



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Michele Russo Luciano

**Enxaguatório bucal contendo extrato da casca de romã
(*Punica granatum*), trimetafosfato de sódio e flúor:
avaliação de seu potencial anticariogênico**

Araçatuba – SP
2020

Michele Russo Luciano

**Enxaguatório bucal contendo extrato da casca de romã
(*Punica granatum*), trimetafosfato de sódio e flúor:
avaliação de seu potencial anticariogênico**

*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*

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Vera e Roque, que sempre acreditaram no meu potencial e contribuíram com essa conquista. Obrigada por fazerem o possível e o impossível por mim e tornarem meu sonho realidade.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

*Na pessoa de seu diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.*

À Prof^a. Dr^a. Debora Barros Barbosa

Pela atenção e apoio durante a iniciação científica que muito me ensinou contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Às minhas amigas de faculdade

Pela amizade durante esses anos, por toda ajuda e convivência e por todos os momentos que estiveram ao meu lado me apoiando, em especial à Mariana que foi minha dupla da faculdade.

Às queridas Pós-graduandas Ana Paula e Gabriela

Por toda orientação e apoio durante os anos de pesquisa, contribuindo em grande parte pelo meu crescimento pessoal e científico.

Aos pacientes

Que confiaram em nós para que executássemos com responsabilidade o que aprendemos e por serem fonte de nosso conhecimento e aperfeiçoamento prático.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

Muito obrigada!

Επίγραφε

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.”

O pequeno Príncipe

LUCIANO, M. R. Enxaguatório bucal contendo extrato da casca de romã (*Punica granatum*), trimetafosfato de sódio e flúor: avaliação de seu potencial anticariogênico. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2020.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo associar o extrato de casca de *Punica granatum* (romã) (PPE) ao trimetafosfato de sódio (TMP) e fluoreto (F) em formulações para uso como enxaguatório bucal, e avaliar sua eficácia na redução do processo de desmineralização do esmalte dental. 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 farmacopeicas por calorimetria de Folin Denis. Blocos de esmalte bovino (4 mm × 4 mm) selecionados por dureza superficial inicial (SH_i) foram alocados aleatoriamente de acordo com grupos de tratamentos de formulação (n = 12 / grupo): ETF1 (3,0% PPE + 0,2% TMP + 100ppm F), TF1 (0,2% TMP + 100 ppmF), ETF2 (3,0% PPE + 0,3% TMP + 225ppm F), TF2 (0,3% TMP + 225 ppm F), F1 (100 ppmF), F2 (225 ppmF) e P (formulação sem E/T/F, água deionizada - placebo). Os blocos foram tratados 2x/dia com cada formulação durante 1 minuto e submetidos a cinco ciclos de pH (soluções desmineralizantes / remineralizantes) a 37° C. A seguir, foram determinadas a dureza superficial final (SH_f) e a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN). A porcentagem de perda de dureza superficial (% SH) foi calculada com a fórmula ($\% SH = [(SH_f - SH_i) / SH_i] \times 100$). A desmineralização da superfície do esmalte foi menor nas amostras tratadas com a formulação ETF2, resultando em uma diminuição de 46% na % SH em comparação com a F2, e uma redução de 35% na % SH ao comparar o TF2 e o ETF2 (p <0,001). Com relação a perda integrada de subsuperfície (ΔKHN) foi maior (~ 26%) com ETF2 em relação a F2 e TF2. Conclui-se que a adição de PPE (3,0%) em formulações para enxaguatórios bucais contendo TMP (0,3%) e F (225ppm) promoveu uma diminuição considerável da perda mineral sem perda de esmalte dental. Assim, cria-se uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de um produto comercial dental sem álcool, podendo ser uma alternativa de tratamento para paciente em risco e com atividade de cárie e com benefícios à saúde já reconhecidos milenarmente da *Punica granatum*.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Polifosfatos. Desmineralização. Esmalte dental. Fluoreto.

LUCIANO, M. R. Mouthwash containing pomegranate peel extract (*Punica granatum*), sodium trimetaphosphate and fluoride: evaluation of its anticariogenic potential. 2020. Completion of course work (Graduation in Dentistry) - School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba 2020.

