que o tema é importante diante dos diferentes impactos em áreas da biomedicina, biotecnologia e industrial, incluindo aplicações farmacêuticas, cirúrgicas, na engenharia alimentar, biorremediação e biohidrometalurgia.

Lebeauz *et al.*⁴⁵ (2014), por meio de uma revisão da literatura abordou a "recalcitrância" de biofilmes bacterianos, caracterizada como a capacidade dos biofilmes patogênicos sobreviver na presença de altas concentrações de antibióticos. Os autores demonstram a importância do tema diante das diversas infecções relacionadas ao biofilme em ambientes médicos. Os autores sugerem que a recalcitrância é uma propriedade característica do estilo de vida do biofilme que leva a falhas de tratamentos e à recorrência de infecções. Os autores apresentam na revisão uma compreensão dos mecanismos moleculares da recalcitrância do biofilme em relação aos antibióticos, descrevendo a importância de conceber estratégias eficientes para prevenir ou erradicar infecções relacionadas ao biofilme.

Klein *et al.*⁴⁶ (2015), por meio de uma revisão da literatura, discorreram sobre biofilmes de *S. mutans*, microrganismo caracterizado como um grande produtor de substâncias poliméricas extracelulares, incluindo exopolissacarídeos (EPS), eDNA e ácido lipoteicóico (LTA). EPS são produzidos por exoenzimas derivadas de *S. mutans* e formam uma matriz espacialmente heterogênea e limitadora de difusão que protege as bactérias incorporadas. Os autores sugerem que a matriz rica em EPS proporciona estabilidade/coesão mecânica entre os microrganismos, propiciando a formação de microambientes altamente ácidos, importantes para a patogênese da cárie dentária. Os autores ainda relatam que *S. mutans* também é produtor de eDNA e LTA, os quais contribuem com o desenvolvimento da matriz ocasionando o aumento da síntese de EPS (glucano) localmente, aumentando a adesão de *S. mutans* a superfícies e a estruturação de biofilmes altamente coesos.

Li *et al.*¹⁵ (2020) avaliou o papel de cada um dos principais componentes químicos de biofilmes bacterianos de *Vibrio parahaemolyticus* [DNA extracelular

(eDNA), proteínas extracelulares e carboidratos]. Os autores sugerem que as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que são responsáveis pela estruturação tridimensional dos biofilmes ainda não foram exploradas quanto ao seu papel na formação do biofilme. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que a formação do biofilme foi correlacionada positivamente tanto com o eDNA quanto com o conteúdo de proteína ($P < 0,01$), mas não com carboidratos. Além disso, os autores demonstram que o tratamento individual com as enzimas DNase I ou protease K reduziu a adesão inicial dos microrganismos e consequentemente a estabilidade estrutural dos biofilmes a partir da hidrólise do eDNA ou das proteínas extracelulares, respectivamente, porém as enzimas não induziram uma dispersão significativa de biofilmes maduros. Por outro lado, a combinação de DNase I e protease K induziu a dispersão dos biofilmes maduros por meio da destruição simultânea de eDNA e proteínas extracelulares. Os autores demonstram que a desestruturação dos biofilmes ocorreu porque houveram danos à configuração do material genético do eDNA e da estrutura secundária das proteínas causada pelo tratamento enzimático. Os autores sugerem que os resultados obtidos fornecem uma nova estratégia para desenvolver métodos ecologicamente corretos para erradicar os biofilmes na indústria alimentícia.

Jarosz *et al.*⁴⁶ (2009) avaliaram a comunicação inter-reino entre *C. albicans* e *S. mutans* com base na produção de moléculas secretadas. Os autores relatam que *C. albicans* é um fungo polimórfico comumente encontrado na cavidade oral humana, onde interage com *S. mutans*, e que passa pela transição de levedura para hifa, a qual está envolvida na virulência do microrganismo e na formação de biofilme. Os autores avaliaram se *S. mutans* (UA159) foi capaz de inibir a formação de tubo germinativo (GT) de *C. albicans* em co-culturas. Os autores sugerem que durante esta fase, *S. mutans* produz o peptídeo estimulador de competência (CSP), cuja função na inibição da formação de GT foi confirmado usando CSP sintético e uma cepa de *S. mutans* que não possui a capacidade de produzir CSP. Outras cepas de *S. mutans* e outros *Streptococcus spp.* também foram capazes de inibir a formação de GT, mas em extensões diferentes. Os autores sugerem que os resultados obtidos refletem que o CSP foi capaz de inibir a mudança morfológica de *C. albicans*, reduzindo sua virulência e capacidade de formação de biofilme.

Flemming e Wingender⁴⁷ (2010) discutiram sobre a matriz extracelular presente nos biofilmes de microrganismos, descrevendo as funções, propriedades e constituintes da matriz EPS que tornam os biofilmes grandes comunidades

complexas. Os autores sugerem que esta matriz autoproduzida é formada de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas (EPS). EPS são principalmente polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, os quais fornecem a estabilidade mecânica característica dos biofilmes, auxiliam na adesão da estrutura às superfícies e criam uma rede polimérica coesa e tridimensional que conecta e imobiliza as células do biofilme. Os autores sugerem que a matriz do biofilme atua como um sistema digestivo, mantendo as enzimas extracelulares próximas às células, o que permite-lhes metabolizar biopolímeros.

Xiao *et al.*⁴⁸ (2012) discutiram sobre os EPS presentes nos biofilmes e nas superfícies bacterianas, os quais fornecem locais de ligação para outros microrganismos ao envolver as células microbianas. Os autores investigaram os mecanismos que modulam a arquitetura tridimensional (3D) da matriz EPS produzida por *S. mutans* e as mudanças populacionais durante a morfogênese de biofilmes, os quais foram formados sobre uma superfície de apatita revestida de saliva. Os autores também avaliaram se a matriz influencia o desenvolvimento de microambientes de pH dentro de biofilmes intactos usando uma técnica de mapeamento de pH 3D in situ. Os resultados revelam que a produção da matriz EPS ajuda a criar heterogeneidades espaciais, formando microcolônias por meio de interações célula-matriz. Esta arquitetura complexa cria microambientes ácidos e ricos em EPS em todo o biofilme, o que propicia o domínio de *S. mutans* patogênicos dentro de um sistema misto de espécies. Os resultados foram mediados pelos genes *gtfB/gtfC* de *S. mutans*, cuja expressão foi aumentada na presença de *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus oralis*. Além disso, compartimentos ácidos foram encontrados no interior de ilhotas bacterianas protegidas por EPS, impedindo a rápida neutralização pelo tampão (pH 7,0) e resultando em regiões de pH baixo (<5,5) em locais específicos. Os autores revelam que a resistência à clorexidina foi aumentada nas células dentro dos complexos de microcolônias em comparação com as externas às estruturas. Os autores sugerem que a formação dos microambientes ácidos se associa à virulência em biofilmes cariogênicos.

Lohse *et al.*⁴⁹ (2018), por meio de uma revisão da literatura, proporcionaram uma visão geral dos processos envolvidos na formação de biofilmes de *C. albicans* e discutiram a rede transcricional que regula o desenvolvimento do biofilme. Os autores sugerem que o impacto médico de *C. albicans* está comumente associado à capacidade de formar biofilmes, além de elencar as vantagens que os biofilmes

proporcionam ao microrganismo aderido à estrutura em comparação à forma planctônica. Além disso, os autores sugerem que a capacidade de interação entre *C. albicans* e espécies bacterianas no biofilme possibilita a formação de biofilmes mistos com maiores benefícios à estrutura, além da capacidade de proteção mútua entre os microrganismos.

Kim *et al.*³⁶ (2018) sugerem que, diante das interações fúngico-bacterianas que geram biofilmes únicos associados a diferentes infecções humanas, entre elas a cárie dentária infantil grave, as modalidades atuais são ineficazes por basearem-se em terapias focadas em um único microrganismo, apesar da natureza polimicrobiana da infecção. Os autores demonstram que a combinação de fluconazol de uso tópico com iodopovidona (PI) é capaz de suprimir o transporte de *C. albicans*, e consequente formação de biofilme misto, ao interromper a montagem de uma matriz protetora de exopolissacarídeo bacteriano (EPS) por meio da inibição da síntese de α -glucano pela exoenzima de *S. mutans* (GtfB) ligada à superfície fúngica. Os autores sugerem que o EPS produzido *in situ* liga-se diretamente ao fluconazol, reduzindo a captação e o transporte intracelular do medicamento. Além disso os autores demonstram que a inibição da atividade de PI, associada à degradação enzimática da matriz de α -glucano restabeleceu a suscetibilidade antifúngica. O efeito de proteção proporcionado pelo EPS derivado de bactérias leva a limitações da ação do antifúngico tópico em biofilmes orais mistos, principalmente devido ao aumento da tolerância de *C. albicans*. Os autores sugerem que os resultados obtidos fornecem novas abordagens para o tratamento de *C. albicans* em biofilmes multiespécies, e indicam os inibidores de EPS como mecanismos importantes para aumentar a eficácia de eliminação de microrganismos e otimizar a atividade anti-biofilme dessas espécies mistas.

Em 2020, Karygianni¹⁷ *et al.*, elencaram as principais características da matriz extracelular de biofilmes microbianos em uma abordagem mais atual. Os autores sugerem que a composição e os mecanismos de formação da matriz e seu papel função do biofilme estão sendo cada vez mais estudados, e o trabalho destaca os avanços recentes nas propriedades físico-químicas e na virulência dos biofilmes a partir de sua estruturação. Os autores sugerem ainda que o direcionamento de condições específicas do biofilme poderia levar a abordagens antibiofilme precisas e eficazes. Além disso, sugerem que há a necessidade de análises mais aprofundadas da matriz EPS em comunidades mistas que estão associadas a muitas doenças

infecciosas humanas, já que o conhecimento no contexto dos biofilmes polimicrobianos é limitado.

Khoury *et al.*⁵⁰ (2020) determinaram o papel dos componentes da matriz do biofilme derivado de *C. albicans* no aumento da colonização por *S. mutans* e formação de biofilme misto. As avaliações comparativas de biofilmes de espécies únicas e mistas demonstraram retenção significativamente melhorada de *S. mutans* em biofilmes com *C. albicans*. O aumento observado em biofilmes de *S. mutans* foi significativamente afetado pela digestão enzimática de polissacarídeos, os quais foram sugeridos pelos autores como fator chave na mediação da formação de biofilme misto. Um modelo de co-infecção oral em camundongos clinicamente relevante foi adaptado para demonstrar a colonização de *S. mutans* mediada por *C. albicans* em um hospedeiro. As análises de tecido colhido e a microscopia eletrônica de varredura demonstraram retenção significativamente maior de *S. mutans* em dentes e línguas de camundongos co-infectados em comparação com camundongos infectados apenas com *S. mutans*. Os resultados apresentados pelo estudo indicam que a secreção de polissacarídeos de *C. albicans* no ambiente oral impacta o desenvolvimento de biofilmes de *S. mutans*, e os autores sugerem que a colonização oral por *Candida* deve ser considerada como um fator na avaliar o risco de cárie.

3.2 Antimicrobianos Convencionais

Hope *et al.*⁵¹ (2004) avaliaram biofilmes multiespécies cultivados em um substrato de hidroxiapatita que foram imersos em uma solução de visualização contendo indicadores fluorescentes de integridade da membrana. A estrutura espacial e a vitalidade celular dentro dos biofilmes foram avaliadas por meio da microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). A clorexidina foi adicionada à solução de visualização para atingir concentrações de 0,05 e 0,2% (peso/vol). Os resultados demonstraram que a exposição a 0,2% de CHX fez com que a estrutura do biofilme se contraísse, gerando alterações nas medições de fluorescência total e nos perfis de fluorescência. Os perfis de fluorescência (fluorescência versus tempo versus profundidade) demonstraram que o efeito é dependente do tempo, e que o indicador mais claro do efeito da CLX diluída ao longo do tempo foi o perfil de viabilidade. Os autores sugerem a possibilidade de usar indicadores fluorescentes de integridade da membrana em conjunto com perfis de viabilidade permitem avaliar a penetração dos

efeitos bactericidas de compostos antimicrobianos ativos na membrana no biofilme, uma alternativa promissora para comprovar a eficácia de tratamentos convencionais.

Ruiz-Linares *et al.*⁵² (2014) avaliaram a capacidade de antimicrobianos [clorexidina 0,2% e 2% (CHX), cetrimida 0,2% (CTR) e alexidina 0,2%, 0,5%, 1% e 2% (ALX)] no controle do biofilme de *S. mutans* formado sobre dentina. Todas as concentrações de ALX testadas e CTR 0,2% promoveram a redução da viabilidade de 99% dos biofilmes avaliados, seguido de CHX de 2% que promoveu redução de 96%. ALX 2% e CTR 0,2% promoveram erradicação dos biofilmes, e CHX 0,2% não produziu erradicação em nenhum caso. Os resultados apresentados pelo estudo demonstram que alexidina 2% e 1% e cetrimida 0,2%, aplicados por um minuto, alcançaram a erradicação do biofilme de *S. mutans* na maioria das amostras quando aplicados a um modelo dentinário.

Xiao *et al.*⁵³ (2018), por meio de uma revisão da literatura avaliou os efeitos da Clorexidina (CLX) na diminuição do risco de infecção pela colonização de equipamentos hospitalares. Os autores sugerem que as evidências demonstram que que os pacientes que utilizaram CLX tiveram um risco significativamente menor de colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido em hospital e *Enterococcus* resistentes à vancomicina.

Bassi *et al.*⁵⁴ (2022) avaliaram a cinética de crescimento de biofilmes de *C. albicans* em superfícies sob a influência de filmes adsorvidos e a eficácia antibiofilme de agentes antifúngicos convencionais: anfotericina B, fluconazol e Nistatina. A motivação dos autores foi que, apesar do uso de antifúngicos durante o tratamento de estomatite protética associada a biofilmes, não está claro como o tempo, a superfície do material e os substratos presentes durante a adesão e o desenvolvimento do biofilme podem influenciar o tratamento clínico. Para isso, corpos de prova foram submersos diferentes sistemas (solução salina tamponada com fosfato, saliva artificial, soro fetal bovino e saliva artificial + soro fetal bovino). Os biofilmes foram formados sobre os espécimes e incubados por 8, 24 e 48 horas (fases inicial, intermediária e de maturação). A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de microdiluição em caldo e a atividade metabólica dos biofilmes foi testada por ensaio colorimétrico. Além disso avaliaram a viabilidade celular, a biomassa relativa e a espessura do biofilme por microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados demonstram que biofilmes tratados com fluconazol e anfotericina B foram parcialmente inibidos de maneira dose-dependente. A Nistatina inibiu a atividade

metabólica a partir de 62,5 µg/mL. Variações na biomassa relativa e espessura foram observadas dependendo das fases de desenvolvimento dos biofilmes, e a porcentagem de células inviáveis foi constante ao longo da formação dos biofilmes. Os autores sugerem que fluconazol e anfotericina B foram capazes de reduzir a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*, porém Nistatina foi mais eficaz.

Alomeir *et al.*⁵⁵ (2023) avaliaram o efeito da Nistatina em biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*. Os biofilmes foram formados em discos de hidroxiapatita revestidos de saliva. Entre 20 e 68 horas, os biofilmes foram tratados com 28.000 UI de solução de NIS, 5 minutos/aplicação, 4 vezes/dia, para mimetizar a aplicação clínica. A estrutura tridimensional do biofilme foi avaliada por microscopia confocal e a expressão dos genes de virulência de *C. albicans* e *S. mutans* foi avaliada por PCR em tempo real. Os resultados demonstram que o tratamento com a substância eliminou totalmente *C. albicans* em biofilmes após 44 horas, e reduziu a abundância de *S. mutans* em 0,5 log UFC/ml após 44 h ($p < 0,05$). O tratamento também reduziu o peso seco do biofilme. Os autores sugerem que a distribuição de biomassa foi alterada pelo tratamento, resultando em menos volume nas camadas de substrato em biofilmes tratados com Nistatina em comparação com o controle. A redução do tamanho e volume das microcolônias também foi observada. Os autores sugerem que a aplicação da substância alterou as características dos biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans*.

3.3 Terapias Alternativas para Inativação de Microrganismos e/ou biofilmes

Panariello *et al.*⁵⁶ (2019) avaliaram a eficácia das enzimas DNase e β -glucanase, individualmente ou em combinação, associadas à Terapia fotodinâmica (aPDT) sobre os componentes da matriz do biofilme de cepas de *C. albicans* suscetíveis (S) e resistentes ao fluconazol (R). Os autores sugerem que apesar da utilização da aPDT para a inativação de microrganismos, essa alternativa não demonstra tantos efeitos quando estes estão incorporados ao biofilme, e, portanto, a determinação de substâncias capazes de desestruturar o biofilme são importantes para melhorar o desempenho da terapia. Para isso, verificaram em microscópio confocal a penetração de fotossensibilizador (PDZ) em biofilmes tratados previamente ou não com DNase em diferentes períodos de incubação. Os resultados obtidos pelo estudo demonstram que a DNase apresentou os melhores resultados, reduzindo o

DNA extracelular (eDNA) e as proteínas solúveis da matriz de ambas as cepas; e polissacarídeos solúveis em água da matriz CaR. Ao associar a enzima com a terapia fotodinâmica mediada por PDZ, os resultados demonstram que a penetração do PDZ em camadas mais profundas do biofilme foi favorecida pelo tratamento prévio com a enzima, de forma que o efeito do aPDT foi potencializado ao reduzir a viabilidade e a quantidade de eDNA.

