



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

VIVIANE DE OLIVEIRA ZEQUINI AMARANTE

Efeito do trimetafosfato de cálcio, associado **OU** não ao fluoreto, sobre as
Propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *Candida albicans* e
Streptococcus mutans

Araçatuba - SP
2025

VIVIANE DE OLIVEIRA ZEQUINI AMARANTE

Efeito do trimetafosfato de cálcio, associado ou não ao fluoreto, sobre as
Propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *Candida*
albicans e *Streptococcus mutans*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutor(a).

Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Batazzo Delbem

Coorientador: Prof. Ass. Caio Sampaio

Araçatuba - SP
2025

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A485e Amarante, Viviane de Oliveira Zequini.
Efeito do trimetafosfato de cálcio, associado ou não
ao fluoreto, sobre as propriedades estruturais e funcio-
nais de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Strepto-*
coccus mutans / Viviane de Oliveira Zequini Amarante. -
Araçatuba, 2025
35 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Thayse Yumi Hosida
Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientador: Prof. Caio Sampaio

1. Compostos de cálcio 2. Fluoretos 3. Biofilmes
4. Fosfatos I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Assoc. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador Prof. Assoc. Rogério de Castilho Jacinto, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo profissionalismo e pela atenção prestada, sempre com disposição para orientar e esclarecer dúvidas ao longo do processo.

Aos funcionários da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Marcel, Luiz e Mário, pela ajuda, atenção e suporte prestados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço imensamente pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa, fundamentais para a execução deste trabalho.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste projeto, deixo aqui minha eterna gratidão.

RESUMO

AMARANTE, VOZ. **Efeito do trimetafosfato de cálcio, associado ou não ao fluoreto, sobre as propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.** 2025. Tese (Doutorado em Ciências, área de Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Este estudo avaliou os efeitos do trimetafosfato de cálcio (CaTMP), isoladamente ou em associação com fluoreto (F), nas propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. O CaTMP foi sintetizado por troca iônica em coluna cromatográfica e caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Biofilmes mistos foram formados *in vitro* em saliva artificial, com renovação parcial a cada 24 h, e tratados três vezes (72, 78 e 96 h) com soluções contendo 1100 ppm de F (F); saliva artificial (CLT); 1% de trimetafosfato de sódio (NaTMP) ou 1% de CaTMP, com ou sem F (NaTMP/F, CaTMP/F). Foi avaliado as células cultiváveis (UFC/mL), atividade metabólica (XTT), biomassa (cristal violeta), composição da matriz extracelular (proteínas e carboidratos) e morfologia dos biofilmes por MEV. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). O NaTMP e o CaTMP apresentaram grânulos pequenos e regulares, e a análise por EDS do CaTMP confirmou a presença de cálcio e ausência de sódio. Nenhum tratamento alterou as contagens de *C. albicans* em relação ao CTL. Para *S. mutans*, NaTMP/F e F reduziram significativamente as UFCs, enquanto CaTMP e CaTMP/F aumentaram essas contagens. Biofilmes tratados com CaTMP e CaTMP/F apresentaram maior biomassa e metabolismo, sem diferença entre si. Todos os tratamentos reduziram proteínas e carboidratos da matriz em relação ao controle, sendo o efeito mais pronunciado para CaTMP/F. A análise por MEV mostrou que o grupo CaTMP/F exibiu arquitetura menos compacta e menor deposição de matriz extracelular. Concluindo, o CaTMP, especialmente quando combinado ao F, modificou de forma significativa a composição e estrutura dos biofilmes mistos, alterando suas propriedades estruturais e funcionais.

Palavras-chave: Compostos de Cálcio; Fluoretos; Biofilmes; Fosfatos

ABSTRACT

AMARANTE, VOZ. **Effect of calcium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on the structural and functional properties of mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans***. 2025. Thesis (Ph.D. in Sciences, area of Children's Dental Health) – School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, 2025.

This study evaluated the effects of calcium trimetaphosphate (CaTMP), alone or in combination with fluoride (F), on the structural and functional properties of mixed *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* biofilms. CaTMP was synthesized by ion exchange in a chromatographic column and characterized using scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Mixed biofilms were formed *in vitro* in artificial saliva, with partial renewal every 24 h, and treated three times (at 72, 78, and 96 h) with solutions containing 1100 ppm F (F); artificial saliva (CTL); 1% sodium trimetaphosphate (NaTMP) or 1% CaTMP, with or without F (NaTMP/F, CaTMP/F). The following parameters were evaluated: viable cell counts (CFU/mL), metabolic activity (XTT), total biomass (crystal violet), extracellular matrix composition (proteins and carbohydrates), and biofilm morphology by SEM. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test ($p < 0.05$). NaTMP and CaTMP exhibited small and regular granules, and EDS analysis of CaTMP confirmed the presence of calcium and absence of sodium. None of the treatments altered *C. albicans* counts compared with the control. For *S. mutans*, NaTMP/F and F significantly reduced CFU values, whereas CaTMP and CaTMP/F increased these counts. Biofilms treated with CaTMP and CaTMP/F showed higher biomass and metabolic activity, with no significant difference between them. All treatments reduced protein and carbohydrate content in the matrix compared with the control, with the most pronounced effect observed for CaTMP/F. SEM analysis revealed that the CaTMP/F group displayed a less compact architecture and lower extracellular matrix deposition. In conclusion, CaTMP, particularly when combined with fluoride, significantly modified the composition and structure of mixed biofilms, altering their structural and functional properties.

Keywords: Calcium Compounds; Fluorides; Biofilms; Phosphates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de NaTMP (A) e CaTMP (C) e seus respectivos espectros de EDS (B e D). 24
- Figura 2 – Valores médios da contagem de unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* (A) e *Streptococcus mutans* (B) em biofilmes mistos. As barras representam os desvios-padrão das médias. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$; $n = 9$). 25
- Figura 3 – Valores médios da produção de biomassa total (ensaio com cristal violeta) (A) e da atividade metabólica (ensaio XTT) (B) em biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. As barras representam os desvios-padrão das médias. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, teste Student–Newman–Keuls; $p < 0,05$; $n = 9$). 25
- Figura 4 – Valores médios das concentrações de proteínas (A) e carboidratos (B) na matriz extracelular de biofilmes duais de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. As barras representam os desvios-padrão das médias. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, teste de Student–Newman–Keuls; $p < 0,05$; $n = 9$). 26
- Figura 5 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de biofilmes duais de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Aumento: 1,0 k; barras de escala: 10 μm . 26

SUMÁRIO

Resumo	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	16
Conclusão	19
Referências	20
ANEXOS	27

Effect of calcium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on the structural and functional properties of mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*

Viviane de Oliveira Zequini Amarante¹, Alberto Carlos Botazzo Delbem¹, Luigi Pedrini Guisso¹, Thamires Priscila Cavazana¹, Jéssica Silva Santana¹, Caio Sampaio¹, João Carlos Silos Moraes², Emerson Rodrigues Camargo³, Thayse Yumi Hosida^{1*}.

¹ Departamento de Odontologia Infantil e Social, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

² Departamento de Física e Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil

³ LIEC – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brasil

Título curto: Trimetafosfato de Cálcio em Biofilme

***Autor correspondente:**

Thayse Yumi Hosida

E-mail: thayse.hosida@unesp.br

Endereço completo: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Odontologia Infantil e Social.

Rua José Bonifácio 1193, 16015-050, Araçatuba/São Paulo, Brazil

Tel. +55 18 3636 3317

(artigo preparado para a submissão ao periódico Biofouling)

Resumo

O presente estudo avaliou os efeitos do trimetafosfato de cálcio (CaTMP), isoladamente ou associado ao fluoreto, sobre as propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. O CaTMP foi sintetizado por troca iônica em coluna cromatográfica e caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Biofilmes foram expostos a soluções contendo saliva artificial (CLT), 1100 ppm F (F), 1% de trimetafosfato de sódio (NaTMP), 1% NaTMP/F, 1% CaTMP ou 1% CaTMP/F. Foram avaliadas as unidades formadoras de colônias (UFCs), biomassa, atividade metabólica, composição da matriz extracelular e estrutura dos biofilmes. O CaTMP apresentou grânulos pequenos e regulares, e a análise por EDS confirmou a presença de cálcio e ausência de sódio. Nenhum tratamento alterou as contagens de *C. albicans*, enquanto NaTMP/F e F reduziram significativamente as UFCs de *S. mutans*. Em contrapartida, CaTMP e CaTMP/F aumentaram a biomassa e a atividade metabólica, sem diferença entre si. O tratamento com CaTMP/F promoveu maiores reduções nos teores de proteínas e carboidratos da matriz, além de gerar uma estrutura menos compacta com menor deposição extracelular. Conclui-se que o CaTMP, especialmente em associação ao F, modulou de forma significativa as propriedades estruturais e funcionais dos biofilmes mistos avaliados.

