

Thaís Yuri Suzuki Costa

**Enxaguatório bucal livre de álcool contendo extrato da
casca de romã, trimetafosfato de sódio e flúor –
avaliação da quantidade de cálcio, fósforo e flúor em
esmalte bovino após ciclagem de pH**

ARAÇATUBA - SP

2020

Thaís Yuri Suzuki Costa

Enxaguatório bucal livre de álcool contendo extrato da casca de romã, trimetafosfato de sódio e flúor – avaliação da quantidade de cálcio, fósforo e flúor em esmalte bovino após ciclagem de pH

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgião dentista.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Debora Barros Barbosa

ARAÇATUBA - SP

2020

Agradecimentos

Gostaria de agradecer profundamente à minha orientadora, Professora Debora, com quem pude aprender muito e que sempre teve muita calma para nos ensinar. Muito obrigada pela oportunidade de tanto aprendizado.

À Ana e Gabi que eu tive o prazer de conhecer e acompanhar suas pesquisas que deram origem a este trabalho incrível. Muito obrigada pela paciência e dedicação.

Ao meus pais, que me deram oportunidade de estudar fora da minha cidade natal, o que me proporcionou muito crescimento e amadurecimento. Em especial à minha mãe, que é um exemplo de mulher, garra e perseverança. Eu tenho a sorte e o privilégio de ser sua filha. Obrigada por todas as palavras de conforto nos momentos que sempre precisei.

À minha xará e segunda mãe, obrigada por sempre nos acolher e amar tão profundamente.

Aos meus queridos irmãos, que todo dia me ensinam diversas formas de amar e me inspiram a ser uma pessoa melhor.

Ao meu amor, que mesmo longe se manteve perto durante esses anos juntos. Aguentando todos os meus surtos existenciais e me apoiando em qualquer decisão que eu viera a tomar.

Aos meus queridos amigos de São Paulo, que nem mesmo a distância por tanto tempo fizeram nossos laços de afeto e amor diminuírem.

À Moradia Estudantil, que não era onde eu dormia, mas foi o lugar onde eu mais me senti em casa durante nos meus anos na FOA. Todo ano renovando suas energias com a entrada e saída de pessoas maravilhosas que por ali passaram. E desta vez eu que estou indo, com muitas memórias e recordações que levarei para minha vida.

Ao João Victor, que sempre me salvou para vazar gesso, que tem o dom de tornar o ambiente mais alegre e levantar a energia de todos ao seu redor. Obrigada pelos risos, cafés e idas ao mercado.

À minha grande amiga parceira, Nathalia Maciel, que possui um coração único, uma luz e simpatia ímpar que esteve ao meu lado em todos esses anos da graduação. Compartilhando momentos de aprendizado e companheirismo que sempre guardarei com muito amor e carinho no meu coração.

COSTA, T.Y.S. **Enxaguatório bucal livre de álcool contendo extrato da casca de romã, trimetafosfato de sódio e flúor – avaliação da quantidade de cálcio, fósforo e flúor em esmalte bovino após ciclagem de pH.** 2020. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2020.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar *in vitro* o efeito de formulações para enxaguatórios bucais livre de álcool contendo extrato da casca de romã, trimetafosfato de sódio e fluoreto de sódio; sobre as concentrações de cálcio, fósforo e flúor em esmalte bovino após sofrerem ciclagem de pH e tratamentos com essas formulações. Obteve-se o extrato da casca da romã por via alcoólica através do processo de maceração e filtração, o qual foi padronizado em % de sólidos e submetido a análises farmacopéicas por colorimetria de Folin Denis. Blocos de esmalte bovino (4 mm × 4 mm) selecionados por dureza superficial inicial (SHi) foram alocados aleatoriamente de acordo com grupos de tratamentos de formulação (n = 12 /grupo): ETF1 (3,0% E + 0,2% TMP + 100ppm F), TF1 (0,2% TMP + 100ppm F), ETF2 (3,0% E + 0,3% TMP + 225ppmF), TF2 (0,3% TMP + 225ppmF), F1 (100ppm F), F2 (225ppm F) e P (formulação sem E/T/F - placebo). Os blocos foram tratados 2x/dia por 1 minuto com cada formulação e submetidos a cinco ciclos de pH (soluções desmineralizantes/remineralizantes) a 37° C. A seguir, determinaram-se as concentrações de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte bovino. Quantidades semelhantes de F foram observadas em todas as formulações. Já a concentração de Ca no esmalte aumentou $\pm 30\%$ na solução F2 em comparação à F1. Por fim, as concentrações de fósforo no esmalte foi superior para a formulação F2 quando comparada com a formulação F1 = solução ETF1 = solução TF1 = solução ETF2 =

solução TF2. Pode-se concluir que, a adição de extrato da casca de romã (*Punica granatum*) à 3% em formulações para enxaguatório contendo TMP e F, manteve as concentrações de F, Ca e P no esmalte bovino em ensaios *in vitro* de ciclagem de pH, não prejudicando sua atividade remineralizante. Assim, cria-se uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de um produto comercial dental sem álcool associando-se os benefícios já comprovados do TMP e F com os milenarmente reconhecidos da *Punica granatum*.

Palavras-chave: Romã; Polifosfatos; Fluoreto de Sódio; Cárie Dentária

COSTA, T.Y.S **Alcohol free mouthwash containing *Punica granatum* peel extract, sodium trimetaphosphate and fluor - assessment of the concentrations of calcium, phosphorus and fluoride in bovine dental enamel after pH cycling.** 2020. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2020.

