

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 31/10/2024.

Ana Paula Miranda Vieira

**Adição de extrato da casca de romã em um
enxaguatório bucal com polifosfato-fluoreto reduz a
desmineralização do esmalte dentário**

*Tese apresentada 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 Doutora em Ciência
Odontológica – Área Biomateriais.*

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcelle Danelon

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Issa Hori



Ana Paula Miranda Vieira

**Adição de extrato da casca de romã em um
enxaguatório bucal com polifosfato-fluoreto reduz a
desmineralização do esmalte dentário**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V658a Vieira, Ana Paula Miranda.
Adição de extrato da casca de romã em um enxaguatório bucal com polifosfato-fluoreto reduz a desmineralização do esmalte dentário / Ana Paula Miranda Vieira. – Araçatuba, 2022
89 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Debora Barros Barbosa
Coorientadora: Profa. Marcele Danelon
Coorientadora: Profa. Juliana Issa Hori

1. Romã (Fruta) 2. Fosfatos 3. Fluoretos 4. Cárie dentária
5. Desmineralização do dente 6. Embrião de galinha 7. Antissépticos bucais I. T.

Black D15
CDD 617.695

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados curriculares

ANA PAULA MIRANDA VIEIRA

Nascimento	08/03/1993 Ilha Solteira - SP
Filiação	Luiz Carlos Vieira Maria Lucia Miranda Mendes
2011/2015	Curso de graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2016/2018	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – área Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2018/2022	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – área Biomateriais, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com período sanduíche na Universidade de Lisboa (2021/2022)
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR - International Association for Dental Research

Comissão examinadora

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Dr^a. Laís Salomão Arias: Doutora em Ciência Odontológica, Área de Saúde Bucal da Criança, pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

Prof^a. Dr^a. Sónia Carina Morais da Silva: Professora Doutora do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho – Braga, Portugal.

Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto: Professor Assistente Doutor do Departamento de Ciências Básicas, Disciplina de Bioquímica, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

Dr^a. Andresa Aparecida Berretta e Silva: Doutora em Ciências Farmacêuticas, Área de Fármacos e Medicamentos, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Prof^a. Dr^a. Debora Barros Barbosa: Professora Assistente Doutora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Disciplina de Prótese Total, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

Dedicatória

À minha mãe Maria Lucia Miranda Mendes

Dedico essa tese a maior amiga que a vida me deu, que desistiu de seus próprios sonhos para viver os meus, gostaria de agradecer ao esforço incessante que fez para que eu pudesse exclusivamente estudar, essa conquista é sua!

À minha avó Carolina Cavaton Miranda (in memoriam)

Minha saudade eterna

Agradecimentos especiais

A Deus

“Porque dele, e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36)

À minha família

Por estarem amorosamente perto, mesmo que fisicamente distantes. Agradeço, em especial, aos meus tios Aparecida Ramirez e Nelson Ramirez pelo apoio ao longo da minha jornada.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Debora Barros Barbosa

Por ter me recebido de braços abertos quando perguntei se poderia me orientar. Sou extremamente grata por todo conhecimento compartilhado, e não digo só conhecimento acadêmico, pois a “prof” não se limita a ensinar somente aquilo que é exigido a nível educacional. Compartilhou comigo conhecimentos para a “vida”, me aproximou mais de Deus com sua fé inabalável e me ajudou a ser um ser humano melhor. Obrigada por tudo.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Marcelle Danelon

Eu sempre digo: “a Marcelle é uma das pessoas mais bondosas que eu conheci em minha vida”. Você tem o dom de ensinar tudo com amor e paciência, te admiro muito e tenho orgulho de ter sido sua coorientada, obrigada por essa oportunidade.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Juliana Issa

E ao seu orientado Mikhael, por toda colaboração no projeto, por me ensinaram novos conceitos e metodologias em uma área que eu não dominava.

Ao meu coorientador no exterior Prof. Dr. Nuno Gonçalo Pereira Mira

Que não hesitou em me receber em seu laboratório, mesmo com todos os empecilhos provocados pela pandemia. Obrigada por ter sido extremamente compreensivo durante todo meu doutorado sanduíche, por ter me incluído em seus projetos e em seu grupo de pesquisa.