ABSTRACT

The present study aimed to associate *Punica granatum* (pomegranate) peel extract (PPE) with sodium trimetaphosphate (TMP), and fluoride (F) in formulations for being used as mouthwash, and evaluate its efficacy on reducing dental enamel demineralization. The pomegranate peel extract was obtained by alcoholic process through the process of maceration and filtration, which was standardized in % solids and subjected to pharmacopoeic 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% PPE + 0.2% TMP + 100 ppmF), TF1 (0.2% TMP + 100 ppmF), ETF2 (3.0% PPE + 0.3% TMP + 225 ppmF), TF2 (0.3% TMP + 225ppm F), F1 (100 ppmF), F2 (225 ppmF), and P (formulation without E/T/F, deionized water- placebo). The blocks were treated 2×/day with each formulation per 1 minute and submitted to five pH cycles (demineralizing/remineralizing solutions) at 37°C. Next, final surface hardness (SHf) and integrated loss subsurface hardness (Δ KHN) were determined. The percentage of surface hardness loss (%SH) was calculated with the following formula $\%SH = [(SHf - SHi)/SHi] \times 100$. Demineralization of the enamel surface was lower in samples treated with formulation ETF2, resulting in a 46% decrease in % SH in comparison with F2, and a 35% reduction in % SH when comparing TF2 and ETF2 ($p < 0.001$). Regarding the integrated loss of subsurface (Δ KHN) was higher (~ 26%) with ETF2 in relation to F2 and TF2. It is concluded that the addition of PPE (3%) in mouthwashes containing TMP (0.3) and F (225ppm) promoted a considerably decrease in the mineral loss of dental enamel. Thus creates a promising prospect for the development of an alcohol free dental commercial product with can be an alternative treatment for patients at risk and with caries activity and with health benefits that have been recognized for thousands of years by *Punica granatum*.

Keywords: *Punica granatum*. Polyphosphates. Desmineralization. Dental Enamel. Fluoride.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Grupos de formulações para enxaguatório bucal e seus constituintes (g)	29
TABELA 2 -	Concentração de compostos fenólicos (mg / mg) nas amostras	29
TABELA 3 -	Média (DP) das variáveis analisadas de acordo com o tratamento das formulações para enxaguatório bucal	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
	MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1	Obtenção e caracterização do extrato da casca da romã.....	14
2.2	Preparo das formulações para enxaguatório bucal.....	14
2.3	Quantificação de totais fenólicos	14
2.4	Determinação de flúor nas soluções.....	15
2.4.1	Projeto experimental- ciclagem de pH (DES>RE) e tratamentos.....	15
2.4.2	Soluções experimentais.....	16
2.4.3	Determinação da dureza do esmalte	16
2.5	Análise estatística.....	16
3	RESULTADOS	18
3.1	Totais Fenólicos nas formulações para enxaguatório bucal	18
3.2	Dureza da superfície do esmalte	18
4	DISCUSSÃO	20
	AGRADECIMENTOS.....	22
5	REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é a doença oral polimicrobiana mais comum no mundo (PHILIP; WALSH, 2019) e, embora o conhecimento sobre cárie tenha aumentado, pesquisadores e dentistas ainda lutam por melhores alternativas para a prevenção e tratamento dessa doença (CHENG et al., 2015). A boca possui uma flora polimicrobiana composta por bactérias e leveduras que desempenham papel importante na fermentação do açúcar em ácidos que levam à desmineralização do esmalte. Os principais microrganismos envolvidos nesse processo são *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Candida sp* (ARIFA; EPHRAIM; RAJAMANI, 2019; EMERENCIANO et al., 2018; HEMANI; GHEENAS 2018; TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