ABSTRACT

The present study had as objective to analyse *in vitro* the effect of formulations for alcohol free mouthwashes containing pomegranate peel extract, sodium trimetaphosphate and sodium fluoride, under concentrations of calcium, phosphorus and flour in bovine enamel after pH cycling and treatment with these formulations.

The pomegranate peel extract was obtained by alcoholic process through the process of maceration and filtration, it was standardized in % of solids and subjected to pharmacopoeial analyzes by Folin Denis colorimetry. Bovine enamel blocks (4 mm × 4 mm) selected by initial surface hardness (SHi) were randomly allocated according to groups of formulation treatments (n= 12/group): ETF1 (3.0% E + 0.2% TMP + 100 ppm F), TF1 (0.2% TMP + 100 ppm F), ETF2 (3.0% E + 0.3% TMP + 225 ppm F), TF2 (0.3% TMP + 225ppm F), F1 (100 ppm F), F2 (225 ppm F), and P (formulation without E/T/F - placebo). The blocks were treated 2x/day for 1 minute with each formulation and subjected to five pH cycles (demineralizing/remineralizing solutions) at 37° C. Next, the concentrations of fluoride (F), calcium (Ca) and phosphorus (P) in the bovine enamel were determined. Similar amounts of F were found in all formulations. The concentration of Ca, on the other hand, increased ± 30% in solution F2 in comparison with F1. Lastly, the concentration of phosphorus in the enamel was highest for formulation F2 when compared to formulation F1 = solution ETF1 = solution TF1 =

solution ETF2 = solution TF2. It can be concluded that the addition of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract at 3% in formulations for mouthwash containing TMP and F kept the concentrations of F, Ca and P in bovine enamel in *in vitro* trials of pH cycling, not harming the remineralizing activity. Thus, creating a promising prospect for the development of a commercial alcohol free dental product associating the already proven benefits of TMP and F with the millennial ones of *Punica granatum*.

Keywords: Pomegranate; Polyphosphates; Sodium Fluoride; Dental Caries.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 1 - | Grupos de formulações para enxaguatório bucal e seus constituintes (g) | 33 |
| TABELA 2 - | Concentração de compostos fenólicos (mg / mg) nas amostras | 33 |
| TABELA 3 - | Média (DP) das variáveis analisadas de acordo com o tratamento das formulações para enxaguatório bucal | 34 |

SUMÁRIO

| | | |
|---|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| | 3.1 Obtenção e caracterização do extrato da casca da romã | 16 |
| | 3.2 Preparo das formulações para enxaguatório bucal | 16 |
| | 3.3 Quantificação de totais fenólicos | 17 |
| | 3.4 Determinação de flúor nas formulações para enxaguatório bucal | 17 |
| | 3.5 Delineamento experimental | 18 |
| | 3.5.1 <i>Processo de desmineralização (DES) e remineralização (RE) do esmalte</i> | 18 |
| | 3.6 Análise das concentrações de F, Ca e P no esmalte | 19 |
| | 3.7 Análise estatística | 20 |
| 4 | RESULTADOS | 21 |
| | 4.1 Totais fenólicos nas formulações para enxaguatório bucal | 21 |
| | 4.2 Concentrações de F, Ca e P no esmalte | 21 |
| 5 | DISCUSSÃO | 22 |
| 6 | CONCLUSÃO | 25 |
| | REFERÊNCIAS | 26 |

1. INTRODUÇÃO

Dentre as principais e mais comuns infecções orais encontra-se a cárie dentária, a gengivite e a periodontite (Philip e Walsh, 2019). Uma característica comum nessas patologias é a presença de microrganismos que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento ou persistência dessas infecções. O controle ou a remoção desses microrganismos se dá através da escovação dental, utilização de fio dental e enxaguatórios bucais, auxiliando no controle e prevenção dessas doenças (Batista, Lins et al. 2014).

O desenvolvimento das doenças bucais tem origem a partir da aderência de bactérias orais, patogênicas ou não, na película adquirida que é derivada de produtos bacterianos e da saliva que se forma sobre os dentes. A placa ou biofilme é considerado fator chave para o desenvolvimento da cárie dental, e os principais agentes etiológicos presentes na placa dentária são os *Streptococcus sp.* (cocos Gram-positivos) e *Actinomyces sp.* (bacilos Gram-negativos) (de Oliveira e Leite, 2020).

Muitas revisões têm abordado a utilização de enxaguatórios bucais como uma alternativa benéfica para o controle de biofilmes microbianos relacionados à cárie (Bhadbhade, Acharya et al. 2011) devido a facilidade de utilização, ação antimicrobiana e antiinflamatória em locais não alcançados pelos processos mecânicos. Além disso, os enxaguatórios bucais podem ser uma medida tópica para aplicação de flúor devido o contato com os dentes, realizando um efeito protetor (Favretto, Danelon et al. 2013).

A clorexidina é um dos agentes químicos mais utilizados nos enxaguatórios bucais. Contudo, sua prescrição deve ser limitada a curtos períodos de tempo devido a seus efeitos colaterais, como: pigmentação nos dentes e língua, alterações no paladar, descamação epitelial, sensações de queimação e sabor amargo (Bhadbhade, Acharya et

al. 2011); (Dabholkar, Shah et al. 2016). Além da clorexidina, os óleos essenciais são muito utilizados, porém o alto teor alcoólico e o sabor desagradável muitas vezes não são bem tolerados pelos pacientes (Bhadbhade, Acharya et al. 2011); (Dabholkar, Shah et al. 2016).