Aos voluntários dessa pesquisa

Por terem aceitado essa missão penosa, agradeço a todos vocês que participaram dessa difícil tarefa em nome da ciência, sem vocês nada disso seria possível.

À Gabriela Lopes Fernandes e família

Por ter me convidado para trabalhar junto com você no projeto em que estava executando com a professora Debora e que originou essa tese. Obrigada pela nossa amizade, por ter me ajudado durante o momento em que mais precisei me acolhendo em sua casa com seus pais.

Eu ganhei uma irmã e uma mãe postiça. Obrigada Lucia e Cassapa por terem me tratado como uma filha, agradeço a Deus por ter colocado vocês em meu caminho.

A todos os meus amigos

Eu sou tão abençoada, a pós-graduação me permitiu conhecer pessoas maravilhosas. Laís Arias, Nayara Emerenciano, Francienne Gonçalves, Priscila Toledo, Gabriel Nunes, Igor Zen, Leonardo de Moraes e Mayra Frasson obrigada por toda ajuda durante esses anos, sinto saudades da nossa convivência diária.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu diretor Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), a todos seus docentes e discentes.

Ao Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora e ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial ao Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Jânder de Carvalho Inácio, e a todos os professores, funcionários e pós-graduandos.

À Diretoria Técnica Acadêmica e a Seção Técnica de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Sayuri Mada Pinheiro, Cristiane Regina Lui Matos e Eduardo Moure Cícero.

À Faculdade de Ciências e Letras - Câmpus de Assis – UNESP, em especial, a Prof^ª. Dr^ª. Lucinéia dos Santos.

À empresa Apis Flora Ltda, e sua farmacêutica responsável Dr^ª. Andresa Aparecida Berretta e Silva.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento na forma de bolsa de doutorado (Processo 2018/06582-5).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento na forma de bolsa de doutorado sanduíche (Programa Institucional de Internacionalização – Edital nº 41/2017, Processo nº 88887.570096/2020-00), código financeiro 001.

Ao Instituto Superior Técnico e a Universidade de Lisboa, em especial ao Instituto de Bioengenharia e Biociências e ao Prof. Dr. Nuno Gonçalo Pereira Mira.

Muito obrigada!

*“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual
encontro mais uma vez Deus, o autor dela”*

Albert Einstein

Vieira, A. P. M. **Adição de extrato da casca de romã em um enxaguatório bucal com polifosfato-fluoreto reduz a desmineralização do esmalte dentário.** 2022 89f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2022.

Objetivos: Avaliar o efeito anti-desmineralizante de um enxaguatório bucal com extrato de casca de romã (3% PPE), trimetafosfato de sódio (0,3% TMP) e flúor (225 ppm F) em um estudo *in situ* e determinar seu potencial de irritação em um estudo *ex vivo*.

Métodos: Este estudo foi duplo-cego cruzado e realizado em quatro fases com 7 dias cada. Doze voluntários utilizaram dispositivos orais contendo blocos de esmalte bovino que foram submetidos a desafios cariogênicos com sacarose (30%) seis vezes ao dia. A formulação ETF (PPE+TMP+F), formulação TF (TMP+F), água deionizada e um enxaguatório comercial (CM) foram gotejados nos blocos de esmalte duas vezes ao dia. Em seguida, determinou-se a porcentagem de perda de dureza superficial (%SH), perda integrada de dureza subsuperficial (Δ KHN), bem como cálcio (Ca), fósforo (P) e fluoreto (F) no esmalte e nos biofilmes. Além disso, as concentrações de polissacarídeos extracelulares solúveis (EPS) foram analisadas a partir do biofilme coletado dos blocos. O potencial de irritação dos enxaguatórios foi avaliado pelo teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha através do efeito vascular produzido durante 300 s de exposição.

Resultados: A formulação ETF promoveu os melhores resultados para %SH e Δ KHN entre todos os grupos ($p < 0,001$), apresentou a maior concentração de Ca e P no esmalte e no biofilme, e a menor quantidade de EPS no biofilme ($p < 0,001$). ETF produziu leve rubor, enquanto CM levou a hiperemia e hemorragia nos ovos.