O principal modo de impedir o desenvolvimento e a progressão da cárie dentária é a escovação, uso do fio dental e de enxaguatórios bucais (AMERICAN ACADEMY ON PEDIATRIC DENTISTRY, 2018; MEGALAA et al., 2018; PINNI et al., 2018). Os enxaguatórios bucais tem vantagens como fácil aplicação, ação antimicrobiana e anti-inflamatória em regiões menos acessíveis para escova e fio dental, além de ser uma fonte tópica de flúor (FAVRETTO et al., 2013, MEGALAA et al., 2018). Estudos mostraram a eficácia da solução de fluoreto de sódio (NaF) a 0,02% (CHEDID; CURY 2004, DELBEM et al., 2006, FAVRETTO et al., 2013) e, para melhorar ainda mais sua eficácia, esta solução deve ser acidificada (DELBEM et al., 2006) ou suplementada com fosfatos (FAVRETTO et al., 2013). Provou-se que a adição de trimetafosfato de sódio (TMP) pode otimizar a capacidade do flúor (F) de reduzir a desmineralização do esmalte, essa ação estaria relacionada à capacidade desse fosfato de se ligar à superfície dental, alterando a permeabilidade de íons cálcio e fosfato (FAVRETTO et al., 2013; MANARELLI et al., 2011; MORETTO et al., 2010; TAKESHITA et al., 2009, 2011).

Nesse sentido, a natureza possui uma enorme fonte vegetal com propriedades medicinais, incluindo a *Punica granatum*. Considerada "uma farmácia em si mesma," essa fruta apresenta propriedades importantes como efeito antimicrobiano, anti-inflamatório, adstringente e ação antioxidante, sem efeito tóxico significativo (AHUJA et al., 2011; KUKREJA; DODWAD, 2012). A *Punica granatum* tem sido relatada como benéfica na redução da dor recorrente na estomatite aftosa e no tempo de cicatrização completo (GHALAYANI et al.,

2013), como auxílio preventivo e terapêutico à doença periodontal (HAJIMAHMOODI et al., 2011; PRASAD; KUNNAIAH 2014) e por apresentar atividade antifúngica contra *Candida sp.* (ENDO et al., 2010). As plantas podem usar várias estratégias para lidar com os microrganismos que vão se desenvolvendo ao longo do tempo (ABREU et al., 2017). Por esse motivo, os metabólitos secundários representam uma grande biblioteca de compostos que podem potencializar os efeitos de antibióticos conhecidos e podem ser fontes importantes de novos medicamentos ou compostos adequados para outras modificações (LU et al., 2017). Os principais compostos químicos presentes na *Punica granatum* são: ácido eicosanóico, conjugado linolênico, alfa linolênico, oleico, palmítico, púnico, esteárico, cítrico e ácido málico, compostos fenólicos como gálico, ácido cumárico, catequina, cloridizina e quercetina, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ferúlico (AHMADIANKIA, 2019). De acordo com Al Obaidi, Muhsin e Ibrahim (2017), ácido elágico, elagitaninos (incluindo punicalagina), ácido púnico, flavonóides, antocianidinas, antocianinas e flavonóis e flavonóides estrogênicos são os compostos com maior atividade terapêutica.

Apesar das propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias da *Punica granatum* serem conhecidas na literatura, sua ação no processo de desmineralização dental quando associado a TMP e F ainda precisava ser investigada. Considerando os riscos à saúde causados pelo uso prolongado de produtos químicos nos enxaguatórios bucais convencionais como por exemplo a clorexidina, que como efeitos adversos podem causar manchamentos na superfície dentária, gosto metálico na boca, sensação de queimação, perda do paladar, descamação da mucosa e reações alérgicas (ALMEIDA; BASTOS, 2001; ZANATTA; ROSING, 2007), os benefícios dos compostos bioativos presentes nas plantas na prevenção de doenças bucais e dentárias, bem como o notável aumento do interesse da população no uso de fitoterápicos, o presente estudo teve como objetivo a associação do extrato de casca de *Punica granatum* (romã) (PPE) ao trimetafosfato de sódio (TMP) e fluoreto (F) em formulações para uso como enxaguatório bucal, e avaliar sua eficácia na redução do processo de desmineralização do esmalte dental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 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 certificados das agências reguladoras ANVISA, CETESB, IBAMA e FDA, além de análises farmacopéicas e microbiológicas. De acordo com as características da casca da romã, foi utilizada a técnica da maceração para o processo de extração. Etanol 70% GL (70° GL) foi utilizado na proporção de 1:3 por 24 horas. Esta mistura foi filtrada a vácuo, separando o extrato bruto e a borra. Nessa borra, o etanol 70° GL foi adicionado novamente e realizada a maceração. Esse processo foi repetido 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 com teor de sólidos (secagem em estufa), onde foi padronizado em % de sólidos (30,1%).