O etanol muitas vezes é empregado nos enxaguatórios bucais por atuar como solvente para outras substâncias e como conservante na formulação. Porém pode produzir uma sensação de queimação nas bochechas, dentes e gengivas, podendo também causar intoxicação por ingestão, no caso de pacientes pediátricos, ou uso excessivo e prolongado (Matos, Serra et al. 2016).

Além disso, o aumento na resistência dos microrganismos aos tratamentos convencionais e os efeitos colaterais causados por esses produtos, motivaram a busca de novas alternativas de tratamento, fazendo com que a pesquisa e o desenvolvimento de produtos utilizando compostos naturais e que não apresentem o álcool em sua composição cresçam consideravelmente (Bhadbhade, Acharya et al. 2011); (Akca, Akca et al. 2016).

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento de várias doenças. A abrangência da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais é vasta e engloba fins variados, também em relação à saúde bucal, podendo ser empregados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (Cordeiro, Sacramento et al. 2006)

Dentre a vasta gama de plantas com potencial medicinal, está a *Punica granatum*, mais conhecida como romã. Trata-se de uma planta cultivada em países de clima quente (Macedo, de Souza et al. 2020) e frequentemente utilizada na medicina popular para tratamento de infecções de garganta, rouquidão, febre, antisséptico e antiviral em processos inflamatórios da mucosa oral (Matos, Garland et al. 2002). A sua

casca contém aproximadamente 20% de taninos ativos, incluindo punicalagina, punicalina e corilagina (Menezes, Cordeiro et al. 2006). Além disso, seu efeito benéfico em processos inflamatórios como a gengivite pode estar relacionado com a presença de flavonoides que possuem uma alta atividade antioxidante e estimulam enzimas endógenas com essa mesma função (Bhadbhade, Acharya et al. 2011). Estudos mostram que a romã apresenta atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos presentes no biofilme dental, incluindo o *Streptococcus mutans* (Bhadbhade, Acharya et al. 2011). Acredita-se que a ação da romã relaciona-se com a redução da capacidade de adesão desses microrganismos na superfície do dente, e da produção de enzimas responsáveis pelo metabolismo da sacarose, dificultando assim o desenvolvimento da cárie (Bhadbhade, Acharya et al. 2011). Além disso, bochechos com extrato da romã reduziram os níveis salivares de outras enzimas como, por exemplo, a aspartato-aminotransferase, que está relacionada com lesões celulares e é encontrada em altos níveis em pacientes com doença periodontal (Bhadbhade, Acharya et al. 2011).

Devido a sua facilidade de uso, a literatura sugere que além de agentes antimicrobianos, os enxaguatórios bucais contenham outros componentes para auxiliar no controle do desenvolvimento de patologias bucais. Nesse contexto, a associação de flúor e fosfatos inorgânicos como o trimetafosfato de sódio (TMP) poderiam atuar na redução do processo de desmineralização presente na cárie dentária. Já é demonstrado que a adição de TMP a uma solução fluoretada otimiza a capacidade do flúor na redução da desmineralização do esmalte (Takeshita et al., 2011 e Favretto et al., 2013); (Takeshita, Exterkate et al. 2011); (Favretto, Danelon et al. 2013), e isso ocorre provavelmente devido a capacidade de se ligarem e permanecerem ligados à superfície do esmalte, modificando a permeabilidade aos íons cálcio e flúor e aos ácidos presentes

nos desafios cariogênicos (McGaughey and Stowell 1977) (van Dijk, Borggreven et al. 1980); (Takeshita, Exterkate et al. 2011).

Sendo assim, pensando nas propriedades benéficas da romã e do TMP juntamente com o fluoreto de sódio, o presente estudo avaliou *in vitro* as concentrações de cálcio, flúor e fósforo presentes em esmalte bovino após a ciclagem de pH e tratamentos com enxaguatórios bucais não alcoólicos produzidos com extrato de casca de romã, TMP e baixas concentrações de flúor (F).

2. OBJETIVOS

O presente estudo avaliou *in vitro* as concentrações de cálcio, flúor e fósforo presentes em esmalte bovino após a ciclagem de pH e tratamentos com enxaguatórios bucais não alcoólicos produzidos com extrato de casca de romã, TMP e baixas concentrações de flúor (F).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização do extrato da casca da romã

A casca da romã (*Punica granatum*) já desidratada, triturada e esterilizada foi obtida em lote único da Companhia Santos Flora (Santos flora Com. De Ervas, Mairiporã, SP - Brasil). O produto possui certificação das agências reguladoras ANVISA, CETESB, IBAMA e FDA, além de análises farmacopéicas e microbiológicas. Para produção do extrato da casca de romã, primeiramente realizou-se o processo de maceração com etanol 70% GL (70° GL) na proporção de 1:3 por 24 horas. Em seguida, essa mistura foi filtrada a vácuo, separando o extrato bruto e a borra. Nessa borra, o etanol 70° GL foi adicionado novamente e realizado o processo de maceração outra vez . Esse procedimento foi repetido por cinco vezes até que não houvesse mais sólidos solúveis presentes no extrato, indicando possível exaustão pelo processo extrator. Essas 5 frações foram misturadas e concentradas em um roto-evaporador a vácuo até o extrato mole ser obtido. Posteriormente, o extrato mole foi diluído em propilenoglicol e caracterizado em relação ao teor de sólidos (secagem em estufa), onde foi posteriormente padronizado em % de sólidos à 30,1%.