Palavras chave: Compostos de cálcio; Fluoretos; Biofilmes; Fosfatos.

Introdução

A cárie dentária impacta negativamente a qualidade de vida relacionada à saúde de crianças em idade pré-escolar e de suas famílias (Zaror et al. 2022). Essa doença multifatorial é modulada pela atividade do biofilme, influenciada pela dieta, e provoca a desmineralização dos tecidos dentários duros em decorrência da produção de ácidos por microrganismos cariogênicos (Gu et al. 2010; Machiulskiene et al. 2020). *Streptococcus mutans* é considerado um dos principais microrganismos envolvidos nesse processo, dada sua capacidade de adesão à superfície dentária, metabolizar açúcares, produzir ácidos e tolerar ambientes ácidos (Marsh e Martin, 2009; Mazurel et al. 2025). Estudos têm destacado também o papel de *Candida albicans* na patogênese e progressão da cárie, devido à sua interação sinérgica com *S. mutans*, resultando na formação de um biofilme estrutural e metabolicamente mais complexo e virulento (He et al. 2017; Kim et al. 2017; Ellepola et al. 2019; Alkhars et al. 2025).

Elementos como cálcio (Ca), fósforo (P) e flúor (F) desempenham papéis essenciais nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte, contribuindo para a prevenção e reparo das lesões cariosas (Hara e Zero, 2010; Cummins, 2013). Nesse contexto, compostos à base de fosfatos cíclicos, como o trimetafosfato de sódio (NaTMP), vêm sendo amplamente investigados por sua capacidade de atuar como barreira de difusão ácida e promover o equilíbrio mineral entre o esmalte e o fluido do biofilme (Favretto et al. 2013; Takeshita et al. 2016; Manarelli et al. 2017). A associação de NaTMP com o F mostrou-se eficaz na redução da perda mineral e na formação de depósitos de fluoreto de cálcio (CaF₂), reforçando o efeito dos dentifrícios e outros produtos fluoretados (Amaral et al. 2018; Gonçalves et al. 2021; Takeshita et al. 2016; Manarelli et al. 2017). No entanto, o NaTMP não apresenta efeito direto sobre os microrganismos do biofilme, atuando de forma indireta por meio da modulação da matriz extracelular e da redução da difusão de íons e ácidos (Cavazana et al. 2019; Mendes-Gouvêa et al. 2018; Emerenciano et al. 2024).

Sendo assim, a substituição do íon sódio (Na) por Ca na estrutura do NaTMP surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de um novo composto, o trimetafosfato de cálcio (CaTMP). Essa modificação pode aprimorar as propriedades do ciclofosfato, pois o Ca participa diretamente da formação e estabilização da apatita, tornando o composto mais reativo com as superfícies mineralizadas e favorecendo sua interação com o biofilme. Além disso, as substituições de Na por Ca podem alterar a carga superficial e a estrutura cristalina do composto, o que teoricamente poderia induzir efeitos antimicrobianos ou antibiofilme, ainda não descritos na literatura.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do CaTMP, isoladamente ou em associação com F, nas propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*. Foram analisados parâmetros relacionados à atividade metabólica, biomassa total, células cultiváveis, composição da matriz extracelular e estrutura do biofilme. A hipótese nula foi de que o CaTMP, com ou sem F, não promovesse alterações nas propriedades estruturais e funcionais dos biofilmes avaliados.

Materiais e Métodos

Síntese e Caracterização do Trimetafosfato de Cálcio.

Trinta gramas de NaTMP foram divididos em 200 mL de água deionizada. A solução resultante foi então passada por uma coluna contendo uma resina de troca catiônica forte na forma H⁺ (PUROLITE C100H, Purolite®, Philadelphia, PA, USA) para remover íons de Na (Watanabe et al. 1998). A solução efluente foi tratada com o sobrenadante obtido a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), Code HC09743RA, Exôdo, Brazil). Após a troca iônica, a solução foi incubada em estufa a 37°C por 48h para induzir a precipitação de CaTMP (Griffith 1962). O precipitado foi então coletado por filtração em papel de filtro quantitativo (Quanty JP42, J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brazil) e um funil de Büchner conectado a um sistema de vácuo (-600 mmHg). O precipitado foi mantido em estufa a 70 °C por 24 h e posteriormente homogeneizado em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) por 12 h (Nunes et al. 2025).

Posteriormente, os pós de CaTMP foram depositados em amostras revestidas com fita de carbono, colocadas sob vácuo e revestidas por pulverização catódica com uma fina camada de ouro (Quorum - Q150T E, West Sussex, Reino Unido). A morfologia da superfície das partículas de CaTMP foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Carl Zeiss, EVO ILS15, Carl Zeiss NTS LTD, Alemanha) operada a uma voltagem de aceleração de 20 kV com uma ampliação de 3.000x. A composição elementar foi determinada por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS, Oxford Instruments, INCAx-act, 133 eV, Inglaterra) usando uma voltagem de aceleração de 20 keV, uma resolução espacial de aproximadamente 2 µm e um tempo de contagem de 150 s. Os elementos químicos analisados incluíram P, Na, Ca e oxigênio (O) (Nunes et al. 2025).

Meio de cultura

A saliva artificial (SA) utilizada como meio de cultivo foi preparada segundo o protocolo descrito por Lamfon et al. (2003), com adaptações propostas por Cavazana et al. (2018). Para o preparo, 1 litro de água deionizada foi enriquecido com 2 g de extrato de levedura

(Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 5 g de peptona bacteriológica (Sigma-Aldrich), 4 g de sacarose (Sigma-Aldrich), 1 g de mucina (Sigma-Aldrich), 0,35 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,2 g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio (NaOH).

Formação e tratamento de biofilme

Foram utilizadas cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC): *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231. As culturas foram previamente mantidas a -70 °C em glicerol e posteriormente reativadas. As amostras de *C. albicans* foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França) e incubadas por 24 h a 37 °C. As culturas de *S. mutans* foram inoculadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h. Em seguida, uma alçada de *C. albicans* obtida das placas de ASD foi transferida para 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco) e incubada durante a noite a 37 °C, sob agitação de 120 rpm. De forma semelhante, colônias de *S. mutans* foram suspensas em 10 mL de caldo BHI (Difco) e incubadas estaticamente durante a noite em 5% de CO₂ a 37 °C. Após o período de incubação, as células fúngicas e bacterianas foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 min a 15 °C, e os pellets celulares resultantes foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl). As suspensões celulares foram então padronizadas, as células fúngicas tiveram sua concentração ajustada para 10⁷ células/mL em saliva artificial, utilizando uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico, enquanto as células bacterianas foram ajustadas espectrofotometricamente para 10⁸ células/mL no mesmo meio. Durante o experimento, a saliva artificial foi renovada a cada 24 h, conforme descrito por Cavazana et al. (2018).

Os biofilmes foram formados no fundo chato de placas de microtitulação de 96 poços (Costar, Corning Inc., Nova Iorque, EUA), nas quais foi adicionada a suspensão microbiana contendo *C. albicans* e *S. mutans*. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 h. Posteriormente, os biofilmes foram tratados três vezes, sendo duas aplicações no primeiro dia (às 10:00 e 16:00 h) e uma no dia seguinte (às 10:00 h), totalizando 96 h de formação (Cavazana et al. 2018). Os tratamentos consistiram em soluções contendo SA (CLT, controle negativo), 1100 ppm F (F, controle positivo), 1% NaTMP (NaTMP), 1% NaTMP com 1100 ppm F (NaTMP/F), 1% CaTMP (CaTMP) e 1% CaTMP com 1100 ppm F (CaTMP/F) (Nunes et al. 2025).