Abreu-Pereira *et al.*⁵⁷ (2022) avaliaram a eficácia da enzima DNase combinada com aPDT mediada por Photodithazine, contra biofilmes formados por uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901) e dois isolados clínicos (R14 e R70). Os biofilmes maduros foram expostos à DNase por 5 minutos, seguido de aplicação de PDZ e luz, isoladamente ou combinados. Os autores realizaram a análise do biofilme por meio da quantificação dos componentes da matriz extracelular (polissacarídeos solúveis e insolúveis em água, proteínas e DNA extracelular) e da biomassa (total e insolúvel), bem como a quantificação das unidades formadoras de colônias. Os resultados demonstram que o tratamento com DNase combinado com aPDT mostrou redução da viabilidade celular de para todas as amostras analisadas (cepa padrão resistente ao fluconazol e os dois isolados clínicos). Os tratamentos foram eficazes na redução de polissacarídeos solúveis em água (36,3%) e DNA extracelular (72,3%), bem como o conteúdo de biomassa insolúvel (43,3%). Os autores sugerem a eficácia do tratamento, visto que a combinação da enzima à aPDT foi capaz de reduzir componentes da matriz extracelular nas três cepas avaliadas, incluindo isolados clínicos.

3.4 Uso de Compostos Naturais Medicinais para Inativação de Microrganismos e/ou Biofilmes

Macros-Arias *et al.*⁵⁸ (2011) avaliaram 8 derivados terpênicos (carvacrol, farnesol, geraniol, linalol, mentol, mentona, terpinen-4-ol e α -terpineol), um fenilpropanóide (eugenol), um álcool fenetílico (tiroso) e sobre microrganismos *C. albicans* isolados de próteses dentárias, por meio do método de microdiluição em caldo. O objetivo foi testar a atividade antifúngica *in vitro* de constituintes puros de óleos essenciais, visando o controle de estomatite protética. A concentração inibitória mínima encontrada para cada substância foi 0,03-0,25% para eugenol e linalol, 0,03-0,12% para geraniol, 0,06-0,5% para mentol, α -terpineol e terpinen-4-ol, 0,03-0,5% para carvacrol e 0,06-4% para mentona. Com exceção do farnesol, mentona e tiroso,

os compostos demonstraram atividade *in vitro* contra os isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Os autores sugerem que as atividades fungistáticas e fungicidas das substâncias podem torná-las em alternativas promissoras para o tratamento tópico de candidíase oral e estomatite protética.

Raut *et al.*⁵⁹ (2013) avaliaram 28 terpenóides de origem vegetal quanto à sua atividade sobre biofilmes de *C. albicans*. A motivação dos autores relaciona-se às infecções causadas pelo microrganismo, e pela crescente resistência medicamentosa associada. Os autores sugerem que são necessárias moléculas que possam prevenir ou erradicar biofilmes, visto que são cruciais para a virulência do microrganismo. Dezoito moléculas exibiram concentrações inibitórias mínimas menores que 2 mg/ml para o crescimento planctônico. Moléculas selecionadas inibiram a morfogênese de levedura para hifa em baixas concentrações e impediram a adesão a uma superfície sólida. 14 terpenóides causaram a inibição significativa ($p < 0,05$) da formação de biofilme. 8 terpenóides foram identificados como inibidores de biofilmes maduros. Dessa forma, os autores sugerem o potencial antibiofilme dos terpenóides como estratégia terapêutica contra infecções associadas ao biofilme de *C. albicans*.

Solimini *et al.*⁶⁰ (2017), por meio de uma revisão de literatura, sugeriram o efeito antimicrobiano apresentado por canabinóides sintéticos (SCs), que são compostos psicotrópicos criados quimicamente em laboratório para imitar a atividade cerebral canabinérgica do delta-9 tetrahydrocannabinol. Os autores sugerem que os SCs apresentam aspecto fitoterápico capaz de atuar em diferentes áreas do corpo, entre elas na inativação de microrganismos associados a infecções. Dessa forma, o uso de substâncias naturais, entre elas os canabinóides, para o tratamento de infecções microbianas é amplamente explorado.

Aziz *et al.*²⁰ (2018) discutiram o uso de óleos essenciais, sobre a composição química, métodos de extração e aplicação nas áreas farmacêutica e terapêutica. Diante dos vários métodos utilizados para sua extração, os quais determinam as propriedades biológicas e físico-químicas dos óleos essenciais, os autores elencaram diferentes métodos avançados (extração com fluido supercrítico, extração com líquido subcrítico e extração por micro-ondas sem solventes) e convencionais (hidrodestilação, destilação a vapor, hidrodifusão e extração com solventes) quanto aos benefícios proporcionados às substâncias. Os autores sugerem que os métodos avançados são considerados as técnicas de extração mais promissoras, relacionados ao menor tempo de extração, baixo consumo de energia, baixo uso de solvente e

menor emissão de dióxido de carbono. Os autores demonstram o potencial dos óleos essenciais a partir de seu uso como agentes anticancerígenos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antivirais e intensificadores de permeação da pele, e sugerem, portanto, que o método de extração é crucial para a eficácia das substâncias.

Cattò *et al.*⁶¹ (2019) consideraram a necessidade de terapias alternativas frente aos atuais fungicidas químicos fortemente presentes no mercado, os quais geram preocupações sobre a sua eficácia diante dos biofilmes, o risco que representam para a saúde humana e a incidência de resistência aos fungicidas. Os autores utilizaram os óleos essenciais das folhas de duas espécies de *Perilla frutescens* (PK e PK-IK) para verificar a capacidade de afetar a formação de biofilme fúngicos de *Colletotrichum musae*, *Fusarium dimerum* e *Fusarium oxysporum*. Os resultados apresentados pelos autores demonstram que os óleos essenciais nas concentrações de 1.000 e 2.000 mg/L apresentaram desempenho anti-biofilme ao reduzir a adesão e germinação de conídios. Além disso as substâncias se mostraram capazes de afetar o desenvolvimento estrutural do biofilme ao reduzir o peso seco de e a quantidade de polissacarídeos e proteínas extracelulares da estrutura. Os autores sugerem a eficácia dos óleos essenciais de *Perilla frutescens* em biofilmes fúngicos, tornando-os alternativas promissoras para o tratamento de infecções associadas.

Ramsey *et al.*⁶² (2020), em uma revisão da literatura, sugeriram o aumento da popularidade dos óleos essenciais, os quais são encontrados em diferentes produtos, incluindo aromatizantes de alimentos, sabonetes, loções, xampus, colônias, detergentes para a roupa e até mesmo repelentes de insetos. Estas substâncias complexas são compostas por centenas de componentes que podem variar muito dependendo do processo de extração ou da origem da planta. Os autores elencaram os benefícios dos óleos essenciais para a saúde, bem como alguns de seus efeitos adversos. Com isso, sugerem que os óleos essenciais, bem como alguns de seus componentes individuais, possuem propriedades antimicrobianas, antivirais, antibióticas, anti-inflamatórias e antioxidantes, além de supostos efeitos psicogênicos, como aliviar o estresse, tratar a depressão e ajudar na insônia.

Lobo *et al.*⁶³ (2021) avaliaram o efeito de seis compostos sobre a atividade de fungos e bactérias, sendo eles α -farnesol (álcool sesquiterpênico que diminui a acidogenicidade e aciduricidade da bactéria e uma molécula fúngica), miricetina (flavonóide que interfere na produção de exopolissacarídeos de *S. mutans*), 2'-hidroxichalconas e 4'-hidroxichalcona (metabólitos intermediários para flavonóides,

composto 1771 (inibidor da síntese lipoteicóica em bactérias Gram-positivas). As atividades antimicrobianas e antibiofilme contra culturas de espécies únicas foram avaliadas. A partir disso, as concentrações eficazes em biofilmes de espécie única foram testadas sobre biofilmes de espécies duplas iniciais e pré-formados. Todos os tratamentos selecionados eliminaram ambas as espécies nos biofilmes iniciais. Já em biofilmes pré-formados algumas combinações eliminaram a bactéria e outras o, e somente as combinações 4'-hidroxichalcona+ tt -farnesol+miricetina, 4'-hidroxichalcona+ tt -farnesol+fluoreto foram eficazes contra ambas as espécies. Os autores sugerem que combinações de compostos com alvos distintos podem prevenir o acúmulo de biofilme de duas espécies de *C. albicans* e *S. mutans* in vitro, e, portanto, tornam-se uma abordagem promissora para erradicar biofilmes mistos.

Choonharuangdej *et al.*⁶⁴ (2021) avaliaram a eficácia de dois óleos essenciais (de canela e de capim limão) sobre biofilmes de *C. albicans* formados sobre discos de resina acrílica. Após a determinação da concentração inibitória mínima de cada substância, concentrações 1/2, 1, 2, 4, 8, 16 vezes a concentração inibitória mínima de cada óleo foram avaliadas sobre biofilmes em diferentes tempos de exposição (1, 2, 4, 8 e 24 horas). Em outro ensaio os biofilmes foram formados sobre discos de resina que ficaram 24 h imersos em soluções dos óleos essenciais avaliados. Os resultados demonstram valores de MIC dos óleos essenciais de canela 0,1 µL/mL e capim-limão 0,4 µL/mL contra *C. albicans*. Os óleos de canela e capim-limão erradicaram 99,0% do biofilme após 1 h de exposição na concentração 8 vezes maior que o MIC (0,8 µL/mL e 3,2 µL/mL, respectivamente). Quando os biofilmes foram formados sobre os discos de resina que ficaram imersos em concentrações 8 e 16 vezes maior que o MIC, os óleos essenciais foram capazes de inibir a formação de biofilme fúngico em aproximadamente 70,0%. Os autores sugerem a partir dos resultados que os óleos essenciais de canela e capim-limão podem eliminar o biofilme pré-estabelecido de *C. albicans*, além de restringir a formação de biofilme fúngico sobre resina.

dos Santos *et al.*⁶⁵ (2022) avaliaram o efeito da curcumina encapsulada associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) sobre biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans*, por meio da análise térmica, absorção óptica e espectroscopia de fluorescência. A viabilidade celular dos biofilmes foi avaliada por meio das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e microscopia confocal. Os grupos avaliados na presença de curcumina e irradiados com a luz exibiram melhor redução logarítmica para os biofilmes mistos. Dessa forma, os autores sugerem que aPDT mediada por

curcumina é uma estratégia potencial para controle de biofilme de duas espécies (*S. mutans* e *C. albicans*).

Ribeiro *et al.*⁶⁶ (2023) avaliaram os efeitos de extratos, frações e moléculas de *Casearia sylvestris* no controle do biofilme cariogênico de *S. mutans*. Os tratamentos selecionados foram avaliados por meio de curvas de inibição do crescimento bacteriano associadas à expressão gênica e microscopia eletrônica de varredura. Apenas a molécula *Caseargrewiin F* (CsF; 125 µg/mL) reduziu a contagem de células viáveis de biofilmes pré-formados (5 logs vs. veículo). Para efeitos tópicos, nenhuma formulação afetou os componentes do biofilme. No ensaio de inibição do crescimento, o CsF gerou uma recuperação constante de células sobreviventes até 24 h, caracterizando-se como bacteriostático. As frações acetato de etila (AcOEt) de Brasília (BRA/DF; 250 µg/mL) causou morte celular progressiva, com ausência total de células em 24 h caracterizando-se como bactericida. CsF e AcOEt_BRA/DF danificaram células de *S. mutans* e influenciaram a expressão de genes de virulência. Os resultados demonstram que ocorreu um efeito contra biofilmes após exposição prolongada. Os autores sugerem que isso ocorre devido à capacidade bacteriostática e/ou bactericida de uma fração e de uma molécula de *C. sylvestris*.

Um estudo prévio desenvolvido pelo grupo³⁹ de pesquisa avaliou o efeito de ZER sobre biofilmes de *C. albicans* suscetíveis (CaS) e resistentes ao fluconazol (CaR) a partir da análise dos componentes da matriz extracelular e viabilidade celular dos microrganismos. A concentração inibitória mínima (CIM), a concentração fungicida mínima (CFM) e a curva de sobrevivência foram determinadas. O valor da CIM de ZER para CaS foi de 256 µg/mL e para CaR foi de 64 µg/mL. A curva de sobrevivência e o valor de MFC coincidiram para CaS (256 µg/mL) e CaR (128 µg/mL). Além disso, a eficácia da substância foi avaliada em biofilmes formados por 48 horas e expostos ao ZER nas concentrações de 128 e 256 µg/mL por 5, 10 e 20 minutos (n = 12). Os biofilmes foram avaliados para determinar a viabilidade celular (UFC/mL) e os componentes da matriz extracelular: polissacarídeos solúveis em água (WSP), polissacarídeos solúveis em álcalis (ASPs), proteínas e DNA extracelular (eDNA), bem como a biomassa (total e insolúvel) foram quantificados. ZER reduziu a viabilidade celular em 38,51% para CaS e em 36,99% para CaR. ZER a 256 µg/mL também reduziu a biomassa total (57%), biomassa insolúvel (45%), WSP (65%), proteínas (18%) e eDNA (78%) de biofilmes CaS. Além disso, uma redução na biomassa insolúvel (13%), proteínas (18%), WSP (65%), ASP (10%) e eDNA (23%)

também foi observado nos biofilmes de CaR. Foi sugerido que ZER foi eficaz contra biofilmes de *C. albicans* resistentes e suscetíveis ao fluconazol e perturbou a matriz extracelular.

Moreira da Silva *et al.*³⁸, investigaram a atividade antimicrobiana de ZER contra o agente cariogênico *S. mutans*. Para isso, ZER foi extraído por hidrodestilação e submetido ao processo de purificação e recristalização. A pureza de ZER foi determinada por meio de análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Então, diferentes concentrações de ZER foram testadas contra a cepa padrão *S. mutans* (ATCC 35668) utilizando o método de microdiluição. A citotoxicidade do ZER foi avaliada utilizando a linhagem celular por meio do ensaio MTT. ZER apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 250 µg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 500 µg /mL contra *S. mutans*. Após seis horas de interação, todas as concentrações testadas começaram a matar as bactérias e todas as bactérias foram mortas entre 48 e 72 horas na concentração de 500 µg/mL (99,99%). ZER não apresentou atividade de citotoxicidade na linhagem de células contínuas de mamíferos. Os autores sugerem o potencial do ZER sobre a bactéria *S. mutans*.

Os autores Shin e Eom³³, em 2019, avaliaram a ação do ZER contra a formação de biofilme de *C. albicans* por meio da exposição dos biofilmes à substância desde o início de sua formação, e exposição de biofilmes maduros à substância, a partir da determinação da atividade metabólica dos microrganismos. Os resultados sugerem que ZER possui atividade antifúngica e antibiofilme, capaz de inibir a formação de biofilme e erradicar o biofilme pré-formado. ZER reduziu consideravelmente o conteúdo de carboidratos e DNA da matriz do biofilme e afetou o crescimento de hifas de *C. albicans*. Além disso, a substância foi capaz de regular os níveis de expressão de genes relacionados ao biofilme e específicos de hifas, incluindo HWP1 e ALS3. Os autores sugerem que, por inibir a formação de biofilmes e o crescimento das hifas de *C. albicans*, a substância pode ser um candidato potencial para tratar e prevenir infecções relacionadas a esse biofilme.

Ainda em 2019, Shin e Eom³⁵ publicaram outro estudo que descreveu a eficácia de ZER na formação de biofilme de duas espécies (*C. albicans* e *S. aureus*, patógenos oportunistas mais comuns que coexistem em biofilmes mistos). Os autores avaliaram os efeitos inibitórios do ZER no crescimento, adesão e formação de biofilme de células planctônicas. Os resultados demonstraram que ZER inibiu notavelmente os biofilmes de espécies mono e duplas formados por *C. albicans* e *S. aureus* por meio do ensaio

XTT. Além disso, foi observada diminuição significativa na biomassa e na densidade celular de biofilmes de duas espécies após o tratamento, confirmada por meio da microscopia confocal de varredura a laser. Os autores sugerem que ZER é um potencial agente antimicrobiano e antibiofilme indicado para o manejo terapêutico de infecções relacionadas a biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.

Girisa *et al.*⁶⁷ (2019) por meio de uma revisão resumiu os modos de ação e o potencial terapêutico de ZER contra diferentes tipos de câncer. Apesar dos avanços no tratamento convencional para o câncer, terapias eficazes são investigadas devido à falta de seletividade, efeitos colaterais adversos, não toxicidades específicas e recorrência do tumor. Os autores relataram que vários fitoquímicos de fontes naturais exibem propriedades medicinais benéficas contra diferentes doenças humanas, e entre eles estão o ZER, que possui diversas propriedades farmacológicas, incluindo antioxidantes, antibacterianas, antipiréticas, antiinflamatórias, imunomoduladoras e também antineoplásicas. Os autores sugerem os efeitos anticancerígenos do ZER são devido à capacidade de causar supressão significativa da proliferação, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase por meio da modulação molecular de diferentes vias, como NF- κ B, Akt e IL-6/JAK2/STAT3 (interleucina-6 /janus quinase-2/transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) e suas proteínas alvo a jusante. Dessa forma, o potencial de ZER em terapias anticâncer fica evidenciado.

