UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

VICTÓRIA TCHARES ESTEVES DOS SANTOS MORAIS

Efeitos de um novo ciclofosfato à base de cálcio, associado ou não ao flúor, sobre a viabilidade, metabolismo e estrutura de biofilmes de interesse cariogênico *in vitro*

Araçatuba - SP
2025

VICTÓRIA TCHARES ESTEVES DOS SANTOS MORAIS

Efeitos de um novo ciclofosfato à base de cálcio, associado ou não ao flúor, sobre a viabilidade, metabolismo e estrutura de biofilmes de interesse cariogênico *in vitro*

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

Orientador: Profa. Dra. Thayse Yumi Hosida
Coorientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba - SP
2025

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter colocado em mim, ainda criança, o sonho de me tornar cirurgiã-dentista e a partir disso ter me abençoado para chegar até aqui.

À minha família pelo apoio incondicional desde antes de entrar na universidade. Além disso, pelo suporte, pela paciência e pelo cuidado que tiveram comigo no decorrer do curso.

Aos meus pais: Gilson Ambrósio Morais e Suzana Esteves dos Santos pela motivação e ensinamentos, pelo empenho, cuidado e amor comigo, sempre mostrando que com dedicação, esforço e diligência eu poderei conquistar tudo o que quiser. Além de serem minha base, me motivaram a permanecer firme durante toda a graduação.

Ao meu irmão, Victor Guilherme Esteves dos Santos Morais que é um exemplo para mim e sempre fomentou meu aprendizado, sem medir esforços.

Ao meu namorado, Gustavo Casemiro Silva pelo amor e paciência, por acreditar em mim e por ter sido meu suporte a todo momento.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, professora Thayse Yumi Hosida que me proporcionou uma das maiores experiências durante a graduação, além de todo apoio, paciência e dedicação.

Ao professor Caio Sampaio por todo apoio e conhecimento compartilhado, além de sempre estar presente, se tornando um mestre por quem tenho respeito e admiração.

Ao professor Rogério Castilho Jacinto por ser um excelente professor, além de ter aceitado fazer parte deste momento.

À minha madrinha da faculdade, Ana Julia Moreno Barreto pelo cuidado e colaboração, além de sempre estar me motivando.

Aos meus amigos que fizeram parte dessa trajetória e que de alguma forma me fizeram chegar até aqui.

À Letícia Conceição dos Santos, minha amiga e confidente da graduação.

À Debora Novais da Silva que foi minha parceira durante 5 anos e com quem compartilhei todos os momentos da graduação se tornando minha irmã.

“A vida é belíssima, mas não é tão simples vivê-la. Às vezes, ela se parece com um imenso jardim. De repente, a paisagem muda e ela se apresenta árida como um deserto ou íngreme como as montanhas. Independentemente dos penhascos que temos de escalar, cada ser humano possui uma força incrível.”

Augusto Cury

RESUMO

MORAIS, V. T. E. S. **Efeitos de um novo ciclofosfato à base de cálcio, associado ou não ao flúor, sobre a viabilidade, metabolismo e estrutura de biofilmes de interesse cariogênico *in vitro***. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Esse estudo teve o objetivo de avaliar o efeito de um novo ciclofosfato à base de cálcio (TMPCa), combinado ou não ao fluoreto (F), sobre a composição microbiana, metabolismo e estrutura de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* formados *in vitro*. A síntese do TMPCa ocorreu a partir de um trimetafosfato de sódio (TMP), sendo realizada por meio de cromatografia. O composto foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia. A avaliação do efeito antibiofilme do composto ocorreu de acordo com os seguintes grupos experimentais: 1% de TMP, com ou sem 1100 ppm F; 1% de TMPCa, com ou sem 1100 ppm de flúor (F). Também, foi testada solução contendo 1100 ppm F (controle positivo), além de saliva artificial (controle negativo, CLT). Cepas de *S. mutans e C. albicans* foram cultivadas em saliva artificial. Os biofilmes formados no fundo de poços de placas de microtitulação foram tratados três vezes (72, 78 e 96 horas após o início da formação), por um minuto. Após esse período, foram realizadas análises de quantificação de células cultiváveis pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), avaliação da produção de biomassa total (teste do cristal violeta) e atividade metabólica dos biofilmes (teste do XTT). O biofilme teve sua estrutura analisada por MEV. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). Observou-se por MEV granulações pequenas e regulares para todos os grupos analisados (i.e., TMP e TMPCa), enquanto nos espectrogramas obtidos pelo EDS, foram observados picos de sódio (Na) para o TMP, além de picos de O e fósforo P comuns aos dois compostos. Houve também a presença de picos característicos de cálcio (Ca) para o composto TMPCa. Com relação aos ensaios de efeito antibiofilme do composto, nenhum tratamento foi capaz de reduzir as UFCs de *C. albicans* em comparação ao CTL. Além disso,

observou-se que 1% de TMPCa levou a UFCs deste microrganismo significativamente maiores que o grupo 1100 ppm F. Nenhum tratamento levou a reduções significativas nas UFCs de *S. mutans*, sendo todos os grupos semelhantes entre si. O grupo 1% de TMPCa, com F, apresentou a maior produção de biomassa, sem diferença significativa do grupo 1%TMPCa. Biofilmes tratados com 1% de TMPCa apresentou o maior metabolismo, seguido dos tratados com 1% de TMPCa, com F. A análise de MEV, os biofilmes mantiveram a estrutura característica, com aglomerados de cocos e hifas, independentemente da presença de F ou do composto analisado. Pode-se concluir que o processo de síntese levou à produção de um novo composto à base de cálcio, o qual, principalmente combinado com o F, afetou a composição microbiana e metabolismo dos biofilmes analisados.

Palavras-chave: cálcio; biofilmes; fosfatos.