2.2 Preparo das formulações para enxaguatório bucal

As formulações foram padronizadas de acordo com seu princípio ativo em: 3% de PPE (E), 0,2 ou 0,3% de trimetafosfato de sódio (TMP), 100 ou 225 ppm de flúor (F) (FAVRETTO, DANELON et al., 2013), além destes, também foram utilizados agentes estabilizantes, conservantes microbiológicos, quelantes, adoçantes, umectantes e água e todas as formulações tiveram seu pH ajustado para 7,0 (Tabela 1). Formulações ETF1 (3% PPE + 0,2% TMP + 100 ppm F), TF1 (0,2% TMP + 100 ppm F), ETF2 (3% PPE + 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 E/T/F, água deionizada – placebo) foram submetidos a um teste de ciclagem de pH.

2.3 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 (FERNANDES et al., 2018; WATERMAN; MOLE 1994). 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 a 760 nm (OLIVEIRA et al., 2013).

2.4 Determinação de flúor nas soluções

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 et al., 2003). O pH das soluções foi determinado com um eletrodo de pH (2A09E, Analyser, São Paulo, Brazil) que foi calibrado com padrões de 7,0 e 4,0 (DANELON et al., 2014).

2.4.1 Projeto experimental - ciclagem de pH (DES>RE) e tratamentos

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 por um teste de 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) (Figura 1): formulação contendo 3,0% de PPE + 0,2% de TMP + 100 ppm de F (ETF1), 0,2% de TMP + 100 ppm de

F (TF1) 3,0% de PPE + 0,3% de TMP + 225 ppm de F (ETF2), 0,3% de TMP + 225 ppm de F (TF2)), 100 ppm de F (F1), 225 ppm de F (F2) e formulação sem F / TMP / PPE (P) (Tabela 1). Os blocos de esmalte foram submetidos a ciclagem de pH por cinco ciclos e tratados com cada formulação duas vezes ao dia (1 minuto), totalizando sete dias. Depois disso, determinaram-se nos blocos a dureza superficial final (SHf), a porcentagem de perda de dureza superficial (%SH), e a perda integrada de dureza subsuperficial (Δ KHN).

2.4.2 Soluções experimentais

Os blocos de cada grupo foram submetidos a cinco ciclos de pH a 37 ° C durante um procedimento que durou sete dias (VIEIRA et al., 2005). Os blocos foram imersos em uma solução desmineralizante (DE: 2,0 mmol / L de cálcio e fosfato em tampão acetato de 75 mmol / L, pH 4,7; 0,04 μ g F / mL; 2,2 mL / mm²). Após 6 horas, os blocos foram transferidos para uma solução remineralizante (RE: 1,5 mmol / L de cálcio, 0,9 mmol / L de fosfato e 150 mmol / L de KCl em tampão cacodílico 0,1 mol / L, pH 7,0; 0,05 mg F / mL; 1,1 mL / mm²) durante 18 horas. Foram realizadas lavagens com água deionizada entre cada etapa. O regime de tratamento consistiu em 60 segundos de imersão em 1 mL / bloco de soluções sob agitação em um agitador rotatório, antes que a solução mudasse de DE (desmineralizante) para RE (remineralizante) e de RE para DE (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.