Ensaio de quantificação de biofilmes

Células cultiváveis

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi utilizada para quantificação das células viáveis. Ao final do experimento, os biofilmes foram lavados com solução NaCl (0,85%), raspados e ressuspensos na mesma solução. As suspensões foram agitadas em vórtex por 1 min, diluídas em série e semeadas em CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, França) e em ágar BHI suplementado com anfotericina B (7 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para a contagem de *C. albicans* e *S. mutans*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24–48 h, e os resultados expressos como log₁₀ UFC/cm² (Cavazana et al. 2018).

Atividade metabólica

A atividade metabólica dos biofilmes foi determinada pelo ensaio de redução do XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio; Sigma-Aldrich), conforme descrito por Fernandes et al. (2016). Após a formação e os tratamentos, os biofilmes foram lavados com solução salina e incubados por 3 h a 37 °C, no escuro, com 200 µL de solução contendo 150 mg XTT/L e 10 mg de metassulfato de fenazina/L (Sigma-Aldrich). Em seguida, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, e a absorbância foi medida a 490 nm. Os resultados foram expressos em função da área dos poços (abs/cm²).

Biomassa total do biofilme

A biomassa do biofilme foi quantificada pelo ensaio de coloração com violeta de cristal (CV) (Monteiro et al. 2011). Após a formação dos biofilmes, estes foram fixados por 15 min à temperatura ambiente com metanol 99% (v/v) (Sigma-Aldrich), corados por 5 min com violeta de cristal 1% (v/v) (Sigma-Aldrich) e posteriormente decorados com ácido acético 33% (v/v) (Sigma-Aldrich). A absorção das soluções resultantes foi medida em 570 nm em leitor de microplacas, sendo os valores expressos em função da área dos poços (abs/cm²).

Análise da composição da matriz extracelular

Os biofilmes foram cultivados em placas de seis poços (Costar, Corning Inc., EUA) contendo 4 mL de suspensão microbiana, conforme descrito anteriormente. Após o tratamento com as diferentes soluções experimentais, os biofilmes foram raspados dos poços, ressuspensos em solução NaCl (0,85%) e submetidos à sonicação por 30 s a 30 W, seguida de renovação em vórtex por 2 min. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 3000 g por 10 min e o sobrenadante filtrado em membrana de nitrocelulose (0,22 µm; Orange

Scientific) para obtenção da fração líquida da matriz extracelular (Monteiro et al. 2013). Uma alíquota dos biofilmes raspados foi filtrada a vácuo em membrana de acetato de celulose (0,22 µm) e seca a 60 °C até peso constante para determinação do peso seco. O conteúdo proteico da matriz extracelular foi determinado pelo método do ácido bicinonínico (Kit BCA; Sigma-Aldrich), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Monteiro et al. 2013), enquanto o conteúdo de carboidratos foi determinado pelo método de Dubois et al. (1956), empregando glicose como padrão. As leituras de absorção foram realizadas em 562 nm para proteínas e 490 nm para carboidratos, e os resultados expressos em mg/g de peso seco do biofilme.

Análise estrutural do biofilme

A morfologia estrutural dos biofilmes de duas espécies, *C. albicans* e *S. mutans*, foi avaliada por MEV. Os biofilmes foram cultivados em placas de 24 poços e expostos às soluções experimentais conforme descrito anteriormente. Após o tratamento final, os poços foram delicadamente enxaguados com NaCl a 0,85%, e os biofilmes foram desidratados em uma série gradual de etanol (70% e 95% por 10 min cada, e 100% por 20 min), seguida de secagem ao ar por 20 min (Silva et al. 2013). O fundo de cada poço foi então excisado com uma lâmina de bisturi esterilizada na chama (nº 11; Solidor, Lamedid Comercial e Serviços Ltda., Barueri, Brasil), revestido com ouro por pulverização catódica e examinado em um microscópio eletrônico de varredura (S-360; Leo, Cambridge, MA, EUA).

Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à ANOVA unidirecional e ao teste post hoc de Student-Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três momentos diferentes (n=9).

Resultados

Caracterização do Trimetafosfato de Cálcio

Imagens de MEV revelaram granulações pequenas e uniformes para todos os grupos analisados, NaTMP e CaTMP (Figura 1A e 1C). As análises de EDS mostraram pico de Na a 1,04 keV para NaTMP, juntamente com picos de O e P comuns a ambos os compostos

(Figura 1B). Além disso, picos característicos de Ca a 3,69 e 4,00 keV foram observados na amostra de CaTMP (Figura 1D).

Avaliação das células cultiváveis

Nenhum dos tratamentos avaliados alterou significativamente o número de *C. albicans* em comparação ao grupo CLT (Figura 2A). Para *S. mutans*, o NaTMP também não promoveu redução significativa em relação ao CLT (Figura 2B). Em contraste, NaTMP/F e F reduziram de forma significativa as UFC de *S. mutans*, enquanto CaTMP e CaTMP/F levaram a um aumento nesses valores, sendo o maior observado para o grupo tratado com CaTMP (Figura 2B).

Avaliação da biomassa

Os biofilmes expostos a F, NaTMP ou NaTMP/F apresentaram valores de biomassa semelhantes ao grupo CLT (Figura 3A). Em contraste, os tratamentos com CaTMP e CaTMP/F promoveram aumento significativo desse parâmetro em relação aos demais grupos. Os maiores valores foram observados para CaTMP (1,26 abs/cm²) e CaTMP/F (1,30 abs/cm²), sem diferença estatística entre si.

Avaliação da atividade metabólica

Os biofilmes tratados com F, NaTMP ou NaTMP/F apresentaram atividade metabólica semelhante à do grupo CLT (Figura 3B). Em contraste, os tratamentos com CaTMP e CaTMP/F resultaram em valores significativamente mais elevados, sem diferença estatística entre si.

Avaliação dos componentes da matriz extracelular do biofilme

Todos os grupos apresentaram redução no conteúdo de proteínas em comparação ao CLT, sendo a maior diminuição observada para o tratamento com CaTMP/F (Figura 4A). Entre NaTMP, NaTMP/F e F, não houve diferenças significativas. Da mesma forma, o teor de carboidratos foi significativamente menor em todos os grupos em relação ao CLT, com CaTMP/F promovendo maior redução (Figura 4B).

Avaliação da estrutura do biofilme

Os biofilmes apresentaram aglomerados de cocos e hifas em todos os grupos, independentemente do tratamento aplicado (Figura 5). No entanto, a análise por MEV revelou que as amostras expostas a soluções contendo F exibiram uma matriz extracelular menos densa. De forma mais evidente, os biofilmes tratados com CaTMP/F apresentaram arquitetura distinta, caracterizada por estrutura menos compacta e redução acentuada da matriz extracelular ao redor das células.

Discussão

A suplementação de produtos fluoretados com sais de fosfato contendo cálcio tem sido apresentada como uma estratégia promissora para reduzir a perda de esmalte em modelos de cárie *in vitro* (Zaze et al. 2014; Emerenciano et al. 2024). Recentemente, Nunes et al. (2025) sintetizaram e caracterizaram um novo composto derivado do NaTMP contendo Ca em sua estrutura (CaNaTMP), o qual apresentou efeito superior ao obtido com fluoreto (1100 ppm F) ou NaTMP na prevenção da erosão inicial do esmalte. Acredita-se que a presença de Ca na estrutura do fosfato cíclico favorece a deposição de uma camada amorfa rica em Ca e P sobre a superfície dentária, aumentando a resistência do esmalte à dissolução ácida e deterioração do amolecimento superficial induzido pelos desafios erosivos. Embora esse estudo tenha se concentrado em um modelo de erosão, suas descobertas reforçam o potencial dos fosfatos contendo Ca como agentes capazes de modular a dinâmica mineral do esmalte. Assim, o presente trabalho amplia essa abordagem, avaliando o efeito do CaTMP, isolado ou associado ao F, sobre parâmetros microbiológicos relacionados à formação de biofilmes cariogênicos. Observou-se que o CaTMP levou a reduções significativas nas concentrações de proteínas e carboidratos da matriz extracelular de biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*, alterando seu metabolismo, composição microbiana e estrutura. Dessa forma, a hipótese nula do estudo foi rejeitada.

