UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Odontologia Restauradora
Subárea: Dentística

Tese de Doutorado

Uso do extrato de romã (*Punica granatum L.*) na superfície dentinária erodida: Ação antioxidante, resistência de união e análise morfológica da interface adesiva após envelhecimento

Pós-graduando:

Thiago Vinícius Cortez
Aluno de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Orientadora:

Profa. Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel
Professora Associada do Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Ribeirão Preto
2022

THIAGO VINICIUS CORTEZ

Uso do extrato de romã (*Punica granatum L.*) na superfície dentinária erodida: Ação antioxidante, resistência de união e análise morfológica da interface adesiva após envelhecimento

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências junto ao Programa de Odontologia Restauradora com Área de Concentração em Dentística.

Orientadora: Profª Drª Aline Evangelista de Souza Gabriel

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Assinatura do autor: _____ Data: ___/___/2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Cortez, Thiago Vinicius.

Uso do extrato de romã (*Punica granatum L.*) na superfície dentinária erodida: Ação antioxidante, resistência de união e análise morfológica da interface adesiva após envelhecimento.

Thiago Vinicius Cortez. Ribeirão Preto, 2022.

94p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista de Souza Gabriel

1. Romã, extrato natural, adesão, antioxidante, erosão dental.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CORTEZ, Thiago Vinicius. Uso do extrato de romã (*Punica granatum L.*) na superfície dentinária erodida: Ação antioxidante, resistência de união e análise morfológica da interface adesiva após envelhecimento

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora. Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Dentística).

Aprovado em: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof.(a).Dr.(a).:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof.(a).Dr.(a).:_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof.(a).Dr.(a).:_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nas dependências da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no Departamento de Odontologia Restauradora e no Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Auxílio CNPq (Categoria doutorado – GD) Processo nº 140877/2019-3.

Dedicatória

Ao precioso ***Deus***, que olha por todos, que alegra o coração de todos, independentemente do momento, para aqueles que andam em seus caminhos, traz perseverança, acolhe de braços abertos e dá razões para viver com sabedoria e juízo.

Aos meus pais, ***Luciana Ap. Ortiz Cortez*** e ***José Renato Cortez,*** meus exemplos, minha base, pelo zelo que sempre tiveram por mim, pela paciência e o amor que nunca me foi negado. O amor que sinto por vocês não cabe em palavras. Sou eternamente grato por tudo!

A meu irmão, ***Pedro Vinicius Cortez,*** pelo amor incomparável e admiração que demonstra por mim, sempre sorridente e de bom humor, por me alegrar mesmo nos dias difíceis. Amo-te muito meu irmão, sempre estarei ao seu lado.

Aos meus queridos avós, ***Joaquim Ortiz*** e ***Neiva Heck,*** pela companhia, compaixão, e exemplo de vida e todo carinho que demonstram por mim. Vocês são muitos especiais e sempre terão um espaço reservado em meu coração.

A minha amada esposa, ***Flávia Aparecida de Menezes Cortez*** e minha querida sogra ***Maria Socorro de Menezes Faustino,*** pelo companheirismo e amor. Sou eternamente grato à Deus por nossos destinos terem se cruzado. Amo muito vocês!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, representada pelo seu diretor ***Prof. Dr. Paulo Nelson Filho,*** por possibilitar o desenvolvimento deste estudo e de todas as etapas da minha formação acadêmica. Ao ***Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva,*** vice-diretor da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP e docente do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, agradeço pelas contribuições durante a qualificação desse projeto, pela amizade e confiança em mim depositada.

À ***Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista de Souza Gabriel***, por me apresentar o meio acadêmico e à pesquisa científica, por todo carinho, paciência, dedicação e compartilhamento de seu conhecimento. Agradeço pela orientação, desde a iniciação científica, pelos sábios conselhos e ensinamentos que me foram transmitidos durante todos esses anos, pela convivência, confiança em mim depositada e por sempre me receber de braços abertos em todos os momentos que necessitei. Sou imensamente grato por todo seu auxílio na realização deste projeto. Obrigado, por incentivar, apoiar, acalmar e orientar. Você foi de extrema importância para meu crescimento pessoal e profissional. Sempre a terei como exemplo a ser seguido, obrigado por tudo que fez por mim durante esses dez anos, levarei lembranças dessa jornada comigo para sempre em meu coração.

Ao ***Prof. Dr. Manoel Damião de Souza Neto,*** chefe do Departamento de Odontologia Restauradora. Agradeço a amizade, confiança em meu trabalho e oportunidades a mim concedidas. Agradeço também pelos ensinamentos voltados à Endodontia que foram transmitidos de modo multidisciplinar durante o período de minha formação, contribuindo de sobremaneira para meu crescimento.

Ao ***Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho,*** coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, agradeço pelas oportunidades a mim concedidas e por ter me acolhido no Programa para a realização dos meus estudos.

A ***Prof.ª Dr.ª Silmara Aparecida Milori Corona,*** por todo aprendizado, motivação, dedicação, atenção, carinho, seus conhecimentos foram de fundamental importância para a realização deste projeto, por passar um pouco do seu conhecimento pessoal e profissional. Obrigado por me incentivar na realização de atendimentos clínicos, sou eternamente grato por todas oportunidades e ensinamentos transmitidos, certamente os levarei para o resto de minha vida.

Ao ***Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira,*** docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela importante contribuição a este projeto durante as análises da ação antioxidante das soluções. Agradeço pela disponibilidade e pelo aprendizado.

Ao ***Prof. Dr. Cláudio de Souza Miranda,*** docente da Faculdade de Economia e Administração de Ribeirão Preto -USP, pela contribuição na análise estatística deste projeto.

Aos demais ***professores do Departamento de Odontologia Restauradora*** pelo grande exemplo, empenho e dedicação ao demonstrarem o quanto pode ser encantadora a carreira acadêmica.

Aos todos os ***professores da FORP-USP*** por serem a minha base de formação profissional, serei sempre grato por tudo o que aprendi com vocês.

Aos amigos professores, ***Prof. Dr. Fernando Mandarino e Prof. Dr. Tomio Nonaka "****eternamente presente em nossos pensamentos****", Prof. Dr. Luis Henrique de Camargo Thomé, Prof.ª Dr.ª Regina Guenka Palma Dibb, Prof.ª Dr.ª Mônica de Campos Serra, Prof.ª Dr.ª Silmara Aparecida Milori Corona e Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista Souza Gabriel*** por serem meus professores em Dentística durante a graduação por acreditarem em mim e me mostrarem a verdadeira arte e essência da Dentística Restauradora. Meus sinceros agradecimentos.