Significado: A adição de PEE na formulação para enxaguatório sem álcool contendo TMP e F aumentou sua propriedade anti-desmineralizante, e esta formulação apresentou menor potencial de irritação quando comparada ao CM testado.

Palavras-chave: Romã; Fosfatos; Fluoretos; Cárie dentária; Desmineralização do dente; Embrião de galinha; Antissépticos bucais.

Abstract

Vieira, A. P. M. **Addition of pomegranate peel extract in a mouthwash with polyphosphate-fluoride reduces the tooth enamel demineralization.** 2022 89f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2022.

Objectives: This study evaluated the anti-demineralizing effect of a mouthwash comprising pomegranate peel extract (PPE 3%), sodium trimetaphosphate (TMP 0.3%), and fluoride (F 225 ppm) in an *in situ* study and assessed its irritation potential in an *ex vivo* study.

Methods: This double-blind crossover study was conducted in four phases with 7 days each. Twelve volunteers used palatal appliances containing bovine enamel blocks that were subjected to cariogenic challenges with sucrose (30%) six times daily. The ETF formulation (PPE+TMP+F), TF formulation (TMP+F), deionized water, and commercial mouthwash (CM) were dropped onto the enamel blocks twice daily. The percentage of surface hardness loss (%SH), integrated loss of subsurface hardness (Δ KHN), calcium (Ca), phosphorus (P), and F in enamel and biofilms were determined. In addition, alkali-soluble extracellular polysaccharide (EPS) concentrations were analyzed in the biofilms collected from the blocks. The irritation potential of the mouthwashes was evaluated using the hen's egg chorioallantoic membrane test through the vascular effect produced during 300 s of exposure.

Results: The ETF formulation presented the best results for %SH and Δ KHN among all groups ($p < 0.001$), showed the highest concentrations of Ca and P in the enamel and biofilm, and the lowest amount of EPS in the biofilm ($p < 0.001$). The ETF produced light reddening, whereas CM led to hyperemia and hemorrhage in the eggs.

Significance: The addition of PPE to alcohol-free mouthwash formulations containing TMP and F increased its anti-demineralizing property, and this formulation presented a lower irritation potential than the CM tested.

Keywords: Pomegranate; Phosphates; Fluorides; Dental Caries; Tooth Demineralization; Chick Embryo; Mouthwashes.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURE 1** Experimental design of the study. 46
- FIGURE 2** Representative images: **(Egg)** Fertilized chicken egg showing the chorioallantoic membrane. Sequence of photographs illustrating the macroscopic changes on the chorioallantoic membrane vasculature after administration of solutions for 300 s: **(NaOH)** sodium hydroxide 0.1N; **(DDS)** sodium dodecyl sulfate 1%; **(NaCl)** sodium chloride 0.9%; **(N)** formulation without pomegranate peel extract (PPE), sodium trimetaphosphate (TMP) and fluoride (F); **(E)** formulation with 0.3% PPE; **(TF)** formulation with 0.3% TMP and 225 ppm F; **(ETF)** formulation with 0.3% PPE, 0.3% TMP and 225 ppm F; **(CM)** commercial mouthwash of essential oil. 47

LISTA DE TABELAS

TABLE 1	Grading of vascular reactions (hyperemia, hemorrhage, and coagulation) in the chorioallantoic membrane of the embryonated egg chicken in the HET-CAM test.	48
TABLE 2	Mean (SD) initial surface hardness loss (SHi), percentage of surface hardness loss (%SH), integrated loss of subsurface hardness (Δ KHN), fluoride, calcium, and phosphorus concentration in enamel and biofilm according to the different treatments.	49

SUMÁRIO

TITLE PAGE	22
ABSTRACT	23
INTRODUCTION	24
MATERIALS AND METHODS	25
RESULTS	30
DISCUSSION	31
CONCLUSION	35
REFERENCES	35
FIGURE AND TABLES CAPTIONS	45
SUPPLEMENTARY MATERIAL	50
 ANEXOS	 51