2.4.3 Determinação da dureza do esmalte

A dureza da superfície do esmalte foi determinada usando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, sob carga de 25 gramas por 10 segundos. Foram realizadas cinco impressões iniciais de 100 μ m na região central do esmalte para a determinação inicial da dureza da superfície (SHi). Após a ciclagem do pH, a dureza superficial final (SHf) foi calculada produzindo cinco outras impressões (100 μ m de distância em relação às impressões iniciais). A porcentagem de perda de dureza superficial (% SH) foi calculada usando a seguinte fórmula: % SH = [(SHf - SHi) / SHi] x 100. Para a análise da perda integrada de subsuperfície,

foi feita uma secção no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Utilizou-se microdurômetro Micromet 5114 (Buehler, Lake Bluff, USA) e software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA) sob carga de 5 g por 10 s. Uma sequência de 14 impressões a distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μm da superfície externa do esmalte foram realizadas na área central do esmalte dos blocos (SPIGUEL et al., 2009). A área de dureza integrada (KHN x μm) da lesão ao esmalte duro será calculada usando a regra trapezoidal (Graph Pad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo-se a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN)

2.5 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em pelo menos três dias independentes. O programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, EUA) foi empregado para a análise estatística com um nível de confiança de 95%. Os testes foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a análise de variância (ANOVA- 1 via) foi aplicada aos dados ΔKHN seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$).

3 RESULTADOS

3.1 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 PPE (formulações de ETF1, ETF2 e E) usando o teste colorimétrico de Folin-Denis (FERNANDES et al., 2018; WATERMAN; MOLE 1994). O conteúdo de totais fenólicos (mg/g) em cada formulação contendo PPE foram semelhantes (média de 11,54 mg/g) e correspondeu a 10% do extrato glicólico de romã produzido pelo método de extração descrito na seção 2.1.

3.2 Dureza da superfície do esmalte

A média de SHi de todos os blocos foi de 364,6 (DP 9,8) KHN ($p = 0,533$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após a alocação aleatória ($p = 0,474$). O uso da solução F2 (225F) resultou em uma queda de 13% na % SH em comparação com a solução F1 (100F) (Tabela 3). A desmineralização da superfície do esmalte foi menor nas amostras tratadas com as soluções ETF2, resultando em uma diminuição de 46% na % SH em comparação com a solução F2 ($p < 0,001$), e uma redução de 35% na % SH ao comparar o TF2 e o ETF2 ($p < 0,001$). Com relação a perda integrada de subsuperfície (Δ KHN) ela foi maior (~26%) com a solução ETF2 ($p > 0,001$) quando comparada à solução F2 ($p < 0,001$) seguida por F2 = solução ETF1 = solução TF2 > solução ETF1 > solução F1 > solução P ($p < 0,001$) (tabela 3).

4 DISCUSSÃO

A cárie dentária é conhecida por ser uma doença multifatorial, que acontece pela interação de diversos fatores como por exemplo uma dieta cariogênica, presença de biofilme na cavidade bucal, ausência de fluoretação das águas de abastecimento e má higienização bucal. Ela é causada pela falta de equilíbrio 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 na ausência do flúor, determinando que o valor do pH em que a desmineralização ocorre é de 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 et al., 2019). O modelo de ciclagem de pH envolve a exposição de substratos (esmalte ou dentina) a combinações de experimentos de desmineralização e remineralização, projetados para a dinâmica de perda e ganho de minerais envolvidos no processo da cárie dentária. Devido a essas vantagens fundamentais, os modelos de ciclagem de pH colaboram para melhorar a compreensão do processo de cárie e os possíveis mecanismos pelos quais F, TMP e PPE exercem o efeito anti-cárie.

