



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

SOFIA EDUARDA DE OLIVEIRA NOVAES

**Efeito do ciclofosfato de cálcio sobre componentes da
matriz extracelular de biofilmes mistos de *Streptococcus
mutans* e *Candida albicans* formados *in vitro***

Araçatuba – SP
2024

SOFIA EDUARDA DE OLIVEIRA NOVAES

Efeito do ciclofosfato de cálcio sobre componentes da matriz extracelular de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* formados *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista

Orientadora: Prof.^a Dra. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba – SP
2024

**Ao meu avô e meus
padrinhos (in memoriam),
dedico este trabalho com
carinho e saudade.**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosilene, que se sacrificou por mim todos os dias e sempre me apoiou em todas as decisões. Ter uma mãe e melhor amiga na mesma pessoa é um privilégio que me possibilitou estar onde estou hoje, e cada vitória que alcanço tem um pedaço de todo esse amor e cuidado que recebi dela a vida toda.

Ao meu pai, José Luis, que sempre me incentivou a buscar a formação em uma universidade pública de qualidade. Sou grata por todas as conversas, aconselhamentos e risadas que me foram proporcionadas por ele durante momentos difíceis. Obrigada por ser tão parceiro e amigo.

À minha irmã, Rafaela, que é minha companheira desde que cheguei nesse mundo. Ter seu apoio, amizade e exemplo me sustentou nessa e em todas as etapas da graduação, mesmo de longe.

À minha família, avôs, tios, padrasto e primos que foram essenciais na minha formação como pessoa. Obrigado por sempre estarem presentes na minha criação, me proporcionando momentos inesquecíveis. Um agradecimento especial às minhas madrinhas, Rosângela e Sueli, que foram presentes e indispensáveis durante toda a minha infância e começo da vida adulta.

Ao meu namorado, Rafael, responsável pelos melhores momentos e experiências. Obrigada por todo o amor e cuidado, perto ou longe, que me sustentou nesse percurso.

Aos meus amigos de infância, com quem vivi todas as brincadeiras, risadas na sala, intervalos e expectativas pré-vestibular, deixando a vida em Lavínia menos entediante e mais divertida. Aos meus amigos da faculdade, que compartilharam comigo as tristezas e alegrias da graduação, dividindo materiais, resumos e a jornada dentro dessa universidade que chamamos de casa.

À minha orientadora, profa. Thayse, por me auxiliar nos anos de iniciação científica e na realização desse trabalho. Agradeço também a todos os professores e pós-graduandos do departamento que foram de extrema importância na realização das pesquisas.

A todos os professores que passaram pela minha vida, desde a infância, que dividiram seus conhecimentos comigo e auxiliaram na formação do ser humano que sou hoje.

Ao Cursinho DACA, projeto de extensão da faculdade, onde tive a oportunidade de ser aluna durante o ensino médio e lecionar na disciplina de história geral por 3 anos durante a faculdade. Aos colegas professores, coordenador discente, secretários e principalmente aos alunos, que me ensinaram muito mais do que imaginam.

Aos pacientes que foram atendidos por mim nas clínicas da faculdade, sou grata pela confiança e pelo aprendizado que adquiri, e espero ter contribuído com a saúde e bem-estar de cada um.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão das bolsas de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização das pesquisas.

Finalizando, agradeço a 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. Luciano Tavares Angelo Cintra.

“Há um lugar que só se pode alcançar com um sonho grande
demais para se sonhar sozinho”

Mitsuru Kubo

RESUMO

NOVAES, S. E. O. **Efeitos do ciclofosfato de cálcio sobre componentes da matriz extracelular de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* formados *in vitro***. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Este estudo avaliou o efeito de um ciclofosfato à base de cálcio (CaTMP), proveniente da substituição do íon sódio (Na^+) do trimetafosfato de sódio (NaTMP) por íons cálcio (Ca^{++}), associado ou não ao fluoreto, sobre a composição da matriz extracelular (MEC) de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, formados *in vitro*. O ciclotrifosfato contendo cálcio (CaTMP) foi sintetizado utilizando uma coluna para cromatografia e adição de solução contendo hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Em seguida, o CaTMP foi caracterizado morfológicamente por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS). Biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* foram formados em saliva artificial e tratados três vezes (72, 78 e 96 horas de formação), por um minuto, com soluções contendo: saliva artificial (controle negativo); 1100 ppm F (NaF); 0,5 e 1% de CaTMP; 0,5 e 1% de CaTMP com 1100 ppmF; 0,5 e 1% de trimetafosfato de sódio (NaTMP), 0,5 e 1% de NaTMP com 1100 ppmF. Após o terceiro tratamento, foram quantificadas as concentrações de proteínas e carboidratos da MEC. Os dados foram submetidos à ANOVA a um critério, seguido pelo teste Student-Newman Keuls ($p < 0,05$). O processo de síntese por cromatografia levou à substituição total dos átomos de Na por átomos de Ca e as partículas apresentaram tamanho homogêneo. Em relação à quantidade de proteínas, o menor valor foi observado para o grupo tratado com 1% de CaTMP com F, quando comparado aos outros tratamentos. Quanto aos carboidratos, os grupos 0,5% CaTMP com F e 1% CaTMP com F promoveram as maiores reduções quando comparado aos outros grupos, sem diferença estatística entre si. Conclui-se que o CaTMP interferiu na composição da matriz extracelular dos biofilmes analisados, especialmente quando combinado ao F, aumentando a concentração de Ca no meio e reduzindo os valores de proteínas e carboidratos no biofilme.