ABSTRACT

MORAIS, V. T. E. S. **Effects of a new calcium-based cyclophosphate, associated or not with fluoride, on the viability, metabolism and structure of biofilms of cariogenic interest *in vitro***. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

This study aimed to synthesize and evaluate the effect of a new calcium-based cyclo-triphosphate (TMPCa), combined or not with fluoride (F), on the microbial composition, metabolism, expression of extracellular matrix components, and structure of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* formed *in vitro*. TMPCa synthesis was carried out from sodium trimetaphosphate (TMP) through chromatography. The compound was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The antibiofilm effect of the compound was evaluated according to the following experimental groups: 1% TMP, with or without 1100 ppm F; 1% TMPCa, with or without 1100 ppm F. A solution containing 1100 ppm F (positive control) and artificial saliva (negative control) were also tested. *S. mutans* ATCC 25175 and *C. albicans* ATCC 10231 strains were cultured to obtain concentrations of 10^8 and 10^7 cells/mL, respectively, in artificial saliva. Biofilms formed at the bottom of microplate wells were treated three times (72, 78, and 96 hours after the start of formation) for one minute. After this period, analyses of quantification of cultivable cells by colony-forming unit (CFU) counting, evaluation of total biomass production (crystal violet test), biofilm metabolic activity (XTT test). Furthermore, the biofilm structure was analyzed by SEM. The data were submitted to ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test, adopting $p<0.05$. SEM revealed small and regular granules for all analyzed groups (i.e., TMP and TMPCa), while in the EDS spectrograms, Na peaks were observed for TMP, in addition to O and P peaks common to both compounds. There was also the presence of characteristic Ca peaks for the TMPCa compound. Regarding the antibiofilm effect assays of the compound, no treatment was able to reduce the CFUs of C. albicans compared to the CTL. Furthermore, it was observed that 1% TMPCa led to significantly higher CFUs of this microorganism than the 1100 ppm F group. None of the treatments resulted in significant reductions in *S. mutans* CFUs, with all groups being similar to each other. The group 1% TMPCa with F presented the highest biomass production, without significant difference from the 1%

TMPCa group. Biofilms treated with 1% TMPCa presented the highest metabolism, followed by those treated with 1% TMPCa with F. SEM analysis the biofilms maintained the characteristic structure, with clusters of cocci and hyphae, regardless of the presence of F or the compound analyzed. In conclusion, It can be concluded that the synthesis process led to the production of a new calcium-based compound, which, mainly combined with F, affected the microbial composition and metabolism of the biofilms analyzed.

Keywords: calcium; biofilm; phosphates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras de TMP e TMPCa e respectivos histogramas de EDS 17

Figura 2 - Valores médios das contagens de unidades formadoras de colônias para *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* 18

Figura 3 - Valores médios de produção de biomassa total e atividade metabólica de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* 19

Figura 4 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes mistos de Streptococcus mutans e Candida albicans. 19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 MATERIAIS E MÉTODOS 13

2.1 Síntese e caracterização do composto e formulação das soluções de tratamento 13

2.2 Formação e tratamento dos biofilmes 13

2.3 Viabilidade microbiana 14

2.4 Avaliação de indicadores de metabolismo de biofilme 15

2.4.1. Quantificação da biomassa total 15

2.4.2. Avaliação da atividade metabólica das células dos biofilmes 15

2.5 Avaliação da estrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 16

2.6 Análise estatística 16

3 RESULTADOS 17

4 DISCUSSÃO 20

5 CONCLUSÃO 23

REFERÊNCIAS 24

1 INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novos biomateriais para o tratamento e recuperação de lesões ocasionadas por traumas e doenças degenerativas [O'Brien, 2011; Haggerty & Oudega, 2013; Nitta & Numata, 2013]. No campo da odontologia, o foco tem sido o combate à cárie, uma doença mediada pelo biofilme, modulada pela dieta, multifatorial, relacionada à desmineralização da estrutura dura do dente (esmalte e dentina) [Gu et al., 2010; Machiulskiene et al., 2020] por ataque ácido de bactérias cariogênicas, tais como o Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus e Lactobacillus spp. [Melo et al., 2013]. O sinergismo dessas bactérias cariogênicas com o fungo Candida albicans tem grande impacto na progressão e desenvolvimento da cárie dentária [Bachtiar and Bachtiar, 2018].

Apesar do declínio mundial, a doença ainda possui elevada prevalência especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, acometendo consideravelmente a população adulta e infantil [Pitts et al., 2017]. Neste contexto, estratégias devem ser formuladas, as quais incluem o desenvolvimento de novos compostos com base em fosfato e cálcio, que podem ser incluídos em produtos de higiene bucal e demais materiais odontológicos. O grupo de pesquisas vem estudando desde 2009 a adição de TMPNa a produtos fluoretados com objetivo de reduzir a perda mineral do esmalte dentário e aumentar a sua capacidade remineralizadora. Observamos que a adição do TMPNa em dentifrícios fluoretados [Takeshita et al., 2016], enxaguatórios bucais [Manarelli et al., 2011; Favretto et al., 2013] e produtos de aplicação tópica profissional [Manarelli et al., 2017] reduziu a perda mineral e aumentou a remineralização do esmalte. Esta ação combinada de TMPNa com fluoreto também aumentou a quantidade de flúor e cálcio no esmalte e suas concentrações no biofilme dentário [Takeshita et al., 2015].

A ação do TMPNa na proteção da HA não está completamente compreendida, porém, os resultados indicam que o mecanismo está relacionado à adsorção do TMPNa na superfície do esmalte que leva a uma redução da troca iônica entre o esmalte e o meio bucal. O TMPNa se liga aos sítios de grupo hidroxila da HA [Delbem et al., 2014; Amaral et al., 2018] diminuindo a perda de cálcio e promovendo a cristalinidade da HA. A adsorção de TMPNa é influenciada pela

presença de fluoreto, já que o aumento da sua concentração no meio reduz a adsorção do TMPNa na HA, sugerindo que o fluoreto e o TMPNa competem pelo mesmo sítio de ligação na HA [Amaral et al., 2018]. Assim, a proporção molar TMP:F influenciam tanto na 13 perda mineral do esmalte [Takeshita et al., 2009; Takeshita et al., 2011; Manarelli et al., 2011; Favretto et al., 2013; Souza et al., 2013; Amaral et al., 2018] quanto na formação de fluoreto de cálcio no esmalte. Este efeito é importante para o controle do processo de cárie dentária, pois a ação anticárie dos produtos fluoretados está relacionada à deposição de fluoreto de cálcio no esmalte e sua dissolução durante os desafios cariogênicos [Delbem et al., 2010].

Apesar da associação TMP/F reduzir a produção de polissacarídeos extracelulares no biofilme dentário [Takeshita et al., 2015; Souza et al., 2017; Cavazana et al., 2018], o TMPNa não tem demonstrado substancial atividade antimicrobiana [Cavazana et al., 2018; Mendes-Gouvêa et al., 2018]. Apesar dos estudos mostrarem que o TMPNa reduz a perda mineral das estruturas dentárias, confirmada por estudo clínico em crianças [Freire et al., 2016], este deve obrigatoriamente estar associado ao fluoreto (200 a 1100 ppm F).