- [4] Cheng L, Zhang L, Yue L, Ling J, Fan M, Yang D, et al. Expert consensus on dental caries management. *Int J Oral Sci.* 2022;14:17.
- [5] Wen PYF, Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM. Global Burden and Inequality of Dental Caries, 1990 to 2019. *J Dent Res.* 2021;101:392-9.
- [6] Duggal MS, Toumba KJ, Amaechi BT, Kowash MB, Higham SM. Enamel demineralization *in situ* with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *J Dent Res.* 2001;80:1721-4.
- [7] Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res.* 2019;53:284-95.
- [8] Favretto CO, Danelon M, Castilho FC, Vieira AE, Delbem AC. *In vitro* evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. *Caries Res.* 2013;47:532-8.
- [9] Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An *in vitro* study. *Arch Oral Biol.* 2017;78:82-7.
- [10] Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sassaki KT, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig.* 2014;18:1119-27.
- [11] de Castro LP, Delbem AC, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C. *In vitro* effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 2015;19:1683-7.
- [12] Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sassaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization *in situ*. *Caries Res.* 2015;49:394-400.
- [13] Souza MDB, Pessan JP, Lodi CS, Souza JAS, Camargo ER, Souza Neto FN, et al. Toothpaste with Nanosized Trimetaphosphate Reduces Enamel Demineralization. *JDR Clin Trans Res.* 2016;2:233-40.

- [14] Emerenciano NG, Botazzo Delbem AC, Pessan JP, Nunes GP, Souza Neto FN, de Camargo ER, et al. *In situ* effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol.* 2018;96:223-9.
- [15] Tafazoli A, Tafazoli Moghadam E. *Camellia Sinensis* Mouthwashes in Oral Care: a Systematic Review. *J Dent. (Shiraz).* 2020;21:249-62.
- [16] Palmas L, Aroffu M, Petretto GL, Escribano-Ferrer E, Díez-Sales O, Usach I, et al. Entrapment of *Citrus limon var. pompia* Essential Oil or Pure Citral in Liposomes Tailored as Mouthwash for the Treatment of Oral Cavity Diseases. *Pharmaceuticals.* 2020;13:216.
- [17] Wassel MO, Sherief DI. Ion release and enamel remineralizing potential of miswak, propolis and chitosan nano-particles based dental varnishes. *Pediatr Dent J.* 2019;29:1-10.
- [18] Philip N, Leishman SJ, Bandara HMHN, Healey DL, Walsh LJ. Randomized Controlled Study to Evaluate Microbial Ecological Effects of CPP-ACP and Cranberry on Dental Plaque. *JDR Clin Trans Res.* 2019;5:118-26.
- [19] Hong SJ, Jeong SS, Song KB. Effects of sanguinaria in fluoride-containing dentifrices on the remineralisation of subsurface carious lesion *in vitro*. *Int Dent J.* 2005;55:128-32.
- [20] Ruan J-H, Li J, Adili G, Sun G-Y, Abuduaini M, Abdulla R, et al. Phenolic Compounds and Bioactivities from Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peels. *J Agric Food Chem.* 2022;70:3678-86.
- [21] Toledo-Merma PR, Cornejo-Figueroa MH, Crisosto-Fuster AdR, Strieder MM, Chañi-Paucar LO, Náthia-Neves G, et al. Phenolic Compounds Recovery from Pomegranate (*Punica granatum L.*) By-Products of Pressurized Liquid Extraction. *Foods.* 2022;11:1070.
- [22] Gullón P, Astray G, Gullón B, Tomasevic I, Lorenzo JM. Pomegranate Peel as Suitable Source of High-Added Value Bioactives: Tailored Functionalized Meat Products. *Molecules.* 2020;25:2859.
- [23] Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum L.*) peel: A review. *Food Chem.* 2018;261:75-86.