Palavras-chave: biofilmes; fosfatos; fluoretos; cálcio.

ABSTRACT

NOVAES, S. E. O. **Effects of calcium cyclophosphate on extracellular matrix components of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* formed in vitro.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

This study evaluated the effect of a calcium-based cyclophosphate (CaTMP), resulting from the replacement of the sodium ion (Na^+) by calcium ions (Ca^{++}) from sodium trimetaphosphate (NaTMP), associated or not with fluoride, on the composition of the matrix extracellular (ECM) of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, formed in vitro. Calcium-containing cyclophosphate (CaTMP) was synthesized using a chromatography column and addition of a solution containing calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Next, CaTMP was characterized morphologically using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Dual biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* were formed in artificial saliva and treated three times (at 72, 78 and 96 hours formation), for one min, with solutions containing: 1100 ppm F (NaF); 0.5 or 1% CaTMP; 0.5 or 1% CaTMP combined with 1100 ppmF; 0.5 or 1% sodium trimetaphosphate (NaTMP), 0.5 or 1% NaTMP combined with 1100 ppm F. Artificial saliva served as negative control (negative control). After the third treatment, the concentrations of proteins and carbohydrates in the ECM were quantified. The data were submitted to one-way ANOVA, followed by the Student-Newman Keuls' test ($p < 0.05$). The chromatographic synthesis process led to the total replacement of Na^+ atoms by Ca^{++} atoms and the particles presented a homogeneous size. Regarding the amount of proteins, the lowest value was observed for the group treated with 1% CaTMP with F, when compared to the other treatments. As for carbohydrates, the 0.5% CaTMP with F and 1% CaTMP with F groups promoted the greatest reductions when compared to the other groups, with no statistical difference between them. It is concluded that CaTMP interfered with the composition of the extracellular matrix of the biofilms analyzed, especially when combined with F, increasing the presence of Ca in the environment and decreasing the values of proteins and carbohydrates in the biofilm.

Keywords: biofilms; phosphates; fluorides; calcium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras TMP (A) e CaTMP, e respectivos histogramas de EDS (C e D) 19
- Figura 2 Valores médios (DP) de proteína (A) e carboidrato (B) da matriz extracelular de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* obtidos após tratamento com diferentes concentrações de NaTMP ou CaTMP, combinados ou não com F. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças estatísticas entre os grupos 20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 Processamento dos compostos de TMP	14
3.2 Preparo da saliva artificial	15
3.3 Cepa de microrganismos, condições de crescimento e tratamento	15
3.4 Tratamento dos biofilmes	16
3.5 Avaliação dos componentes da matriz extracelular	16
3.5.1 Extração da matriz extracelular	16
3.5.2 Determinação do peso seco dos biofilmes	16
3.5.3 Quantificação das proteínas e polissacarídeos extracelulares (EPS)	17
3.6 Análise estatística	17
4 RESULTADOS	18
5 DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial, biofilme-açúcar dependente (Sheiham; James, 2015), ocasionada pela produção bacteriana de ácidos a partir da metabolização de carboidratos fermentáveis da dieta, provocando progressivamente a desmineralização do esmalte dentário (Cummins; Bowen, 2006). O biofilme dentário pode ser definido como uma comunidade microbiana organizada, aderida às superfícies vivas ou inertes, e envolvido por uma matriz extracelular produzida pelas células (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999). O biofilme dentário pode ser definido como uma comunidade microbiana organizada, aderida às superfícies vivas ou inertes, e envolvido por uma matriz extracelular produzida pelas células (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999). A matriz extracelular do biofilme consiste num material extracelular, produzido essencialmente pelo próprio microorganismo, constituído, em geral, por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Esta estrutura confere ao biofilme estabilidade mecânica, possibilita sua adesão a superfícies, além de atuar como um sistema digestivo externo, mantendo as enzimas extracelulares próximas das células, permitindo-lhes metabolizar substâncias dissolvidas, coloidais, e biopolímeros sólidos (Flemming; Wingender, 2010).