A exposição dos biofilmes ao CaTMP resultou, possivelmente, em níveis elevados de Ca e P, o que pode interferir nos componentes da matriz extracelular (Lynch, 2004). A capacidade dos microrganismos presentes em biofilmes de detectar alterações nos componentes do ambiente é um mecanismo essencial que lhes permite adaptar-se de maneira eficiente às condições externas, desencadeando a expressão de genes relacionados à virulência e à resistência (Islam, 2020). A tolerância ao Ca pode desempenhar um papel determinante em bactérias cariogênicas (Astasov-Frauenhoffer et al. 2017), uma vez que esse íon influencia o metabolismo celular microbiano, bem como a capacidade das células de perceber e responder às variações ambientais, um aspecto crucial da patogênese

bacteriana (Rosch et al. 2008). Além disso, a rigidez estrutural necessária para a proteção frente ao ambiente externo, juntamente com a regulação gênica e o controle da adsorção de nutrientes, constitui uma das principais funções da matriz extracelular (Hobley et al. 2015).

A sacarose é um componente fundamental na produção da matriz extracelular, influenciando, portanto, no crescimento do biofilme e, por esse motivo, foi adicionada à saliva artificial no presente estudo (Tomé et al. 2017). No entanto, observou-se que o tratamento com CaTMP/F reduziu de forma mais pronunciada os conteúdos de proteínas e carboidratos da matriz extracelular em comparação aos demais grupos, confirmando o efeito sinérgico entre o F e o Ca descrito na literatura (Cavazana et al. 2019, Amaral et al. 2018). O F pode interagir com o Ca proveniente do CaTMP, resultando na formação de depósitos de CaF_2 , que atuam como reservatórios iônicos capazes de liberar F e Ca gradualmente no microambiente do biofilme (Amaral et al. 2018; Cavazana et al. 2021). Essa liberação controlada pode alterar a consistência e a densidade da matriz, reduzindo a produção de polissacarídeos extracelulares e proteínas estruturais, como observado em estudos prévios com CaGP e NaTMP (Cavazana et al. 2019; Emerenciano et al. 2024). A diminuição desses componentes está associada à menor adesão e coesão do biofilme, além de favorecer a penetração de agentes antimicrobianos e tampões salivares.

A presença de glucanos insolúveis em água na matriz do biofilme é um fator relevante para o potencial cariogênico dos biofilmes dentários, e, portanto, a redução de carboidratos representa um aspecto favorável para o controle da cárie dentária (Koo et al. 2013). Níveis mais baixos de proteínas também desempenham um papel significativo, uma vez que essas moléculas estão envolvidas na adesão do biofilme às superfícies, na ligação intercelular, na transferência horizontal de genes e em outras funções essenciais da matriz extracelular (Flemming et al. 2010; 2023). Essas reduções estão de acordo com a arquitetura distinta do biofilme observada por MEV no grupo CaTMP/F, que apresentou uma estrutura menos compacta e mais irregular, com menor densidade de matriz e maior espaçamento entre as células microbianas. Essa configuração sugere uma estrutura de biofilme mais permeável, condição que pode reduzir a formação de microambientes ácidos e, conseqüentemente, minimizar a desmineralização dentária (Xiao et al. 2012). Além disso, uma matriz menos densa favorece a difusão de íons e tampões salivares, o que reforça o potencial protetor do CaTMP associado ao F. Assim, a modificação estrutural promovida por CaTMP/F pode contribuir de maneira significativa para reduzir a virulência do biofilme e proteger as superfícies dentárias contra a desmineralização (Xiao et al. 2012).

A exposição dos biofilmes ao CaTMP promoveu alterações funcionais significativas, refletidas pelo aumento da biomassa total e da atividade metabólica, o que sugere um

possível efeito de reorganização estrutural. A presença de íons Ca pode favorecer a agregação celular e a estabilidade da matriz extracelular, uma vez que o Ca é capaz de formar pontes iônicas entre macromoléculas (como polissacarídeos e proteínas), reforçando a coesão intercelular e a adesão ao substrato (Leitão et al. 2018; Rose, 2020). Essa interação contribui para o aumento da biomassa observada nos grupos tratados com CaTMP, independentemente da associação com F. Além disso, o aumento da atividade metabólica nesses grupos pode estar relacionado à maior disponibilidade de Ca na superfície microbiana, favorecendo as reações de transporte e respiração celular. Esses resultados estão em consonância com estudos utilizando glicerofosfato de cálcio (CaGP), que também indicam aumento da biomassa e do metabolismo sem aumento concomitante no número de células viáveis (Cavazana et al. 2023).

Os resultados deste estudo mostraram que os tratamentos contendo CaTMP e CaTMP/F promoveram um aumento nas contagens de *S. mutans*, enquanto NaTMP/F e F reduziram significativamente esses valores em relação ao controle. Esse comportamento pode ser explicado pela influência do Ca na fisiologia bacteriana e na estabilidade do biofilme. O Ca atua como cofator essencial em diversos processos celulares, modulando vias metabólicas, integridade da parede celular e sinalização intracelular, além de favorecer a formação de pontes iônicas entre polímeros aniônicos da matriz extracelular (Rosch et al. 2008; Leitão et al. 2018). Essa capacidade de ligação pode aumentar a coesão entre as células e estabilizar a estrutura tridimensional do biofilme, resultando em maior viabilidade microbiana e acúmulo de biomassa, como observado nos grupos tratados com CaTMP. Estudos recentes também demonstraram que compostos à base de cálcio, como o CaGP, podem intensificar a compactação da matriz e o crescimento de biofilmes mistos, sem necessariamente exercer efeito antimicrobiano direto, sugerindo um papel modulador do cálcio sobre a organização e o metabolismo microbiano (Cavazana et al. 2023; Emerenciano et al. 2024). Por outro lado, as reduções nas contagens de *S. mutans* nos grupos tratados com F e NaTMP/F estão associadas à conhecida ação antimicrobiana do F, que interfere no metabolismo ácido e na atividade enzimática bacteriana, comprometendo o crescimento e a sobrevivência das células (Nassar; Gregory, 2017). Dessa forma, o efeito do CaTMP parece estar mais relacionado à modulação físico-química e estrutural do biofilme do que à inibição direta da viabilidade microbiana.

Apesar dos achados, algumas limitações inerentes a este modelo experimental devem ser mencionadas. É importante destacar que um modelo de biofilme de dupla espécie não reproduz completamente a complexidade polimicrobiana característica do ambiente oral. Além disso, deve-se considerar que o protocolo utilizado não incorpora variáveis

hidrodinâmicas comparáveis às que ocorrem na cavidade bucal. Ainda assim, apesar dessas limitações, o modelo de biofilme empregado neste estudo forneceu informações adicionais sobre os mecanismos pelos quais o CaTMP pode influenciar a dinâmica do processo cariogênico, incentivando a realização de pesquisas futuras envolvendo esse novo composto.

De forma geral, os resultados obtidos indicam que o CaTMP, embora não exerça ação antimicrobiana direta, influencia de modo significativo as propriedades estruturais e funcionais do biofilme, especialmente quando combinado ao F. Essa ação parece ocorrer por meio da modulação da matriz extracelular, do aumento da biomassa e da reorganização morfológica observada por MEV. Assim, o CaTMP se mostra um composto promissor, com potencial para atuar como agente multifuncional, capaz de integrar efeitos de remineralização e controle do biofilme cariogênico.

Conclusão

O CaTMP, isolado ou associado ao F, alterou as propriedades estruturais e funcionais de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans*, promovendo aumento da biomassa e do metabolismo e redução dos componentes da matriz e da compactação do biofilme, sem exercer efeito antimicrobiano direto.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — Brasil (CAPES), Código Financeiro 001 (bolsa de doutorado concedida à primeira autora), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Código Financeiro 134345/2020-7, pelo apoio financeiro.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse.