O principal achado deste estudo é que a associação de PPE (3%) com TMP (0,3%) e F (225 ppm) (ETF2) resultou em uma diminuição de 46% na % SH em comparação com a formulação contendo apenas 225 ppm de F (F2) e uma redução de 35% na % SH ao comparar o TF2 e o ETF2, a saber, a presença do extrato de casca de romã em associação com TMP e F reduz a perda de minerais na superfície do esmalte. A ação do TMP e do flúor no processo anti-cárie já está bem estabelecida (AKABANE et al., 2018; DANELON et al., 2017; EMERENCIANO et al., 2018; FAVRETTO et al., 2013; MANARELLI et al., 2017; TAKESHITA et al., 2015). 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 (CAVAZANA et al., 2019; DANELON et al., 2014; NORDBO; ROLLA, 1972; TAKESHITA et al., 2009), além disso o trimetafosfato de sódio (TMP) tem se mostrado eficaz como agente cariostático, ao ser adicionado à vernizes, dentifrícios e enxaguatórios bucais levando a uma redução significativa da perda mineral do esmalte (TAKESHITA et al., 2009, 2015; DANELON et al., 2013, 2014; MANARELLI et al., 2015). O TMP é um polifosfato cíclico condensado e, de acordo com a literatura, preserva a estabilidade e integridade da superfície do mineral do esmalte (GONZALES, 1971). No

entanto, a ação da romã isolada e associada a esses ingredientes ativos ainda não havia sido muito bem investigada.

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 et al., 2008, ZHANG et al., 2009). A literatura mostra claramente como a romã é rica em polifenóis (como punicalagina, ácido gálico e elágico, entre outros) (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012), e também cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio, encontrados principalmente na casca dessa fruta (ESAWYA 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 relataram que os polifenóis monoméricos e poliméricos interagem com essa matriz de esmalte orgânico (através de processos covalentes, iônicos, de ligação de hidrogênio ou hidrofóbicos) (HAN et al., 2003; LOOMIS, 1974; PIERPOINT, 1969; ZHANG 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 cálcio) (KIM; JIN, 2018; TIAN et al., 2009). Há também estudos mostrando que o ácido gálico (presente na romã) pode funcionar como transportador de íons cálcio, favorecendo o processo de remineralização (CHENG et al., 2008).

Embora os efeitos benéficos da *Punica granatum* no processo de desmineralização e remineralização do esmalte dental ainda não tenham sido avaliados na literatura, existem muitos estudos que comprovam sua atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (ALKATHIRI et al., 2017; BARADARAN RAHIMI et al., 2020; VUČIĆ et al., 2019) que são compatíveis com nossos resultados.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a adição de PPE (3,0%) em formulações para enxaguatório bucal contendo TMP (0,3) e F (225ppm) promoveu uma diminuição considerável da perda mineral do esmalte dental. Assim, cria-se uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de um produto comercial dental sem álcool, podendo ser uma alternativa de tratamento para paciente em risco e com atividade de cárie e com benefícios à saúde já reconhecidos milenarmente da *Punica granatum*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos o desenvolvimento e a análise das formulações de enxaguatório bucal pela Apis Flora Indl. Coml. Ltda. e pelo uso de suas instalações.

REFERÊNCIAS

- Abreu AC, Coqueiro A, Sultan AR, Lemmens N, Kim HK, Verpoorte R, van Wamel WJB, Simoes M, Choi YH. Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA. *Sci Rep*. 2017;7(1):3777.
- Ahmadiankia N. Molecular targets of pomegranate (*Punica granatum*) in preventing cancer metastasis. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(9):977-88.
- Ahuja S, Dodwad V, Kukreja BJ, Mehra P, Kukreja P. A comparative evaluation of efficacy of *Punica granatum* and chlorhexidine on plaque and gingivitis. *J Int. Clin Dent Res Org*. 2011;3(1):29-32.
- Akabane S, Delbem AC, Pessan J, Garcia L, Emerenciano N, Gonçalves DF, Danelon M. In situ effect of the combination of fluoridated toothpaste and fluoridated gel containing sodium trimetaphosphate on enamel demineralization. *J Dent*. 2018;68:59-65.
- ALMEIDA, B. S.; BASTOS, J. R. M. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. *RGO*, v. 49, n. 3, p. 133-8, 2001.
- Al-Obaidi DM, Muhsin SA, Ibrahim AA. In vivo antimicrobial inhibition of *punica granatum* extracts as mouthwash. *Russian Open Med J*. 2017;6(4):1-5.
- Alkathiri B, El-Khadragy MF, Metwally DM, Al-Olayan EM, Bakhrebah MA, Abdel Moneim AE. Pomegranate (*Punica granatum*) Juice Shows Antioxidant Activity against Cutaneous Leishmaniasis-Induced Oxidative Stress in Female BALB/c Mice. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(12):1592.
- Arifa MK, Ephraim R, Rajamani T. Recent advances in dental hard tissue remineralization: a review of literature. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2019;12(2):139-44.
- Baradaran Rahimi V, Ghadiri M, Ramezani M, Askari VR. Antiinflammatory and anti-cancer activities of pomegranate and its constituent, ellagic acid: Evidence from cellular, animal, and clinical studies. *Phytother Res*. 2020;34(4):685-720.