Estudos prévios, têm mostrado que supersaturar o meio com cálcio pode reduzir o efeito erosivo dos ácidos [Lussi et al., 2011]. Assim, como o TMPNa apresenta a capacidade de adsorver ao esmalte [Amaral et al., 2016; Amaral et al., 2018; Nalin et al., 2021], de reduzir a penetração dos ácidos e melhorar a difusão de cálcio para o interior do esmalte [Takeshita et al., 2016; Gonçalves et al., 2021], funcionalizar o NaTMP com o cálcio pode ajudar a fixar este íon, aumentar sua disponibilidade na superfície dentária e influenciar na atividade antimicrobiano do composto.

Entretanto, nenhum estudo analisou se a substituição do sódio pelo cálcio na molécula do TMPNa, produziria um composto com atividade antimicrobiana significativa ao TMP, sem a necessidade de associação de outros agentes antimicrobianos. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar a atividade do novo ciclotrifosfato (TMPCa) sobre indicadores de metabolismo dos biofilmes estudados, viabilidade microbiana das espécies incluídas, e estrutura destes biofilmes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese e caracterização do composto e formulação das soluções de tratamento

A síntese do composto foi realizada em uma coluna cromatográfica (3 cm × 30 cm), e o composto foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Os compostos de TMPCa foram utilizados em soluções. As concentrações dos compostos adicionadas foram baseadas em estudos prévios realizados com trimetafosfato de sódio [Takeshita et al., 2009; Manarelli et al., 2011].

2.2 Formação e tratamento dos biofilmes

Saliva artificial foi utilizada como meio de cultura, conforme descrito por Lamfon et al. [2003] e modificado por Cavazana et al. [2018], de acordo 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 $CaCl_2$ (Sigma- Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado com NaOH para 6,8.

Para esse estudo, 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 ºC. Culturas de *S. mutans* foram semeadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e incubadas em 5% de CO_2 a 37 ºC 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 ºC 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 CO_2 a 37 ºC. Após o período de incubação, as células fúngicas e bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm, por 5 minutos, a 15 ºC, e os *pellets* de células foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina (0,85% NaCl). A quantidade de células fúngicas foi ajustada para uma concentração

de 10^7 células/mL em saliva artificial com auxílio de uma Câmara de Neubauer e um microscópio óptico, enquanto a quantidade de células bacterianas foi ajustada espectrofotometricamente para uma concentração de 10^8 células/mL em saliva artificial [Cavazana et al., 2018]. A cada 24 h a saliva artificial era renovada.

Os biofilmes foram formados no fundo dos poços de placas de microtitulação. Para isso, a suspensão microbiana (1 x 10^7 células/mL *C. albicans* + 1 x 10^8 células/mL *S. mutans*) foi adicionada aos poços e as placas, incubadas a 37 ºC por 72 horas. Posteriormente, os biofilmes pré-formados (72 horas) foram tratados duas vezes no 1º dia (10:00 e 16:00 horas) por 1 minuto e mais uma vez no dia seguinte (10:00) (totalizando biofilmes de 96 horas). Assim, cada biofilme foi exposto aos respectivos tratamentos por um total de três vezes [Cavazana et al., 2018]. Os biofilmes foram tratados com soluções contendo 0,5 ou 1% de CaTMP ou TMP, associados ou não com 1100 ppm F. Saliva artificial foi considerada como controle negativo (CTL), e uma solução de 1100 ppm F (1100F) foi considerada como controle positivo. Desta forma, o trabalho incluiu seis grupos experimentais: controle negativo (CTL); 1100 ppm F (1100F); 1% TMP (1%TMP); 1% TMP combinado com F (1%TMP/F); 1% TMPCa (1%TMPCa); 1%TMPCa combinado com F (1%TMPCa/F).

2.3 Viabilidade microbiana

A viabilidade microbiana foi avaliada pela quantificação de células cultiváveis, realizada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) [Sampaio et al., 2022]. Para isso, no final do período experimental descrito acima, os biofilmes formados nas placas de 96 poços foram lavados com solução salina e raspados dos poços. Na sequência, as suspensões de biofilmes foram vigorosamente agitadas em vórtex por 1 minuto e, então, passaram por diluições decimais seriadas (em solução salina), sendo posteriormente plaqueadas em CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, França) e BHI Agar suplementado com anfotericina B (7 µg/mL; Sigma-Aldrich), para a contagem de *C. albicans* e *S. mutans*, respectivamente. Após 24-48 horas de incubação a 37 ºC, foi realizada a contagem do número de UFCs.

2.4 Avaliação de indicadores de metabolismo de biofilme

2.4.1. Quantificação da biomassa total

A biomassa total dos biofilmes foi quantificada através do ensaio de coloração com cristal violeta (CV) [Cavazana et al., 2019; Sampaio et al., 2022]. Desta forma, após o período de formação de biofilme e tratamentos, o meio de cultura foi aspirado e as células não aderidas foram removidas por meio da lavagem com solução salina. Em seguida, os biofilmes foram fixados com 200 µL de metanol (99% v/v) (Sigma-Aldrich), o qual foi removido depois de 15 minutos de contato. As placas de 96 poços contendo os biofilmes secaram na temperatura ambiente e 200 µL de CV (1% v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foram adicionadas a cada poço e as placas incubadas por 5 minutos. Os poços foram então lavados suavemente com água deionizada, e 200 µL de ácido acético (33% v/v) (Sigma-Aldrich) foram adicionados para liberar e remover a coloração dos biofilmes. A solução obtida foi transferida para nova placa de microtitulação de 96 poços. A absorbância das soluções obtidas foi lida em um leitor de placa de microtitulação com comprimento de onda de 570 nm. A absorbância final foi padronizada de acordo com a área dos poços (absorbância/cm^2).

2.4.2. Avaliação da atividade metabólica das células dos biofilmes

A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada através do ensaio de redução do XTT (*2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2Htetrazolium hydroxide*; Sigma-Aldrich) [Sampaio et al., 2022], após o terceiro tratamento do biofilme. Este ensaio se caracteriza pela conversão do XTT para formazan e inclui citocromo P450 em bactérias. Para isso, os biofilmes foram lavados com solução salina e, posteriormente, 200 µL de uma solução de 150 mg XTT/L e 10 mg de metassulfato de fenazina/L foram adicionados em cada poço. As placas ficaram incubadas a 37 ºC no escuro, com agitação de 120 rpm. Após 3 horas, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para poços de novas placas de microtitulação de 96 poços e a absorbância lida a 490 nm. Os valores de absorbância foram padronizados por unidade de área dos poços (absorbância/cm^2).