Entre os principais agentes etiológicos da cárie dentária, destaca-se a bactéria gram-positiva *Streptococcus mutans*, devido à sua habilidade de colonizar a superfície dental, metabolizar carboidratos fermentáveis e produzir ácido láctico, além de ter a capacidade de crescer e se multiplicar em ambiente ácido (Marsh; Martin, 2009). *S. mutans* metaboliza a sacarose (açúcar ou polímeros, tais como amido), gerando como subproduto, grande quantidade de ácido láctico, o qual é capaz de solubilizar o componente mineral do dente e iniciar o processo cariogênico (Marsh; Martin, 2009). Apesar do *S. mutans* ser citado frequentemente como o principal agente patógeno responsável pela cárie dentária (Bowen; Koo, 2011), os processos de instalação e progressão da doença também envolvem outros microorganismos (Bowen *et al.*, 2018; Hajishengallis *et al.*, 2017; Takahashi; Nyvad, 2011).

Dentre os diversos microorganismos envolvidos no processo cariogênico, destaca-se *Candida albicans*, que é o fungo mais comumente detectado nas

superfícies bucais humanas durante as infecções, participando na formação de biofilmes polimicrobianas em tecidos bucais e acrílicos, podendo atuar na aderência de outros microorganismos, interferindo na sua patogenicidade (Diaz *et al.*, 2012; Montelongo-Jauregui; Lopez-Ribot, 2018). Diversos estudos relatam a importância de *C. albicans* na instalação e progressão da cárie dentária (Falsetta *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2018; Sampaio *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2018), especialmente nos casos de cárie severa da infância (Kim *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2018).

Observa-se que a presença de *C. albicans* em biofilmes de *S. mutans*, além de contribuir com o crescimento e desenvolvimento de microcolônias bacterianas, favorece a atividade das GTFs, induzindo a expressão dos fatores de virulência da bactéria (Falsetta *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2018). Além disso, dados recentes demonstraram que a presença do fungo aumentou o potencial cariogênico de biofilmes de *S. mutans*, potencializando a desmineralização dentária (Sampaio *et al.*, 2019). Apesar do declínio da prevalência de cárie dentária (Kassebaum *et al.*, 2015), esta doença ainda hoje é considerada como um tópico negligenciado em muitos sistemas de saúde, uma vez que representa um grande problema de saúde na maioria dos países industrializados, atingindo uma vasta parcela de adultos, mas especialmente, acometendo grande parte da população infantil (Petersen *et al.*, 2005).

As concentrações de fósforo (P) e cálcio (Ca), não somente no biofilme total, mas também no fluido do biofilme, exercem papel fundamental nos processos de des- e remineralização da estrutura dentária. A presença destes íons no ambiente bucal durante o desafio cariogênico proporciona uma diminuição no processo de desmineralização e um aumento no processo de remineralização do esmalte dentário (Ten Cate *et al.*, 1996). Este cenário tem impulsionado a investigação de estratégias visando à potencialização dos efeitos preventivos de produtos, dentre as quais se destaca a suplementação com sais de fosfatos.

Estudos recentes mostraram que soluções e dentifrícios suplementados com o um novo ciclofosfato de cálcio (CaTMP) promove efeito protetor na erosão inicial do esmalte superiores ao grupo 1100 ppm F e NaTMP, *in vitro* (Guisso, 2024; Macedo, 2021). Logo, a síntese do CaTMP proveniente do trimetafosfato de sódio (NaTMP) é eficaz por meio de uma coluna cromatográfica de troca iônica com resina catiônica seguida de uma reação de neutralização com uma solução contendo fonte

de Ca (Guisso, 2024; Macedo, 2021). Além de efeito na erosão inicial do esmalte, dentifrícios contendo CaTMP promoveram efeitos protetores superiores ao grupo 1100 F na desmineralização do esmalte dental bovino *in vitro* (Peres, 2023) e apresenta citocompatibilidade e potencial de biomineralização em células odontoblásticas (Basi, 2024).

Estes achados abrem possibilidades para associações entre íons ou compostos, com a finalidade de potencializar os efeitos do CaTMP tanto sobre os tecidos dentários duros, como sobre biofilmes orais e a matriz extracelular.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito ciclofosfato à base de cálcio (CaTMP), proveniente da substituição do íon sódio (Na^+) do trimetafosfato de sódio (NaTMP) por íons cálcio (Ca^{++}), associado ou não ao fluoreto (F), sobre a composição da matriz extracelular (MEC) de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, formados *in vitro*.