Kim *et al.*³⁷ (2020) avaliaram o uso potencial de ZER como agente anti-biofilme e/ou anti-virulência contra *Acinetobacter baumannii*, um patógeno oportunista multirresistente que afeta pacientes com sistema imunológico comprometido e está associado a infecções de origem hospitalar. Doses subinibitórias diminuíram a formação de biofilme e desestruturaram os biofilmes maduros de *A. baumannii*, avaliados por meio de placas de microtitulação e microscopia confocal de varredura a laser. A eficácia do ZER sobre os biofilmes foi dependente da dose. No geral, os autores sugerem que ZER pode ser um agente bioativo promissor para o tratamento de infecções relacionadas ao biofilme e à virulência causadas por *A. baumannii* multirresistente, visto que a substância interferiu significativamente na motilidade de *A. baumannii* e a análise transcricional revelou que ZER regulou negativamente a expressão de genes associados ao biofilme e à virulência em *A. baumannii*.

Woo *et al.*⁶⁸ (2021) avaliaram a capacidade de ZER em inibir a atividade da urease de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) pela formação de dímeros, trímeros ou tetrameros de urease. Os resultados demonstram que ZER dimerizou, trimerizou ou

tetramerizou com as moléculas de urease A e urease B de *H. pylori*, e que esta formação inibiu a atividade da urease. Os autores sugerem que ZER poderia efetivamente dimerizar com ambas as moléculas causando inibição funcional significativa da atividade da urease. Dessa forma, os autores sugerem que ZER pode ser um inibidor eficaz da urease do *H. pylori* que pode ser adequado para uso terapêutico em humanos.

Tojima *et al.*⁶⁹ (2021) avaliaram a hipótese de que ZER suprime a hipertrofia cardíaca e a fibrose *in vitro* e *in vivo* por meio da análise dos efeitos de ZER na hipertrofia induzida pela fenilefrina (PE) e nas respostas fibróticas induzidas pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Para tal, camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos e administrados oralmente com ZER 20 mg/kg por 8 semanas e a função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia. A análises da ecocardiografia determinaram que o encurtamento fracional do ventrículo esquerdo estava aumentado e a espessura da parede estava reduzida no grupo ZER em comparação com o grupo veículo. A análise histológica mostrou que a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão e a fibrose cardíaca foram inibidas no grupo ZER em comparação com o grupo veículo. Os autores sugerem, portanto, que ZER melhora a disfunção cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão ao suprimir a hipertrofia cardíaca e a fibrose.

Memari *et al.*⁷⁰ (2022) sugerem um uso potencial de ZER para induzir apoptose e suprimir metástases em células HT-29^o associadas ao câncer colorretal (CCR). Os autores sugerem que os medicamentos à base de plantas e, em particular, ZER têm sido amplamente estudados e utilizados em terapias anticâncer, uma vez que induzem efeitos anticancerígenos significativos. Os autores avaliaram os efeitos anticancerígenos *in vitro* do ZER no CCR, com foco na apoptose e migração celular usando o ensaio MTT. Além disso, o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado para determinar os níveis de expressão de mRNA dos genes relacionados à migração e à apoptose. Os resultados apontam que ZER induziu apoptose em células HT-29 e interrompeu o ciclo celular na fase G2/M. Além disso, o ZER inibiu significativamente a migração de células HT-29 e diminuiu a expressão e atividade do mRNA da MMP-2/-9, demonstrando seu potencial anticâncer.

Alsaffar *et al.*⁷¹ (2023) avaliaram as propriedades anti-inflamatórias de ZER no diagnóstico de artrite induzida por colágeno (CIA) em animais experimentais. Os resultados sugeriram que a substância reduziu a gravidade clínica em animais

induzidos por CIA em comparação com animais saudáveis, além de reduzir significativamente ($p < 0,001$) a concentração de moléculas de citocinas inflamatórias. Os autores sugerem que o potencial terapêutico do ZER está associado à restauração da histologia normal na cartilagem e nos tecidos. Além disso, os resultados relatados pelos autores determinam que ZER não apresenta propriedades tóxicas como hepatotoxicidade, imunotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade. Dessa forma, os autores sugerem o potencial da substância como anti-inflamatório natural.

Urla *et al.*⁷² (2023) utilizaram duas linhagens celulares de rabdomiossarcoma (RD e RH30) como modelo para determinar o efeito *in vitro* de ZER nas células, por meio de ensaio MTT, apoptose via citometria de fluxo, expressão gênica por PCR em tempo real, migração por ensaio transwell e sinalização intracelular por Western blotting. Os resultados determinam que ZER possui efeitos anticancerígenos nas células RD e RH30 de uma maneira dependente da dose por meio da inibição do crescimento celular e indução de apoptose. Os autores sugerem que ZER proporcionou efeitos inibitórios e apoptóticos nas linhagens celulares de rabdomiossarcoma pediátrico e, portanto, se torna um candidato promissor para a terapia anticâncer.

4 MATERIAL E MÉTODO

A lista de materiais utilizados no desenvolvimento do presente estudo, bem como a metodologia detalhada dos experimentos estão representados a seguir.

4.1 Material

Os materiais de consumo, instrumentais e equipamentos utilizados para a realização de todas as etapas deste trabalho estão listados na sequência.

4.1.1 Materiais de consumo

- Ácido Sulfúrico (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Água destilada (Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Limitada, São Paulo, Brasil);
- Água Mili-Q (Mega Purity, Billerica, USA);
- Alça de inoculação 10 µL (Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália);
- Alça estéril de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
- Álcool 70% (Itajá, Goianésia, Goiás, Brasil);
- Álcool 90 % (Itajá, Goianésia, Goiás, Brasil);
- Álcool Isoamílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Álcool Isopropílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Bastão refil de cola quente;
- Cepa de *C. albicans* resistente a fluconazol, ATCC 96901 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA);
- Cepa padrão de *S. mutans* UA159;
- Cloranfenicol Levigoro (Alamar Tecno-Científica Ltda);
- Clorexidina 2,0% (Manipulada em Farmácia Universitária – UNESP, Araraquara, SP, Brasil);
- Cloreto de Potássio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Sódio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Cubetas para leitura em espectrofotômetro (Semperlab, Araraquara, São Paulo, Brasil);

- D-Glicose Anidra (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO), pureza 99,9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Fenol 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Fosfato de Potássio -KH₂ PO₄ (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Gesso pedra tipo III Herodent (Vidogent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Isolante Para Resina Acrílica Cel-Lac (SS White, São Cristóvão, Rio de Janeiro, Brasil);
- Matriz pré-confeccionada para obtenção dos corpos de prova de resina acrílica, com diâmetro de 10 mm e espessura de 2 mm (Araraquara, SP, Brasil);
- Meio de cultura Bacto Tryptone (BD Biosciences Advanced Bioprocessing, Miami, FL, EUA);
- Meio de cultura Bacto Yeast Extract (BD Biosciences Advanced Bioprocessing, Miami, FL, EUA);
- Meio de cultura Brain Heart Infusion Broth for microbiology BHI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA);
- MOPS Purificado (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Mufla acrílica própria para micro-ondas, STG (VIPI, Blumenau, SC, Brasil);
- Nistatina (NYS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Parafilm (Laboratory film 38 m X 10 cm) (BOECO, Hamburgo, Alemanha);
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA);
- Placas de 24 poços (Kasvi, K12-024, Pequim, China);
- Placas de 96 poços (Kasvi, K12-096, Pequim, China);
- Placas de Petri 90 X 15 mm (Pleion, Barueri, São Paulo, Brasil);
- Placas de vidros jateados com óxido de alumínio com rugosidade de aproximadamente 3,0 µm (Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil);
- Ponteira para micropipeta (100-10000 µL) (Kasvi, Pequim, China);
- Ponteira para micropipeta (20-200 µL) (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil);
- Ponteira para micropipeta 5 mL (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil);
- Ponteira para repetidora (1 mL) (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);

- Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Resina acrílica para base de prótese, termicamente ativada, cor rosa médio, específica para micro-ondas (VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda.)
- Sulfato de Magnésio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Tubo tipo Eppendorf 2 mL (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil);
- Tubo tipo FALCON cônico (15 mL) (Biogen, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Tubo tipo FALCON cônico (50 mL) (Biogen, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Tubos de vidro 10x2x5 (Semperlab, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Yeast Nitrogen Base (YNB) (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA)
- Zerumbone (ZER) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA – código Sigma Z3902).

4.1.2 Instrumentais

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Compasso de Ponta Seca (Orto Central, São Paulo, SP, Brasil);
- Espátula Dupla 7 (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil);
- Faca para gesso (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil);
- Garrafas de vidro graduadas (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Graal de plástico para espátulação de gesso (JOX, São Paulo, SP, Brasil);
- Micropipeta de 0,5-10 µL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 100-1000 µL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 20-200 µL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de repetição (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Pipetador Automático para pipetas de 0,1 a 200 mL (Fisherbrand Sciences, EUA)
- Pote Paladon de vidro com tampa (Nova OGP Indústria e Comércio EIRELI, Curitiba, Bragança Paulista, São Paulo, Brasil);
- Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Régua Endodôntica Milimetrada Calibradora (Mk Life, Porto Alegre, RS, Brasil);

4.1.3 Equipamentos

- Agitador Orbital (TE-420, Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, São Paulo, Brasil);

- Agitador tipo vórtex (Modelo A162) (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. No 6614 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Balança de precisão Modelo: BG 400. N° 016450 (GEHAKA – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, Brasil);
- Banho Maria (Modelo 1102) (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil);
- Banho seco para microtubos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA);
- Câmara de fluxo laminar vertical (Pachane Indústria e Comércio Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
- Centrífuga para microtubos (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Dissecador de amostras (RVC 2–18 CD plus, Christ, Osterode am Harz, Alemanha);
- Espectrofotômetro (Kasvi, Pequim, China);
- Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Estufa bacteriológica (Modelo MA 0324) (Marconi Equipamentos Laboratóriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
- Estufa de CO₂ (Modelo 3100) (Thermo Scientific, Marietta, Ohio, EUA);
- Freezer -20°C (CVU30, Consul, São Paulo, Brasil);
- Freezer -80°C (REVCO, Thermo Scientific, USA);
- Leitor de microplacas tipo ELISA (EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, RU);
- Micro-ondas Brastemp Crisp 27 (Brastemp, Manaus, AM, Brasil);
- Nanoespectrofotômetro (DS-11, DeNovix, United States);
- Phmetro de bancada Q400AS (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Prensa hidráulica PM 2000 (Vipi Delta, Pirassununga, SP, Brasil);
- Rugosímetro Digital SJ 410 Mitutoyo superfícies especiais (Color Trac Ltd, Tóquio, Japão).

4.2 Método

As duas condições experimentais avaliadas no presente estudo, assim como os grupos avaliados estão apresentados nos quadros 1 e 2 a seguir.

Quadro 1 – Grupos experimentais referentes ao ensaio de Inibição da adesão e formação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans*. Neste ensaio, os biofilmes foram formados sobre discos de resina que ficaram imersos por 8 h nas soluções avaliadas.

Grupos	Tratamentos realizados
ZER 256	Biofilmes formados sobre superfícies previamente expostas ao ZER na concentração de 256 µg/mL ³⁹ . Neste grupo os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica que ficaram imersos em solução ZER de 256 µg/mL por 8 h, a fim de verificar a eficácia da substância em inibir a formação de biofilme por meio do tratamento prévio da superfície.
ZER 512	Biofilmes formados sobre superfícies previamente expostas ao ZER na concentração de 512 µg/mL. Neste grupo os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica que ficaram imersos em solução ZER de 512 µg/mL por 8 h, a fim de verificar a eficácia da substância em inibir a formação de biofilme por meio do tratamento prévio da superfície.
NYS	Biofilmes formados sobre superfícies previamente expostas à nistatina (NYS) na concentração de 250 µg/mL ⁷³ . Neste grupo os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica que ficaram imersos em solução de nistatina de 250 µg/mL por 8 h, a fim de verificar a eficácia da substância nessa concentração em inibir a formação de biofilme por meio do tratamento prévio da superfície.
CLX	Biofilmes formados sobre superfícies previamente expostas à solução de Clorexidina 2,0% (CLX) ⁵² . Neste grupo os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica que ficaram imersos em solução de CLX a 2,0% por 8 h, a fim de verificar a eficácia da substância nessa concentração em inibir a formação de biofilme por meio do tratamento prévio da superfície.
C-	Amostras controles de crescimento microbiano (sem intervenção de nenhum antimicrobiano). Neste grupo os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica que ficaram imersos em água pelo período de 8 h, a fim de avaliar se o crescimento microbiano estava ocorrendo em todos os experimentos e para verificar a eficácia dos tratamentos realizados comparados aos controles.

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 2 – Grupos experimentais referentes ao ensaio de Erradicação de biofilmes mistos maduros de *C. albicans* e *S. mutans*. Neste ensaio os biofilmes foram formados sobre discos de resina sem intervenção prévia no mesmo, e após 48 h de formação, os biofilmes foram expostos às soluções avaliadas por 20 min sob agitação orbital.

Grupos	Tratamentos realizados
ZER 256	Biofilmes maduros de 48 h foram expostos ao ZER na concentração de 256 µg/mL ³⁹ . Neste grupo os biofilmes foram tratados com ZER 256 µg/mL por 20 minutos, sob agitação orbital, a fim de verificar a eficácia da substância nessa concentração em diminuir a viabilidade celular e os componentes do biofilme formados.
ZER 512	Biofilmes maduros de 48 h expostos ao ZER na concentração de 512 µg/mL. Neste grupo os biofilmes maduros foram tratados com ZER 512 µg/mL por 20 minutos, sob agitação orbital, a fim de verificar a eficácia da substância nessa concentração em diminuir a viabilidade celular e os componentes dos biofilmes formados.
NIS	Biofilmes maduros de 48 h expostos à NYS na concentração de 250 µg/mL ⁷³ . Neste grupo os biofilmes maduros foram tratados com nistatina a 250 µg/mL por 20 minutos, sob agitação orbital, a fim de verificar a eficácia da substância na viabilidade celular e sobre os componentes dos biofilmes.
CLX	Biofilmes maduros de 48 h expostos à CLX 2,0% ⁵² . Neste grupo os biofilmes maduros foram tratados com CLX 2,0% por 20 minutos, sob agitação orbital, a fim de verificar a eficácia da substância na viabilidade celular e nos componentes dos biofilmes.
C-	Amostras controles de crescimento microbiano (sem intervenção de nenhum antimicrobiano). Neste grupo as amostras foram expostas a solução salina tamponada com fosfato (PBS) pelo tempo de 20 minutos sob agitação orbital, a fim de avaliar se o crescimento microbiano estava ocorrendo em todos os experimentos e para verificar a eficácia dos tratamentos realizados comparados aos controles.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.1 Confeção e padronização dos corpos de prova de resina acrílica

Previamente à realização dos ensaios microbiológicos os corpos de prova foram fabricados e padronizados quanto à rugosidade^{74,75}. Para a confecção dos corpos de provas da resina acrílica foram utilizadas matrizes de metal com orifícios de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

A inclusão das matrizes nas muflas foi realizada com gesso pedra tipo III, proporcionado de acordo com as recomendações do fabricante em gral de borracha, utilizando uma espátula para gesso. Após a manipulação do gesso, a parte inferior da mufla foi preenchida. Então, a matriz metálica foi posicionada centralizada sobre uma placa de vidro jateado com óxido de alumínio com dimensões de 4,0 cm x 4,0 cm x 0,5 cm. Antes da presa total do gesso, o conjunto foi pressionado contra o material com o auxílio de uma placa de vidro plana, para garantir a inserção da matriz de maneira uniforme.

Após a presa do gesso com a matriz posicionada, todo o conjunto foi recoberto com uma camada de isolante para gesso e outra placa de vidro jateado com óxido de alumínio (4,0 cm x 4,0 cm x 0,5 cm) foi posicionada sobre a matriz. Essas placas foram previamente jateadas para padronizar a superfície das amostras em aproximadamente 3 µm simulando a superfície interna das próteses. Então, a parte superior da mufla ainda vazia foi posicionada sobre a parte inferior e preenchida com nova porção de gesso pedra tipo III. A mufla com as partes inferior e superior preenchidas foi mantida em prensa hidráulica com 0,5 toneladas de pressão até a presa total do gesso.

A resina acrílica termicamente ativada da marca VIPI Wave foi utilizada para a confecção dos corpos de prova utilizados no presente estudo. Foi aplicado isolante para resina acrílica (Cel-Lac) em toda a superfície interna da mufla com o auxílio de um pincel. A resina foi preparada por meio da mistura do pó ao monômero na proporção indicada pelo fabricante, sendo 14 gramas de pó para 6,5 mL de líquido. A mistura foi realizada com o auxílio de uma espátula 7 em um pote de vidro com tampa. Na fase plástica, a mistura foi adicionada à mufla até o recobrimento total da matriz metálica. Então, a mufla foi fechada com 4 parafusos e posteriormente prensada em prensa hidráulica por 5 minutos com 1,5 toneladas. Após a prensagem a mufla foi levada ao micro-ondas por 2,5 minutos em potência alta, seguindo as recomendações do fabricante.