A doutoranda ***Julia Gallas*** pela colaboração, pelos conhecimentos transmitidos a respeito do extrato de romã, por todo suporte e apoio. Sua contribuição enriqueceu este trabalho, obrigado minha amiga!

A aluna de iniciação científica e graduanda da FORP/USP ***Isabela Licursi***, grande amiga e parceira que ajudou nos estudos iniciais desta pesquisa.

Aos amigos da pós-graduação, ***Ana Laura, Ariane Fernandes, Barbara Jobim, Bruna Moreira, Bruna Abreu, Daniel, Isabella Quero, Fabio Augusto, Fillipe Mendes, Laís Peloso, Leonardo Lobo, Luiza Gotardo, Mirian Saavedra, Rafael Camargo, Reinaldo Dias, Renato Reis, Shelyn Yamakami, Thaís Fillus, Thaís Oliveira, Thamires Lima e Vitória Paschoini,*** pela companhia, amizade durante essa etapa.

Aos meus queridos amigos de graduação em ***Odontologia da FORP-USP, Amanda Martins, Flávia Cunha, Gabriela Queiroz, Laís Makrakis e Lucas Teixeira*** pela amizade de longa data, companhia, pela presença em minha vida.

Aos técnicos de Laboratório ***Débora Fernandes Costa Guedes***, ***Patrícia Marchi e Reginaldo Santana***, por sua companhia diária dando força e estímulo todos os dias, pela atenção dispensada e eficiência em rodas as oportunidades que tiveram para me ajudar.

As funcionárias ***Maria Amália Oliveira, Maria Isabel, Rosângela Angelini,*** e funcionários, ***Fred Augusto*** e ***Carlos Feitosa*** agradeço por sempre me receberem bem e pelo auxílio e suporte prestados quando necessário, pelo companheirismo e amizade que tive alegria de conquistar.

Ao secretário da pós-graduação ***Mauro Henrique Leoni Bernardo,*** pela paciência e atenção, por tirar minhas dúvidas e conselhos sempre com um sorriso no rosto.

A todos que participantes desta pesquisa pela cooperação, empenho e preocupação dispendidas a este trabalho.

Ao ***CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,*** pelo auxílio financeiro.

“Tudo posso naquele que me fortalece, Jesus!”

(Filipenses 4:13)

Resumo

CORTEZ, T.V. **Uso do extrato de romã (*Punica granatum L.*) na superfície dentinária erodida: Ação antioxidante, resistência de união e análise morfológica da interface adesiva após envelhecimento**

O pré-tratamento do substrato dentinário erodido com substâncias antioxidantes vêm sendo estudado a fim de torná-lo mais receptivo aos procedimentos adesivos, além de diminuir a degradação da interface adesiva. Este trabalho avaliou o efeito do extrato de romã (*P. granatum*) na dentina bovina erodida. Avaliou-se a ação antioxidante, a resistência de união (RU) ao cisalhamento e morfologia da interface por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após envelhecimento. Preparou-se o extrato hidroalcóolico da casca da romã a 10% pelo método da liofilização. A evidenciação do polifenol punicalagina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada pela captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) em 515 nm. Para a RU, utilizou-se 96 fragmentos de dentina bovina, que foram planificados e divididos em hígido ou erodido (2h, ácido cítrico 0,3%), e subdivididos de acordo com o pré-tratamento (n=12): água destilada ou extrato de *P. granatum*. Os espécimes foram restaurados com adesivo autocondicionante de um passo (DMG) e resina bulk fill (DMG), utilizando matriz de teflon bipartida. A avaliação da RU foi feita em dois tempos, imediata (24h após protocolo restaurador) e após 12 meses de envelhecimento térmico-hidrolítico (12.000 ciclos), em máquina universal de ensaios. As falhas foram analisadas em lupa estereoscópica com 40x aumento. Para a MEV, 24 fragmentos de dentina e 24 de dentina erodida receberam os mesmos tratamentos da RU (n=6), em seguida, os espécimes foram preparados e metalizados e realizou-se as análises imediata (24h) e após 12 meses. Os dados de RU foram analisados por ANOVA a 3 critérios (α=0,05) e falhas pelo teste Qui-quadrado. O extrato da romã apresentou melhor potencial antioxidante que o padrão controle (IC50=3,5). A dentina erodida apresentou menor RU que a hígida (p=0,000). Na análise imediata, os espécimes tratados com *P. granatum* mostraram RU sem diferença do controle (p>0,05). Após o envelhecimento, os espécimes tratados com *P. granatum* apresentaram maior RU que o controle. Na MEV, a dentina erodida apresentou desmineralização peritubular e, nos grupos tratados com *P. granatum*, observou-se camada híbrida com *tags*. Conclui-se que o extrato experimental da casca de romã apresentou ação antioxidante, e preservou a interface adesiva da dentina erodida.

Palavras-chave: Romã, extrato natural, adesão, antioxidante, erosão dental.

Abstract

CORTEZ, T.V **The use of pomegranate extract (*Punica granatum L.*) on eroded dentin surface: Antioxidant action, bond strength and morphological analysis of the adhesive interface after aging**