3.2 Preparo das formulações para enxaguatório bucal

As formulações foram padronizadas de acordo com seu princípio ativo em: 3% de extrato glicólico da casca de romã (E), 0,2 ou 0,3% de trimetafosfato de sódio (TMP), 100 ou 225 ppm de flúor (F), além destes, também foram utilizados estabilizadores, conservantes microbiológicos, quelantes, adoçantes, umectantes e água e todas as formulações tiveram seu pH ajustado para 7,0 (Tabela 1). Assim, as formulações foram divididas nos seguintes grupos: ETF1 (3% E + 0,2% TMP + 100 ppm F), TF1 (0,2% TMP + 100 ppm F), ETF2 (3% E + 0,3% TMP + 225 ppm F), TF2

(0,3% TMP + 225 ppm F), F1 (100 ppm F), F2 (225 ppm F) e P (formulação sem os ativos - placebo).

3.3 Quantificação de totais fenólicos

Para estabelecer os totais fenólicos presentes nas formulações contendo extrato da casca de *Punica granatum* (PPE), foi realizada uma curva analítica de ácido gálico (Waterman and Mole 1994, Fernandes, Berretta et al. 2018). Todas as formulações e a solução padrão de ácido gálico foram preparadas em um balão volumétrico de 50 mL usando água como solvente. As formulações permaneceram em um banho ultrassônico por 30 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para outro balão de 50 mL, onde 2,5 mL de reagente Folin-Denis (Qhemis-High Purity, Hexis, São Paulo, Brasil) e 5,0 mL de 29% de carbonato de sódio (Cinética, São Paulo, Brazil) foram adicionados. As soluções foram protegidas da luz e as leituras foram realizadas após 30 min em um espectrofotômetro UV-Vis (EONC Espectrofotômetro do EONC, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 760 nm (de Oliveira, de Castro et al. 2013).

3.4 Determinação de flúor nas formulações para enxaguatório bucal

A concentração de F na solução foi determinada usando um eletrodo específico para o íon F (9609 BN; Orion Research Inc., Beverly, MA, USA) conectado a um analisador de íons (Orion 720 Aplus; Orion Research Inc., Beverly, MA, USA) e calibrado com padrões contendo 0,25 a 4,00 ppm F. Inicialmente, 1,0 mL de cada produto foi dissolvido em água deionizada e transferido para um balão volumétrico. O volume foi então ajustado para 100 mL usando água deionizada. Para cada produto, foram feitas 3 diluições. Posteriormente, 2 amostras de 1 mL foram tamponadas com tampão de ajuste de força iônica total (TISAB II) (Delbem, Sasaki et al. 2003). O pH

das soluções foi determinado com um eletrodo de pH (2A09E, Analyser, São Paulo, Brasil) que foi previamente calibrado com padrões 7,0 e 4,0 (Danelon, Takeshita et al. 2014).

3.5 Delineamento experimental

Blocos de esmalte (4×4 mm, $n = 84$) de incisivos bovinos foram armazenados em solução de formaldeído a 2% (pH 7,0) por 30 dias em temperatura ambiente. As superfícies de esmalte dos blocos foram em sequência polidas e selecionadas pela dureza superficial inicial (SHi) do total de blocos e do intervalo de confiança e, em seguida, randomizados (320,0 a 380,0 KHN) em 7 grupos ($n = 12$ por grupo), de acordo com tratamento proposto para cada formulação (Tabela 1).

Os blocos de esmalte foram submetidos a ciclagem de pH por cinco ciclos e tratados com cada formulação duas vezes ao dia por 1 minuto, totalizando sete dias. Em seguida, os blocos foram submetidos à análises para a determinação da concentração de flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte.

3.5.1 Processo de desmineralização (DES) e remineralização (RE) do esmalte

Os blocos de cada grupo foram submetidos a cinco ciclos de pH a 37°C durante um procedimento que durou sete dias (Vieira, Delbem et al. 2005). Os blocos foram imersos em uma solução DES (2,0 mmol / L de cálcio e fósforo em tampão acetato de 75 mmol/L, pH 4,7; 0,04 $\mu\text{g F/mL}$; 2,2 mL/ mm^2). Após 6 horas, os blocos foram transferidos para uma solução RE (1,5 mmol/L de cálcio, 0,9 mmol/L de fósforo e 150 mmol/L de KCl em tampão cacodílico 0,1 mol/L, pH 7,0; 0,05 mgF/mL; 1,1 mL/ mm^2) durante 18 horas. O regime de tratamento consistiu em 60 segundos de imersão em 1 mL/bloco em cada formulação para enxaguar sob agitação em um agitador rotatório (Mesa agitadora TE 141, Orbital. Tecnal Equipamentos, Piracicaba - SP, Brasil.), antes

que a solução mudasse de DES para RE e de RE para DES (duas vezes por dia). Lavagens com água deionizada foram realizadas entre todas as etapas. Nos últimos dois dias, os blocos foram mantidos em solução remineralizante.