Após a polimerização da resina em micro-ondas foi aguardado o resfriamento do conjunto para a desinclusão dos corpos de prova. Os corpos de prova foram então removidos da mufla, recortados com o auxílio de uma tesoura para remover as rebarbas e armazenadas em água esterilizada por 48 horas para a liberação dos monômeros residuais.

A rugosidade superficial de cada corpo de prova (n=120) foi verificada em rugosímetro (SJ 400; Mytutoyo Corp), e padronizada entre 2,7 e 3,7 μm^{74} . As medidas foram realizadas na área central de cada corpo de prova em intervalos de 2,0 mm. A resolução foi de 0,01 μm , o intervalo (comprimento de corte) foi de 0,8 mm, o comprimento transversal foi de 2,4 mm e a velocidade da caneta foi de 0,5 mm/segundo⁷⁵. Cada medida foi realizada em triplicata e a média de Ra foi utilizada para a análise estatística. As amostras que não apresentavam rugosidade dentro dos parâmetros determinados foram descartadas.

Previamente a cada ensaio os discos utilizados foram esterilizados em luz ultravioleta em capela de fluxo de laminar por 1 hora alternando entre as duas faces⁷⁶.

4.2.2 Preparo das soluções de tratamento

As soluções contendo a substância Zerumbone (ZER) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram preparadas previamente a cada experimento nas concentrações de 256 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antifúngica do ZER na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$ foi comprovada previamente³⁹, e o dobro da concentração (512 $\mu\text{g/mL}$) foi sugerido no presente estudo, uma vez que um biofilme mais complexo foi avaliado. O ZER foi adquirido na forma de cristal (10mg) e foi dissolvido em 1mL de DMSO PA (99,99%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) conforme as orientações do fabricante. Posteriormente, as diluições para as concentrações a serem utilizadas foram feitas com água destilada a partir da solução 10 mg/mL utilizando a fórmula de razões entre concentração inicial e final ($C1 \times V1 = C2 \times V2$).

Como controle foi utilizada solução de Nistatina (NYS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Clorexidina 2,0% (CLX) (Farmácia Universitária UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil). NYS foi preparada na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ por meio da diluição em DMSO 1% a partir de uma solução de 10 mg/mL com o uso da fórmula de razões entre concentração inicial e final ($C1 \times V1 = C2 \times V2$). Os grupos para controle de crescimento microbiano foram tratados apenas com água destilada esterilizada.

4.2.3 Cultivo dos microrganismos

As cepas de *C. albicans* ATCC96901 (resistente ao fluconazol) e *S. mutans* UA159, armazenadas a -80° C, foram descongeladas e plaqueadas em placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) suplementado com cloranfenicol (50 mg/L) para *C. albicans*³⁹ e meio Brain heart infusion (BHI) suplementado com anfotericina B (50 mg/L) para *S. mutans*.

Após 48 h de crescimento a 37°C em CO₂ 5%, o pré-inóculo de cada microrganismo foi conduzido individualmente. Para isso, 5 colônias de *C. albicans* foram inoculadas em 10 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB) e incubadas por 16 h³⁹, e 5 colônias de *S. mutans* foram inoculadas em 10 mL de Tryptone com Yeast Extract medium (TYE+1% glicose) e incubadas por 18 h a 37 °C em estufa de CO₂ 5%. Após, os inóculos foram formados a partir de diluições de 1:20 de cada cultura em seus respectivos meios e, então, os microrganismos cresceram até atingirem a fase mid-log de crescimento que corresponde as seguintes absorbâncias verificadas em espectrofotômetro: *C. albicans*: OD 600 nm: 0,74 ±0,03 ajustado em 1,0E+07 UFC/mL e *S. mutans* OD 600 nm: 0,684 ±0,079 ajustado em 1,0E+07 UFC/mL.

4.2.4 Tratamentos dos biofilmes

As duas condições experimentais de tratamento dos biofilmes estão apresentadas a seguir.

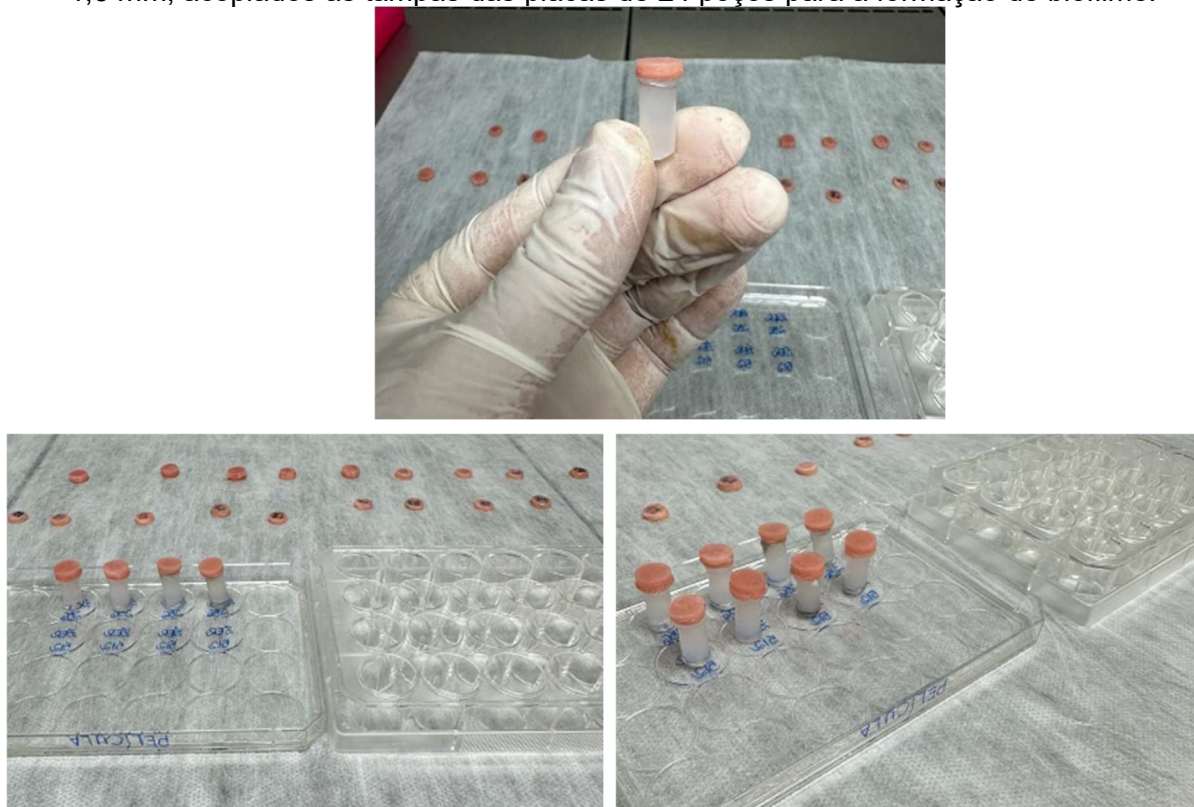
4.2.4.1 Efeito da ZER na inibição da adesão e formação dos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans*

Nesta etapa foi avaliada a capacidade da substância em inibir a formação de biofilme por meio do tratamento prévio das superfícies de discos de resina que simulam a base da prótese.

Para isso, os discos de resina foram acoplados às tampas de placas de 24 poços utilizando bastões de cola quente seccionados em 1,5 cm, os quais foram posicionados na tampa de cada placa. Os discos permaneceram suspensos, de maneira que não tocassem o fundo da placa e estivessem centralizados em cada poço, e então o conjunto foi novamente esterilizado em luz ultravioleta. (Imagem 1).

Após, os discos foram imersos em soluções por 8 h, simulando a imersão noturna da prótese, e os biofilmes foram formados sobre essa superfície tratada (Imagem 2).

Imagem 1 – Discos de resina sobre bastões de cola quente previamente seccionados em 1,5 mm, acoplados às tampas das placas de 24 poços para a formação de biofilme.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Imagem 2 – Discos de resina sobre bastões de cola quente previamente seccionados em 1,5 mm, acoplados às tampas das placas de 24 poços após a imersão em solução por 8 h.

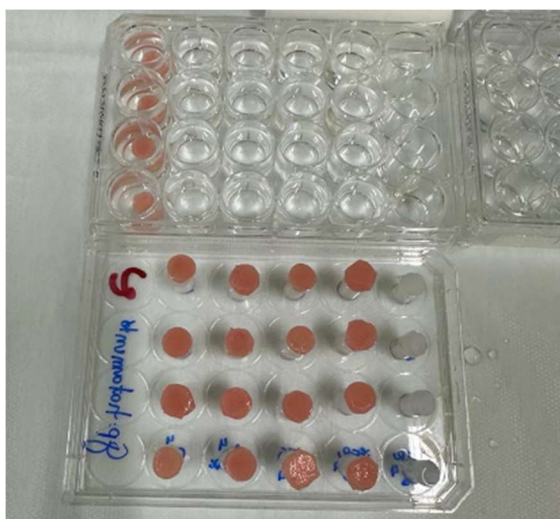


Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Em seguida, 1 mL do inóculo de cada microrganismo (*C. albicans* e *S. mutans*) foram adicionados aos poços para formação do biofilme misto, na presença do meio de cultura Tryptone com Yeast Extract suplementado com glicose 1%. As tampas das placas em que os discos de resina estavam fixados foram unidas às placas, e estas foram então incubadas por 8 h a 37 °C em CO₂ 5% para a fase de adesão. Após a fase de adesão, foi realizada a lavagem dos biofilmes formados sobre os discos de resina com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e troca do meio de cultura por meio fresco (TYE + glicose 1%) e o biofilme permaneceu em overnight por mais 8 h a 37 °C em CO₂ 5%. Trocas do meio foram conduzidas a cada 8h alternando a suplementação entre glicose e sacarose até obter um biofilme maduro de 48 h. As trocas do meio de cultura e a suplementação com glicose e sacarose foram realizadas nos tempos: 8h; 24h; 32h; 40h; 48h. Grupos controle sem tratamento (C-), contendo NYS (C+) e CLX também foram avaliados.

Após 48h do início da formação do biofilme, os dispositivos de resina acrílica foram lavados com PBS (200 µL) e posteriormente desprendidos das placas dentro dos respectivos poços (Imagem 3). Foram acrescentados 2 mL de NaCl 0,89% e os dispositivos foram raspados com o auxílio de uma ponteira esterilizada (parte traseira) para remoção do biofilme aderido. O conteúdo foi então armazenado em microtubos de 2 mL para as análises posteriores.

Imagem 3 – Discos de resina desprendidos dos bastões de cola quente em seus respectivos poços para raspagem e remoção do biofilme.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

A eficácia do ZER na inibição da adesão e formação de biofilmes sobre os discos de resina foi avaliada a partir da contagem de colônias viáveis após plaqueamento (UFC/mL) e análise dos componentes do biofilme. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e em três ocasiões distintas (n=12).

4.2.4.2 Efeito do ZER na erradicação de biofilmes formados sobre os discos de resina

Para avaliar a eficácia do ZER na inativação do biofilme formado, os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica sem a imersão prévia nas substâncias avaliadas. Para isso, os discos foram acoplados às placas logo após a esterilização e os biofilmes de 48 horas foram formados, conforme descrito previamente. Após a formação dos biofilmes mistos maduros, estes foram submetidos ao contato com ZER nas concentrações de 256 e 512 µg/mL por 20 minutos e mantidos em estufa de agitação orbital durante o período de tratamento³⁹. Após os tratamentos, os biofilmes aderidos aos dispositivos de resina foram lavados com solução salina PBS (200 µL), posteriormente, os mesmos foram desprendidos das placas dentro dos respectivos orifícios e 2 mL de NaCl 0,89% foram adicionados para a remoção do biofilme aderido com o auxílio de uma ponteira esterilizada, conforme descrito anteriormente.

Grupos controle sem tratamento (C-), contendo NYS (C+) e CLX também foram avaliados. A eficácia do tratamento de biofilmes formados sobre os discos de resina foi conduzida a partir da contagem de colônias viáveis após plaqueamento (UFC/mL) e análise dos componentes do biofilme. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e em três ocasiões distintas (n=12).

4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos

A eficácia dos tratamentos foi avaliada a partir da determinação da atividade antimicrobiana, por meio da contagem de colônias viáveis, bem como dos efeitos sobre os componentes dos biofilmes. Os testes realizados no presente estudo estão apresentados a seguir.

4.2.5.1 Avaliação da viabilidade celular dos microrganismos e dos componentes do biofilme

Após a formação de biofilmes maduros, estes foram lavados 3 vezes com Phosphate buffered saline (PBS) esterilizado. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução salina de NaCl 0,89% em cada orifício e os biofilmes foram cuidadosamente desprendidos dos corpos de prova com o auxílio de uma pinça e uma ponteira de uma pipeta. Esses biofilmes foram transferidos para um microtubo esterilizado. Em seguida, mais 1 mL de NaCl 0.89% foi adicionado nos poços e mais uma vez o disco foi raspado e novamente o volume coletado foi adicionado ao microtubo de 2 mL. Por fim, os biofilmes foram submetidos à sonicação (30 s; 7 w; 190 J)⁷⁷ para o desprendimento das células aderidas.

Após a sonicação o volume de 2 mL foi alíquotado para possibilitar as avaliações relativas à eficácia dos tratamentos realizados. Para isso, 0,1 mL foi separado para a diluição seriada e plaqueamento para realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e mais 0,1 mL foi separado para análise do peso seco total. O restante do volume (1,8 mL) foi centrifugado a 5.500 xg por 10 min a uma temperatura de 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2 mL, onde posteriormente, o volume inicial (1,8 mL) foi separado em alíquotas para análise dos componentes solúveis do biofilme [polissacarídeos solúveis em água - WSP (1 mL), Proteínas (0,15 mL) e DNA extracelular - eDNA (0,65 mL)]. O precipitado celular, com os componentes insolúveis do biofilme, foi mantido no microtubo e ressuspenso em 1 mL de água Mili-Q, tendo alíquotas separadas para quantificação de proteínas totais (0,05 mL) e determinação do peso seco insolúvel e dos polissacarídeos solúveis em álcali – ASP (0,95 mL).

4.2.5.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) foram realizadas para cada amostra em placas de 96 poços, de maneira que cada poço foi preenchido com o volume de 180 μ L de NaCl 0,89%, e então 20 μ L da amostra inicial foi transferida para o primeiro poço, o conteúdo foi misturado com o auxílio da micropipeta puxando e soltando a mistura algumas vezes, e então novamente transferido para o poço adjacente, e assim foi repetido em cada poço até obter a diluição final de 10^{-6} . Foram então plaqueados

25 µL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} , em duplicata, em placas Petri contendo três tipos de meio: meio BHI com anfotericina para contagem de colônias de *S. mutans* (Imagem 4), meio SDA com cloranfenicol para contagem de colônias de *C. albicans* (Imagem 5) e meio BHI puro para contagem dos microrganismos totais (Imagem 6).

O meio BHI foi preparado conforme às instruções do fabricante misturando 26 gramas do meio obtido em forma de pó, em 500 mL de água. A mistura foi então autoclavada e, após resfriamento, o conteúdo foi vertido em placas petri com auxílio de uma pipeta sorológica padronizando o volume de 25 mL de meio por placa. Após a presa do meio, as placas foram fechadas, envolvidas com papel filme e armazenadas em geladeira. O meio BHI com suplementação de anfotericina foi preparado da mesma maneira conforme já descrito, com exceção da suplementação com antifúngico Anfotericina B para evitar o crescimento fúngico e possibilitar a contagem apenas de unidades formadoras de colônias bacterianas. Para isso, 0,0125 g da substância foi diluída em 1 mL água e adicionado ao meio quando este atingiu uma temperatura de 50°C, controlada em banho maria e com o uso de termômetro. O meio SDA foi preparado com 5µg/mL de cloranfenicol e conforme as descrições do fabricante, misturando 65 g em 500 mL de água e posteriormente autoclavado.

Após 48h de incubação a contagem das colônias foi conduzida e foi obtida a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por área do corpo de prova (UFC/mL) foi calculado. Para o cálculo de UFC/mL, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), e q equivale ao volume em mL, pipetada para cada diluição nas semeaduras das placas.

Imagem 4 – Plaqueamento do biofilme em meio BHI suplementado com Anfotericina B, para contagem das colônias de *S. mutans*.



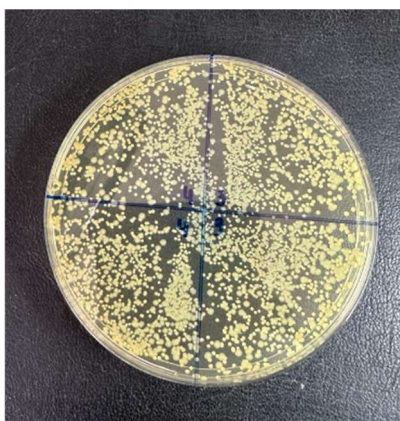
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Imagem 5 – Plaqueamento de do biofilme em meio SDA suplementado com cloranfenicol, para contagem das colônias de *C. albicans*.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Imagem 6 – Plaqueamento de do biofilme em meio BHI sem suplementação para contagem de microrganismos totais (*C. albicans* + *S. mutans*).