The pre-treatment of eroded dentin with antioxidant substances has been studied to make the surface more receptive to adhesive procedures and to decrease the degradation of the adhesive interface. This study evaluated the effect of pomegranate extract (*P. granatum*) on bovine eroded dentin. Antioxidant action, shear bond strength (SBS) and interface morphology were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) after interface aging. The 10% hydroalcoholic extract of the pomegranate peel was prepared by the lyophilization method. The evidence of punicalagin polyphenol was confirmed by high-performance liquid chromatography. Antioxidant activity was evaluated by capturing the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical at 515 nm. For the SBS, 96 bovine dentin fragments were sectioned, flattened, and divided into sound or eroded (2h, 0.3% citric acid); and subdivided according to the pre-treatment (n=12): distilled water or *P. granatum* solution. The specimens were restored with one-step self-etching adhesive (DMG) and bulk fill resin (DMG), using a bipartite Teflon matrix. The SBS evaluation was performed in two stages, immediately (24h after the restorative protocol) and after 12 months of thermohydrolytic aging (12,000 cycles), using a universal testing machine. The bond failures were analyzed using a stereoscopic magnifying glass under 40x magnification. For SEM, 24 fragments of dentin and 24 of eroded dentin received the same treatments as for SBS (n=6), then, the specimens were prepared, metalized and the analyzes were performed immediately (24h) and after 12 months. SBS data were analyzed by 3-way ANOVA (α=0.05) and failures by the Chi-square test. The pomegranate extract had better antioxidant potential than the standard antioxidant (IC50=3.5). Eroded dentin had lower RU than sound (p=0.000). In the immediate analysis, the specimens treated with *P. granatum* had SBS without difference from the water group (control) ($p>0.05$). After aging, specimens treated with *P. granatum* had higher SBS than the control. In SEM, the eroded dentin showed peritubular demineralization and, in the groups treated with *P. granatum*, a hybrid layer with tags was observed. It was concluded that the experimental solution of pomegranate peel had antioxidant action and preserved the adhesive interface of the eroded dentin.

Keywords: Pomegranate, natural extract, adhesion, antioxidant, dental erosion.

Sumário

1. Introdução.....35

2. Proposição.....41

3. Materiais e Métodos 45

4. Resultados.....63

5. Discussão.....73

6. Conclusões.....83

7. Referências Bibliográficas 87

Introdução

O desgaste dental por erosão é uma doença crônica e irreversível, causada pela perda dos tecidos dentais duros, esmalte e dentina, sem o envolvimento de bactérias (Chan et al., 2020; Warreth et al., 2020; Wiegand et al., 2021). O desgaste erosivo é decorrente da interação entre fatores biológicos, químicos e comportamentais (Wiegand et al., 2021). A erosão dental está relacionada principalmente ao consumo de alimentos ácidos (Chan et al., 2020), a redução do fluxo salivar (Tulek et al., 2020), e aos distúrbios gastrointestinais (Lechien et al., 2020; Rauber et al., 2020; Kawar et al., 2021). Trata-se de um processo cumulativo ao longo da vida e sua prevalência tem aumentado consideravelmente, especialmente em adolescentes e adultos jovens (Gillborg et al., 2020; Korkmaz et al., 2020). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado devem ser realizados, para que se evitem perdas e danos à estrutura dental (Michou et al., 2020; Donovan et al., 2021).

Durante o processo de erosão, há a desmineralização da superfície dental e desorganização da matriz orgânica, o que dificulta a penetração do sistema adesivo (He et al., 2019; Belmar da Costa et al., 2021). A matriz orgânica da dentina erodida prejudica a infiltração do adesivo devido ao alto conteúdo de água nas fibras colágenas e a possibilidade de colapso das mesmas, dificultando a hibridização e acelerando a degradação da interface adesiva (Zimmerli et al., 2012).

Dessa forma, fica evidente que a união entre o material restaurador resinoso e a dentina está relacionada à infiltração do sistema adesivo na matriz colágena, que é exposta por meio de condicionamento ácido (Frassetto et al., 2016) ou uso de adesivo/primer acídico (Kanniappan et al., 2022). A zona de difusão entre resina-dentina que contempla a camada de adesivo, também conhecida como camada híbrida, tem a função de retenção micromecânica da restauração, e sua integridade é um fator responsável pela longevidade das restaurações (Betancourt et al., 2019).

Os fatores envolvidos na degradação do colágeno da camada híbrida são resíduos ácidos oriundos do condicionamento ácido e por ação sistemas adesivos autocondicionantes ácidos (Betancourt et al., 2019), a infiltração incompleta do adesivo na rede de colágeno exposta (Perdigão et al 2013), a ativação das metaloproteinases (MMPs) que tem a capacidade de degradar o colágeno (Breschi et al.,2018), a presença de alto conteúdo orgânico da dentina que ocasiona a degradação enzimática das fibrilas e a lixiviação da resina do camada hibrida (Perdigão et al 2013; Breschi et al., 2018; Betancourt et al., 2019).

Após o uso do sistema adesivo, seja de condicionamento total ou autocondicionante, a seleção de resina composta com propriedades favoráveis é de extrema importância para o sucesso do procedimento restaurador. A esse respeito, merecem destaque as resinas do tipo bulk fill, ou de preenchimento único, que apresentam baixo grau de contração após a polimerização, permitem a utilização em camadas de 4 a 5 mm, e proporcionam agilidade no procedimento restaurador (Chesterman et al., 2017; Hoffmann et al., 2021). Estudo *in vitro* demonstrou menor tensão de contração nas áreas gengival e incisal de lesões cervicais restauradas com resina bulk fill (Correia et al., 2018). O uso de resina bulk fill em lesões não cariosas (causadas por processo erosivo/abrasivo) apresentou bom desempenho clínico se comparado às resinas convencionais (Canali et al., 2019).

Na tentativa de melhorar a molhabilidade do substrato dental e modificar a superfície a fim de torná-la mais propícia aos procedimentos adesivos, estratégias restauradoras, como a aplicação de compostos naturais contendo bioativos, são amplamente estudadas na Odontologia (Ziotti et al., 2016; Fakhri et al., 2020). O uso de extratos naturais na estrutura dental pode melhorar a união do material ao substrato, pois aumenta a resistência à degradação das fibrilas colágenas (Rana et al., 2019; Fakhri et al., 2020; Souza-Gabriel et al., 2020).

Em relação ao substrato erodido, verifica-se que extratos de chá verde, semente de uva, semente de toranja, rosa mosqueta, cravo, romã e quitosana foram capazes de modificar a película salivar e melhorar o efeito protetor contra a erosão do tanto do esmalte quanto da dentina (Niemeyer et al., 2020; Fakhri et al., 2020; Belmar da Costa et al., 2021; Gungor & Donmez, 2021).