- [24] Gözlekçi S, Saraçoğlu O, Onursal E, Ozgen M. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacogn Mag.* 2011;7:161-4.
- [25] Fernandes GL, Vieira APM, Danelon M, Emerenciano NG, Berretta AA, Buszinski AFM, Hori JI, Lima MHFd, Reis TFd, Lima JAd, Delbem ACB, Silva SCMd, Barbosa DB. Pomegranate Extract Potentiates the Anti-Demineralizing, Anti-Biofilm, and Anti-Inflammatory Actions of Non-Alcoholic Mouthwash When Associated with Sodium-Fluoride Trimetaphosphate. *Antibiotics.* 2022; 11(11):1477.
- [26] Garcia LSG, Delbem ACB, Pessan JP, Dos Passos Silva M, Neto FNS, Gorup LF, et al. Anticaries effect of toothpaste with nano-sized sodium hexametaphosphate. *Clin Oral Investig.* 2019;23:3535-42.
- [27] do Amaral JG, Sassaki KT, Martinhon CC, Delbem AC. Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization *in situ*. *Am J Dent.* 2013;26:75-80.
- [28] Danelon M, Garcia LG, Pessan JP, Passarinho A, Camargo ER, Delbem ACB. Effect of Fluoride Toothpaste Containing Nano-Sized Sodium Hexametaphosphate on Enamel Remineralization: An *in situ* Study. *Caries Res.* 2019;53:260-7.
- [29] Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an *in vitro* and *in situ* study. *Caries Res.* 2009;43:302-7.
- [30] Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res.* 2005;39:123-9.
- [31] Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res.* 2002;36:347-52.

- [32] Marcato RA, Garbelini CCD, Danelon M, Pessan JP, Emerenciano NG, Ishikawa AdS, et al. *In situ* evaluation of 200 ppm fluoride toothpaste content trimetaphosphate, xylitol and erythritol on enamel demineralization and dental biofilm. *J Dent*. 2021;111:103724.
- [33] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28:350-6.
- [34] Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H. Micro-sampling by abrasion. *Caries Res*. 1985;19:97-102.
- [35] Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, et al. *In vitro* evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res*. 2007;41:263-7.
- [36] Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res*. 1983;17:23-31.
- [37] Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem*. 1925;66:375-400.
- [38] Française R. Arrêté du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques. 26 décembre 1996;300:19137-8.
- [39] Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol*. 1985;23:287-91.
- [40] ICCVAM. 2010. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No. 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.
- [41] Radzki D, Wilhelm-Węglarz M, Pruska K, Kusiak A, Ordyniec-Kwaśnica I. A Fresh Look at Mouthwashes-What Is Inside and What Is It For? *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19.
- [42] Kim Y-R, Nam S-H. A randomized, placebo-controlled clinical trial evaluating of a mouthwash containing *Sambucus williamsii* var. *coreana* extract for prevention of gingivitis. *Sci Rep*. 2022;12:11250.

- [43] Vergara-Buenaventura A, Castro-Ruiz C. Use of mouthwashes against COVID-19 in dentistry. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2020;58:924-7.
- [44] Carr E, Aslam-Pervez B. Does the use of alcohol mouthwash increase the risk of developing oral cancer? *Evid Based Dent*. 2022;23:28-9.
- [45] Gulube Z, Patel M. Effect of *Punica granatum* on the virulence factors of cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*. *Microb Pathog*. 2016;98:45-9.
- [46] Pandit S, Jung JE, Choi HM, Jeon JG. Effect of brief periodic fluoride treatments on the virulence and composition of a cariogenic biofilm. *Biofouling*. 2018;34:53-61.
- [47] Cavazana TP, Hosida TY, Pessan JP, Sampaio C, Monteiro DR, Delbem ACB. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. *Biofouling*. 2019;35:710-8.
- [48] Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. *In vitro* evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res*. 2009;43:50-6.
- [49] Forcin LV, Oliveira TS, Tomaz PL, Matochek MH, Polassi MR, Vilhena FV, et al. Enamel remineralization and surface roughness after treatment with herbal-containing toothpastes. *J Clin Exp Dent*. 2021;13:e849-e58.
- [50] Xie L, Roto AV, Bolling BW. Characterization of ellagitannins, gallotannins, and bound proanthocyanidins from California almond (*Prunus dulcis*) varieties. *J Agric Food Chem*. 2012;60:12151-6.
- [51] Xiang Q, Li M, Wen J, Ren F, Yang Z, Jiang X, et al. The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: A review. *J Food Biochem*. 2022;46:e14105.
- [52] Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Camargo ER, Delbem ACB. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. *Arch Oral Biol*. 2018;90:108-12.
- [53] Coceska E, Gjorgievska E, Coleman NJ, Gabric D, Slipper IJ, Stevanovic M, et al. Enamel alteration following tooth bleaching and remineralization. *J Microsc*. 2016;262:232-44.