3.6 Análise das concentrações de F, Ca e P no esmalte

Os blocos ($n = 12$ / por grupo, $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) foram obtidos a partir das metades das amostras originais de $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ não incorporadas e fixadas com cola adesiva em um mandril para disco de lixas. Discos de polimento autoadesivos (diâmetro 13 mm) e carboneto de silício de gramatura 400 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) foram fixados no fundo do tubo de poliestireno (J-10; Injeplast, São Paulo, SP, Brasil). Uma camada de $50,0 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{m}$ de cada bloco de esmalte foi removida. Os frascos, após a adição de 0,5 mL de HCl 1,0 mol/L, foram mantidos sob agitação constante por 1 hora (Weatherell, Robinson et al. 1985) com modificações de acordo com (Alves, Pessan et al. 2007). Para a análise de F, utilizou-se o eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyzer, São Paulo, Brasil) acoplados em um analisador de íons (Orion 720A +, Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA). Os eletrodos foram calibrados com padrões contendo de 0,25 a 4,00 μg F/mL (100 ppm F, Orion 940907), nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas com 0,25 mL da solução de biópsia, tamponada com o mesmo volume de TISAB II modificado com NaOH 1.0 mol/L (Akabane, Delbem et al. 2018). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. A análise de cálcio (Ca) foi realizada usando o método colorimétrico Arsenazo III (Vogel, Chow et al. 1983). As leituras de absorvância foram registradas a 650 nm usando um leitor de placas (PowerWave 340, Biotek, Winooski, VT, EUA). O fósforo (P) foi medido de acordo com (Fiske e

Subbarow 1925), e as leituras de absorvância foram registradas a 660 nm. Os resultados foram também expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

3.7 Análise estatística

Utilizou-se o programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, EUA) para a análise estatística, com um nível de confiança de 95%. Os testes foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), seguido da ANOVA de um critério e do teste de Student-Newman-Keuls ambos com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Totais fenólicos nas formulações para enxaguatório bucal

A Tabela 2 ilustra a média dos totais fenólicos, expressos em ácido gálico (mg / mg), encontrados em cada formulação contendo 3% de E (formulações ETF1, ETF2 e E), usando o teste colorimétrico de Folin-Denis. O conteúdo total de fenólicos (mg/g) em cada formulação contendo PPE foi muito semelhante (uma média de 11,54 mg/g) e correspondeu a 10% do extrato glicólico de romã produzido pelo método de extração descrito na seção 3.1.

4.2 Concentrações de F, Ca e P no esmalte

O pH médio de todas as soluções de enxaguatório bucal foi ajustado para 7,0. A média de dureza de superfície inicial para todos os blocos foi de 364,6 KHN (DP 9,8) ($p = 0,533$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após a alocação aleatória ($p = 0,474$). Quantidades semelhantes de F foram observadas para a solução F2, ETF2 e TF2 ($p > 0,001$). Com a solução F2, a concentração de Ca no esmalte aumentou em $\pm 30\%$ quando comparada à solução F1 ($p < 0,001$). Não foi observada diferença significativa entre as soluções F1, ETF1, ETF2 e TF2 em relação às concentrações de Ca no esmalte, exceto no placebo (P), que apresentou menor concentração ($p < 0,001$). As concentrações de fósforo no esmalte foram maiores para a solução F2 quando comparadas com a solução F1 = solução ETF1 = solução TF1 = solução ETF2 = solução TF2 ($p > 0,001$) e a solução P apresentou a menor concentração quando comparada às outras soluções ($p < 0,001$) (Tabela 3).

5. DISCUSSÃO

A cárie dental é considerada uma doença dieta-biofilme dependente, ou seja, para que essa doença ocorra é necessário haver acúmulo de biofilme sobre as superfícies dentais associadas a uma frequente ingestão de carboidratos fermentáveis (Pigozzi, Morawski 2016).

O processo cariioso ocorre quando há o desequilíbrio dinâmico entre os processos de remineralização e desmineralização da superfície do esmalte. Rica em íons, como cálcio e fosfato, a saliva tem um papel importante nesse processo, determinando que o valor do pH em que a desmineralização ocorre em 5,5, abaixo desse valor de referência, os ácidos produzidos pelos biofilmes orais podem atuar na estrutura do esmalte, o que pode levar a uma perda excessiva de minerais e consequente cavitação (Jyotika, Anil et al. 2019).

O principal achado deste estudo é que a associação de extrato da casca de romã com TMP e F não prejudicou a ação desses dois últimos compostos, que já possuem atividade bem estabelecida no processo anticárie (Favretto, Danelon et al. 2013, Takeshita, Danelon et al. 2015, Danelon, Pessan et al. 2017, Manarelli, Delbem et al. 2017, Akabane, Delbem et al. 2018, Emerenciano, Botazzo Delbem et al. 2018). Estudos mostram que o TMP pode ser adsorvido na superfície do esmalte, reduzindo a desmineralização, pois esse processo pode dificultar a difusão ácida e alterar a afinidade entre esmalte e as proteínas da saliva (Nordbo and Rolla 1972, Takeshita, Castro et al. 2009, Danelon, Takeshita et al. 2014, Cavazana, Hosida et al. 2019).

A ação da romã isolada e associada a esses ativos ainda não havia sido investigada. Embora a presença do extrato de romã não tenha elevado as concentrações de F, Ca e P no esmalte dental, também não promoveu um efeito negativo, pois poderia ocorrer uma diminuição desses compostos devido a uma interação com o extrato.