2.5 Avaliação da estrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise estrutural dos biofilmes por MEV, os biofilmes foram formados em placas de microtitulação de 24 poços. Após formação e tratamentos, os biofilmes foram fixados com exposição ao Etanol em diferentes concentrações (70% por 10 min, 95% por 10 min, e 100% por 20 min, seguido por 20 min de secagem). Em seguida, o fundo dos poços das placas foi destacado com lâmina de bisturi estéril, e os biofilmes foram recobertos com ouro. Após recobrimento, os biofilmes foram analisados em microscópio (S-360 microscope, Leo, Cambridge, MA, EUA) [Sampaio et al., 2022].

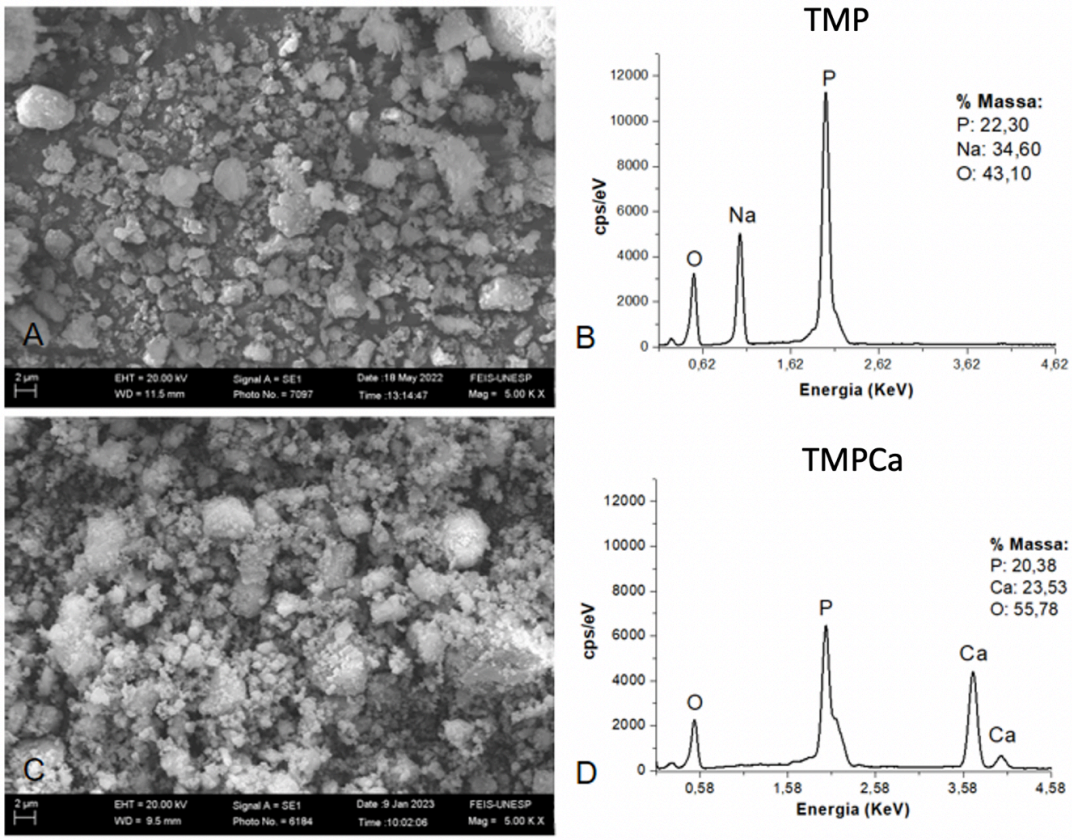
2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Barlett), e então foram submetidos à ANOVA, seguido pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. A análise estatística foi conduzida utilizando o *software* SigmaPlot 12,0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA), adotando $p<0,05$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes (n=9).

3 RESULTADOS

Através das imagens obtidas pelo MEV, foi possível observar granulações pequenas e regulares para todos os grupos analisados (*i.e.*, TMP e TMPCa) (Figura 1). Pelos espectrogramas obtidos pela técnica de EDS, foram observados picos de Na a 1,04 keV para o TMP, além de picos de O e P comuns aos dois compostos. Houve também a presença de picos a 3,69 e 4,00 KeV característicos de Ca para o composto TMPCa (Figura 1).

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

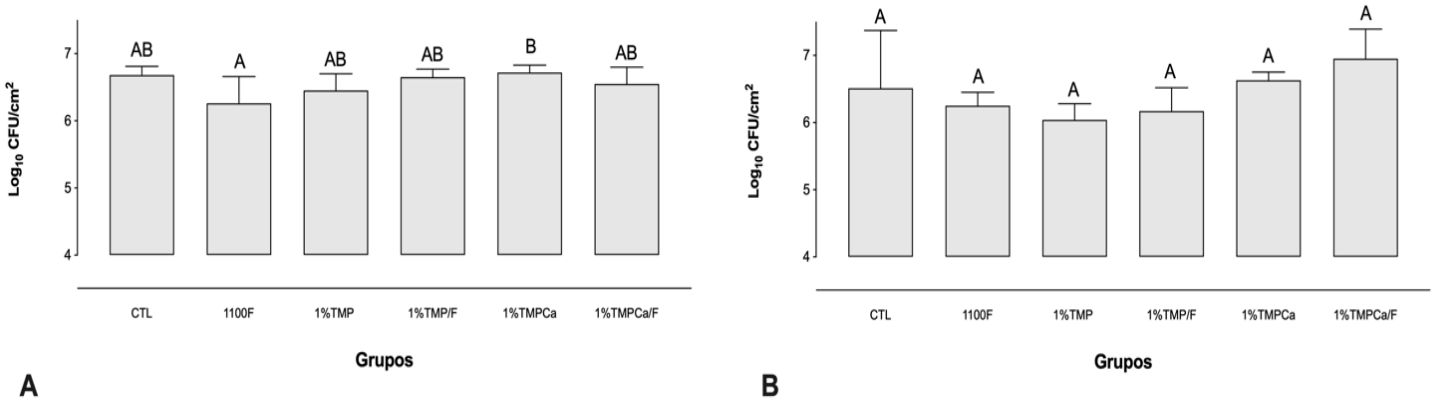


Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Nenhum tratamento foi capaz de reduzir as UFCs de *C. albicans* em comparação ao CTL. Além disso, observou-se que 1%TMPCa levou a UFCs deste microrganismo significativamente maiores que o grupo 1100F (Figura 2A). Nenhum

tratamento levou a reduções significativas nas UFCs de *S. mutans* em comparação ao grupo CTL, sendo todos os grupos semelhantes entre si (Figura 2B).