Dentre os extratos naturais utilizados na Odontologia, destaca-se a romã (*Punica granatum L.*) por ser rica em flavonóides (catequinas e antocianinas) e taninos (punicalina, punicalagina, ácidos púnico, galágico e elágico) (Orak et al., 2012; BenSaad et al., 2017). Os extratos de romã também são conhecidos pelo seu efeito inibidor de metaloproteinases, tendo sido sugerido potencial antimetastático contra células de câncer oral (Peng et al., 2020), potencial antiinflamatório (Zarfeshany et al., 2014; Ghavipour et al., 2017) e antioxidante (Shaygannia et al., 2016; Eghbali et al., 2021). A alta concentração de compostos fenólicos é importante para a proteção celular, contra o efeito danoso causado pelos radicais livres (Shaygannia et al., 2016). Tais radicais são responsáveis por provocar doenças inflamatórias (Danesi & Ferguzon 2017), bem como por acelerar o envelhecimento celular, pois alteram os sistemas biológicos (Durazzo et al., 2019). Vučić et al. (2019) verificaram que a romã apresentou efeitos antidiabéticos, anti-hipertensivos e antitumorais.

O uso do extrato de romã em exaguatórios bucais para a redução do biofilme dental, bem como o efeito contra doenças periodontais, tem sido observado em estudos clínicos randomizados (Batista et al., 2014; Deepak & Samuel, 2018). Diferenças nos perfis de compostos fenólicos foram observadas entre as partes da romã (casca, semente e fruto), sendo as amostras da casca, as que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos antioxidantes (Akhtar et al., 2015; Russo et al., 2018).

Apesar de inúmeros estudos elucidarem os benefícios do extrato de romã (Bhandari 2012; Akhtar et al., 2015; Peršurić et al., 2020), poucos utilizam esse extrato para tratamento da superfície dental previamente a inserção do material resinoso, sendo a maioria deles realizada em dente o recebeu agente clareador (Sharafeddin & Farshad, 2015; Souza-Gabriel et al., 2020; Suratno et al., 2021; Abodahb et al., 2022).

Em 2015, Sharafeddin & Farshad não encontraram diferença na resistência de união da resina composta ao esmalte clareado com peróxido de carbamida 15% e tratado com chá de romã 10%. No entanto, estudos recentes em substratos clareados com peróxido de hidrogênio acima de 35%, verificaram que a solução de *P. granatum* foi capaz de reestabelecer, total ou parcialmente, a resistência adesiva do material restaurador ao esmalte (Suratno et al., 2021; Abodahb et al., 2022) e à dentina (Souza-Gabriel et al., 2020). Esses resultados evidenciam que os compostos fenólicos antioxidantes da solução de romã possam ter capturado os radicais O_2 livres da superfície e favorecido a adesão do sistema resinoso (Souza-Gabriel et al., 2020; Suratno et al., 2021). Em dentina não clareada, Sajana et al. (2020) verificaram que a solução de romã 20% aumentou a resistência adesiva quando comparada ao controle sem tratamento. Até o momento, não se verificam estudos com extrato de romã aplicado em dentina erodida que avaliam a resistência de união do material restaurador.

Considerando o potencial dos extratos naturais de romã na Odontologia e, diante da escassez da literatura, faz-se necessário estudos para a avaliar o efeito desse extrato na dentina submetida a processo erosivo, no que se refere à ação antioxidante, resistência adesiva e morfologia da interface ao longo do tempo.

Proposição

Este estudo tem como objetivo analisar, *in vitro*, os efeitos do extrato hidroalcóolico da casca de romã 10% (*P. granatum*) na adesão ao substrato dentinário erodido. Para tanto, o estudo possuirá os seguintes objetivos específicos:

- Preparar uma solução a partir de extrato da casca de romã (*P. granatum)* e comparar o potencial antioxidante do extrato da casca de *P. granatum* aos padrões antioxidantes sintéticos de BHA e BHT;
- Avaliar a resistência adesiva do material restaurador à dentina erodida pelo teste de cisalhamento e os padrões de falhas obtidos em dois tempos: imediata (24h) e envelhecida (12 meses).
- Avaliar as mudanças morfológicas da interface adesiva (imediata e envelhecida) em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Materiais e métodos

Delineamento experimental

Para o ensaio da ação antioxidante, utilizou-se o extrato da casca da romã, testada em triplicata, em diferentes concentrações, comparada aos padrões antioxidante BHT e BHA (Sigma-Aldrich, Louis, MO, EUA). A variável resposta foi o teste pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Para a avaliação da resistência adesiva, foram utilizados 96 fragmentos de dentina bovina divididos em 2 níveis: hígidos e erodidos, depois foram subdivididos em outros 2 níveis de acordo com o pré-tratamento da superfície (n=12): água destilada (controle) extrato da casca da romã (*P. granatum*). Foi realizada a análise imediata (logo após protocolo restaurador), e a análise após envelhecimento de 12 meses. A variável de resposta (dependente) foi a análise quantitativa da resistência de união ao cisalhamento do material restaurador ao substrato (MPa) e posterior análise das falhas (%). Para a avaliação das mudanças morfológicas da interface adesiva foram utilizados 48 fragmentos de dentina (n=6) subdivididos e tratados do mesmo modo que o a resistência de união. A variável resposta foi a análise qualitativa das fotomicrografias das interfaces adesivas realizadas em MEV por 3 examinadores previamente calibrados. A Figura 1 traz o desenho esquemático dos ensaios realizados.