Referências

- Alkhars N, Manning S, Al Jallad N, Zeng Y, Wu TT, Fogarty C, et al. 2025. Birth cohort study identifies *Candida albicans* as a risk factor for dental caries. *J Dent Res* 26:220345251340040.
- Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. 2018. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 106:2553–2564.
- Astasov-Frauenhoffer M, Varenganayil MM, Decho AW, Waltimo T, Braissant O. 2017. Exopolysaccharides regulate calcium flow in cariogenic biofilms. *PLoS One* 12:e0186256.
- Cavazana TP, Hosida TY, Pessan JP, Sampaio C, Monteiro DR, Delbem ACB. 2019. Activity of sodium trimetaphosphate associated or not with fluoride on dual-species biofilms. *Biofouling* 35:710–718.
- Cavazana TP, Hosida TY, Sampaio C, de Moraes LA, Monteiro DR, Pessan JP, Delbem ACB. 2021. Calcium glycerophosphate and fluoride affect the pH and inorganic composition of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Dent* 115:103844.
- Cavazana TP, Hosida TY, Sampaio C, de Moraes LA, Monteiro DR, Pessan JP, et al. 2023. The activity of calcium glycerophosphate and fluoride against cariogenic biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* formed in vitro. *Antibiotics (Basel)* 12:422.
- Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Monteiro DR, Botazzo Delbem AC. 2018. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions in vitro. *Arch Oral Biol* 90:9–12.
- Cummins D. 2013. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent* 41(Suppl 2):S1–S11.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356.
- Ellepola K, Truong T, Liu Y, et al. 2019. Multi-omics analyses reveal synergistic carbohydrate metabolism in *Streptococcus mutans*–*Candida albicans* mixed-species biofilms. *Infect Immun* 87:e00339–19.
- Emerenciano NG, Delbem ACB, Gonçalves FMC, de Camargo ER, de Souza Neto FN, et al. 2024. Effect of nanometric β -calcium glycerophosphate supplementation in conventional toothpaste on enamel demineralization: an in vitro study. *J Mech Behav Biomed Mater* 151:106354.
- Favretto CO, Danelon M, Castilho FC, Vieira AE, Delbem AC. 2013. In vitro evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. *Caries Res* 47:532–538.
- Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, Barbosa DB. 2016. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling* 32:329–338.

- Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, et al. 2023. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol* 21:70–86.
- Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–633.
- Griffith E. 1962. The structure of the salt sodium calcium metaphosphate ($\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$). *Inorg Chem* 1:962–964.
- Gu LS, Kim J, Kim YK, Liu Y, Dickens SH, Pashley DH, et al. 2010. A chemical phosphorylation-inspired design for type I collagen biomimetic remineralization. *Dent Mater* 26:1077–1089.
- Hara AT, Zero DT. 2010. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am* 54:455–467.
- He J, Kim D, Zhou X, et al. 2017. RNA-Seq reveals enhanced sugar metabolism in *Streptococcus mutans* co-cultured with *Candida albicans* within mixed-species biofilms. *Front Microbiol* 8:1036.
- Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 39:649–669.
- Islam MS. 2020. Calcium signaling: from basic to bedside. *Adv Exp Med Biol* 1131:1–6.
- Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, et al. 2017. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep* 7:41332.
- Koo H, Falsetta ML, Klein MI. 2013. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res* 92:1065–1073.
- Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. 2003. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* 111:465–471.
- Leitão TJ, Cury JA, Tenuta LMA. 2018. Kinetics of calcium binding to dental biofilm bacteria. *PLoS One* 13:e0191284.
- Lynch RJ. 2004. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. *Int Dent J* 54(Suppl 1):310–314.
- Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. 2020. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res* 54:7–14.
- Manarelli MM, Delbem ACB, Báez-Quintero LC, de Moraes FRN, Cunha RF, Pessan JP. 2017. Fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate reduce enamel demineralization in vitro. *Acta Odontol Scand* 75:376–378.
- Marsh PD, Martin MV. 2009. *Oral microbiology*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.

- Mazurel D, Brandt BW, Boomsma M, Crielaard W, Lagerweij M, Exterkate RAM, et al. 2025. *Streptococcus mutans* and caries: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 104:594–603.
- Mendes-Gouvêa CC, do Amaral JG, Fernandes RA, Fernandes GL, Gorup LF, et al. 2018. Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver nanoparticles: characteristics and antimicrobial efficacy. *Biofouling* 34:299–308.
- Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R, et al. 2011. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling* 27:711–717.
- Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. 2013. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol* 114:1175–1183.
- Nassar HM, Gregory RL. 2017. Biofilm sensitivity of seven *Streptococcus mutans* strains to different fluoride levels. *J Oral Microbiol* 9:1328265.
- Nunes MM, Guisso LP, Hosida TY, de Camargo ER, Silos Moraes JC, Pessan JP, et al. 2025. Synthesis and characterization of calcium-containing sodium cyclotriphosphate and its protective effect on enamel erosion in vitro. *Dent Mater* S0109-5641(25)00749-3.
- Rosch JW, Sublett J, Gao G, Wang YD, Tuomanen EI. 2008. Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host. *Mol Microbiol* 70:435–444.
- Rose RK. 2000. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for biofilm formation and retention. *Biochim Biophys Acta* 1475:76–82.
- Silva S, Pires P, Monteiro DR, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, et al. 2013. The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Med Mycol* 51:178–184.
- Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem ACB. 2016. Remineralizing potential of a low fluoride toothpaste with sodium trimetaphosphate: an in-situ study. *Caries Res* 50:571–578.
- Tomé FM, Ramos LP, Freire F, Pereira CA, Oliveira ICB, Junqueira JC, et al. 2017. Influence of sucrose on growth and sensitivity of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 32:1237–1243.
- Watanabe M, Yoshida K, Sakurai M, Sato S. 1998. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. *J Mater Sci* 33:5601–5606.
- Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, et al. 2012. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog* 8:e1002623.
- Zaror C, Matamala-Santander A, Ferrer M, Rivera-Mendoza F, Espinoza-Espinoza G, Martínez-Zapata MJ. 2022. Impact of early childhood caries on oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg* 20:120–135.

Zaze AC, Dias AP, Sasaki KT, Delbem AC. 2014. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *Clin Oral Investig* 18:1619–1624.

Figuras

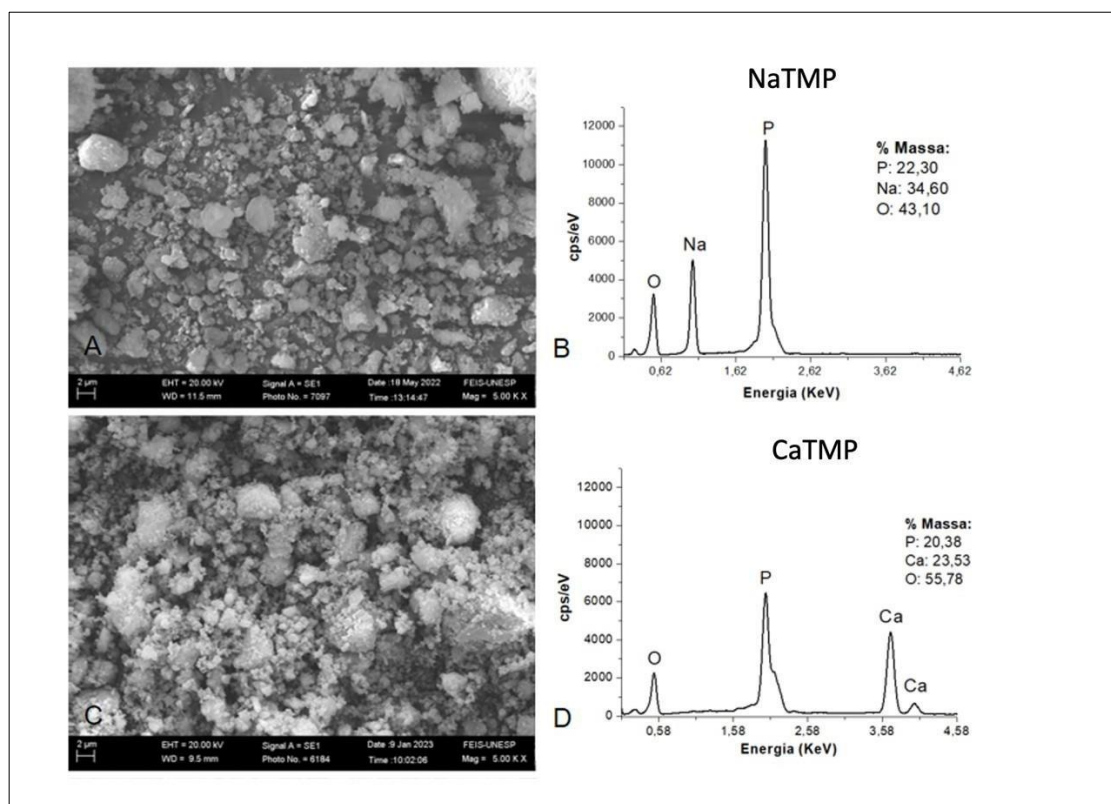


Figura 1. Fotomicrografia obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de NaTMP (A) e CaTMP (C) e seus respectivos espectros de EDS (B e D). NaTMP = trimetafosfato de sódio; CaTMP = trimetafosfato de cálcio.