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.2.5.3 Análise do peso seco total^{56,78}

Para a determinação do peso seco total do biofilme, 100 µL de cada amostra foram pipetados e colocados em papel alumínio previamente pesados e etiquetados. Também foram adicionados 100 µL da solução de NaCl a 0,89% a fim de desconsiderar o valor do peso seco total da substância. As amostras foram secas em um forno a 100°C, e novamente pesadas na balança de precisão. A diferença entre o peso inicial e o peso final foi calculada e, em seguida, descontado o valor do peso da solução de NaCl a 0,89%. O valor final foi considerado o peso seco total da amostra.

4.2.5.4 Quantificação de proteínas Solúveis^{79,80}

Foram diluídos 15 µL da alíquota da suspensão do biofilme para determinar a quantidade proteínas solúveis. 5 µL da amostra diluída foram utilizados, em triplicata (15 µL) para a determinação de proteínas solúveis nos biofilmes usando o método de Bradford⁷⁹. O método de Bradford⁷⁹ é baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250. Para isso, foram realizadas diluições seriadas de albumina de soro bovino (BSA) para obtenção de uma curva padrão, conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 – Valores para a curva padrão do teste de quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

Diluição	BSA	Água
0	0 µL	1,00 mL
0,03125	15,625 µL	984,37 µL
0,06250	31,250 µL	968,75 µL
0,12500	62,500 µL	937,50 µL
0,25000	125,000 µL	875,00 µL
0,50000	250,000 µL	750,00 µL
1,00000	500,000 µL	500,00 µL
1,40000	750,000 µL	300,00 µL

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, em uma placa de 96 poços foram adicionadas alíquotas de 5 µL, em triplicata, para cada ponto da curva e para cada amostra a ser analisada. Após, foram adicionados 250 µL do reagente de Bradford e a placa foi incubada por 20 minutos a 37 °C sob agitação orbital de 75 rpm. Em seguida, a absorbância de cada orifício foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm. Os dados das amostras de

biofilmes foram convertidos em concentrações de proteínas, usando a equação da reta gerada.

4.2.5.5 Quantificação de proteínas Insolúveis^{79,80}

Foi transferido o volume de 50 μL para um microtubo contendo 100 μL de esferas de vidro e 200 μL de H_2O Milli-Q. Em seguida, as amostras foram submetidas à disrupção mecânica usando bead beater (3vezes/ 30s), aquecidas sob agitação (100 xg / 100 $^\circ\text{C}$ / 60 minutos). Após, as amostras foram centrifugadas para separação do sobrenadante (quickspin; 10.000 xg/min). O sobrenadante foi transferido para um microtubo esterilizado. Então, 5 μL da amostra diluída foram utilizados, em triplicata (15 μL), para a determinação de proteínas insolúveis nos biofilmes usando o método de Bradford⁷⁹, conforme descrito anteriormente.

4.2.5.6 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)^{56,81}

O volume de 1 mL do sobrenadante foi homogeneizado e transferido para um tubo do tipo Falcon de 15 mL. A este tubo com 1 mL de sobrenadante foram adicionados 2.5 volumes de etanol 95% (2,5 mL). O conteúdo do tubo foi homogeneizado e armazenado em freezer (-20°C) durante 18 h para ocorrer a precipitação dos polissacarídeos solúveis em água. Após a precipitação, todas as amostras foram removidas do freezer, homogeneizadas e centrifugadas (9.500 $\text{xg}/20\text{ min}/4^\circ\text{C}$). Os sobrenadantes foram descartados. As amostras foram então lavadas 3 vezes com etanol 75% gelado. Os tubos com as amostras foram agitados (usando vórtex), centrifugados e o sobrenadante foi dispensado. Posteriormente às lavagens, o precipitado foi seco ao ar e suspenso novamente em 0,25 mL de água. Foi realizada uma nova agitação para homogeneizar o precipitado na solução e as amostras foram então submetidas a quantificação de carboidratos totais pelo método fenol-ácido sulfúrico⁸¹. Este método utiliza glicose para a curva padrão (Quadro 4) e foi realizado dentro de uma capela de exaustão de gases.

Quadro 4 – Valores para a curva padrão do teste de quantificação de polissacarídeos solúveis em água – WSP pelo método fenol-ácido sulfúrico

Tubo	0	0,75	1,25	2,50	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00
Água (µL)	160,00	159,25	158,75	157,50	155,00	150,00	145	140,00	135,00
Glicose (µL)	0	0,75	1,25	2,50	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00
NaOH (µL)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00

Fonte: Elaboração própria.

Para análise de WSP, foram adicionados 200 µL de fenol 5% a cada tubo de vidro (13 mm) contendo 200 µL de cada amostra em triplicata. Os tubos foram agitados cuidadosamente. Então, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico a cada tubo, e os mesmos foram agitados imediatamente. Depois de 20 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. Os dados das amostras de biofilmes foram convertidos em concentrações de polissacarídeos, usando a equação da reta gerada (slope 0,048 – 0,051; R2 próximo de 1).

4.2.5.7 Análise do peso seco insolúvel e dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)^{56,81}

Previamente ao início do ensaio de ASP se faz necessário calcular o peso seco insolúvel do biofilme para determinar o volume de NaOH a ser utilizado para precipitação dos polissacarídeos.

4.2.5.7.1 Peso seco insolúvel

Uma alíquota de 0,95 mL da suspensão de biofilme foi colocada imediatamente em gelo. Após a alíquota ser refrigerada, o tubo foi centrifugado (13000 xg/10 min/4° C). O sobrenadante foi cuidadosamente removido do tubo e descartado. Então, o precipitado foi seco em um concentrador de amostras por aproximadamente 3 h. Os precipitados obtidos foram pesados em balança analítica para determinação do peso seco insolúvel.

4.2.5.7.2 Polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

De acordo com o peso obtido, foram adicionados a cada tubo 300 µL de 1N NaOH para cada 1 mg do peso seco do precipitado. Os microtubos foram incubados por 2h em banho seco (300 xg/37° C). Terminado o período, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg/10 min/4° C) e os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados com o auxílio de uma pipeta e transferidos para microtubos de 2 mL, preservando somente o precipitado. Novamente, o mesmo volume de 1N NaOH (300 µL de 1N NaOH/1 mg do peso seco) foi transferido para os tubos contendo precipitados. Os tubos foram agitados (com vórtex) para romper os precipitados e os mesmos passos foram repetidos para a extração de ASP, ou seja, após a incubação, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg /10 min), o sobrenadante mais uma vez cuidadosamente coletado e adicionado ao mesmo microtubo de 2 mL citado anteriormente. Por fim, os precipitados foram novamente ressuspensos na quantidade inicial de NaOH e centrifugados (13.000 xg/10 min/4° C), os sobrenadantes foram novamente transferidos para os microtubos correspondentes (com os sobrenadantes previamente coletados nas etapas anteriores).

Após a extração do ASP, os mesmos ficaram em solução de 1N NaOH, e foram precipitados. Para tal, foram adicionados 3 volumes de etanol 95% gelado e as amostras levadas ao freezer (-20° C) pelo período de 18 h. Passadas as 18h, ocorreu a precipitação dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), então, os tubos foram removidos do freezer, agitados e centrifugados (9.500xg / 2 0 min / 4° C). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas 3 vezes com etanol 75% gelado.

Posteriormente à lavagem, o precipitado foi seco ao ar e ressuspenso em 1N NaOH (no mesmo volume total da extração original). Em seguida, os volumes foram completados com água mili-Q esterilizada até completar o volume de 200 µL. Por fim, as amostras ficaram prontas para a quantificação de carboidratos totais usando o método com fenol e ácido sulfúrico⁸¹, utilizando uma curva previamente construída com glicose e solução de NaOH para a curva padrão (Quadro 5) em uma capela de exaustão de gases.

Quadro 5 – Valores para a curva padrão do teste de quantificação de polissacarídeos solúveis em álcali – ASP pelo método fenol-ácido sulfúrico.

Tubo	0	0,75	1,25	2,50	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00
Água (µL)	160,00	159,25	158,75	157,50	155,00	150,00	145	140,00	135,00
Glicose (µL)	0	0,75	1,25	2,50	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00
NaOH (µL)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00

Fonte: Elaboração própria.

O volume usado por amostra foi determinado com base no volume disponível para análise (30 a 40 µL). Assim, foi adicionada água MiliQ para completar o volume até 200 µl e as leituras da absorbância foram realizadas dentro da curva padrão previamente realizada.

4.2.5.8 Análise de DNA extracelular (eDNA)^{56,82}

A quantificação de eDNA foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rice et al. 2007⁸². Para isso, foi acrescentado às alíquotas de 0,65 mL o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e, em seguida, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas em movimentos curtos e repetidos de vai-e-vem (30 vezes). Então, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg / 20 min / 4° C) e a fase aquosa transferida para um microtubo de 2 mL. Neste novo microtubo, foi adicionado 1 volume clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e em seguida foi realizada a centrifugação (13.000 xg / 20 min / 4° C) das amostras e a transferência da fase aquosa para um novo tubo de 1,5 mL. A fase aquosa de cada amostra foi misturada com 3 volumes de etanol 99% e 1/10 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e armazenada à -20° C/18h. O eDNA precipitado com etanol foi coletado por centrifugação (13.000 xg / 20 min / 4° C), e lavado 3 vezes com etanol 70% gelado, secado ao ar, e então dissolvido em 20 µl de tampão TE. A quantidade de eDNA foi determinada usando nano espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm.

4.2.6 Análises estatísticas

Após a tabulação dos dados, foi realizada a estatística descritiva. Em seguida, a normalidade e homoscedasticidade dos dados para cada um dos componentes da matriz (variáveis dependentes) foram avaliadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Após os dados atenderem ao pressuposto de normalidade, foi realizado o teste ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey para dados homoscedásticos e pós-teste de Games-Howell para dados considerados heterocedásticos. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises foram realizadas com o software SPSS (IBM® SPSS® Statistics, versão 21, Chicago, IL, EUA).

5 RESULTADO

Os resultados obtidos no presente estudo estão representados a seguir.

5.1 Porcentagem de Redução

A taxa de redução (%) da viabilidade celular, bem como dos componentes do biofilme estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 a seguir para as duas condições experimentais: inibição da adesão e formação de biofilme e erradicação de biofilmes maduros de 48 h. Todos os cálculos foram realizados comparando com o grupo controle de crescimento, respectivo de cada grupo.

5.1.1 Viabilidade celular

As taxas de redução da viabilidade celular dos microrganismos, a partir das duas condições experimentais avaliadas, estão representadas a seguir.

Tabela 1 – Porcentagem de redução dos valores de UFC/mL ($\log_{10}$) dos microrganismos em biofilme misto após o ensaio de inibição da adesão e formação do biofilme em cada grupo de tratamento comparado ao grupo controle de crescimento (sem tratamento).

Microrganismo	ZER 256 $\mu\text{L/mL}$	ZER 512 $\mu\text{L/mL}$	NYS	CLX
<i>C. albicans</i> +				
<i>S. mutans</i> ($\log_{10}$)	3,71%	4,01%	4,02%	3,12%
<i>C. albicans</i> ($\log_{10}$)	56,68%	78,34%	77,95%	98,45%
<i>S. mutans</i> ($\log_{10}$)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 – Porcentagem de redução dos valores de UFC/mL ($\log_{10}$) dos microrganismos em biofilme misto após o ensaio de erradicação do biofilme em cada grupo de tratamento comparado ao grupo controle de crescimento (sem tratamento).

Microrganismo	ZER 256 $\mu\text{L/mL}$	ZER 512 $\mu\text{L/mL}$	NYS	CLX
<i>C. albicans</i> +				
<i>S. mutans</i> ($\log_{10}$)	3,56%	3,63%	3,40%	2,60%
<i>C. albicans</i> ($\log_{10}$)	19,64%	22,79%	70,18%	96,95%
<i>S. mutans</i> ($\log_{10}$)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Fonte: Elaboração própria.

5.1.2 Componentes do biofilme

As taxas de redução dos componentes dos biofilmes, a partir das duas condições experimentais avaliadas, estão representadas a seguir.

Tabela 3 – Porcentagem de redução dos componentes do biofilme misto após o ensaio de inibição da adesão e formação do biofilme em cada grupo de tratamento comparado ao grupo controle de crescimento (sem tratamento).

Parâmetro	ZER 256 μl/mL	ZER 512 μl/mL	NYS	CLX
Biomassa total (mg)	9,04%	11,30%	1,69%	10,73%
Biomassa insolúvel (mg)	18,10%	19,44%	11,89%	23,09%
Proteínas totais (μg)	18,11%	36,95%	14,82%	14,61%
Proteínas insolúveis (μg)	12,04%	13,75%	14,90%	15,77%
WSP (μg)	8,67%	16,43%	1,00%	5,67%
ASP (μg)	43,96%	43,96%	26,37%	25,27%
eDNA (ng)	10,27%	11,47%	3,90%	7,88%

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 – Porcentagem de redução dos componentes do biofilme misto após o tratamento de biofilmes maduros de 48 h em cada grupo de tratamento comparado ao grupo controle de crescimento (sem tratamento).

Parâmetro	ZER 256 μl/mL	ZER 512 μl/mL	NYS	CLX
Biomassa total (mg)	12,43%	16,90%	13,56%	15,25%
Biomassa insolúvel (mg)	18,59%	20,35%	16,41%	15,63%
Proteínas totais (μg)	6,82%	8,19%	10,31%	15,36%
Proteínas insolúveis (μg)	20,17%	20,49%	13,57%	14,20%
WSP (μg)	17,09%	19,57%	8,90%	9,66%
ASP (μg)	47,77%	51,11%	37,78%	44,44%
eDNA (ng)	25,59%	33,38%	6,23%	14,32%

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Inibição da Adesão E Formação Do Biofilme

Os resultados obtidos a partir do ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme estão representados a seguir.

5.2.1 Viabilidade celular dos microrganismos

Os resultados referentes à contagem das colônias viáveis estão representados na Tabela 5. Os valores de $\log_{10}$ UFC/mL relativos à contagem total das colônias de *C. albicans* e *S. mutans*, demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os grupos de tratamento. Todos os grupos apresentaram redução significativa de $\log_{10}$ UFC/mL em relação ao grupo controle ($p \leq 0,035$). O grupo ZER 512 apresentou a maior redução em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), entretanto, foi estatisticamente semelhante aos grupos ZER 256 e NYS ($p \geq 0,051$).

Para a contagem de $\log_{10}$ UFC/mL de *C. albicans*, foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre todos os grupos de tratamento. Todos os grupos apresentaram redução de $\log_{10}$ UFC/mL em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$). O grupo CLX apresentou a maior redução em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), sendo diferente dos demais grupos ($p < 0,001$). Os grupos ZER 512 e NYS apresentaram a segunda maior redução em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), sendo diferentes dos demais grupos ($p < 0,001$) e semelhantes entre si ($p = 1,000$). O grupo ZER 256 também apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), porém, em menor escala quando comparado aos grupos CLX, ZER 512 e NYS.

Os valores de contagem de $\log_{10}$ UFC/mL de *S. mutans* não apresentaram diferença estatística significativa ($p = 1,000$) entre os grupos de tratamento.

Tabela 5 – Médias e desvios padrão dos valores de da análise dos biofilmes resultantes do ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme.

Inibição da adesão e formação de biofilmes						Valor de <i>p</i>
Microrganismo	C-	ZER 256 μl/mL	ZER 512 μl/mL	NYS	CLX	
<i>C. albicans</i> +	8,134 a	7,832 bc	7,808 c	7,807 bc	7,880 b	<0,001
<i>S. mutans</i> (log ₁₀)	±0,105	± 0,375	± 0,855	± 0,563	± 0,394	
<i>C. albicans</i> (log ₁₀)	6,466 a	2,801 b	1,400 c	1,425 c	0,100 d	<0,001
	±0,412	± 0,926	± 0,534	± 0,580	± 0,328	
<i>S. mutans</i> (log ₁₀)	8,079 a	8,079 a	8,079 a	8,079 a	8,079 a	1,000
	±0,000	± 0,000	± 0,000	± 0,000	± 0,000	

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

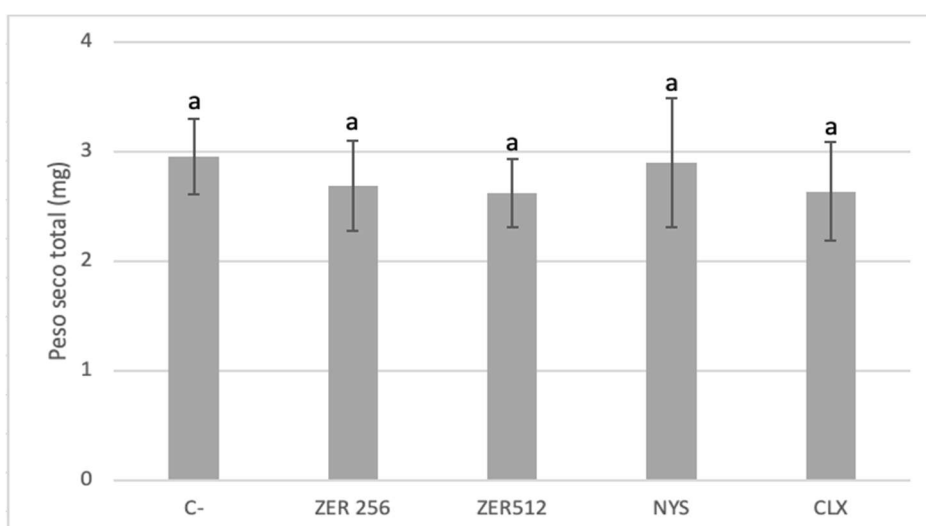
Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Componentes do biofilme

Os resultados referentes aos componentes do biofilme após o ensaio de inibição da adesão e formação do biofilme estão representados na Tabela 5.