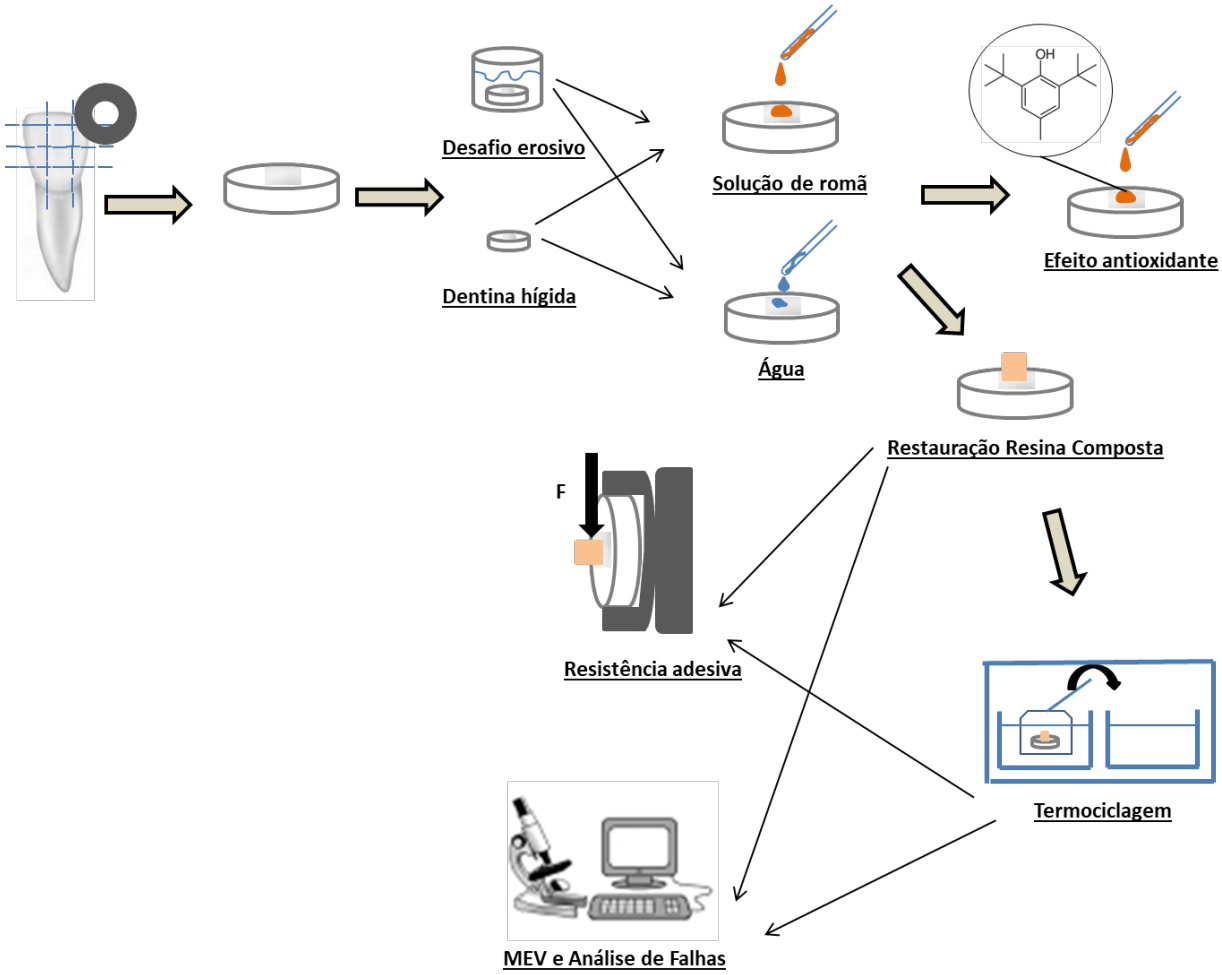

Figura 1. Desenho esquemático do fluxograma do experimento.

Preparo do extrato hidroalcóolico de *Punica granatum*

Inicialmente, realizou-se estudo (Gallas et al., 2018) com folha, semente e casca da romã para caracterização dos extratos, e determinou-se as concentrações ideais baseadas na ação antimicrobiana e na concentração do polifenol punicalagina. Verificou-se que a solução da casca da fruta em concentração 10% apresentou os melhores resultados.

As soluções de *P. granatum* foram preparadas a partir de frutas da romã obtidas de uma mesma plantação. Foram colhidas aproximadamente 10 frutas maduras, que foram higienizadas com água filtrada corrente e escova. Cada fruto foi cortado ao meio sendo separadas casca e polpa (semente e suco). A seguir, a polpa foi peneirada até que se extraísse

todo o suco da semente. O extrato do suco não foi utilizado, devido ao seu alto teor de açúcar, de modo a se evitar alterações no resultado.

As amostras obtidas da casca foram pesadas em balança analítica (Shimadzu, AUW, Baureri, São Paulo, Brasil) e secas pelo método da liofilização (Nova analítica, São Paulo, Brasil) a -80ºC, por 48 h. O solvente utilizado foi o etanol 50% e água a 70ºC, a fim de liberar os flavonóides. Após a extração, as amostras foram levadas a evaporação total por aquecimento controlado e vácuo e obteve-se o pó puro da casca da fruta, que foi identificado e armazenado sob refrigeração a 4ºC (Gallas et al., 2018).

No momento da utilização, foram preparadas soluções a partir de 0,1 g do pó da casca, diluídas em 10 mL de etanol 50% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) + água destilada (etanol e água 1:1), assim obteve-se um extrato hidroalcóolico da casca da romã a 10% (*P. granatum* 10%). Em seguida, as amostras foram submetidas a sonicação por ultrassom (Cientec, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) por 60 min e posterior centrifugação (Odontobras, ATX, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 5 min, em rotação de 1500 rpm, a temperatura ambiente e esse processo deve repetido por 3 vezes até obtenção de extratos límpidos (Figura 2).

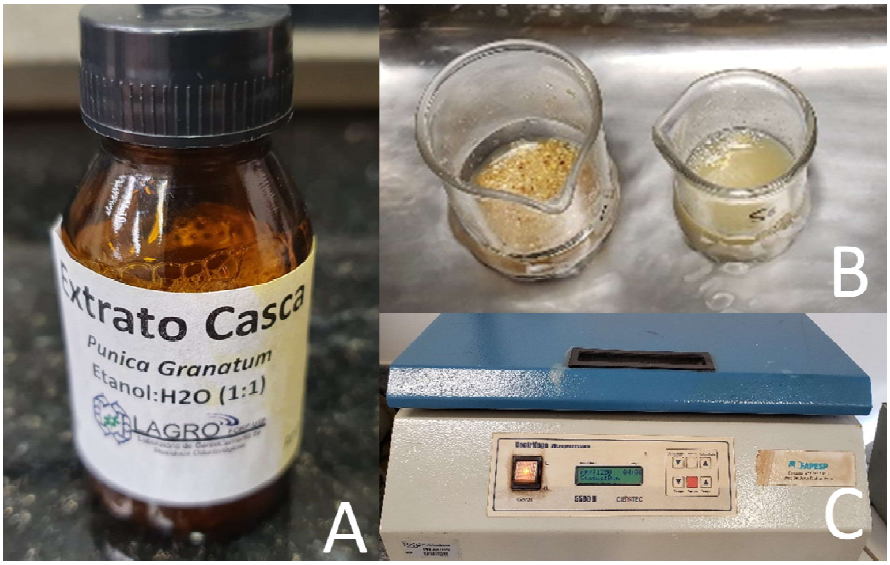

Figura 2. Preparo do extrato hidroalcóolico da casca de romã (*Punica granatum L.*) pelo método de liofilização. (A) Extrato hidroalcóolico de romã a 10% finalizado. (B) Ultrassom Cientec. (C) Centrifuga Odontobas.