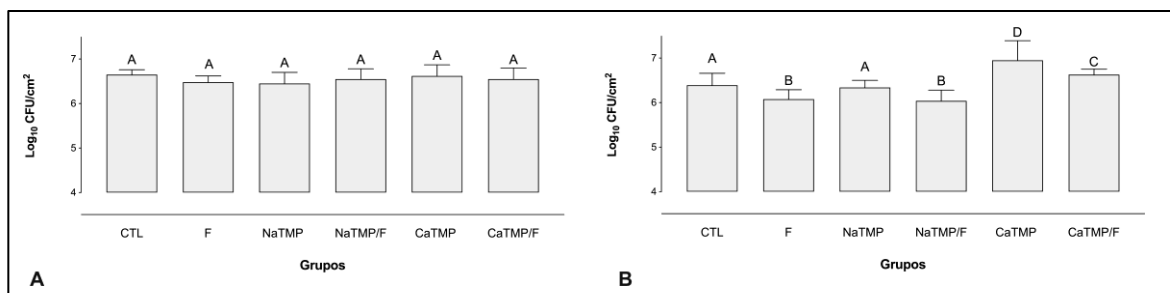


Figura 2. Valores médios da contagem de unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* (A) e *Streptococcus mutans* (B) em biofilmes mistos. As barras representam os desvios-padrão das médias. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$; $n=9$). CTL = controle negativo (saliva artificial); F = 1100 ppm F; NaTMP = 1% NaTMP; NaTMP/F = 1% NaTMP combinado com 1100 ppm F; CaTMP = 1% CaTMP; CaTMP/F = 1% CaTMP combinado com 1100 ppm F.

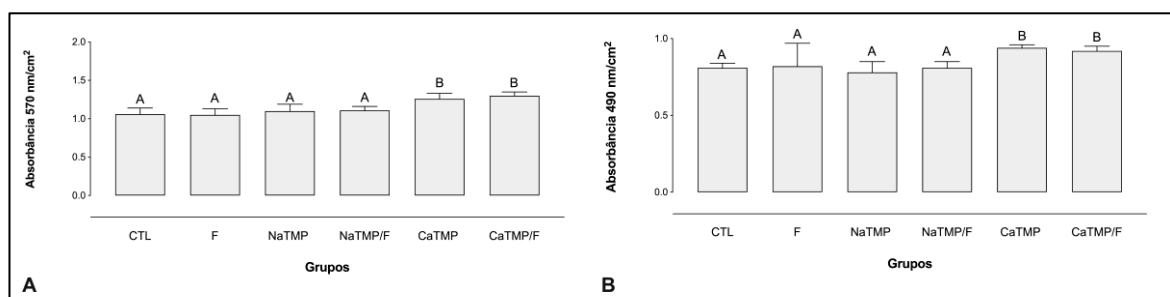


Figura 3. Valores médios da produção de biomassa total (ensaio com cristal violeta) (A) e da atividade metabólica (ensaio XTT) (B) em biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. As barras representam os desvios-padrão das médias. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$; $n=9$). CTL = controle negativo (saliva artificial); F = 1100 ppm F; NaTMP = 1% NaTMP; NaTMP/F = 1% NaTMP combinado com 1100 ppm F; CaTMP = 1% CaTMP; CaTMP/F = 1% CaTMP combinado com 1100 ppm F.

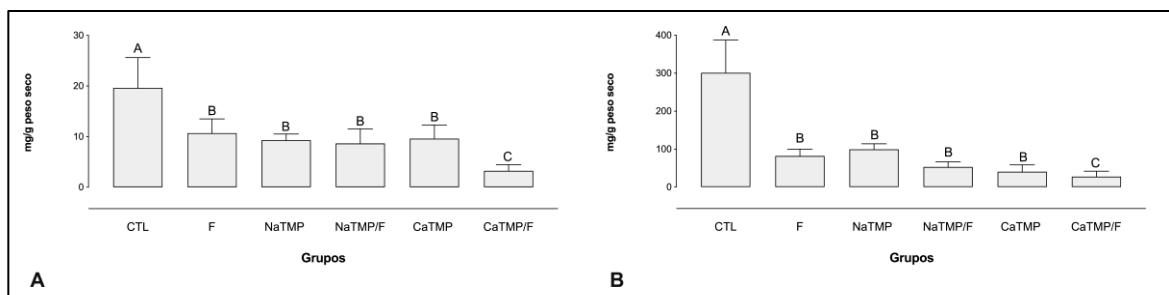


Figura 4. Valores médios das concentrações de proteínas (A) e carboidratos (B) na matriz extracelular de biofilmes duais de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. As barras representam os desvios-padrão das médias. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, teste de Student–Newman–Keuls; $p < 0,05$; $n = 9$). CTL = controle negativo (saliva artificial); F = 1100 ppm F; NaTMP = 1% NaTMP; NaTMP/F = 1% NaTMP combinado com 1100 ppm F; CaTMP = 1% CaTMP; CaTMP/F = 1% CaTMP combinado com 1100 ppm F.

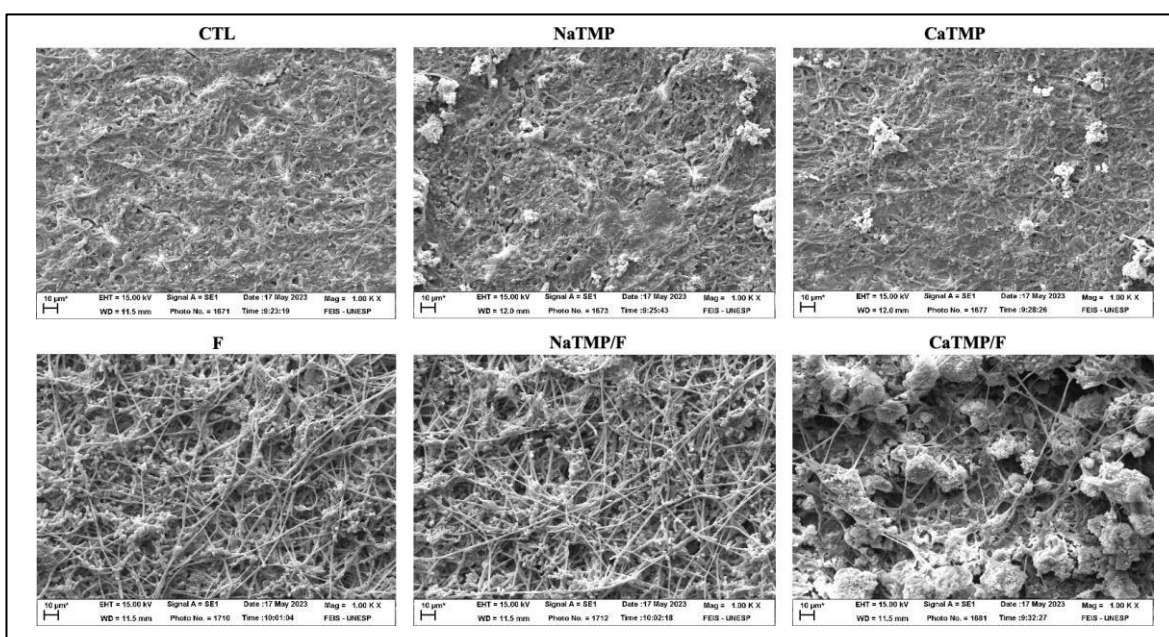


Figura 5. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de biofilmes duais de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Aumento: 1,0 k; barras de escala: 10 μm . CTL = controle negativo (saliva artificial); F = 1100 ppm F; NaTMP = 1% NaTMP; NaTMP/F = 1% NaTMP combinado com 1100 ppm F; CaTMP = 1% CaTMP; CaTMP/F = 1% CaTMP combinado com 1100 ppm F.