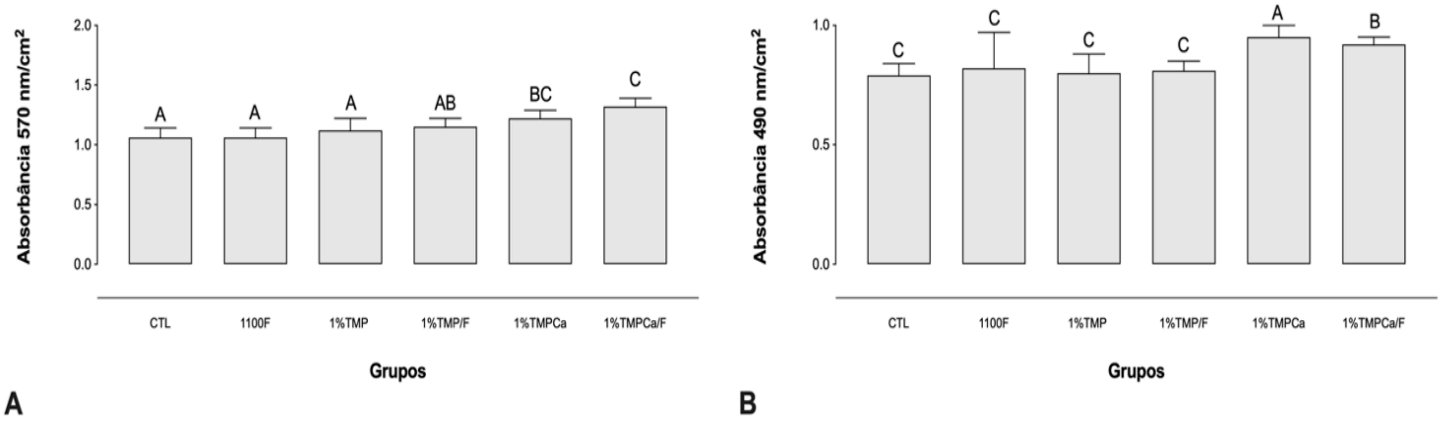
Figura 2 - Valores médios das contagens de unidades formadoras de colônias para *Candida albicans* (A) e *Streptococcus mutans* (B) em biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Barras denotam os desvios padrões das médias. Letras distintas denotam diferenças significativas entre os grupos. CTL = controle negativo; 1100F = 1100 ppm F; 1%TMP = 1% TMP; 1%TMP/F = 1% TMP combinado com F; 1%TMPCa = 1% TMPCa; 1%TMPCa/F = 1%TMPCa combinado com F (ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls, *n*=9)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

O grupo 1%TMPCa/F apresentou a maior produção de biomassa, sem diferença significativa, entretanto, do grupo 1%TMPCa (Figura 3A). Biofilmes tratados com TMP, com ou sem F, apresentaram produção de biomassa semelhante às observadas para os grupos CTL e 1100F. Com relação à atividade metabólica dos biofilmes, observou-se que o grupo 1%TMPCa apresentou os maiores valores, seguido do grupo 1%TMPCa/F (Figura 3B).

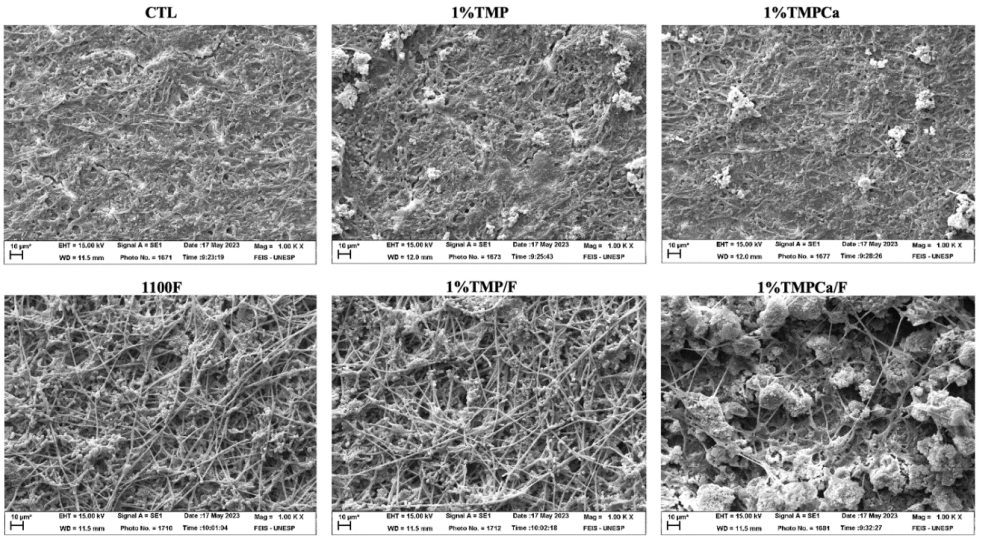
Figura 3 - Valores médios de produção de biomassa total (teste do cristal violeta) (A) e atividade metabólica (teste do XTT) (B) de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Barras denotam os desvios padrões das médias. Letras distintas denotam diferenças significativas entre os grupos. CTL = controle negativo; 1100F = 1100 ppm F; 1%TMP = 1% TMP; 1%TMP/F = 1% TMP combinado com F; 1%TMPCa = 1% TMPCa; 1%TMPCa/F = 1%TMPCa combinado com F (ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls, *n*=9)



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

A análise estrutural por MEV revelou que os biofilmes tratados com soluções contendo F apresentaram uma tendência de menor quantidade de matriz extracelular em relação às suas contrapartes sem F. No entanto, apesar dessas diferenças na matriz extracelular, os biofilmes mantiveram a estrutura característica, com aglomerados de cocos e hifas, independentemente da presença de F ou do composto analisado (Figura 4).

Figura 4 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes mistos de Streptococcus mutans e Candida albicans. Aumento de 1.00 k; Barras: 10 µm. CTL = controle negativo; 1100F = 1100 ppm F; 1%TMP = 1% TMP; 1%TMP/F = 1% TMP combinado com F; 1%TMPCa = 1% TMPCa; 1%TMPCa/F = 1%TMPCa combinado com F



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

4 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]. Recentemente, foi demonstrado que a síntese de um novo composto proveniente do TMP aumentou o efeito anticárie de dentifrícios sem fluoreto suplementados com TMPCa [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; entretanto, aspectos microbiológicos como a composição microbiana, metabolismo e matriz extracelular de biofilmes, não foram explorados naquela ocasião. No presente estudo, o CaTMP, associado ou não ao F, exerceu influência significativa no metabolismo, estrutura e composição microbiana do biofilme analisado.