Os valores de peso seco total demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento (p=0,193).

Gráfico 1 – Peso seco total

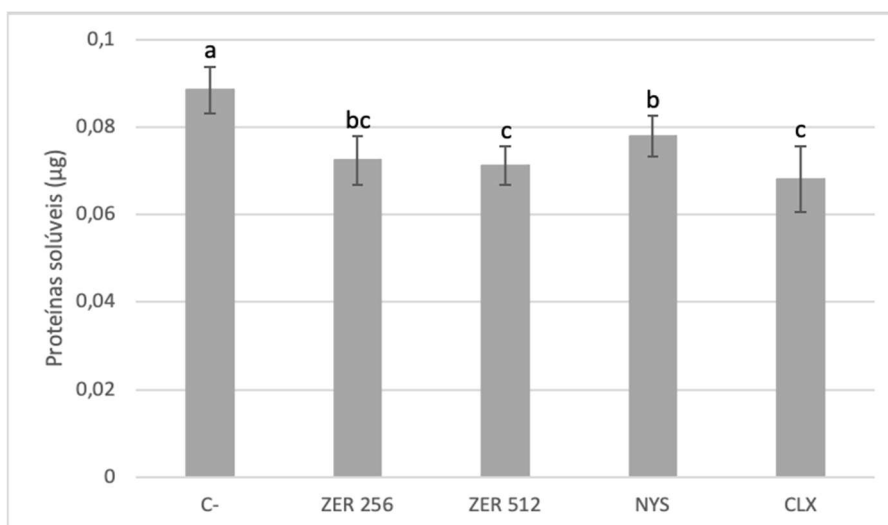


Médias e desvios-padrão do peso seco total dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) (p<0,05).

Fonte: Elaboração própria.

Ao avaliar os níveis de proteínas solúveis, foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). Todos os grupos apresentaram redução dos níveis de proteínas solúveis em relação ao grupo controle ($p \leq 0,034$). Os grupos ZER 256, ZER 512 e CLX apresentaram a maior redução e foram semelhantes entre si ($p \geq 0,227$).

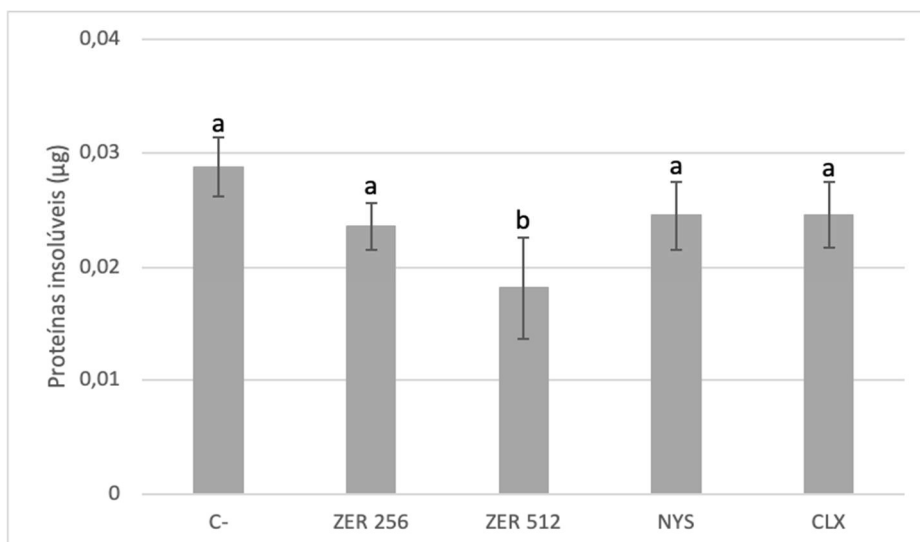
Gráfico 2 – Proteínas solúveis



Médias e desvios-padrão das proteínas solúveis dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

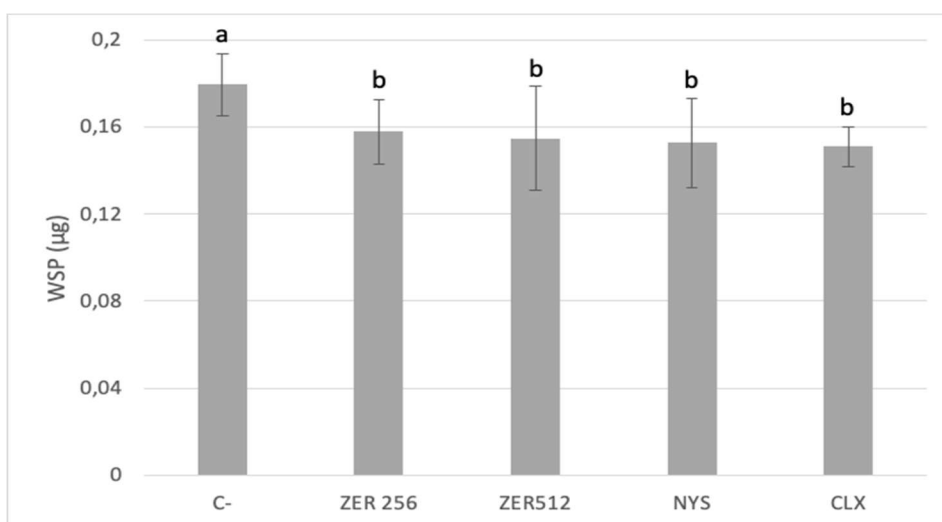
Em relação as proteínas insolúveis, foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). O grupo ZER 512 apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e aos demais grupos avaliados.

Gráfico 3 – Proteínas insolúveis

Médias e desvios-padrão das proteínas insolúveis dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Para os níveis de WSP foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). Todos os grupos apresentaram redução de WSP em relação ao grupo controle ($p \leq 0,015$) e foram estatisticamente semelhantes entre si ($p \geq 0,828$).

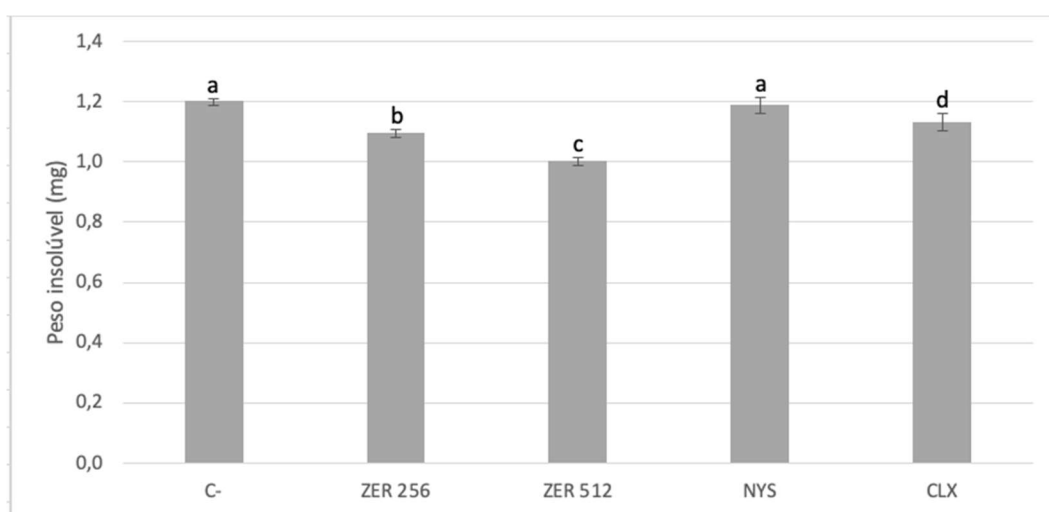
Gráfico 4 – WSP

Médias e desvios-padrão dos níveis de WSP dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Para o peso seco insolúvel foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os grupos de tratamento. O grupo tratado com ZER a 512 $\mu\text{L/mL}$ apresentou a maior redução ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. A segunda maior redução em relação ao grupo controle foi provocada pelo grupo tratado com ZER a 256 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,001$). O grupo CLX também apresentou redução ($p < 0,001$) da biomassa insolúvel, porém em menor escala. O grupo NYS se comportou estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p = 1,000$).

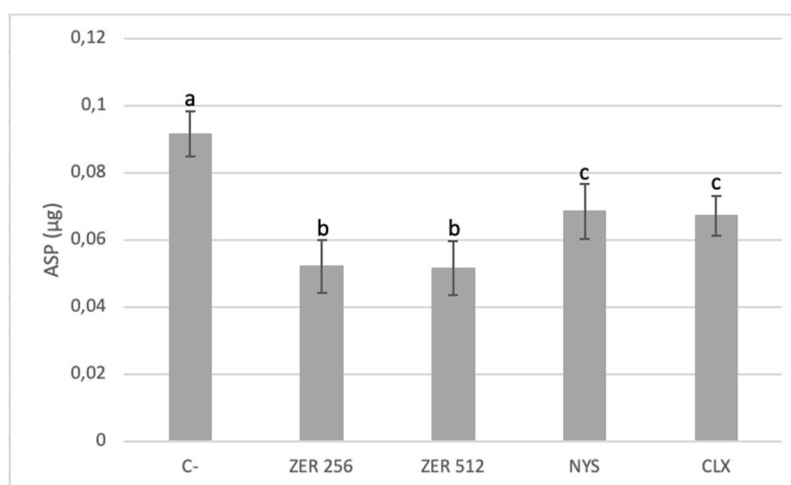
Gráfico 5 – Peso insolúvel



Médias e desvios-padrão dos níveis de peso insolúvel dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e da formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

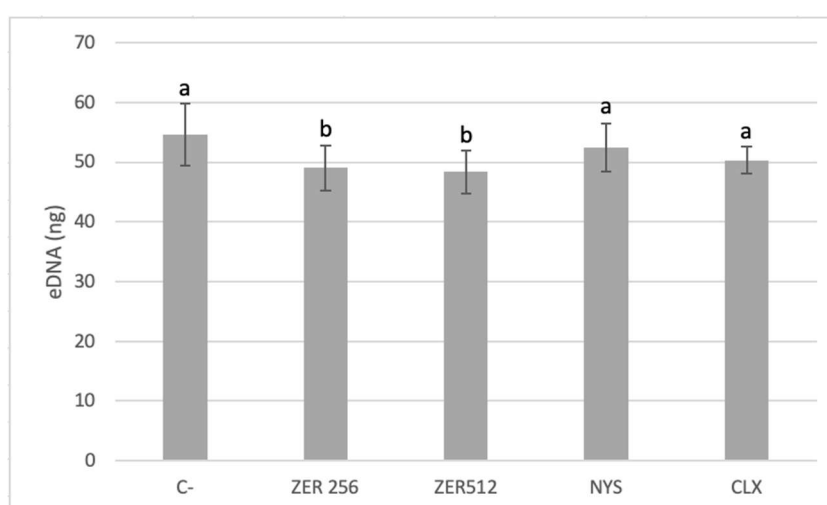
Para os níveis de ASP foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). Os grupos ZER 256 e ZER 512 apresentaram redução significativa dos níveis de ASP em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e foram semelhantes entre si ($p = 0,940$). Os grupos de tratamento NYS e CLX também apresentaram redução ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle, sendo semelhantes entre si ($p = 0,828$) e diferentes dos grupos ZER 256 e ZER 512 ($p < 0,001$).

Gráfico 6 – ASP

Médias e desvios-padrão dos níveis de ASP dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento para a quantificação de eDNA ($p = 0,001$). Os grupos ZER 256 e ZER 512 apresentaram redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,008$) dos níveis de eDNA em relação ao grupo controle, sendo semelhantes entre si ($p = 1,000$). Os grupos NYS e CLX apresentaram valores estatisticamente semelhantes ao controle.

Gráfico 7 – eDNA

Médias e desvios-padrão dos níveis de eDNA dos biofilmes, após ensaios de inibição da adesão e formação do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 – Médias e desvios padrão da análise dos biofilmes após o ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme.

Inibição da adesão e formação de biofilmes						
Parâmetro	C-	ZER 256 µl/mL	ZER 512 µl/mL	NYS	CLX	ANOVA one way
Biomassa total (mg)	2,949 ± 0,342	2,683 ± 0,413	2,616 ± 0,312	2,899 ± 0,587	2,633 ± 0,449	0,193
Biomassa insolúvel (mg)	1,199 ± 0,010	1,095 ± 0,013	1,002 ± 0,013	1,187 ± 0,026	1,131 ± 0,029	<0,001
Proteínas totais (µg)	0,088 ± 0,005	0,072 ± 0,005	0,071 ± 0,004	0,077 ± 0,004	0,068 ± 0,007	<0,001
Proteínas insolúveis (µg)	0,028 ± 0,002	0,023 ± 0,002	0,018 ± 0,004	0,024 ± 0,002	0,024 ± 0,002	<0,001
WSP (µg)	0,179 ± 0,014	0,157 ± 0,014	0,154 ± 0,023	0,152 ± 0,020	0,151 ± 0,009	<0,001
ASP (µg)	0,091 ± 0,006	0,051 ± 0,007	0,051 ± 0,008	0,0685 ± 0,008	0,067 ± 0,006	<0,001
eDNA (ng)	54,640 ± 5,261	49,025 ± 3,693	48,370 ± 3,550	52,508 ± 4,012	50,333 ± 2,301	0,001

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Inativação de Biofilmes Maduros

Os resultados obtidos a partir do ensaio de erradicação dos biofilmes maduros estão representados a seguir.

5.3.1 Viabilidade celular dos microrganismos

Considerando os valores de $\log_{10}$ UFC/mL, para os microrganismos crescidos em meio inespecífico (BHI) foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os grupos de tratamento para contagem das colônias de *C. albicans* e *S. mutans*. Todos os grupos apresentaram redução de $\log_{10}$ UFC/mL em relação ao grupo controle ($p \leq 0,024$) e foram estatisticamente semelhantes entre si ($p = 1,000$).

Para a contagem de $\log_{10}$ UFC/mL de *C. albicans* foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os grupos de tratamento. Todos os grupos apresentaram redução de $\log_{10}$ UFC/mL em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$). O

grupo CLX apresentou a maior redução em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), sendo diferente dos demais grupos ($p < 0,001$). O grupo NYS apresentou a segunda maior redução em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,001$). Os grupos ZER 256 e ZER 512 também apresentaram redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e apresentaram similaridade estatística entre si ($p = 1,000$).

Para a contagem de $\log_{10}$ UFC/mL de *S. mutans* em meio específico (BHI + Anfotericina B) não foi observada diferença estatística significativa ($p = 1,000$) entre os grupos de tratamento. Todos os valores referentes à contagem das colônias viáveis estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Médias e desvios padrão da análise dos biofilmes após o ensaio de erradicação de biofilmes maduros

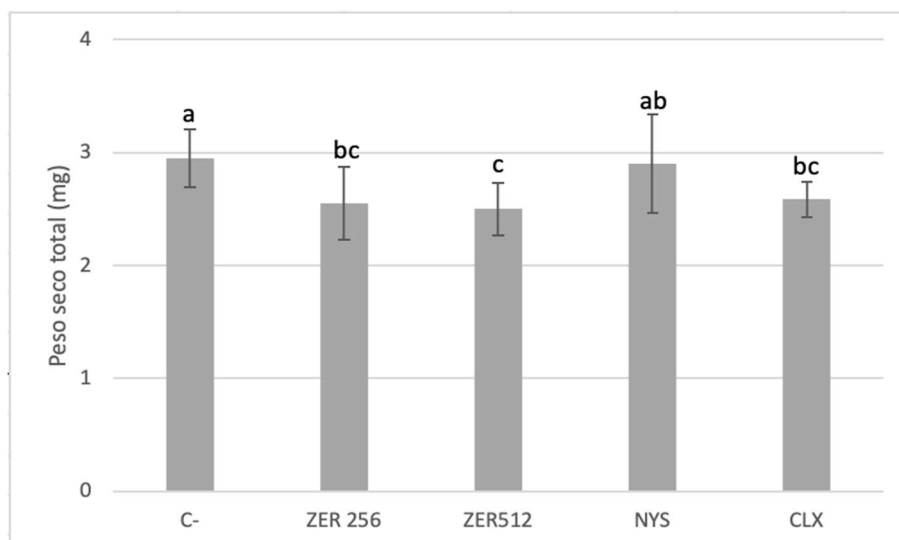
Parâmetro	Grupos de tratamento					ANOVA one way
	C-	ZER 256 $\mu\text{L/mL}$	ZER 512 $\mu\text{L/mL}$	NYS	CLX	
<i>C. albicans</i> +	8,089 a	7,801 b	7,795 b	7,814 b	7,879 b	<0,001
<i>S. mutans</i> ($\log_{10}$)	$\pm 0,128$	$\pm 0,177$	$\pm 0,365$	$\pm 0,366$	$\pm 0,228$	
<i>C. albicans</i> ($\log_{10}$)	6,564 a	5,275 b	5,068 b	1,957 c	0,200 d	<0,001
	$\pm 0,549$	$\pm 0,612$	$\pm 0,585$	$\pm 0,892$	$\pm 0,100$	
<i>S. mutans</i> ($\log_{10}$)	8,079 a	8,079 a	8,079 a	8,079 a	8,079 a	1,000
	$\pm 0,000$	$\pm 0,000$	$\pm 0,000$	$\pm 0,000$	$\pm 0,000$	

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.3.2 Componentes do biofilme

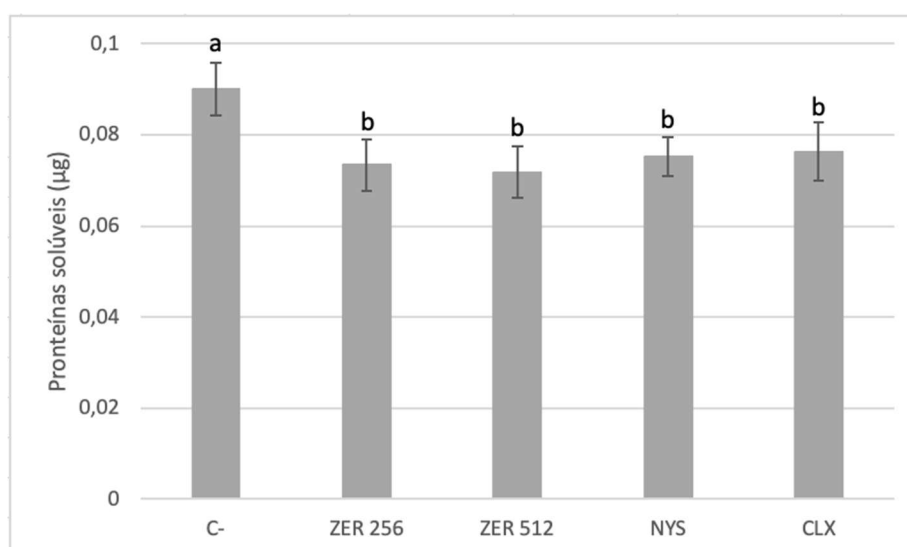
Os valores de peso seco total demonstraram que houve diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). Os grupos ZER 256, ZER 512 e CLX apresentaram redução significativa no peso seco total em relação ao grupo controle ($p \leq 0,038$) e foram semelhantes entre si ($p = 1,000$).