3 METODOLOGIA

3.1 Processamento do ciclofosfato à base de cálcio

O ciclofosfato contendo cálcio (CaTMP) foi preparado a partir da diluição de NaTMP ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, CAS 7785-84-4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em água deionizada (pH 5,6). A rota de síntese para a substituição do Na^+ pelo Ca^{++} foi realizada por cromatografia seguida pela mistura de solução de TMP sem Na e solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Griffith, 1962; Watanabe *et al.*, 1998). Para realizar a cromatografia, a solução foi tratada em uma coluna de vidro (2 cm x 30 cm) contendo resina de troca iônica catiônica forte na forma H^+ (PUROLITE C100H, Purolite®, Philadelphia, PA, EUA) para a substituição dos íons Na^+ pelos de íons de Ca^{++} , com fluxo de 0,5 mL/min (Watanabe *et al.*, 1998). Após a passagem pela coluna (pH 0,7) foi adicionado à solução tratada a solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Cód.HC09743RA, Exôdo, Sumaré, SP, Brasil) diluído em água deionizada até atingir o mesmo valor de pH da solução de NaTMP antes da troca iônica. A solução foi mantida em estufa por 48 horas a 37°C para precipitação do novo composto, seguido pela filtragem usando papel filtro quantitativo (Quanty JP42, J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e funil de Buchner conectado a um sistema de vácuo (-600 mmHg) (Amaral *et al.*, 2018; Griffith, 1962). O precipitado foi mantido em estufa por 24 horas a 70°C para secagem, e o pó, homogeneizados em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, IdarOberstein, Alemanha) por 8 horas (Amaral *et al.*, 2018; Guisso, 2024).

A caracterização do CaTMP foi realizada na Faculdade de Engenharia (FEIS/Unesp). O pó sintetizado foi depositado sobre suporte recoberto com fita de carbono, submetidos a vácuo e pulverização catódica para uma fina cobertura com ouro (Quorum - Q150T E, West Sussex, UK). As morfologias das partículas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Carl Zeiss, EVO ILS15, Carl Zeiss NTS LTD, Germany) a 20 kV e aumento de 3.000 x. A composição química das amostras foi determinada por espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS, Oxford Instruments, INCAx - act, 133 eV, England) com 20 keV, resolução espacial de x 2 μm e tempo de contagem de 150 s. Os elementos químicos analisados foram fósforo (P), oxigênio (O), sódio (Na) e cálcio (Ca) (Guisso, 2024).

3.2 Preparo da saliva artificial

Foi preparada saliva artificial de acordo com Lamfon *et al.* (2003), conforme modificado por Cavazana *et al.* (2018), com a seguinte composição: Para 1 L de água deionizada: 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 com NaOH para 6,8.

3.3 Cepas de microrganismos, formação de biofilme

Foram utilizadas as seguintes cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC): *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231. Culturas dos microrganismos mantidas a -70 °C em glicerol foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França), para *C. albicans*, e cultivadas por 24 horas a 37 °C. Culturas de *S. mutans* foram semeadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Para *C. albicans*, uma alçada obtida das placas de ASD foi suspensa em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco) e incubada a 37 °C durante a noite, sob agitação de 120 rpm. Colônias de *S. mutans* foram suspensas em 10 mL de BHI caldo (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 recuperadas por centrifugação a 8000 rpm, por 5 minutos, a 15 °C, e os pellets de células foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina (0,85% NaCl). A quantidade de células fúngicas e bacterianas foi ajustada para uma concentração de 10⁷ e 10⁸ células/mL, respectivamente. A cada 24 h, a saliva artificial foi renovada (Cavazana *et al.*, 2018).

3.4 Tratamento dos biofilmes

As concentrações de CaTMP foram determinadas de acordo com dados anteriores (Guisso, 2024), resultando nos seguintes grupos experimentais: 0,5 e 1% de CaTMP; 0,5 e 1% de CaTMP com 1100 ppmF; 0,5 e 1% de trimetafosfato de sódio (NaTMP), 0,5 e 1% de NaTMP com 1100 ppmF. Além disso, foi avaliada solução contendo 1100 ppm F, enquanto SA pura foi testada como controle negativo (CN).