Rastreamento do tanino punicalagina no extrato pela técnica de CLAE

A caracterização do extrato foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tal, foi escolhido o tanino punicalagina, que é um polifenol, sendo classificada como tanino hidrolisável (elagitanino) de alto peso molecular, com reconhecidas atividades antioxidante e anti-inflamatória e antimicrobiana, se destacando como uma promissora molécula com várias funções benéficas à saúde (BenSaad et al., 2017) (Figura 3).

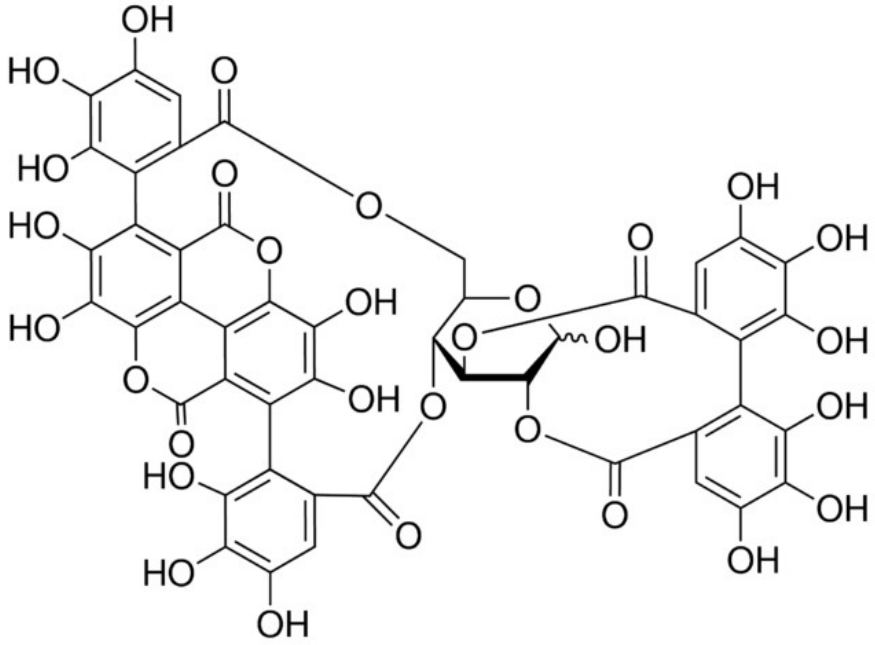

Figura 3. Estrutura química da punicalagina. Fórmula empírica $C_{48}H_{28}O_{30}$; Peso molecular = 1084,72

As amostras foram analisadas em sistema Acquity UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) de cromatografia líquida de ultra-performance acoplado aos detectores de arranjo de diodos (*Diode Array Detector*) e ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) (Figura 4), operando com fonte de ionização Z-Spray em modo negativo de análise.

Um volume de 5 µL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis® Express C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm o diâmetro da partícula) (Supelco-53829U MSDS). A fase móvel consistiu de 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol + 0,1% de ácido fórmico (solvente B). A separação dos compostos iniciou em modo gradiente com 10% de metanol, em seguida, aumentou-se para 90% de metanol em 4 min, permanecendo assim por 6 min e, retornando as condições iniciais com 10% de metanol dentro dos 6 min seguintes. O tempo total de análise foi de 12 min com taxa de fluxo de 500 µL/min. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de Z-spray foram: voltagem do capilar = 2,50 kV, voltagem do cone = 40 V,

temperatura da fonte = 150 °C, temperatura do gás de dessolvatação = 400 °C, e fluxo do gás de dessolvatação = 900 L/h. A análise foi realizada no modo SIR (*Selected Ion Recording*).

Comparou-se a concentração de punicalagina no extrato experimental com a do padrão de punicalagina (Sigma-Aldrich, Louis, MO, EUA). Estes extratos ficaram armazenados em frascos fechados e refrigerados a 4°C. O pH do extrato foi aferido em 4,75.

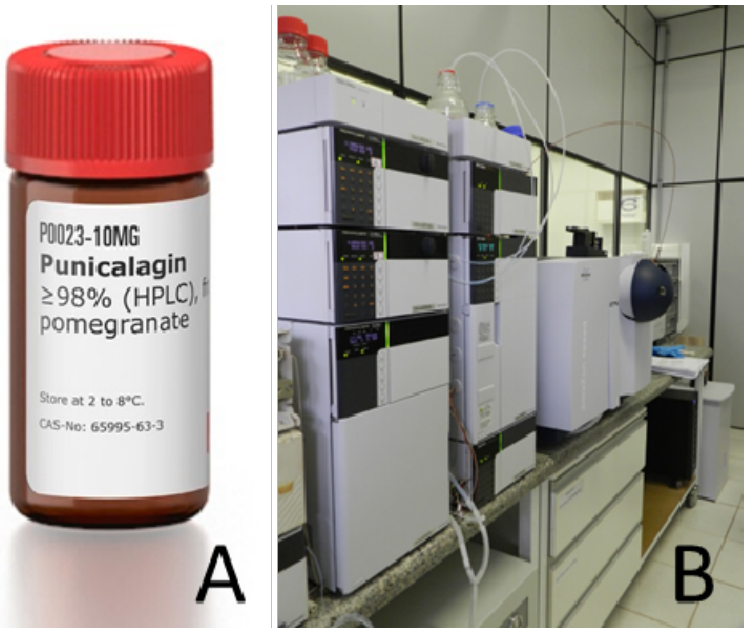

Figura 4. (A) Pó padrão de punicalagina (Sigma-Aldrich). (B) Equipamento para Cromatografia líquida de ultra-performance (Waters Corporation).

As curvas padrão para identificação de punicalagina (isômeros α e β) foram construídas com concentrações baseadas nas estimativas dos teores da fruta. De uma solução mãe em metanol contendo a punicalagina (Sigma-Aldrich), se fizeram sete diluições, partindo-se da concentração de 1000 µg/mL até a concentração de 0,05 µg/mL. Para a solução de *P. granatum,* foram feitas seis diluições, partindo de 1000 µg/mL até 0,1 µg/ml (Figura 5).