Assim, foi possível observar que essa associação poderia ser realizada, mantendo os níveis minerais, sem ocasionar a perda da ação do F e do TMP na dinâmica da desmineralização/remineralização do esmalte dentário.

Embora a literatura não mostre estudos avaliando a ação anti-cárie da romã, esse efeito é comprovado por vários outros extratos como: cacau, alcaçuz, própolis verde brasileira, folhas de chá, noz-moscada e etc., e esses estudos mostram que essa atividade está associada aos polifenóis presentes nos extratos (Onishi, Umemura et al. 2008, Zhang, Xue et al. 2009). A literatura mostra claramente como a romã é rica em polifenóis (como punicalagina, ácido gálico e elágico, entre outros) (Ismail, Sestili et al. 2012), e também cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio, encontrados principalmente na casca dessa fruta (Esawya, Ragaba et al. 2019). Zhang et al. (2009) avaliaram a ação do extrato de *Galla chinensis* na matriz de esmalte bovino submetida a desafios ácidos e reportaram que os polifenóis monoméricos e poliméricos interagem com essa matriz de esmalte orgânico (através de processos covalentes, iônicos, de ligação de hidrogênio ou hidrofóbicos) (Pierpoint 1969, Loomis 1974, Han, Jaurequi et al. 2003, Zhang, Xue et al. 2009) levando a um metamorfismo dessa matriz que precipitou e diminuiu a perda de íons na estrutura do esmalte. Outra ação possível é a ligação dos compostos presentes no extrato à superfície dos cristais do esmalte, impedindo sua desmineralização, além de facilitar a deposição de mais íons na superfície (através do transportador de íons) (Tian, Li et al. 2009, Kim and Jin 2018). Há também estudos mostrando que o ácido gálico (presente na romã) pode funcionar como transportador de íons cálcio, favorecendo o processo de remineralização (Cheng, Li et al. 2008). Estimula-se, portanto, estudos que busquem elucidar os mecanismos relacionados ao provável potencial anticárie de extratos obtidos da romã.

Dados ainda não publicados de nosso grupo de pesquisa mostraram que a adição do extrato da casca de romã à formulações contendo TMP e F reduziu o potencial desmineralizante no esmalte submetido a ciclagem de pH entre 35 a 46% quando comparadas com as formulações contendo apenas TPM e F. Além disso, existem muitos estudos que comprovam a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (Alkathiri, El-Khadragy et al. 2017, Vucic, Grabez et al. 2019, Baradaran Rahimi, Ghadiri et al. 2020) da *Punica granatum* que servem de estímulo para continuidade de estudos com extratos provenientes desta planta para o desenvolvimento de enxaguatórios bucais para combater não somente a cárie dental, mas outras doenças bucais como a gengivite e candidíase oral.

6. CONCLUSÃO

A adição de extrato da casca de romã (*Punica granatum*) à 3% em formulações para enxaguatório contendo TMP e F, manteve as concentrações de F, Ca e P no esmalte bovino em ensaios *in vitro* de ciclagem de pH, em especial quando foram tratados com formulações contendo as menores concentrações de TMP (0,2%) e F (100 ppm). Assim, cria-se uma perspectiva promissora para a criação de um produto comercial livre de álcool associando-se os benefícios já comprovados do TMP e F com os milenarmente reconhecidos da *Punica granatum*.

REFERÊNCIAS

- Akabane, S., A. C. Delbem, J. Pessan, L. Garcia, N. Emerenciano, D. F. Goncalves and M. Danelon (2018). "In situ effect of the combination of fluoridated toothpaste and fluoridated gel containing sodium trimetaphosphate on enamel demineralization." J Dent **68**: 59-65.
- Akca, A. E., G. Akca, F. T. Topcu, E. Macit, L. Pikdoken and I. S. Ozgen (2016). "The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study." Biomed Res Int **2016**: 3627463.
- Alkathiri, B., M. F. El-Khadragy, D. M. Metwally, E. M. Al-Olayan, M. A. Bakhrebah and A. E. Abdel Moneim (2017). "Pomegranate (*Punica granatum*) Juice Shows Antioxidant Activity against Cutaneous Leishmaniasis-Induced Oxidative Stress in Female BALB/c Mice." Int J Environ Res Public Health **14**(12).
- Alves, K. M., J. P. Pessan, F. L. Brighenti, K. S. Franco, F. A. Oliveira, M. A. Buzalaf, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2007). "In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices." Caries Res **41**(4): 263-267.
- Baradaran Rahimi, V., M. Ghadiri, M. Ramezani and V. R. Askari (2020). "Anti-inflammatory and anti-cancer activities of pomegranate and its constituent, ellagic acid: Evidence from cellular, animal, and clinical studies." Phytother Res.
- Batista, A. L., R. D. Lins, R. de Souza Coelho, D. do Nascimento Barbosa, N. Moura Belem and F. J. Alves Celestino (2014). "Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction." Complement Ther Clin Pract **20**(1): 93-98.
- Bhadbhade, S. J., A. B. Acharya, S. V. Rodrigues and S. L. Thakur (2011). "The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse." Quintessence Int **42**(1): 29-36.

Cavazana, T. P., T. Y. Hosida, J. P. Pessan, C. Sampaio, D. R. Monteiro and A. C. B. Delbem (2019). "Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms." Biofouling: 1-9.