Gráfico 14 – Peso seco total

Médias e desvios-padrão do peso seco total dos biofilmes, após o ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas; letras iguais indicam semelhança estatística (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Ao avaliar os níveis de proteínas solúveis, foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). Todos os grupos apresentaram redução dos níveis de proteínas solúveis em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$) e foram estatisticamente semelhantes entre si ($p \geq 0,253$).

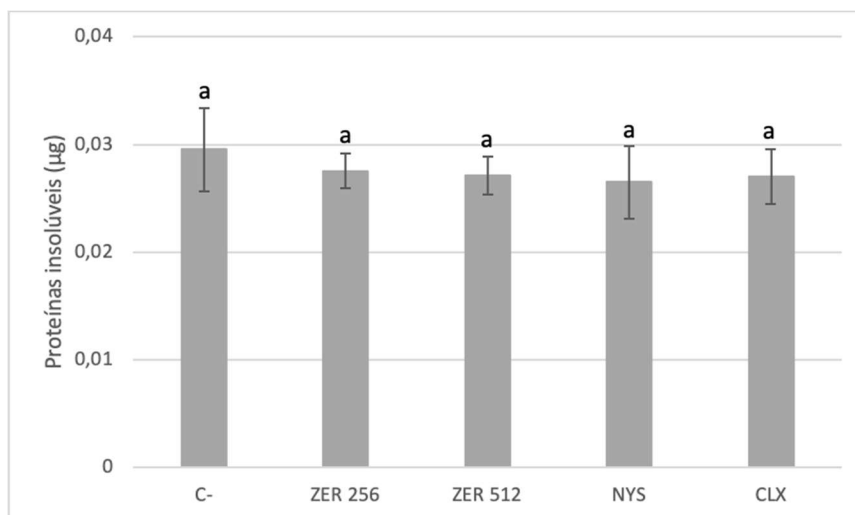
Gráfico 15 – Proteínas solúveis

Médias e desvios-padrão das proteínas solúveis dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Em relação as proteínas insolúveis, não foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p=0,084$).

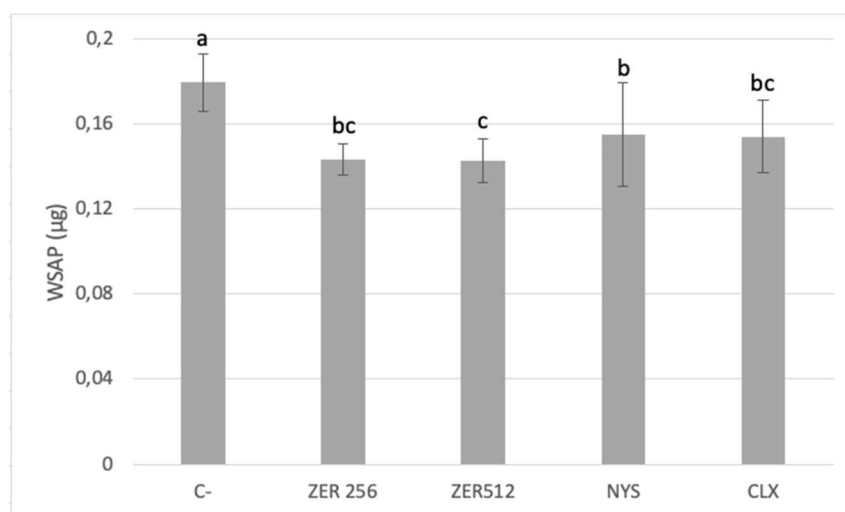
Gráfico 16 – Proteínas insolúveis



Médias e desvios-padrão das proteínas insolúveis dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p<0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

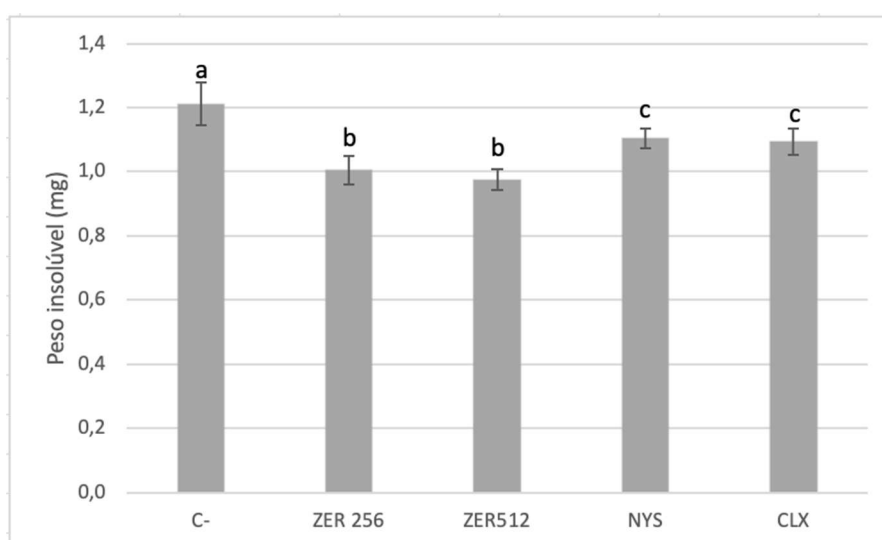
Para os níveis de WSP foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p<0,001$). Todos os grupos apresentaram redução dos níveis de WSP em relação ao grupo controle ($p\leq 0,041$). Os grupos de tratamento ZER 256 e ZER 512 apresentaram a maior redução ($p<0,001$) em relação ao grupo controle, sendo semelhantes entre si ($p=1,000$) e ao grupo CLX ($p\geq 0,066$).

Gráfico 17 – WSP

Médias e desvios-padrão dos níveis de WSP dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Para o peso seco insolúvel foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os grupos de tratamento. Os grupos tratados com ZER a 256 µl/mL e 512 µl/mL apresentaram a maior redução ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle, sendo semelhantes entre si ($p = 0,300$). Os grupos CLX e NYS também apresentaram redução ($p < 0,001$) da biomassa insolúvel, porém em menor escala.

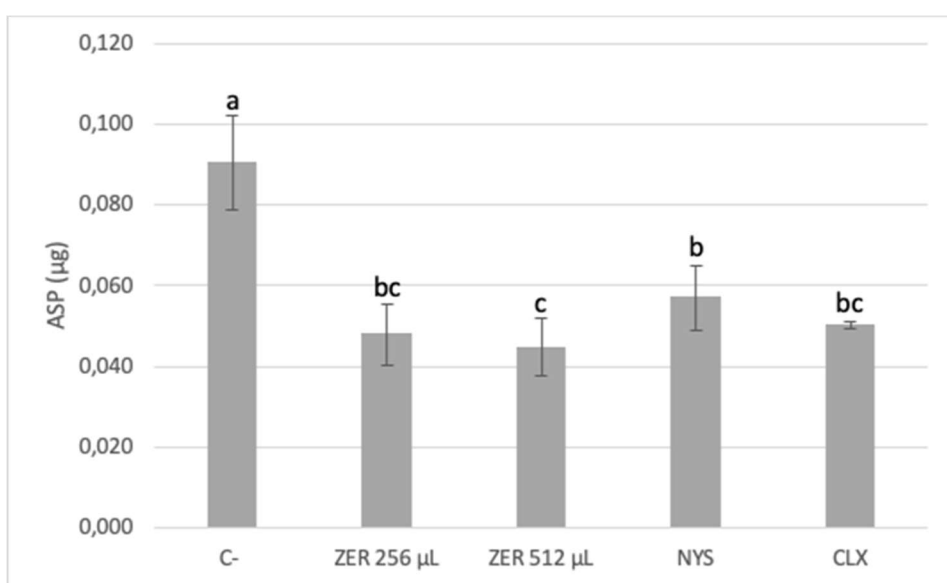
Gráfico 18 – Peso insolúvel

Médias e desvios-padrão dos níveis de peso insolúvel dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Para os níveis de ASP foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,001$). Todos os grupos apresentaram redução dos níveis de ASP em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Os grupos de tratamento ZER 256, ZER 512 e CLX apresentaram as maiores reduções de ASP ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle, sendo semelhantes entre si ($p \geq 0,966$). O grupo NYS também apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), entretanto foi diferente do grupo ZER 512 ($p = 0,003$).

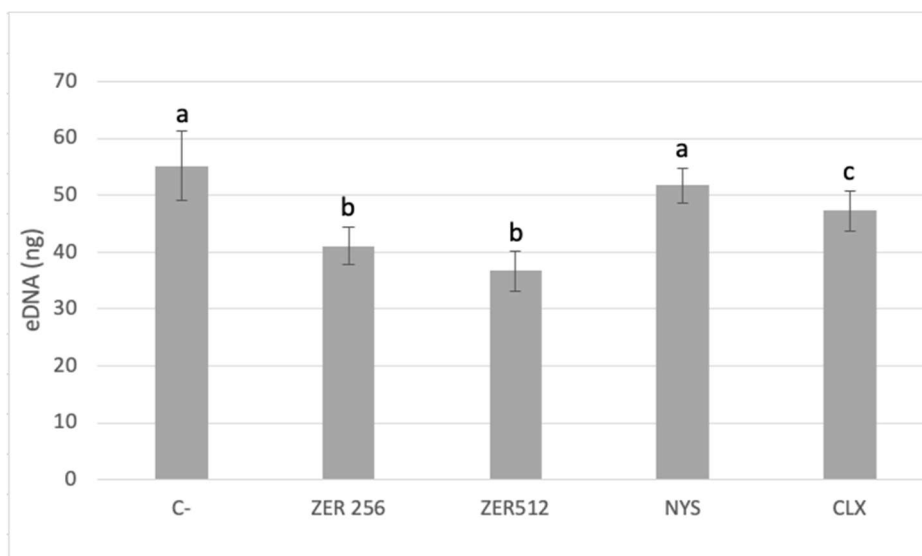
Gráfico 19 – ASP



Médias e desvios-padrão dos níveis de ASP dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Foi observada diferença estatística entre os grupos de tratamento para a quantificação de eDNA ($p < 0,001$). Os grupos ZER 256 e ZER 512 apresentaram a maior redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) dos níveis de eDNA em relação ao grupo controle, sendo diferentes dos grupos NYS e CLX ($p \leq 0,004$), e semelhantes entre si ($p = 0,117$).

Gráfico 20 – eDNA

Médias e desvios-padrão dos níveis de eDNA dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa (dados analisados com o teste ANOVA one-way) ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 – Médias e desvios padrão da análise dos biofilmes obtidas no ensaio de erradicação do biofilme maduro

Parâmetro	Grupos de tratamento					ANOVA one way
	C-	ZER 256 µl/mL	ZER 512 µl/mL	NYS	CLX	
Biomassa total (mg)	2,949 ± 0,257	2,550 ± 0,320	2,499 ± 0,233	2,900 ± 0,439	2,583 ± 0,158	<0,001
Biomassa insolúvel (mg)	1,211 ± 0,066	1,004 ± 0,045	0,974 ± 0,033	1,103 ± 0,032	1,094 ± 0,041	<0,001
Proteínas totais (µg)	0,090 ± 0,005	0,073 ± 0,005	0,071 ± 0,005	0,075 ± 0,004	0,076 ± 0,006	<0,001
Proteínas insolúveis (µg)	0,029 ± 0,003	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,026 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,084
WSP (µg)	0,179 ± 0,013	0,143 ± 0,002	0,142 ± 0,010	0,155 ± 0,024	0,153 ± 0,017	<0,001
ASP (µg)	0,090 ± 0,011	0,047 ± 0,011	0,044 ± 0,007	0,056 ± 0,007	0,050 ± 0,007	<0,001
eDNA (ng)	55,106 ± 6,088	41,002 ± 3,270	36,708 ± 3,476	51,675 ± 3,108	47,216 ± 3,438	0,001

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O uso de compostos naturais medicinais para a inativação de microrganismos tem sido explorado^{60,62}. O composto natural ZER, extraído de rizomas da espécie *Zingiber zerumbet*, demonstra seu potencial em diferentes áreas, entre elas estão terapias anticâncer^{67,70,72}, terapias anti-inflamatórias⁷¹, disfunções cardíacas⁶⁹ e na inativação de fungos e bactérias^{33,35,36,39,68}, porém, seu efeito na redução de viabilidade celular dos microrganismos e componentes de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans* ainda não foi avaliado. Os biofilmes avaliados no presente estudo foram formados sobre espécimes de resina acrílica, que simulam a base de próteses dentárias, as quais estão diretamente relacionadas com a colonização de diferentes espécies de microrganismos e consequente formação de biofilme.

Os resultados obtidos pelo presente estudo evidenciam a atividade de ZER na redução da viabilidade celular de *C. albicans* e também sobre os componentes do biofilme. No presente estudo, ZER reduziu o número de colônias viáveis de *C. albicans* e os componentes da matriz do biofilme, tanto na inibição da adesão e formação de biofilmes sobre uma superfície tratada com a substância quanto na erradicação de biofilmes mistos de 48 h formados sobre resina acrílica.

No ensaio de inibição de adesão e formação de biofilme, todas as substâncias testadas (ZER, NYS e CLX) reduziram a viabilidade celular de *C. albicans*, entretanto, as substâncias avaliadas não apresentaram atividade antimicrobiana para *S. mutans*. Os biofilmes formados sobre a superfície tratada com ZER 512 µg/mL apresentaram 78% de redução de viabilidade celular para *C. albicans*, sendo o maior valor de redução comparado ao grupo controle. Foi constatado que biofilmes de *C. albicans* formados na presença de ZER 64 µg/mL tiveram sua atividade metabólica reduzida em até 83,5%, e a substância inibiu a adesão das células às superfícies³³. Em outro estudo, a presença de ZER 128 µg/mL durante os ensaios de formação de biofilme misto de *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* reduziu até 98,9% da atividade metabólica dos microrganismos³⁵. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os estudos anteriores que demonstraram que o ZER apresenta capacidade de inibir a adesão e formação de biofilmes por meio da redução na atividade metabólica e na viabilidade celular dos microrganismos. Dessa forma, os resultados citados demonstraram a ação antibiofilme de ZER durante a adesão e a formação de biofilmes de *C. albicans*.