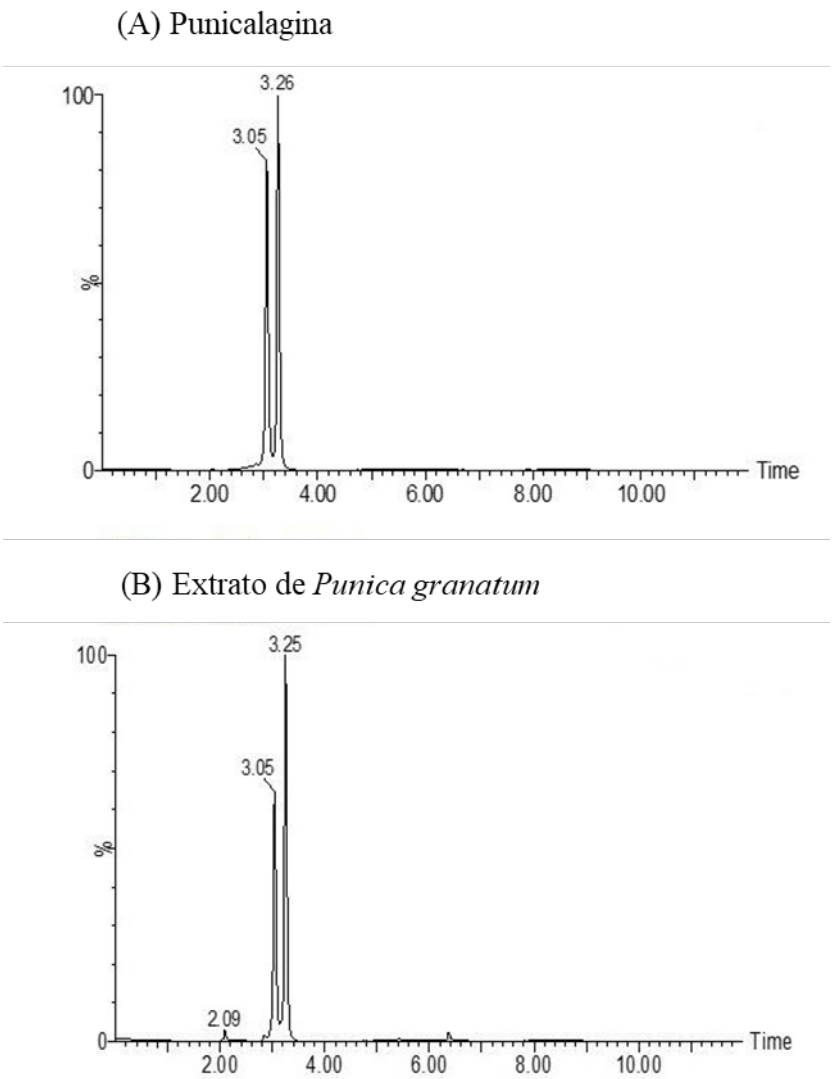

Figura 5. Identificação dos picos dos isômeros (α e β) da punicalagina. A) Padrão punicalagina (Sigma), B) Extrato experimental de *P. granatum.*

Verificou-se que os picos dos isômeros do padrão de punicalagina (α = 3.05 µg/mL and β =3.25 µg/mL) e do extrato experimental de *P. granatum* (α = 3.05 µg/mL and β =3.26 µg/mL) foram similares. A quantidade total de punicalagina foi de 6,31 µg/mL (α + β) para o extrato experimental.

Avaliação do potencial antioxidante do extrato experimental

A avaliação do potencial antioxidante foi feita pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Boly et al., 2016). Utilizou-se 10µL do extrato hidroalcóolico da casca de romã que foram testados em triplicata em diferentes concentrações

(10, 15, 20, 30, 40 e 50 µg/mL). Aos extratos, foram adicionados 1,0 mL de tampão acetato de 0,1 M (pH 5,5), 1,0 mL de etanol PA e 0,5 mL de solução etanólica DPPH 250 µM. (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A mudança na absorbância foi medida após 20 minutos a 515 nm a 25◦C. A atividade antioxidante dos espécimes foi comparada com padrões sintéticos que impedem a oxidação e sequestram radicais livres. Os padrões utilizados foram BHA (2-terc-butil-4-hidroxianisol; e; 3-terc-butil-4-hidroxianisol; fórmula $C_{11}H_{16}O_2$) e BHT (hidroxitolueno butilado e fórmula $C_{15}H_{24}O$).

Os resultados foram expressos em IC50 (µg/mL), que indica a concentração de solução necessária para produzir redução de 50% no radical livre DPPH, e foram apresentados como a média e o desvio padrão obtidos nas medições em triplicata. O sequestro de radicais livres foi calculado pela fórmula: %AA = 100 – [(A (controle) – A (amostra) / A (controle)] x 100, no qual A (controle) representa a absorbância da solução de DPPH sem a amostra e A (amostra) representa a absorbância da amostra com o DPPH.

Ensaio de resistência de união ao cisalhamento

Incisivos bovinos conservados em solução de timol 0,1% a 9°C foram lavados em água corrente por 24 horas para eliminação dos resíduos de timol e examinados macroscopicamente com auxílio de lupa estereoscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) em aumento de 20x. Foram selecionados para este estudo 60 incisivos que não apresentassem linhas de fratura ou fissuras na coroa.

Os dentes bovinos foram submetidos à profilaxia com pedra pomes por 60 segundos, seccionados transversalmente a 2mm da junção cemento-esmalte, com auxílio de disco diamantado (Buehler, Illinois, EUA) em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha). Os espécimes foram padronizados nas dimensões de (5 x 5 x 3 mm). Posteriormente, foram

polidos utilizando lixas #1200 em politriz (Panambra, São Paulo, São Paulo, Brasil) por 60 segundos (Figura 6).