Cheng, L., J. Li, Y. Hao and X. Zhou (2008). "Effect of compounds of *Galla chinensis* and their combined effects with fluoride on remineralization of initial enamel lesion in vitro." J Dent **36**(5): 369-373.

Cordeiro, C. H. G., Sacramento, L. V. S. D., Corrêa, M. A., Pizzolitto, A. C., & Bauab, T. M. (2006). "Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **42**(3), 395-404.

Dabholkar, C. S., M. Shah, R. Kathariya, M. Bajaj and Y. Doshi (2016). "Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Pomegranate-Containing Mouthwash Against Oral-Biofilm Forming Organisms: An Invitro Microbial Study." J Clin Diagn Res **10**(3): Zc65-69.

Danelon, M., J. P. Pessan, F. N. Souza-Neto, E. R. de Camargo and A. C. Delbem (2017). "Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study." Arch Oral Biol **78**: 82-87.

Danelon, M., E. M. Takeshita, L. C. Peixoto, K. T. Sasaki and A. C. B. Delbem (2014). "Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization." Clin Oral Investig **18**(4): 1119-1127.

de Oliveira, B., & Leite, M. F. (2020). "Prospecção Tecnológica Sobre Enxaguatório Bucal com Potencial Clareador". Cadernos de Prospecção, **13**(4), 1122.

de Oliveira, J. R., V. C. de Castro, P. das Gracas Figueiredo Vilela, S. E. Camargo, C. A. Carvalho, A. O. Jorge and L. D. de Oliveira (2013). "Cytotoxicity of Brazilian plant

extracts against oral microorganisms of interest to dentistry." BMC Complement Altern Med **13**: 208.

Delbem, A. C., K. T. Sasaki, A. M. Castro, L. M. Pinto and M. Bergamaschi (2003). "Assessment of the fluoride concentration and pH in different mouthrinses on the Brazilian market." J Appl Oral Sci **11**(4): 319-323.

Emerenciano, N. G., A. C. Botazzo Delbem, J. P. Pessan, G. P. Nunes, F. N. Souza Neto, E. R. de Camargo and M. Danelon (2018). "In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition." Arch Oral Biol **96**: 223-229.

Esawya, M. A., T. I. M. Ragaba, A. S. G. I Shalabya, M. Bashab and M. Emam (2019). "Evaluated bioactive component extracted from *Punica granatum* peel and its Ag NPs forms as mouthwash against dental plaque." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology **18**: 1-9.

Favretto, C. O., M. Danelon, F. C. Castilho, A. E. Vieira and A. C. Delbem (2013). "In vitro evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization." Caries Res **47**(5): 532-538.

Fernandes, R. A., A. A. Berretta, E. C. Torres, A. F. M. Buszinski, G. L. Fernandes, C. C. Mendes-Gouvea, F. N. de Souza-Neto, L. F. Gorup, E. R. de Camargo and D. B. Barbosa (2018). "Antimicrobial Potential and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Phytosynthesized by Pomegranate Peel Extract." Antibiotics (Basel) **7**(3).

Fiske, C. H. and Y. Subbarow (1925). "The colorimetric determination of phosphorus." J Biol Chem **66**: 375-400.

Folin, O. and W. Denis (1915). "A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine." Biol. Chem **22**: 305-308.

- Han, B., J. Jaurequi, B. W. Tang and M. E. Nimni (2003). "Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices." J Biomed Mater Res A **65**(1): 118-124.
- Ismail, T., P. Sestili and S. Akhtar (2012). "Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects." J Ethnopharmacol **143**(2): 397-405.
- Jyotika, S., G. Anil, S. Ankit and K. Shikha (2019). "Agents to Maintain Tooth Integrity: An Equilibrium between Remineralization and Demineralization-A Review." International Journal of Dental and Medical Specialty **6**(1): 9-14.
- Kim, E. J. and B. H. Jin (2018). "*Galla chinensis* extracts and calcium induce remineralization and antibacterial effects of enamel in a *Streptococcus mutans* biofilm model." Journal of Korean Academy of Oral Health **42**(3): 90-96.
- Loomis, W. D. (1974). "Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles." Methods Enzymol **31**: 528-544.
- Macedo, D. R. R. B. D., de Souza, H. T. N., & Guimarães, M. V. (2020). "Ação antimicrobiana e anti-inflamatória da *Punica granatum* L. (Romã) no tratamento da doença periodontal: Uma Revisão de Literatura". Revista Saúde-UNG-Ser. **14**(1/2), 51-58.
- Manarelli, M. M., A. C. B. Delbem, L. C. Baez-Quintero, F. R. N. de Moraes, R. F. Cunha and J. P. Pessan (2017). "Fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate reduce enamel demineralization in vitro." Acta Odontol Scand **75**(5): 376-378.
- Manarelli, M. M., A. E. Vieira, A. A. Matheus, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2011). "Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study." Caries Res **45**(6): 506-509.