ANEXO A

Biofouling - Preparing Your Paper

Article Types

Research Article

- Should be written with the following elements in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should be no more than 9000 words, inclusive of:
 - Abstract
 - Tables
 - References
 - Figure or table captions
- Should contain an unstructured abstract of 200 words.
- Should contain between 3 and 6 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.

Data Note

- Should be written with the following elements in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should be no more than 9000 words, inclusive of:
 - Abstract
 - Tables
 - References
 - Figure or table captions
- Should contain an unstructured abstract of 200 words.
- Should contain between 3 and 6 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
- Further information about this article type: Data Notes are a short, peer-reviewed article type that concisely describe research data (dataset) stored in a repository, prior to submission. Data Notes do not include any interpretation or conclusion of the data (see preparing your paper). Data Notes should only describe the data. The dataset of Data Notes can be either original (not previously published) or be issued from a published research article as long as the datasets have not already been published.
- Further to the data sharing policy for the journal, Data Note submissions must include a [data availability statement](#) and describe data available via a [repository](#).

Format-Free Submission

Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. Manuscripts may be supplied as single or multiple files. These can be Word, rich text format (rtf), open document format (odt), PDF, or LaTeX files. Figures and tables can be placed within the text or submitted as separate documents. Figures should be of sufficient resolution to enable refereeing.

- There are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to evaluate a manuscript: abstract, author affiliation, figures, tables, funder information, and references. Further details may be requested upon acceptance.
- References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. For manuscripts submitted in LaTeX format a .bib reference file must be included. Author name(s), journal or book title, article or chapter title, year of publication, volume and issue (where appropriate) and page numbers are essential. All bibliographic entries must contain a corresponding in-text citation. The addition of DOI (Digital Object Identifier) numbers is recommended but not essential.
- The [journal reference style](#) will be applied to the paper post-acceptance by Taylor & Francis.
- Spelling can be US or UK English so long as usage is consistent.

Note that, regardless of the file format of the original submission, an editable version of the article must be supplied at the revision stage.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. Taylor & Francis Editing Services can also help you create research promotion materials, including infographics, video abstracts, lay summaries and graphical abstracts, to support your article's impact. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure all listed authors meet the [Taylor & Francis authorship criteria](#). All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. **CRedit Roles.** This journal collects CRediT roles as part of the submission process and includes them on published articles when supplied by the authors. You may be required to provide CRediT roles (contributor details) for yourself and your co-authors. For more information about CRediT visit [Author Services](#).

3. **Graphical abstract** (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .tiff. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1. Taylor & Francis Editing Services provides a [graphical abstract creation service](#) for a fee.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#). Taylor & Francis Editing Services provides a [video abstract creation service](#) for a fee.
5. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
6. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial or non-financial interest that has arisen from the direct applications of your research. If there are no relevant competing interests to declare please state this within the article, for example: *The authors report there are no competing interests to declare.* [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
7. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
8. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, fileset, audio file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. Articles with extenders, such as infographics or video summaries, are up to 108% more likely to be downloaded (based on data in May 2024 from Plain Language Summary of Publication and Clinical Trial Protocol articles published in Future Oncology in 2023). We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#). Taylor & Francis Editing Services can help you create research promotion materials, including infographics, video abstracts, lay summaries and graphical abstracts, to support your article's impact. For more information, including pricing, [visit this website](#).
10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
13. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Submitting Your Paper

This journal uses Taylor & Francis' [Submission Portal](#) to manage the submission process. The Submission Portal allows you to see your submissions across Taylor & Francis' journal portfolio in one place. To submit your manuscript please click [here](#).

Please note that *Biofouling* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Biofouling* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information regarding repositories](#).

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer-reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to

ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Color figures will be reproduced in color in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in color in the print version, a charge will apply.

Charges for color figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 color figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

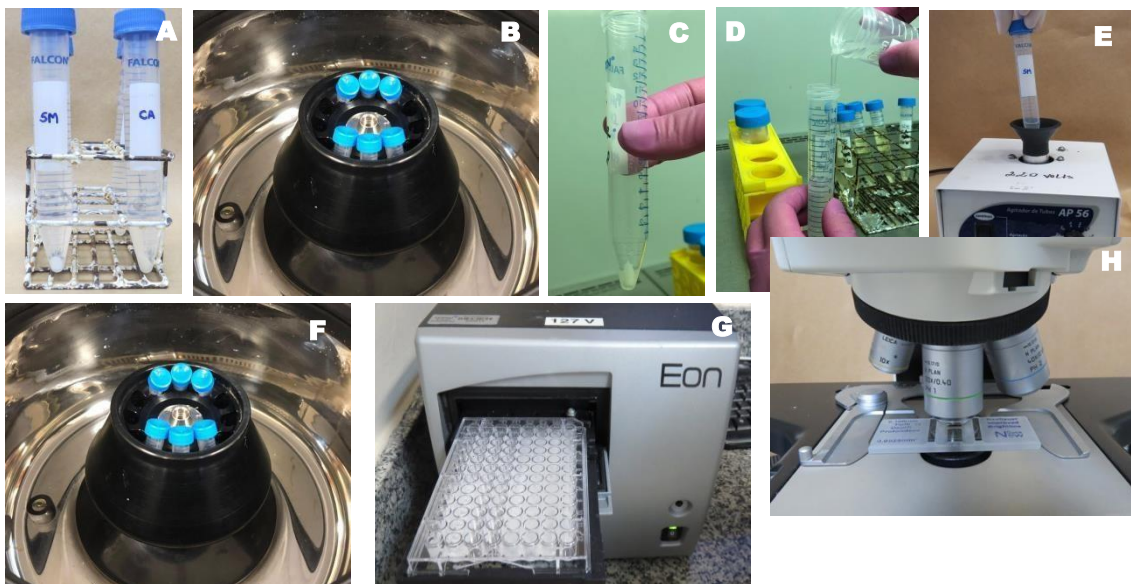
Queries

If you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).

Updated 8th July 2025

ANEXO B

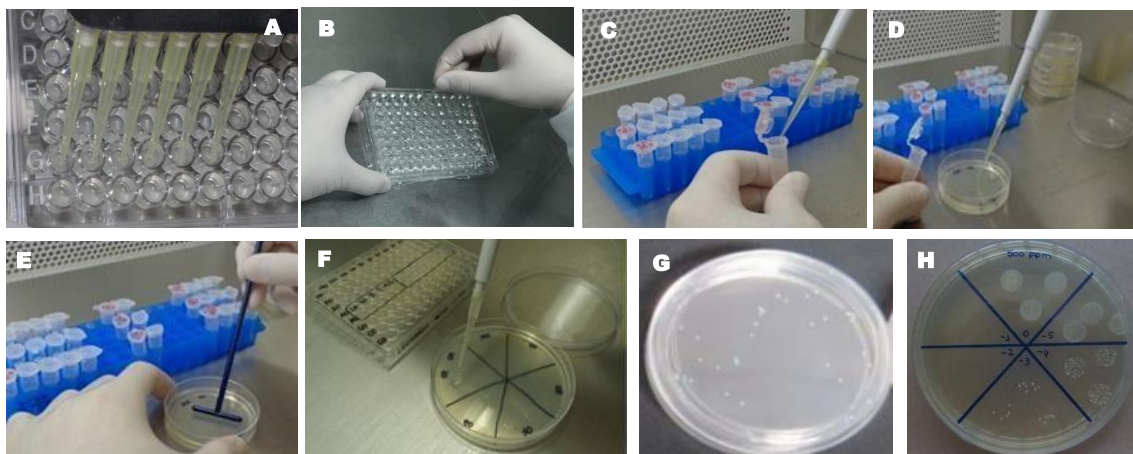
Ilustração esquemática da preparação do inóculo da cepa de *S. mutans* e *C. albicans*



(A) Preparação do pré-inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231; (B) Centrifugação do inóculo a 8000 rpm durante 5 min; (C) Obtenção do pellet de células e descarte do sobrenadante; (D) Lavagem das células de *S. mutans* e *C. albicans* NaCl (0,85%), (E) Homogeneização em vórtex e (F) Centrifugadas novamente (foram realizadas duas lavagens com NaCl); (G) Aliquotas de 200 μ l adicionadas aos poços de placas de 96 poços e levadas para leitura em espectrofotômetro a 640 nm afim de ajustar o número de células de *S. mutans* para 10^8 células/mL em saliva artificial (SA); (H) O número de células de *C. albicans* ajustado para 10^7 células/mL em SA usando uma câmara de Neubauer.