A exposição do TMPCa nos biofilmes leva a níveis mais altos de cálcio (Ca) e fosfóro (P), o que poderia influenciar substancialmente em parâmetros de metabolismo dos biofilmes [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], podem 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 deste fungo e consequentemente 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.

Especificamente aos indicados de metabolismo e composição microbiana dos biofilmes estudados, padrões semelhantes aos do presente estudo também foram apresentados por Cavazana et al., [2023], avaliando o efeito de soluções de CaGP em biofilmes de duplas espécies. Na ocasião, os autores observaram que as soluções contendo cálcio (*i.e.*, CaGP) levaram à uma maior produção de biomassa e atividade metabólica que o controle negativo (saliva artificial). O tratamento com cálcio aumenta a quantidade de cálcio ligado à superfície microbiana no biofilme dentário [Leitão et al., 2018]. O cálcio interage com proteínas de superfície e forma pontes iônicas entre macromoléculas carregadas negativamente, melhorando a agregação celular. A proximidade de células vizinhas é relatada como dependente da ponte de cálcio [Rose, 2000], e a presença de Ca leva à conexão entre moléculas [Körstgens, 2001]. Essa mudança na composição do biofilme pode justificar o aumento na produção de biomassa e metabolismo encontrado para os biofilmes tratados com TMPCa, independentemente da presença de F, em comparação com o grupo CTL. Sugere-se que a ligação de Ca e microrganismos pode reter novos compostos, aumentando assim a biomassa do biofilme. Essa hipótese está em consonância com os resultados quantitativos do presente estudo e com os resultados obtidos por Cavazana et al. [2023], considerando que o aumento na biomassa e metabolismo para o grupo contendo cálcio não foi acompanhado por um aumento no número de células. De fato, assim como para os resultados de viabilidade microbiana, dados recentes não publicados demonstraram que tratamentos com TMPCa, especialmente combinado com F, foi capaz de diminuir a expressão de componentes da matriz extracelular de biofilmes de interesse cariogênico.

Apesar dos resultados supracitados, algumas limitações inerentes ao presente modelo de estudo devem ser mencionadas. É importante enfatizar que um modelo de biofilme de dupla espécie não representa totalmente a natureza polimicrobiana encontrada no meio bucal. Além disso, deve-se ressaltar que o presente protocolo não envolve variáveis hidrodinâmicas semelhantes ao que ocorre na boca. Apesar das limitações deste modelo de biofilme, entretanto, os resultados obtidos forneceram dados adicionais sobre os mecanismos pelos quais o TMPCa

pode interferir na dinâmica da cárie dentária, estimulando novos estudos com este ciclofosfato.

5 CONCLUSÃO

Com base no exposto, pode-se concluir que o TMPCa sintetizado, especialmente quando combinado ao F, afetou a composição e metabolismo dos biofilmes analisados.

REFERÊNCIAS

AMARAL J.G.; DELBEM, A.C.B.; PESSAN, J.P.; MANARELLI, M.M.; BARBOUR, M.E. Effects of polyphosphates and fluoride on hydroxyapatite dissolution: A pH-stat investigation. **Arch Oral Bio**l, v. 63, p. 40-46, mar 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996915300960?via%3Dihub. Acesso em: 06 mai. 2025.

AMARAL, J.G.; PESSAN J.P.; SOUZA, J.A.S.; MORAES, J.C.S.; DELBEM, A.C.B. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 106, n. 7, p. 2553-2564, oct. 2018. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.34072. Acesso em: 26 mar. 2025.

ASTASOV-FRAUENHOFFER, M.; VARENGANAYIL, M.M.; DECHO, A.; WWALTIMO, T.; BRAISSANT, O. Exopolysaccharides regulate calcium flow in cariogenic biofilms. **PLoS One**, v. 12, n. 10, oct. 2017. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0186256. Acesso em: 26 mar. 2025.

BACHTIAR, E.W.; BACHTIAR, B.M.; Relationship between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in early childhood caries, evaluated by quantitative PCR. **F1000Res**, n. 7, p.1645, oct. 2018. Disponível em: https://f1000research.com/articles/. Acesso em: 26 mar. 2025.

CAVAZANA, T.P.; PESSAN, J.P.; HOSIDA, T.Y.; MONTEIRO, D.R.; BOTAZZO, A.C.D. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions *in vitro*. **Arch. Oral Biol**, v. 90, p. 9-12, jun. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996918300530. Acesso em: 26 mar. 2025.

CAVAZANA, T.P.; HOSIDA, T.Y.; PESSAN, J.P.; SAMPAIO, C. MONTEIRO, D.R.; DELBEM, A.C.B. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 6, p. 710-718, jul. 2019. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2019.1653455. Acesso em: 26 mar. 2025.

CAVAZANA, T.P.; HOSIDA, T.Y.; SAMPAIO, C.; DE MORAIS, L.A.; MONTEIRO, D.R.; PESSAN, J.P.; DELBEM, A.C.B. Calcium glycerophosphate and fluoride affect the pH and inorganic composition of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **J Dent**, v.115, p. 103844, dez. 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571221002670. Acesso em: 26 mar. 2026.

CAVAZANA, T.P.; HOSIDA, T.Y.; SAMPAIO, C.; DE MORAIS, L.A.; MONTEIRO, D.R.; PESSAN, J.P.; DELBEM, A.C.B. The Activity of Calcium Glycerophosphate and Fluoride against Cariogenic Biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Formed *In Vitro*. **Antibiotics (Basel)**, v.12, n. 2, p. 422, fev. 2023. Disponível em: https://www.mdpi.com/2079-6382/12/2/422. Acesso em: 26 mar. 2025.

DELBEM, A.C.; SOUZA, J.A.; ZAZE, A.C.; TAKESHITA, E.M.; SASSAKI, K.T.; MORAES, J.C. Effect of trimetaphosphate and fluoride association on hydroxyapatite dissolution and precipitation *in vitro*. **Braz Dent J**, v. 25, n. 6, p. 479-484, nov-dez. 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/j/bdj/a/x5NwPgpMsmKBcpDLFwfkWYS/. Acesso em: 26 mar. 2025.

DUBOIS, M. GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem**, v. 28, n.3, p. 350-356, mar. 1956. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/ac60111a017. Acesso em:26 mar. 2025.