Os biofilmes foram formados no fundo dos poços de placas de microtitulação de 6 poços contendo 4 mL do inóculo foram utilizadas, durante 72 h. Posteriormente, os biofilmes pré-formados foram tratados duas vezes no 1º dia (às 10:00 e 16:00 horas) por 1 minuto e mais uma vez no dia seguinte (10:00h) (totalizando biofilmes de 96 horas). Assim, cada biofilme foi exposto aos respectivos tratamentos por um total de três vezes (Sampaio et al., 2018). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três momentos diferentes.

3.5 Avaliação dos componentes da matriz extracelular

3.5.1 Extração da matriz extracelular

Após tratamento com as soluções, os biofilmes foram lavados com solução salina e raspados do fundo dos poços usando raspadores de células (Kasvi) e ressuspensos em solução salina. Na sequência, as amostras de biofilmes foram sonicadas por 30 segundos a 30 W e as suspensões obtidas foram homogeneizadas a vórtex por 2 minutos. Finalmente, as suspensões foram centrifugadas a $3.000 \times g$, por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro de nitrocelulose (0,22 μm ; Orange Scientific) (Silva *et al.*, 2009). Este sobrenadante foi utilizado para a análise de proteínas e polissacarídeos extracelular (EPS) (Rocha *et al.*, 2018).

3.5.2 Determinação do peso seco dos biofilmes

Uma amostra dos biofilmes raspados foi filtrada em membrana de acetato de celulose (0,22 μm) e a membrana foi seca a 60 °C até que um peso seco constante possa ser determinado (Monteiro *et al.*, 2012). A membrana também foi pesada

antes da filtragem dos biofilmes. Portanto, o peso seco final dos biofilmes foi a diferença entre as duas medidas.

3.5.3 Quantificação de proteínas e polissacarídeos extracelulares (EPS)

O conteúdo proteico da matriz extracelular dos biofilmes foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (Kit BCA, Sigma-Aldrich), usando albumina de soro bovino como padrão (Monteiro *et al.*, 2012). Um volume de 25 µL do sobrenadante obtido foi transferido para poços de placas de 96 poços contendo 200 µL da mistura dos reagentes A e B do kit BCA. As microplacas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e a absorbância das soluções obtidas serão lidas a 562nm (Microplate Spectrophotometer EON, Biotek, USA). O conteúdo de carboidratos da matriz extracelular foi mensurado de acordo com o método de Dubois *et al.* (1956) usando glicose como padrão. Em tubos de ensaio de vidro, 500 µL do sobrenadante obtido foram misturados com 500 µL de fenol 9 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico (95-98%; Sigma-Aldrich). A solução foi homogeneizada em vórtex e, após 15 minutos de repouso na temperatura ambiente, a absorbância será lida a 490nm.

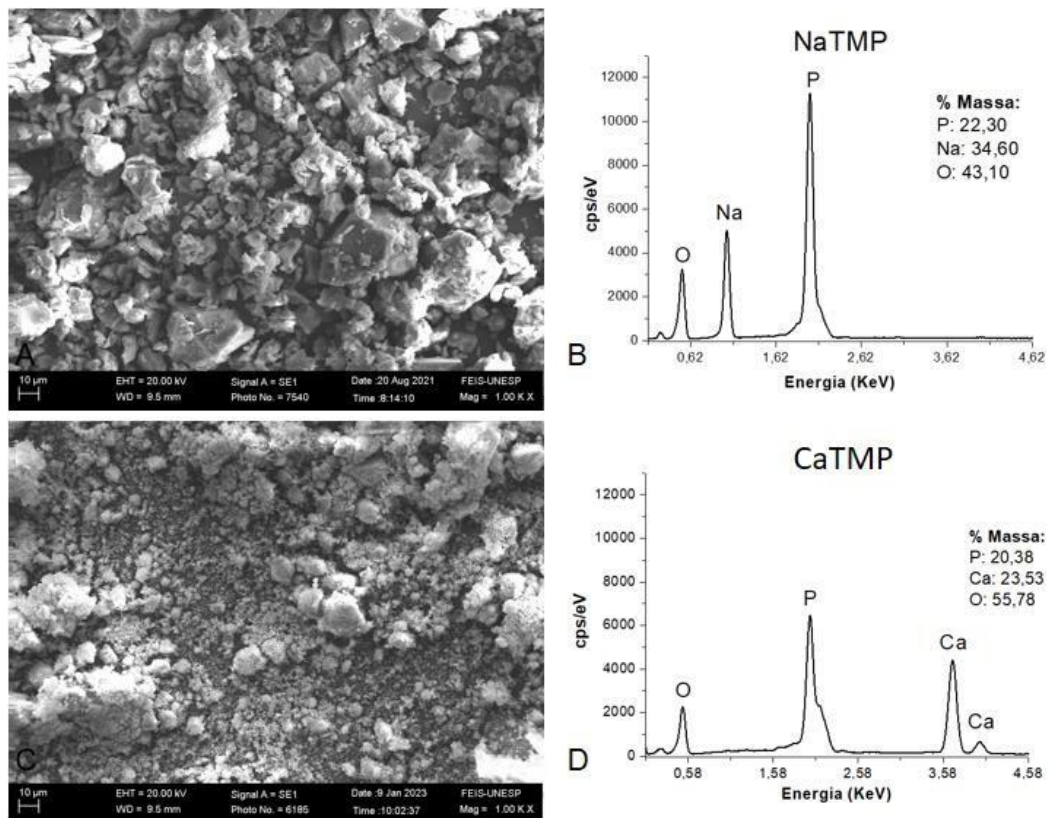
3.6 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos em três momentos diferentes. Os dados foram submetidos à ANOVA a um critério, seguido pelos testes Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$). A análise estatística foi realizada usando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA), adotando $p < 0.05$ como estatisticamente significativa.