Quanto à viabilidade celular dos microrganismos no ensaio de erradicação de biofilmes maduros, ZER 256 µg/mL e 512 µg/mL reduziram aproximadamente 20% e 23% da viabilidade celular de *C. albicans*, respectivamente, e não apresentaram atividade na viabilidade celular de *S. mutans*. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com um estudo prévio em que o ZER 256 µg/mL reduziu a viabilidade celular de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol em aproximadamente 37% em biofilmes simples³⁹. Entretanto, ZER não mostrou-se eficaz em reduzir a viabilidade celular de *S. mutans* após o tratamento de biofilmes maduros. Em estudo anterior foi observado a atividade antimicrobiana do ZER contra culturas planctônicas de *S. mutans* com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 250 µg/mL e de Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 500 µg/mL³⁸. A estruturação dos microrganismos em biofilme aumenta a tolerância aos fármacos, principalmente em virtude da matriz extracelular do biofilme. Portanto, a atividade antimicrobiana das substâncias testadas sobre biofilme e sobre culturas planctônicas apresentam comportamento diferente. Ao considerar que os testes de CIM e CBM são realizados em culturas planctônicas dos microrganismos (que não estão incorporadas ao biofilme) e que a presença dos microrganismos na estrutura do biofilme torna-os menos suscetíveis à ação de antimicrobianos, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que *S. mutans* no biofilme apresenta susceptibilidade reduzida, de maneira que ZER em concentração de 250 µg/mL não apresentou atividade sobre o microrganismo no biofilme, embora apresentou eficácia sobre cultura planctônica. Um estudo avaliou o efeito da curcumina encapsulada, um composto natural conhecido por sua atividade antimicrobiana, associada à terapia fotodinâmica sobre biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans*, e os efeitos foram maiores sobre *C. albicans* do que sobre *S. mutans*, assim como o observado no presente estudo⁶⁵. Por outro lado, diferentes frações de *Casearia sylvestris* Sw, uma espécie de planta rica em diterpenos, promoveu redução na viabilidade celular de biofilmes de *S. mutans*, entretanto, mas não foi capaz de afetar os componentes da matriz do biofilme⁶⁶.

Clorexidina é uma substância comumente utilizada como agente desinfetante para erradicar microrganismos devido à sua eficácia de amplo espectro, apresentando efeitos bactericidas e fungicidas. Nistatina é um antifúngico utilizado comumente para ao tratamento de infecções fúngicas. Essas duas substâncias foram avaliadas no presente estudo como controle de tratamento. Os efeitos foram maiores sobre *C. albicans* que sobre *S. mutans*, em ambas as condições experimentais avaliadas

(inibição de adesão e formação de biofilme e erradicação de biofilme maduro). Em estudo anterior foi demonstrado que a nistatina (4 vezes ao dia, por aproximadamente 3 dias) reduziu a viabilidade celular dos microrganismos e o peso seco total do biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre discos de hidroxiapatita, de maneira que viabilidade celular de *S. mutans* foi reduzida somente após 44 horas de ensaio⁵⁵. No presente estudo, a Nistatina reduziu aproximadamente 71% da viabilidade celular do fungo *C. albicans*, demonstrando seu efeito antifúngico comprovado, mas não apresentou efeitos sobre *S. mutans*. Considerando que o ensaio foi realizado com 20 minutos de exposição às substâncias, os resultados obtidos aqui, comparados aos obtidos por Alomeir *et al.*⁵⁵, sugerem a necessidade de regimes prolongados de tratamento para obtenção de efeito sobre bactérias e outros microrganismos presentes no biofilme. No presente estudo, a solução de CLX a 2,0% foi a substância que promoveu maior redução de viabilidade celular de *C. albicans*, tanto após a imersão dos corpos de prova contendo o biofilme maduro de 48 h por 20 minutos na solução, cuja viabilidade celular de *C. albicans* foi reduzida aproximadamente 97%, quanto na adesão e formação de biofilmes sobre superfícies expostas por 8 h à substância, que promoveu aproximadamente 98,5% de redução de viabilidade fúngica. Porém, a substância não apresentou o mesmo efeito sobre *S. mutans*. A bactéria cariogênica *S. mutans* é um grande produtor de matriz de biofilmes, principalmente na presença de sacarose, a qual atua como substrato para a síntese de exopolissacarídeos, como glucanos e frutanos⁴³. A eficácia da CLX é reduzida contra biofilmes maduros, sendo que a resistência das células microbianas à substância é aumentada na presença dos exopolissacarídeos da matriz, os quais possuem carga negativa e afetam a penetração da CLX (uma substância catiônica) no biofilme⁴⁸. Desta forma, a baixa atividade da substância sobre a bactéria observada no presente estudo pode ser atribuída à presença da matriz extracelular que afeta a penetração (e atividade antimicrobiana) de substâncias como a CLX, visto que os biofilmes foram formados na presença de glucose e frutose, e, portanto, com grande conteúdo de polissacarídeos. Por outro lado, o efeito da substância no biofilme de próteses dentárias foi avaliado após imergir a prótese por 5 minutos em CLX 2,0% e a área coberta por biofilme foi significativamente reduzida nos grupos testes comparados ao controle⁸³, entretanto, não foi realizada a quantificação dos microrganismos. Outro estudo avaliou o efeito de CLX 2,0% sobre biofilmes simples de *S. mutans* e foi observado 96% de redução de viabilidade celular do microrganismo,

com regimes de 1 semana de aplicação⁵². No presente estudo, após a exposição à substância por 20 minutos não houve redução da viabilidade celular de *S. mutans*, sugerindo a necessidade de exposição prolongada à substância.

Ao comparar a atividade de ZER sobre a redução da viabilidade celular dos microrganismos nas duas condições experimentais avaliadas, o ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme foi mais eficaz em reduzir o número de colônias viáveis, cuja redução foi de aproximadamente 78% para *C. albicans* e 4% para microrganismos totais, na concentração de 512 µg/mL. O tratamento dos biofilmes maduros com a mesma concentração da substância reduziu a viabilidade celular de *C. albicans* em aproximadamente 23% e 4% dos microrganismos totais. ZER é um sesquiterpeno monocíclico, os terpenos promovem alterações na permeabilidade e fluidez da membrana celular, o que afeta a adesão fúngica⁵⁸. Além disso, esses componentes atuam como inibidores da morfogênese de leveduras em hifas e, quando adicionados aos biofilmes na fase inicial do seu desenvolvimento, impedem a evolução dos biofilmes⁵⁹. Por outro lado, a atividade da substância em desestruturar os componentes dos biofilmes maduros de 48 h foi maior em comparação aos componentes do biofilme analisados após o ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme. Considerando que a matriz extracelular é formada por diferentes biomoléculas funcionais que garantem o arranjo de uma estrutura robusta de suporte microbiano, abordagens que podem reduzir essas substâncias poliméricas quando os biofilmes já estão estabelecidos são promissoras, uma vez que podem enfraquecer a estrutura do biofilme e potencializar a morte celular.

A matriz extracelular dos biofilmes consiste em um arranjo de diferentes biomoléculas produzidas pelos próprios microrganismos que permanecem agregados. Ácidos nucleicos (eDNA), proteínas (solúveis e insolúveis), exopolissacarídeos (β -glucanos, α -mannanas), lipídeos e outras biomoléculas fazem parte deste arranjo, de maneira que cada um desses componentes desempenha uma função na estruturação do biofilme⁴⁷. As substâncias poliméricas presentes na matriz dos biofilmes promovem a adesão e coesão de microrganismos, e dificultam a difusão de fármacos⁴⁷. Os biofilmes de *C. albicans* são estruturados pelo complexo mananas-glucanas (MGCx), formado pela interação entre WSPs (α -mananas) e ASPs (β -glucanas), cuja estruturação é fundamental para a resistência antifúngica observada nesses biofilmes¹⁷. A bactéria *S. mutans* é uma grande produtora de matriz de biofilmes, principalmente na presença de sacarose, a qual atua como substrato para a síntese

de exopolissacarídeos, como glucanos e frutanos⁴³. Biofilmes cariogênicos de *S. mutans* são constituídos principalmente por exopolissacarídeos, no entanto, o DNA extracelular (eDNA) também é encontrado em quantidades elevadas⁴⁶. A coexistência de *C. albicans* e *S. mutans* em biofilmes multiespécies é comum diante da grande variedade de espécies microbianas que habitam o ambiente oral.

No presente estudo, a análise dos componentes do biofilme de 48 h de *C. albicans* e *S. mutans* após o tratamento com ZER 256 µg/mL demonstrou reduções no WSP (20,17%), proteínas solúveis (18,59%) e eDNA (25,59%). A concentração de ZER 512 µg/mL também reduziu os mesmos componentes do biofilme com resultados semelhantes, sendo 20,49% no WSP, 20,35% nas proteínas solúveis e 33,38% no (eDNA). Em estudo, prévio também foi observada redução dos componentes do biofilme simples de *C. albicans* resistente ao fluconazol, entretanto em maior escala, sendo WSP (65,93%), proteínas (16,51%) e eDNA (78,3%)³⁹. Os resultados obtidos no presente estudo podem ser justificados pela presença dos glucanos produzidos por *S. mutans* que circundam as células de *C. albicans*, aumentando a resistência antifúngica e a tolerância de *C. albicans* em biofilmes mistos^{36,42}.

Assim, considerando a organização estrutural da matriz extracelular do biofilme, os resultados do presente estudo foram promissores, uma vez que após o tratamento de biofilmes mistos maduros de 48 h de *C. albicans* e *S. mutans*, o tratamento com ZER (512 µg/mL) reduziu aproximadamente 20% dos polissacarídeos solúveis em água (WSP) da matriz extracelular do biofilme, e, aproximadamente 44% dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP). Esses resultados corroboram com o estudo prévio do grupo que avaliou a eficácia de ZER em biofilmes de *C. albicans* susceptíveis e resistentes ao fluconazol, que apresentaram redução de 60% e 65% dos níveis de WSP, respectivamente, e 10% dos níveis de ASP para ambas as cepas, quando tratados com ZER na concentração de 256 µg/mL. Biofilmes bacterianos apresentam maior quantidade de polissacarídeos, cuja principal característica é dificultar a penetração e consequente ação de antibióticos e/ou outros fármacos⁴⁴. Ao comparar a presença de polissacarídeos na parede celular de culturas planctônicas e de células envolvidas pelo biofilme, o conteúdo de β -1-3glucanos é maior, o que aumenta sua resistência às terapias antimicrobianas^{16,17,42}. Os glucanos produzidos por *S. mutans* são capazes de aumentar a tolerância de *C. albicans* aos fármacos, quando ambos estão presentes em biofilme misto, isto porque reduz a permeabilidade do biofilme, diminuindo a quantidade de substâncias disponíveis na microestrutura³⁶.

No presente estudo, a quantidade total de WSP dos biofilmes mistos de 48 h que não sofreram nenhuma intervenção (grupo controle) foi de 0,179 µg. Em estudo prévio foi observado que, em biofilmes simples de *C. albicans*, a quantidade total de WSP do grupo controle foi de 0,09 µg. Os resultados obtidos no presente estudo em relação à taxa de redução de WSP presentes na matriz extracelular dos biofilmes mistos demonstram que a presença de *S. mutans* no biofilme elevou os níveis de polissacarídeos quando comparado aos biofilmes fúngicos simples, corroborando com os estudos citados anteriormente que evidenciam a quantidade de polissacarídeos de biofilmes mistos, principalmente na presença de *S. mutans*, considerado um grande produtor de glucanos. A presença dos glucanos produzidos pelo *S. mutans* torna a estrutura mais robusta e de difícil penetração para os fármacos. Dessa forma, a redução de polissacarídeos da matriz de biofilmes mistos (aproximadamente 20% de WSP e aproximadamente 44% de ASP) observada no presente estudo demonstra que ZER pode atuar promovendo a desorganização das interações MGCx e reduzindo a quantidade de exopolissacarídeos, favorecendo a atividade antimicrobiana.

Ao comparar a redução dos polissacarídeos após o tratamento com ZER (aproximadamente 20% para WSP) com a redução promovida pelo tratamento com Nistatina e Clorexidina, utilizados como controle neste estudo, a porcentagem de redução obtida com o ZER foi em média 16% maior (13,57% para NIS e 14,20% para CLX). Esse resultado pode ser considerado favorável, uma vez que esses fármacos são antimicrobianos bem estabelecidos no tratamento de infecções microbianas. Um estudo prévio avaliou o efeito da Nistatina em biofilmes de *C. albicans* suscetíveis e os resultados apontaram que, apesar da redução da viabilidade celular, a substância não foi capaz de afetar a matriz de exopolissacarídeos, sendo ineficaz contra a arquitetura do biofilme³⁸.

Além dos polissacarídeos, houve redução de aproximadamente 33% do DNA extracelular (eDNA) presente nos biofilmes mistos avaliados neste estudo. Esses resultados corroboram com estudo prévio em que foi avaliado biofilme simples de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901) submetido ao tratamento com ZER em que foi observado 23% de redução de eDNA. O eDNA participa na estruturação do biofilme, sendo capaz de interagir com diversas substâncias poliméricas extracelulares¹⁵. Essa redução, promovida pelo ZER sugere o enfraquecimento da matriz do biofilme, uma vez que o eDNA desempenha funções relacionadas à manutenção da integridade estrutural. O eDNA e os polissacarídeos solúveis em água

estão estruturalmente relacionados, de forma que o eDNA é circundado por componentes do complexo MGCx na matriz extracelular do biofilme, podendo apresentar ligações fortes ou fracas, o que interfere no processo de hidrólise dos polissacarídeos pelas enzimas⁴¹. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo comprovam essa relação, visto que a exposição ao ZER levou à redução de WSP e de eDNA presentes na matriz do biofilme.

O presente estudo demonstrou que o tratamento dos biofilmes mistos maduros com ZER 256 µg/mL promoveu aproximadamente 17% de redução das proteínas solúveis da matriz, enquanto a concentração de 512 µg/mL promoveu aproximadamente 20% de redução. Em estudo prévio realizado sobre biofilmes simples de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol foi observado redução apenas das proteínas insolúveis da matriz para ambas as espécies (aproximadamente 15%)³⁹. As proteínas são componentes presentes em larga escala no biofilme que desempenham um papel digestivo na dinâmica do biofilme, realizando a ruptura de biopolímeros extracelulares para obtenção de energia^{18,41}. Em estudos anteriores, não foi observada redução nas proteínas do biofilme de *C. albicans*, mesmo com redução na viabilidade celular e outros componentes da matriz extracelular, após o tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana, comumente utilizada para a inativação de microrganismos^{56,57}. A redução de proteínas pode ser uma abordagem importante, uma vez que se relacionam à obtenção de energia da microestrutura, e sua redução pode ser um indicativo de supressão das atividades microbianas.

O peso seco total dos biofilmes também foi avaliado no presente estudo. A concentração de 256 µg/mL promoveu aproximadamente 12% de redução, enquanto a concentração de 512 µg/mL promoveu aproximadamente 17% de redução em relação ao grupo controle. Esses resultados corroboram com estudos prévios em que foi constatado que ZER na concentração de 256 µg/mL promoveu uma redução significativa da biomassa total do biofilme multiespécie formado por *C. albicans* e *S. aureus*, constatada por meio de microscopia confocal de varredura a laser³⁵. Em estudo prévio, a biomassa total dos biofilmes de *C. albicans* foi reduzida em aproximadamente 13% quando tratados com ZER na concentração de 256 µg/mL. A biomassa total do biofilme consiste em células microbianas e nos componentes solúveis e insolúveis do biofilme. Dessa forma, ZER se mostrou eficiente em reduzir componentes do biofilme, evidenciando sua atividade antibiofilme. Antifúngicos convencionais (Nistatina e anfotericina B) também foram capazes de reduzir a

biomassa de biofilmes de *C. albicans* de maneira dose-dependente⁵⁴. No presente estudo, NYS e CLX reduziram 13,56% e 15,25% do peso seco total dos biofilmes, respectivamente, demonstrando que ZER foi mais eficiente que os antifúngicos convencionais avaliados no presente estudo.

Os biofilmes avaliados no presente estudo foram formados sobre superfícies que simulam a base de próteses dentárias comumente utilizadas. Os corpos de prova foram fabricados com resina acrílica termicamente ativada e padronizados quanto à rugosidade, estabelecida entre 2.7 e 3.7 μm ⁷⁴. Diante da grande colonização de bases de próteses por microrganismos, a busca por agentes que reduzam a aderência microbiana, e consequente, a formação de biofilme é de grande interesse. Biofilmes de *C. albicans* foram formados sobre discos de resina que foram previamente expostos a óleos essenciais de canela e de capim limão, e, foi observado até 70% de redução na atividade metabólica dos mesmos⁶⁴. Os resultados obtidos no presente estudo, a partir do ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme, evidenciaram o potencial do ZER em inibir a colonização da resina por microrganismos.

O potencial antifúngico do ZER ficou evidenciado no presente estudo por meio dos resultados obtidos nas duas condições experimentais avaliadas. O tratamento de biofilmes maduros promoveu maior redução nos componentes do biofilme quando comparado ao ensaio de adesão e formação dos biofilmes sobre a superfície tratada. Porém, a viabilidade celular de *C. albicans* foi mais afetada após o ensaio de inibição da adesão e formação de biofilme, embora ZER não tenha apresentado eficácia sobre a redução da viabilidade celular de *S. mutans*. Dessa forma, a capacidade da substância em reduzir a colonização de *C. albicans* sobre superfícies previamente tratadas e, posteriormente, em desestruturar biofilmes maduros ficou evidenciada, e os resultados aqui obtidos tornam ZER uma alternativa promissora para a desestruturação de biofilmes mistos. Entretanto, o efeito de ZER sobre a viabilidade celular de *S. mutans* precisa ser mais bem avaliado, a fim de encontrar resultados promissores. Além disso, outros estudos precisam ser desenvolvidos para avaliar o efeito de ZER em modelos *in vivo*.

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.

Não autorizo a publicação deste trabalho até 28 de fevereiro de 2026.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 28 de fevereiro de 2024.

Ana Luíza Gorayb Pereira