Cavazana TP, Hosida TY, Pessan JP, Sampaio C, Monteiro DR, Delbem ACB. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. *Biofouling*. 2019;35(6):710-8.

Chedid SJ, Cury JA. Effect of 0.02% NaF solution on enamel demineralization and fluoride uptake by deciduous teeth in vitro. *Braz Oral Res*. 2004;18(1):18-22.

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(5):369-73.

Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural products and caries prevention. *Caries Res*. 2015;49 Suppl 1:38-45.

Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2017;78:82-87.

Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig*. 2014;18(4):1119-27.

Delbem AC, Sasaki KT, Castro AM, Pinto LM, Bergamaschi M. Assesment of the fluoride concentration and pH in different mouthrinses on the brazilian market. *J Appl Oral Sci*. 2003;11(4):319-23.

Delbem AC, Tiano GC, Alves KM, Cunha RF. Anticariogenic potencial of acidulate solutions with low fluoride concentration. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(4):233-7.

American Academy on Pediatric Dentistry. Policy on use of fluoride. *Oral Health Policies*. 2018;40(6):49-50.

Emerenciano NG, Delbem ACB, Pessan JP, Nunes GP, Souza Neto FN, Camargo ER, Danelon M. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol*. 2018;96:223-29.

Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol*. 2010;161(7):534-40.

Esawya MA, Ragaba TIM, Shalabya ASG, Bashab M, Emam, M. Evaluated bioactive component extracted from *Punica granatum* peel and its Ag NPs forms as mouthwash against dental plaque. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;18:1-9.

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(5):532-8.

Fernandes RA, Berretta AA, Torres EC, Buszinski AFM, Fernandes GL, Mendes-Gouvêa CC, Souza-Neto FN, Gorup LF, Camargo ER, Barbosa DB. Antimicrobial potential and cytotoxicity of silver nanoparticles phytosynthesized by pomegranate peel extract. *antibiotics*. 2018;7(3):51.

Folin O, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Biol Chem*. 1915;22:305-8.

Ghalayani P, Zolfaghary B, Farhad AR, Tavangar A, Soleymani B. The efficacy of *Punica granatum* extract in the management of recurrent aphthous stomatitis. *J Res Pharm Pract*. 2013;2(2):88-92.

Gonzalez M. Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. *J Dent Res* 1971; 50: 1056-1064.

Hajimahmoodi M, Shams-Ardakani M, Saniee P, Siavoshi F, Mehrabani M, Hosseinzadeh H, Foroumadi P, Safavi M, Khanavi M, Akbarzadeh T, Shafiee A, Foroumadi A. In vitro antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Nat Prod Res*. 2011;25(11):1059-66.

Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(1):118-24.

Hemani K, Gheenass S. Evaluation of antimicrobial property of extract of *Punica granatum* (L.) on oral pathogens. *Int J Pharma Bio Sci*. 2018;8(3):35-40.

Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(2):397-405.

Jyotika S, Anil G, Ankit S, Shikha K. Agents to maintain tooth integrity: an equilibrium between remineralization and demineralization-a review. *Int J Dent Med Spec.* 2019;6(1):9-14.

Kim EJ, Jin BH. Galla chinensis extracts and calcium induce remineralization and antibacterial effects of enamel in a *Streptococcus mutans* biofilm model. *J Kor Acad Oral Health.* 2018;42(3):90-6.

Kukreja BJ, Dodwad V. Herbal mouthwhases: a gift of nature. *Int J Pharma Bio Sci.* 2012;3(2):46-52.

Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* 1974;31:528-44.

Manarelli MM, Delbem ACB, Báez-Quintero LC, Moraes FRN, Cunha RF, Pessan JP. Fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate reduce enamel demineralization in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2017;75(5):376-8.

Manarelli MM, Vieira AE, Matheus AA, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. *Caries Res.* 2011;45(6):506-9.

Megalaa N, Thirumurugan K, Kayalvizhi G, Sajeev R, Kayalvizhi EB, Ramesh V, Vargeese A. A comparative evaluation of the anticaries efficacy of herbal extracts (Tulsi and Black myrobalans) and sodium fluoride as mouthrinses in children: a randomized controlled trial. *Indian J Dent Res.* 2018;29(6):760-7.

Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem AC, Martinhon CC. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res.* 2010;44(2):135-40.

Navia JM, Henry CA: Longitudinal study of cariostatic effects of sodium trimetaphosphate and sodium fluoride when fed separately and together in diets of rats. *J Dent Res* 1969; 48:183-191.

Nordbö H, Rölla G. 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.* 1972;51(3):800-11.

Oliveira JR, Castro VC, Vilela PGF, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, Oliveira LD. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:208.

Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, Matsumura M, Sasaki Y, Ogasawara T, Ooshima T. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Arch Oral Biol.* 2008;53(3):257-60.

Philip N, Walsh LJ. Cranberry polyphenols: natural weapons against dental caries. *Dent J.* 2019;7(1):20.

Pierpoint WS. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem J.* 1969;112(5):609-16.

Pinni J, Sakar Avula JS, Mukthineni S, Bandi S, Gokul T. Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica Granatum*) pericarp extract against *Streptococcus Mutans*: a source for natural mouth rinse: an in-vitro and in-vivo study. *Biomed Pharmacol J.* 2018;11(4):2025-30.

Prasad D, Kunnaiah R. *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2014;18(4):428-32.

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(4):302-7.

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

Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res.* 2009;43(1):50-6.

Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki 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(4):394-400.

Takeshita EM, Exterkate RA, Delbem AC, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. *Caries Res.* 2011;45(5):494-7.

Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Chen Y, Luo Y. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chem.* 2009;113(1):173-9.

Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005;39(6):514-20.

Vučić V, Grabež M, Trchounian A, Arsić A. Composition and potential health benefits of pomegranate: a review. *Curr Pharm Des.* 2019;25(16):1817-27.

Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. Boston: Blackwell Scientific; 1994.

Zhang L, Xue J, Li J, Zou L, Hao Y, Zhou X, Li W. Effects of *Galla chinensis* on inhibition of demineralization of regular bovine enamel or enamel disposed of organic matrix. *Arch Oral Biol.* 2009;54(9):817-22.

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

Constituintes	Formulação para enxaguatório						
	ETF1	TF2	ETF2	TF2	F1	F2	P
Extrato da casca de romã (PPE)	10,40	-	10,40	-	-	-	-
Estabilizantes	0,50	0,50	0,50	0,50	0,5	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 (F)	0,02	0,02	0,05	0,05	0,02	0,05	-
Trimetafosfato de sódio (TMP)	0,20	0,20	0,30	0,30	-	-	-
Edulcorante	7,50	7,50	7,50	7,50	7,5	7,50	7,50
Umectante	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Água purificada q.s.	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 - Média (DP) das variáveis analisadas de acordo com o tratamento das formulações para enxaguatório bucal

Formulação	%SH (KHN)	ΔKHN (KHN \times μm)
P	-87,4 ^a (3,2)	6734,9 ^a (1217,9)
F1	-73,4 ^b (4,5)	5046,4 ^b (778,5)
F2	-64,1 ^c (5,0)	3810,1 ^c (842,2)
ETF1	-51,7 ^d (7,1)	3710,7 ^c (973,0)
TF1	-60,5 ^e (8,1)	4510,2 ^d (621,9)
ETF2	-34,5 ^f (4,4)	2814,2 ^e (975,3)
TF2	-53,1 ^d (5,0)	3878,1 ^c (853,8)

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