

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 18/05/2026



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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. 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 soluções contendo 1100 ppm de F (F); saliva artificial (CTL); 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  $\mu\text{m}$ . 26

## SUMÁRIO

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

## **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.

## 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 Morais 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 Morais 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  $\beta$ -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.