- Matos, A., J. L. Garland and W. F. Fett (2002). "Composition and physiological profiling of sprout-associated microbial communities." J Food Prot **65**(12): 1903-1908.
- Matos, L. M., Oliveira, L. P., Serra, M. G. D., & Silva, M. L. (2016). "Efeito dos antissépticos com e sem álcool sobre a microbiota oral". Revista Interdisciplinar, **8**(4), 174-180.
- McGaughey, C. and E. C. Stowell (1977). "Effects of polyphosphates on the solubility and mineralization of HA: relevance to a rationale for anticaries activity." J Dent Res **56**(6): 579-587.
- Menezes, S. M., L. N. Cordeiro and G. S. Viana (2006). "Punica granatum (pomegranate) extract is active against dental plaque." J Herb Pharmacother **6**(2): 79-92.
- Moretto, M. J., A. C. Magalhaes, K. T. Sasaki, A. C. Delbem and C. C. Martinhon (2010). "Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion." Caries Res **44**(2): 135-140.
- Nordbo, H. and G. Rolla (1972). "Desorption of salivary proteins from hydroxyapatite by phytic acid and glycerophosphate and the plaque-inhibiting effect of the two compounds in vivo." J Dent Res **51**(3): 800-811.
- Onishi, T., S. Umemura, M. Yanagawa, M. Matsumura, Y. Sasaki, T. Ogasawara and T. Ooshima (2008). "Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions." Arch Oral Biol **53**(3): 257-260.
- Pierpoint, W. S. (1969). "o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides." Biochem J **112**(5): 609-616.
- Pigozzi, L. B., & Morawski, R. (2016). "Efeito antimicrobiano de dentifícios e enxaguatórios bucais sobre bactérias cariogênicas".

Takeshita, E. M., L. P. Castro, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2009). "In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate." Caries Res **43**(1): 50-56.

Takeshita, E. M., M. Danelon, L. P. Castro, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2015). "Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ." Caries Res **49**(4): 394-400.

Takeshita, E. M., R. A. Exterkate, A. C. Delbem and J. M. ten Cate (2011). "Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro." Caries Res **45**(5): 494-497.

Tian, F., B. Li, B. Ji, J. Yang, G. Zhang, Y. Chen and Y. Luo (2009). "Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities." Food Chemistry **113**(1): 173-179.

van Dijk, J. W., J. M. Borggreven and F. C. Driessens (1980). "The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel." Arch Oral Biol **25**(8-9): 591-595.

Vieira, A. E., A. C. Delbem, K. T. Sasaki, E. Rodrigues, J. A. Cury and R. F. Cunha (2005). "Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel." Caries Res **39**(6): 514-520.

Vogel, G. L., L. C. Chow and W. E. Brown (1983). "A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples." Caries Res **17**(1): 23-31.

Vucic, V., M. Grabez, A. Trchounian and A. Arsic (2019). "Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review." Curr Pharm Des **25**(16): 1817-1827.

Waterman, P. G. and S. Mole (1994). " Analysis of Phenolic Plant Metabolites." Blackwell Scientific: Oxford, UK; Boston, MA, USA.

Weatherell, J. A., C. Robinson, M. Strong and H. Nakagaki (1985). "Micro-sampling by abrasion." Caries Res **19**(2): 97-102.

Zhang, L., J. Xue, J. Li, L. Zou, Y. Hao, X. Zhou and W. Li (2009). "Effects of *Galla chinensis* on inhibition of demineralization of regular bovine enamel or enamel disposed of organic matrix." Arch Oral Biol **54**(9): 817-822.

TABELA 1- Grupos de formulações para enxaguatório bucal e seus constituintes (g).

| Componentes | Quantidade (g) | | | | | | |
|------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | P | F1 | TF1 | ETF1 | F2 | TF2 | ETF2 |
| Extrato glicólico da casca de romã | - | - | - | 10,40 | - | - | 10,40 |
| Estabilizante | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Conservante microbiológico | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Quelante | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Fluoreto de sódio | - | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| TMP | - | - | 0,20 | 0,20 | - | 0,30 | 0,30 |
| Edulcorante I | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,50 |
| Edulcorante II | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| Água purificada q.s.p | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

TABELA 2- Concentração de compostos fenólicos (mg/g) nas amostras.

| Amostras | Fenóis totais expressos em ácido gálico |
|---------------------------|---|
| | (média ± DP) |
| Extrato glicólico de romã | 114,98 ± 3,55 |
| Formulação ETF1 | 11,48 ± 0,22 |
| Formulação TF1 | 0,54 ± 0,07 |
| Formulação ETF2 | 11,59 ± 0,55 |
| Formulação TF2 | 0,53 ± 0,07 |
| Formulação P | 0,49 ± 0,06 |

TABELA 3- Concentração média e desvio padrão de F, Ca e P nas formulações para enxaguatório bucal.

| Formulações | F ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) | Ca ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) | P ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) |
|--------------------|---|--|---|
| P | 0,48 (0,21) ^a | 156,6 (33,1) ^a | 155,3 (33,6) ^a |
| F1 | 0,62 (0,37) ^b | 207,5 (63,7) ^b | 211,1 (75,4) ^b |
| TF1 | 0,66 (0,21) ^b | 212,3 (85,3) ^b | 227,0 (99,1) ^b |
| ETF1 | 0,73 (0,28) ^b | 218,1 (65,6) ^b | 224,5 (72,6) ^b |
| F2 | 1,19 (0,45) ^c | 269,4 (51,2) ^c | 281,1 (94,0) ^c |
| TF2 | 0,91 (0,48) ^c | 188,2 (28,4) ^b | 221,7 (79,1) ^b |
| ETF2 | 0,97 (0,32) ^c | 253,2 (71,9) ^d | 192,4 (73,0) ^b |

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada variável separadamente. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$).