ANEXO C

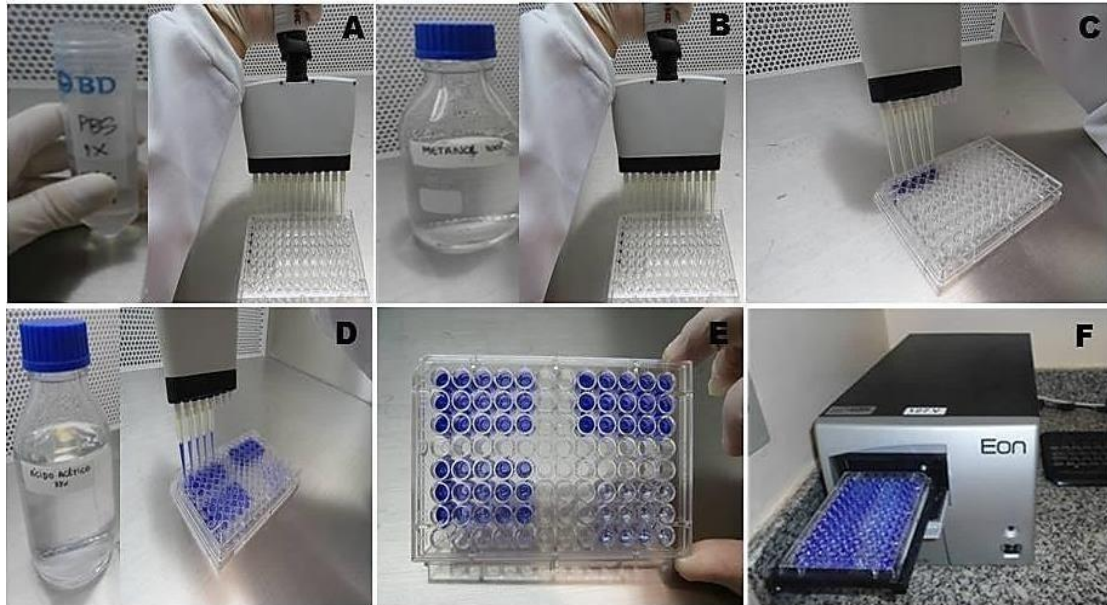
Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) dos biofilmes



(A) Remoção do tratamento e lavagem com NaCl (B) Raspagem do poço com auxílio de ponteiros (200 μ L de NaCl 0,85 %) – 5 vezes; (C) Diluições decimais seriadas das suspensões de biofilmes em NaCl; (D), (E) e (F) Plaqueamento das diluições no meio de cultura CHROMagar (*C. albicans*) e BHI ágar (*S. mutans*); (G) e (H) Crescimento das UFCs de *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente

ANEXO D

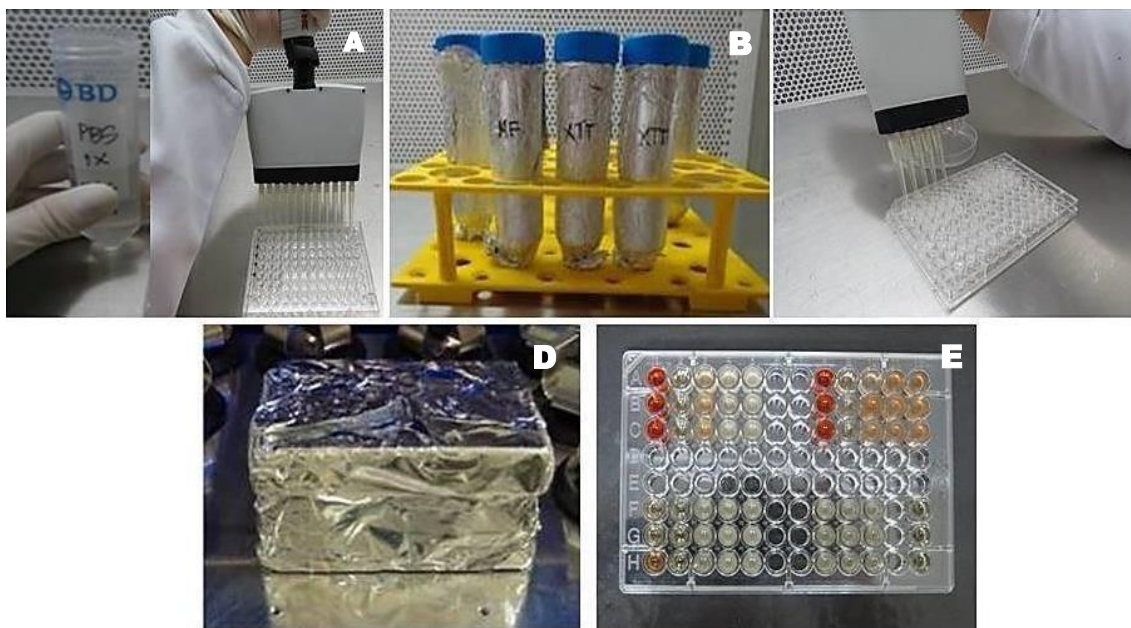
Quantificação da biomassa total dos biofilmes



(A) Lavagem dos poços com NaCl 0,85% para remoção das células não aderidas; (B) fixação dos biofilmes com metanol 99 %; (C) adição de 200 μ L de cristal violeta 1 % para corar os biofilmes; (D) remoção do cristal violeta e adição de 200 μ L de ácido acético 33 %; (E) transferência de 200 μ l da solução final obtida para poços de placas de microtitulação de 96 poços; (F) leitura de absorbância (570 nm) da solução obtida.

ANEXO E

Avaliação da atividade metabólica das células dos biofilmes



(A) Lavagem dos poços contendo biofilme tratado com 200 μ L de NaCl 0,85% (B) soluções de XTT e metassulfato de fenazina (MF) protegidas da luminosidade; (C) incubação das placas com solução de XTT + MF (1 mL/poço) (protegidas da luminosidade) por 3 horas a 37 °C; (D) Diferentes tonalidades (dependendo da maior ou menor atividade metabólica das células) da solução de XTT após o período de incubação; (E) Transferência de 200 μ l da solução final para poços de placas de microtitulação de 96 poços para leitura de absorbância (490 nm)

ANEXO F

Quantificação de proteína e carboidrato e extracelular dos biofilmes



(A) Secagem das amostras de biofilmes após tratamento com TMP e/ou F em membrana de acetato de celulose (previamente pesada), para determinação do peso seco dos biofilmes; (B) Amostra sonicada a 30 w por 30 s e (C) homogeneizada em vórtex; (D) centrifugação das amostras durante 10 min a 3000 g; (E) filtragem do sobrenadante obtido anteriormente; (F) Kit BCA utilizado para quantificação do conteúdo proteico da matriz extracelular; (G) Pipetagem de 200 μ l da mistura dos reagentes do kit em poços de placa de 96 poços; (H) Pipetagem de 25 μ l do sobrenadante da amostra de biofilme para quantificação de proteínas; (I) Para determinação do conteúdo de carboidrato da matriz extracelular, 500 μ l do sobrenadante das amostras foram adicionados à mistura de 500 μ l de fenol a 9% e 2,5 mL de ácido sulfúrico em tubos de ensaio de vidro; (J) Diferentes tonalidades de cores nos tubos demonstrando diferentes teores de carboidrato; (K) As quantidades de proteína e carboidrato da matriz dos biofilmes foram determinadas colorimetricamente por leitura em espectrofotômetro a 562 e 490 nm, respectivamente.