- [54] Mirkarimi M, Eskandarion S, Bargrizan M, Delazar A, Kharazifard MJ. Remineralization of artificial caries in primary teeth by grape seed extract: an *in vitro* study. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2013;7:206-10.
- [55] Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. *In vitro* remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. J Dent. 2008;36:900-6.
- [56] Nagi SM, Hassan SN, Abd El-Alim SH, Elmissiry MM. Remineralization potential of grape seed extract hydrogels on bleached enamel compared to fluoride gel: An *in vitro* study. J Clin Exp Dent. 2019;11:e401-e7.
- [57] Cheng L, Li J, Hao Y, Zhou X. Effect of compounds of *Galla chinensis* and their combined effects with fluoride on remineralization of initial enamel lesion *in vitro*. J Dent. 2008;36:369-73.
- [58] Ginsburg I, Koren E, Shalish M, Kanner J, Kohen R. Saliva increases the availability of lipophilic polyphenols as antioxidants and enhances their retention in the oral cavity. Arch Oral Biol. 2012;57:1327-34.
- [59] Ginsburg I, Kohen R, Koren E. Microbial and host cells acquire enhanced oxidant-scavenging abilities by binding polyphenols. Arch Biochem Biophys. 2011;506:12-23.
- [60] Ginsburg I, Kohen R, Shalish M, Varon D, Shai E, Koren E. The oxidant-scavenging abilities in the oral cavity may be regulated by a collaboration among antioxidants in saliva, microorganisms, blood cells and polyphenols: a chemiluminescence-based study. PLoS One. 2013;8:e63062.
- [61] Jacob B, Malli Sureshababu N, Ranjan M, Ranganath A, Siddique R. The Antimicrobial Effect of Pomegranate Peel Extract versus Chlorhexidine in High Caries Risk Individuals Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Randomized Triple-Blind Controlled Clinical Trial. Int J Dent. 2021;2021:5563945.
- [62] Silva MS, García-Estévez I, Brandão E, Mateus N, de Freitas V, Soares S. Molecular Interaction Between Salivary Proteins and Food Tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2017;65:6415-24.

- [63] Baumann T, Bereiter R, Lussi A, Carvalho TS. The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Scientific reports*. 2017;7:12999.
- [64] Yu D, Sipos T, Wu MM, Naleway C. Remineralization potential of an anticaries/antigingivitis mouthrinse. *Am J Dent*. 2005;18:361-4.
- [65] Sun FC, Engelman EE, McGuire JA, Kosmoski G, Carratello L, Ricci-Nittel D, et al. Impact of an Anticaries Mouthrinse on *In Vitro* Remineralization and Microbial Control. *Int J Dent*. 2014;2014:982071.
- [66] Vlachojannis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine® Products: An Update on the Efficacy and Safety. *Phytother Res*. 2016;30:367-73.
- [67] Fraguas-Sánchez AI, Martín-Sabroso C, Torres-Suárez AI. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Model: A Research Approach for *Ex Vivo* and *In Vivo* Experiments. *Curr Med Chem*. 2022;29:1702-17.
- [68] Palmeira-de-Oliveira R, Monteiro Machado R, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. *Altex*. 2018;35:495-503.
- [69] Dahl JE. Potential of dental adhesives to induce mucosal irritation evaluated by the HET-CAM method. *Acta Odont Scand*. 2007;65:275-83.
- [70] Lönnroth E-C, Dahl J, Shahnava H. Evaluating the Potential Occupational Hazard of Handling Dental Polymer Products Using the HET-CAM Technique. *Int J Occup Saf Ergon*. 1999;5:43-57.
- [71] Coelho CC, Grenho L, Gomes PS, Quadros PA, Fernandes MH. Nano-hydroxyapatite in oral care cosmetics: characterization and cytotoxicity assessment. *Sci Rep*. 2019;9:11050.
- [72] Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chem*. 2015;174:417-25.
- [73] Lanigan RS. Final Report on the Safety Assessment of Sodium Metaphosphate, Sodium Trimetaphosphate, and Sodium Hexametaphosphate. *Int J Toxicol*. 2001;20:75-89.