EMERENCIANO, N.G.; DELBEM, A.C.B.; GONÇALVES, F.M.C.; DE CAMARGO, E.R.; DE SOUZA NETO, F.N.; GORUP, L.F.; SILVA-SOUSA, Y.T.C.; DANELON, M. Effect of nanometric β-calcium glycerophosphate supplementation in conventional toothpaste on enamel demineralization: an *in vitro* study. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 151, p. 106354, mar 2024. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1751616123007087. Acesso em: 26 mar. 2025.

FAVRETTO, C.O.; DANELON, M.; CASTILHO, F.C.; VIEIRA, A.E.; DELBEM, A.C. *In vitro* evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. **Caries Res**, v. 47, n. 5, p. 532-538, jun. 2013. Disponível em: https://karger.com/cre/article-abstract/47/5/532/85985/In-vitro-Evaluation-of-the-Effect-of-Mouth-Rinse?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

FAVRETTO, C.O.; DELBEM, A.C.B.; MORAES, J.C.S.; CAMARGO, E.R.; DE TOLEDO, P.T.A.; PEDRINI, D. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. **Clin Oral Investig**, v. 22, p. 3021-3029, fev. 2018. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-018-2384-3. Acesso em: 26 mar. 2025.

FLEMMING, H.C.; VAN HULLEBUSCH, E.D.; NEU, T.R.; NIELSEN, P.H.; SEVIOUR, T. STOODLEY, P.; WINGENDER, J.; WUERTZ, S. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nat Rev Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 70-86, fev. 2023. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41579-022-00791-0#citeas. Acesso em: 26 mar. 2025.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 623-633, set. 2010. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrmicro2415. Acesso em: 26 mar. 2025.

FREIRE, I.R.; PESSAN, J.P.; AMARAL, J.G.; MARTINHON, C.C.; CUNHA, R.F.; DELBEM, A.C.; Anticaries effect of low-fluoride dentifrices with phosphates in children: A randomized, controlled trial. **J Dent**, v. 50, p. 37-42, jul. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300571216300847. Acesso em: 26 mar. 2025.

GONÇALVES, F.M.C.; DELBEM, A.C.B.; GOMES, L.F.G.; EMERENCIANO, N.G.; PESSAN, J.P.; ROMERO, G.D.A.; CANNON. M. L.; DANELON, M. Effect of fluoride, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate combination treatment on the remineralization of caries lesions: An *in vitro* study. **Arch Oral Biol**, v. 122, p. 105001, fev. 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996920303794?via%3Dihub. Acesso em: 06 mai. 2025.

GU, L.S.; KIM, J.; KIM, Y.K.; LIU, Y.; DICKENS, S.H.; PASHLEY, D.H.; LING, J.Q.; TAY, F.R. A chemical phosphorylation-inspired design for Type I collagen biomimetic remineralization. **Dent Mat**, v.26, n.11, p. 1077-1089, nov. 2010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0109564110001880?via%3Dihub. Acesso em: 26 mar. 2025.

HAGGERTY, A.E.; OUDEGA, M. Biomaterials for spinal cord repair. **Neurosci Bull**, v. 29, n. 4, p. 445-459, ago. 2013. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-013-1362-7. Acesso em: 26 mar. 2025.

HOBLEY, L.; HARKINS, C.; MACPHEE, C.E.; STANLEY-WALL, N.R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 5, p. 649-669, set. 2015. Disponível em: https://academic.oup.com/femsre/article/39/5/649/530591?login=false. Acesso em: 26 mar. 2025.

ISLAM, M.S. Calcium signaling: from basic to bedside. **Adv Exp Med Biol**, v. 1131, p. 1-6, 2020. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-12457-1_1#citeas. Acesso em 26 mar. 2025.

KOO, H.; FALSETTA, M.L.; KLEIN, M.I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J Dent Res**, v. 92, n. 12, p. 1065-1073, set. 2013. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0022034513504218. Acesso em: 26 mar. 2025.

LAMFON, H.; PORTER, S.R.; MCCULLOUGH, M.; PRATTEN, J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. **Eur. J. Oral Sci**, v. 111, n. 6, p. 465-471, nov. 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.0909-8836.2003.00084.x. Acesso em: 26 mar. 2025.

LEITÃO, T.J.; CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A. Kinetics of calcium binding to dental biofilm bacteria. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0191284, jan. 2018. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191284. Acesso em: 26 mar. 2025.

LIN, Y.; ZHOU, X.; LI, Y. Strategies for *Streptococcus mutans* biofilm dispersal through extracellular polymeric substances disruption. **Mol Oral Microbiol**, v. 37, n.1, p. 1-8, fev. 2022. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/omi.12355. Acesso em: 26 mar. 2025.

LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; RAKHMATULLINA, E.; GANSS, C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**, v. 45, n. 1, p. 2-12, mai. 2011. Disponívem em: https://karger.com/cre/article-abstract/45/Suppl.%201/2/85538/Dental-Erosion-An-Overview-with-Emphasis-on?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 06 mai. 2025.

LYNCH, R.J. M. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. **Int Dent J**, v. 54, n. S5, p. 310-314, 2004. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1875-595X.2004.tb00004.x. Acesso em: 26 mar. 2025.

KUNSHENG, Z.; YANGYANG, L.; YUNXIA, R. Research on the phosphorylation of soy protein isolate with sodium tripoly phosphate. **J Food Eng**, v. 79, n. 4, p. 1233-1237, abr. 2007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877406003360. Acesso em: 26 mar. 2025.

KÖRSTGENS, V.; FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; BORCHARD, W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Water Sci Technol**, v. 43, n. 6, p. 49-57, mar. 2000. Disponível em: https://iwaponline.com/wst/article-abstract/43/6/49/9470/Influence-of-calcium-ions-on-the-mechanical?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

MACHIULSKIENE, V.; CAMPUS, G.; CARVALHO, J.C.; DIGE, I.; EKSTRAND, K.R.; JABLONSKI-MOMENI, A.; MALTZ, M.; MANTON, D.J.; MARTIGNON, S.; MARTINEZ-MIER, E.A.; PITTS, N.B.; SCHULTE, A.G.; SPLIETH, C.H.; TENUTA, L.M.A.; FERREIRA ZANDONA, A.; NYVAD, B. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. **Caries Res**, v. 54, n. 1, p. 7-14, fev. 2020. Disponível em: https://karger.com/cre/article-abstract/54/1/7/86000/Terminology-of-Dental-Caries-and-Dental-Caries?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

MANARELLI, M.M.; DELBEM, A.C.B.; BÁEZ-QUINTERO, L.C.; DE MORAES, F.R.N.; CUNHA, R.F.; PESSAN, J.P. Fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate reduce enamel demineralization in vitro. **Acta Odontol Scand**, v. 75, n. 5, p. 376-378, abr. 2017. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00016357.2017.1318448. Acesso em: 26 mar. 2015.