4 RESULTADOS

As imagens obtidas pelo MEV, foi possível observar granulações pequenas e regulares para os grupos de NaTMP e CaTMP (Figura 1A e 1C). Pelos espectrogramas obtidos pela técnica do EDS, foram observados picos de Na a 1,04 keV para o NaTMP, além de picos de O a 0,52 keV e P a 2,02 keV comuns para os dois compostos, houve também a presença de picos a 3,69 e 4,00 KeV característicos de Ca no grupo de CaTMP. A porcentagem (%) da massa de P nas amostras de CaTMP foi menor quando comparada ao NaTMP e a % de O foi maior para no CaTMP (Figura 1C e 1D).

Figura 1 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras TMP (A) e CaTMP, e respectivos histogramas de EDS (C e D)

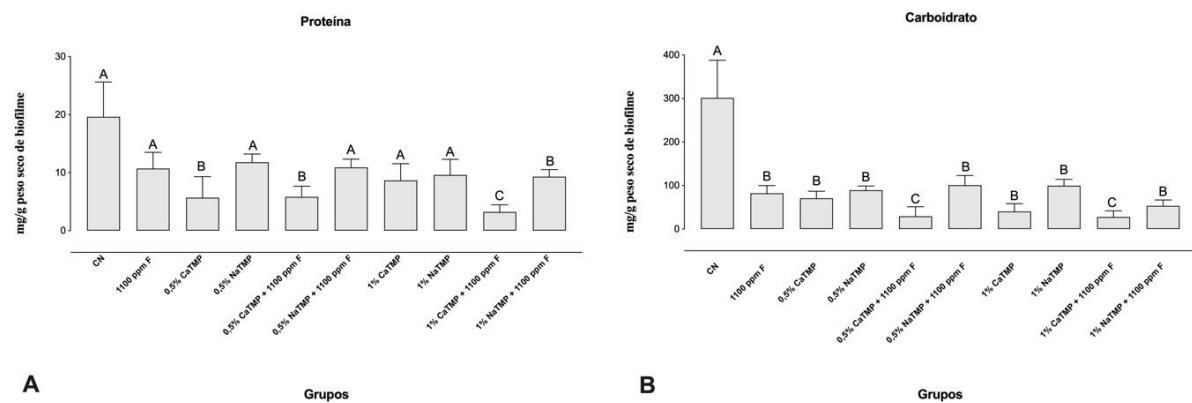


Fonte: Basi, 2024

Em relação à quantidade de proteínas, o menor valor foi observado para o grupo tratado com 1% CaTMPF quando comparado aos outros tratamentos ($p > 0,05$;

Figura 2A). Os grupos 0,5% CaTMP, associado ou não ao F, e o grupo 1% NaTMPF apresentaram redução na proteína quando comparado ao grupo de 1100 ppmF, sem diferença estatística entre os mesmos ($p>0,05$; Figura 2A). Quanto aos carboidratos, todos os tratamentos apresentaram redução quando comparado ao grupo controle (CTL). Os grupos 0,5% CaTMPF e 1% CaTMPF promoveu as maiores reduções de EPS quando comparado aos outros grupos avaliados, sem diferença estatística entre eles ($p>0,05$; Figura 2B).

Figura 2 - Valores médios (DP) de proteína (A) e carboidrato (B) da matriz extracelular de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* obtidos após tratamento com diferentes concentrações de NaTMP ou CaTMP, combinados ou não com F. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças estatísticas entre os grupos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024

5 DISCUSSÃO

A suplementação de produtos fluoretados com sais de fosfato contendo cálcio demonstrou ser uma alternativa na redução da perda do esmalte em modelos de cárie *in vitro* (Emerenciano *et al.*, 2024; Zaze *et al.*, 2014). Estudo recente mostrou que síntese de um novo composto proveniente do NaTMP, aumentou o efeito anticárie de dentifrícios sem fluoreto suplementados com CaTMP (Peres, 2023). A presença de fosfato de cálcio levaria a sua maior precipitação sobre a superfície dental potencializando o efeito contra a formação de lesão de cárie, porém nenhum dado sobre o efeito na matriz extracelular. No presente estudo, o CaTMP, associado ou não ao F, influenciou na redução da concentração de proteína e carboidrato da matriz extracelular no biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*.

A exposição do CaTMP nos biofilmes leva a níveis mais altos de cálcio (Ca) e fósforo (P), o que poderia influenciar os componentes da matriz extracelular (Lynch, 2004). A capacidade dos microrganismos dentro dos biofilmes de detectar alterações nos componentes do meio é uma tarefa importante que permite que os patógenos se ajustem de forma eficiente ao ambiente, desencadeando assim a expressão de genes responsáveis pela virulência e resistência (Islam, 2020). Os tratamentos com altas concentrações de Ca, conforme demonstrado anteriormente (Cavazana *et al.*, 2021), pode ter induzido alterações celulares, resultando na lise celular e na liberação de material genético que pode ser competente para a sobrevivência em um ambiente com alto teor de Ca. Além disso, o excesso de Ca afeta a formação de hifas, resultando na formação de pseudo-hifas e diminuição da virulência desse fungo e conseqüentemente interferir nos componentes da matriz extracelular.

A tolerância ao Ca pode desempenhar um papel crucial em bactérias cariogênicas (Astasov-Frauenhoffer *et al.*, 2017), uma vez que este íon altera o metabolismo celular dos microrganismos e sua capacidade de detectar e responder à concentração ambiental, um aspecto crucial da patogênese bacteriana (Rosch *et al.*, 2008). A rigidez estrutural para a proteção do ambiente externo e o controle da regulação gênica e adsorção de nutrientes são funções importantes da matriz extracelular (Hobley *et al.*, 2015). A sacarose consiste em um componente essencial para a produção de matriz extracelular, afetando assim o crescimento do biofilme (Tomé *et al.*, 2017), e por isso foi adicionada à saliva no presente estudo.

Os tratamentos realizados com CaTMP e F foram eficazes na redução de carboidratos e proteínas da matriz extracelular. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo anterior, que avaliou o efeito do glicerofosfato de cálcio (CaGP) no biofilme de duas espécies de *S. mutans* e *C. albicans* (Cavazana *et al.*, 2019). Um estudo *in situ* mostrou uma redução significativa nas concentrações de polissacarídeos extracelulares (EPS) em biofilmes expostos a CaGP e F (Amaral *et al.*, 2018), reforçando assim os presentes achados. A presença de glucanos insolúveis em água na matriz do biofilme é um fator relevante na patogenicidade do biofilme relacionado à cárie dentária (Koo; Falsetta; Klein, 2013). Esses polissacarídeos dificultam a penetração de fármacos e produzem áreas ácidas, favorecendo a desmineralização das superfícies dentárias (Xiao *et al.*, 2012). Nesse sentido, a redução de carboidratos consiste em um aspecto favorável para o controle da cárie dentária. Os valores mais baixos de proteínas também desempenham um papel importante na cárie dentária, dado o seu envolvimento na fixação do biofilme nas superfícies, permitindo a ligação entre as células, a transferência horizontal de genes entre as células e outras funções da matriz extracelular (Flemming; Wingender, 2010).

É importante enfatizar, no entanto, que um modelo de biofilme de dupla espécie não representa totalmente um biofilme multiespécie encontrado no meio bucal. Apesar da limitação deste modelo de biofilme, os resultados obtidos forneceram dados adicionais sobre os mecanismos pelos quais o CaTMP interfere na dinâmica da cárie dentária, estimulando novos estudos com este ciclofosfato.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o CaTMP interferiu na composição da matriz extracelular dos biofilmes analisados, especialmente quando combinado ao F.