MANARELLI, M.M.; VIEIRA, A.E.M.; MATHEUS, A.A.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C.B. Effect of mouthrinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an *in vitro* study. **Caries Res**, v. 45, n. 6, p. 506-509, set. 2011. Disponível em: https://karger.com/cre/article-abstract/45/6/506/85876/Effect-of-Mouth-Rinses-with-Fluoride-and?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

MENDES-GOUVÊA, C.C.; DO AMARAL, J.G.; FERNANDES, R.A.; FERNANDES, G.L.; GORUP, L.F.; CAMARGO, E.R.; DELBEM, A.C.B.; BARBOSA, D.B. Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver nanoparticles: characteristics and antimicrobial efficacy. **Biofouling**, v. 34, n. 3, p. 299-308, fev. 2018. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2018.1437146. Acesso em: 26 mar. 2025.

MELO, M.A.; GUEDES, S.F.; XU, H.H.; RODRIGUES, L.K. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. **Trends in Biotechnol**, v. 31, n. 8, p. 459-467, ago. 2013. Disponível em: https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(13)00119-4. Acesso em: 26 mar. 2025.

NALIN, E.K.P.; DANELON, M.; SILVA, E. S.; HOSIDA, T. Y.; PESSAN, J. P.; DELBEM, A.C.B. Surface Free Energy, Interaction, and Adsorption of Calcium and Phosphate to Enamel Treated with Trimetaphosphate and Glycerophosphate. **Caries Res**, v. 55, n. 5, p. 496-504, set. 2021. Disponível em: https://karger.com/cre/article-abstract/55/5/496/822451/Surface-Free-Energy-Interaction-and-Adsorption-of?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 06 mai. 2025.

NITTA, S.K.; NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 1, p. 1629-1654, jan. 2013. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/14/1/1629. Acesso em: 26 mar. 2025.

O'BRIEN, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Mat Today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, mar. 2011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X. Acesso em: 26 mar. 2025.

PERES, G.R. Efeito de um novo ciclofosfato de cálcio na desmineralização do esmalte: estudo *in vitro* [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2023.

ROSCH, J.W.; SUBLETT, J.; GAO, G.; WANG, Y.D.; TUOMANEN, E.I. Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host. **Mol Microbiol**, v. 70, n. 2, p. 435-444, out. 2008. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2008.06425.x. Acesso em: 26 mar. 2025.

ROSE, R.K. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for biofilm formation and retention. **Biochim Biophys Acta**, v. 1475, n. 1, p. 76-82, jun. 2000. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416500000489. Acesso em: 26 mar. 2025.

SAMPAIO, C.; DELBEM, A.C.B.; HOSIDA, T.Y.; DE MORAIS, L.A.; FERNANDES, A.V.P.; SOUZA NETO, F.N.; DE CAMARGO, E.R.; MONTEIRO, D.R.; PESSAN, J.P. Effects of nano-sized sodium hexametaphosphate on the viability, metabolism, matrix composition, and structure of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 38, n. 4, p. 321-330, abr. 2022. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2022.2064220. Acesso em: 26 mar. 2025.

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**, v. 47, n. 7, p. 681-689, nov. 2009. Disponível em: https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/47/7/681/1040941?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

SOUZA, J.A.; BARBOSA, D.B.; BERRETTA, A.A.; DO AMARAL, J.G.; GORUP, L.F.; DE SOUZA NETO, F.N.; FERNANDES, R.A.; FERNANDES, G.L.; CAMARGO, E.R.; AGOSTINHO, A.M.; DELBEM, A.C.B. Green synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities. **Future Microbiol**, v. 13, n. 3, p. 345-357, mar. 2018. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb-2017-0173. Acesso em: 26 mar. 2025.

SOUZA, J.A.; AMARAL, J.G.; MORAES, J.C.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C.B. Effect of sodium trimetaphosphate on hydroxyapatite solubility: an in vitro study. **Braz Dent J**, v. 24, n. 3, p. 235-240, mai-jun. 2013. Disponível em: https://www.scielo.br/j/bdj/a/J4nqGrBm3xvXHGJvnChp7Kh/?lang=en. Acesso em: 26 mar. 2025.

TAKESHITA, E.M.; DANELON, M.; CASTRO, L.P.; CUNHA, R.F.; DELBEM, A.C.B. Remineralizing potential of a low fluoride toothpaste with sodium trimetaphosphate: an *in situ* study. **Caries Res**, v. 50, n. 6, p. 571-578, nov. 2016. Disponível em: https://karger.com/cre/article-abstract/50/6/571/86260/Remineralizing-Potential-of-a-Low-Fluoride?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

TAKESHITA, E.M; DANELON, M.; CASTRO, L.P.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C.B. Effectiveness of a toothpaste with low fluoride content combined with trimetaphosphate on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. **Caries Res**, v. 49, n. 4, p. 394-400, jun. 2015. Disponível em: https://karger.com/cre/article-abstract/49/4/394/85669/Effectiveness-of-a-Toothpaste-with-Low-Fluoride?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 26 mar. 2025.

TOMÉ, F.M; RAMOS, L.P.; FREIRE, F.; PEREIRA, C.A.; OLIVEIRA, I.C.B.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C.; OLIVEIRA, L.D. 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**, v. 32, n. 6, p. 1237-1243, abr. 2017. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10103-017-2201-2. Acesso em: 26 mar. 2025.

WATANABE, M,.; YOSHIDA, K.; SAKURAI, M.; SATO, S. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. **J Mater Sci**, v. 33, p. 5601-5606, dez. 1998. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004412131566. Acesso em: 26 mar. 2025.

XIAO, J.; KLEIN, M.I.; FALSETTA, M.L.; LU, B.; DELAHUNTY, C.M.; YATES, J.R.; YATES III, J.R.; HEYDORN, A.; KOO, H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002623, abr. 2012. Disponível em: https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002623. Acesso em: 26 mar. 2025.

ZAZE, A.C.; DIAS, A.P.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C.B. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 6, p. 1619-1624, jul. 2014. Disponível em:

https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-013-1140-y#citeas. Acesso em: 26 mar. 2025.