REFERÊNCIAS

- Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(7):2553-64.
- Astasov-Frauenhoffer M, Varenganayil MM, Decho AW, Waltimo T, Braissant O. Exopolysaccharides regulate calcium flow in cariogenic biofilms. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186256
- Basi DMC. Efeito citotóxico e potencial de biomineralização de um novo ciclotrifosfato de cálcio [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2024.
- Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018;26:229-42.
- Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011;45(1):69-86.
- Cavazana TP, Hosida TY, Pessan JP, Sampaio C, Monteiro DR, Delbem ACB. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. *Biofouling*. 2019;35(6):710-8.
- Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Monteiro DR, Delbem ACB. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions in vitro. *Arch Oral Biol*. 2018;90:9-12.
- Cavazana TP, Hosida TY, Sampaio C, de Morais LA, Monteiro DR, Pessan JP, Delbem ACB. Calcium glycerophosphate and fluoride affect the pH and inorganic composition of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Dent*. 2021;115:103844.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
- Cummins D, Bowen WH. Biotechnology in oral care. *Cosmetic Science and technology series. Biotech in Personal Care* 2006;29:23-52.

- Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, Ikonomou L, Dongari-Bagtzoglou A. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun*. 2012;80(2):620-32.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956;28(3):350-6.
- Emerenciano NG, Delbem ACB, Gonçalves FMC, de Camargo ER, de Souza Neto FN, Gorup LF, Silva-Sousa YTC, Danelon M. Effect of nanometric β -calcium glycerophosphate supplementation in conventional toothpaste on enamel demineralization: an in vitro study. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2024;151:106354.
- 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. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-81.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:623–33.
- Griffith EJ. The structure of salt sodium calcium metaphosphate ($\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$). *Inorg Chem*. 1962;1(4):962
- Guisso LP. Synthesis and characterization of a new calcium-containing cyclophosphate and its effect in dentifrices against enamel erosion in vitro [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2024.
- Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol. Oral Microbiol*. 2017;32:24-34.
- Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(5):649-69.
- Islam MS. Calcium signaling: from basic to bedside. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:1-6.
- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015;94:650-8.

- Kim D, Sengupta A, Niepa THR, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci. Rep.* 2017;7:41332.
- Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013;92:1065-73.
- Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(6):465-71.
- Lynch RJ. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. *Int Dent J.* 2004;54(5 Suppl 1):310-14.
- Marsh PD, Martin MV. *Oral microbiology.* 5th ed. United Kingdom: Churchill Livingstone; 2009.
- Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol.* 2012;54(5):383-91.
- Montelongo-Jauregui D, Lopez-Ribot JL. *Candida* Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. *J Fungi.* 2018;4(4):122.
- Nunes MM. Síntese e caracterização de ciclotrifosfato de sódio contendo cálcio e seu efeito na prevenção da erosão do esmalte in vitro [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2021.
- Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis.* 2018;24:518-26.
- Peres GR. Efeito de um novo ciclofosfato de cálcio na desmineralização do esmalte: estudo in vitro [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2023.
- Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83:661-9.
- Rocha GR, Florez Salamanca EJ, Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern. Med.* 2018;18(1):61.

Rosch JW, Sublett J, Gao G, Wang YD, Tuomanen EI. Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host. *Mol Microbiol.* 2008;70(2):435-44.

Sampaio AA, Souza SE, Ricomini-Filho AP, Del Bel Cury AA, Cavalcanti YW, Cury JA. *Candida albicans* Increases dentine demineralization provoked by streptococcus mutans biofilm. *Caries Res.* 2019;53(3):322-31.

Sampaio C, Hosida TY, Cavazana TP, Monteiro DR, Pessan JP, Delbem ACB. Evaluation of sodium hexametaphosphate, associated or not with fluoride, in mixed biofilm before and after exposure to sucrose. *Braz Oral Res.* 2018;32:50.

Sheiham A, James WP. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res.* 2015;94(10):1341-7.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med. Mycol.* 2009;47:681-9.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294-303.

ten Cate JM, Dundon KA, Vernon PG, Damato FA, Huntington E, Exterkate RA, et al. Preparation and measurement of artificial enamel lesion, a four-laboratory ring test. *Caries Res.* 1996;30:400-07.

Tomé FM, Ramos LP, Freire F, Pereira CA, Oliveira ICB, Junqueira JC, Jorge AOC, Oliveira LD. 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.* 2017;32(6):1237-43.

Watanabe M, Yoshida K, Sakurai M, Sato S. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. *J Mater Sci.* 1998;33:5601-6.

Xiao J, Grier A, Faustoferri RC, Alzoubi S, Gill AL, Feng C, Liu Y, Quivey RG, Kopycka-Kedzierawski DT, Koo H, Gill SR. Association between oral candida and bacteriome in children with severe ECC. *J Dent Res.* 2018;97(13):1468-76.

Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Heydorn A, Koo H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002623.

Zaze AC, Dias AP, Sasaki KT, Delbem AC. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 2014;18(6):1619-24.