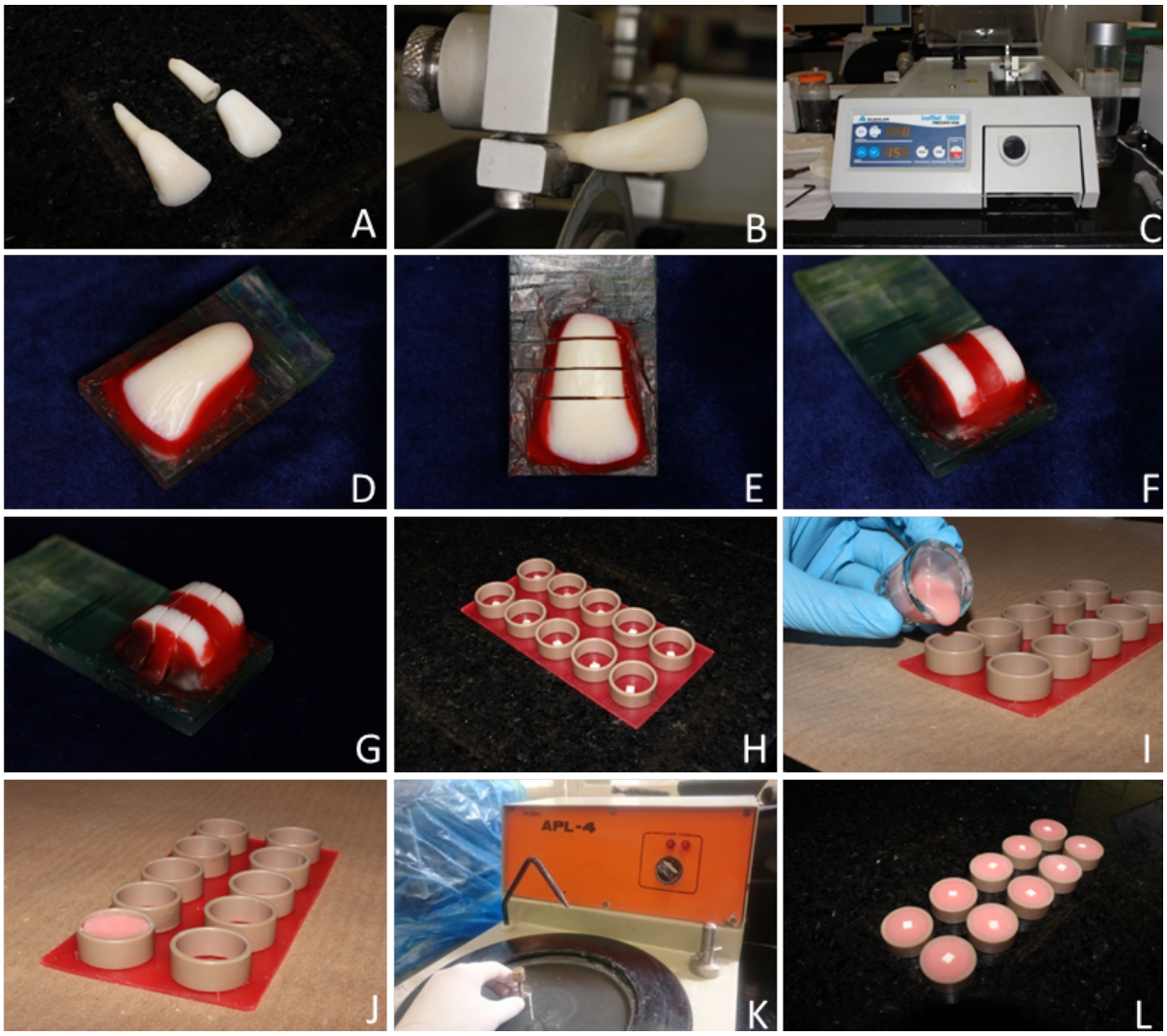

Figura 6. (A) Dente bovino hígido íntegro e seccionado; (B) Dente bovino posicionado para corte; (C) Máquina de corte metalográfica Isomet 1000; (D) Fixação da coroa dental em cera; (E) Cortes transversais padronizados; (F) Fixação dos fragmentos; (G) Fragmentos com cortes longitudinais; (H) Alinhamento dos fragmentos em lâmina de cera; (I) Embutimento dos fragmentos em tubos de PVC; (J) tubo preenchido por resina autopolimerizável; (K) Planificação da superfície em Politriz automática; (L) Corpos-de-prova prontos.

Formação das lesões de erosão artificiais

Para induzir a formação das lesões de erosão, cada espécime foi imerso em 20 mL de ácido cítrico 0.3% (pH=3.2) individualmente e colocado na mesa agitadora (CT155; Cientec, Belo Horizonte, MG, Brasil) (Figura 7), na qual permaneceram sob agitação constante a 50 rpm, por 2 horas. Após esse período, os espécimes foram lavados com água destilada e

armazenados individualmente em ependdorffs contendo saliva artificial por 24 horas a 37ºC. A saliva artificial foi composta por metilparabeno (2,0 g), carboximetilcelulose de sódio (10,0 g), KCl (0,625 g), MgCl 2.6H_2O (0,059 g), $CaCl_2.2H_2O$ (0,166 g), K_2HPO_4 (0,804 g), e KH_2PO_4 (0,326 g) em 1L de água destilada, conforme descrito por Ururahy et al. (2017).

Figura 7. Espécimes posicionados em mesa agitadora para realização de desafio erosivo em ácido cítrico 0,3%.

Protocolo restaurador

Realizada profilaxia com pedra pomes e água em escova de Robinson na superfície dos corpos-de-prova. O extrato experimental foi aplicado de acordo com o protocolo: gotejar 3 mL por 2 minutos, friccionar de forma ativa com auxílio de microbrush, deixar agir por 10 minutos e secar levemente com papel absorvente (Gallas, 2018).

Em seguida, foi empregado o sistema adesivo autocondicionante de 1 passo Ecosite Bond (DMG, Hamburgo, Alemanha), aplicado ativamente com microbrush por 10s, aguardando-se 20s para penetração nos túbulos, seguido de 5s de jato de ar para remoção do solvente e fotopolimerização por 10s com LED Grand Valo (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) a 1000 mW/cm^2, no modo *standard*.

As superfícies de dentina foram restauradas com a resina composta Ecosite Bulk Fill (cor Universal; DMG, Hamburgo, Alemanha) com auxílio de matriz de Teflon bipartida (3 mm de diâmetro interno e 4 mm de altura), estabilizada com cera utilidade, de maneira a obter fragmentos de resina composta com as medidas acima citadas. A resina composta foi incluída em incremento único (3 a 4 mm) e polimerizada por 20s com o Grand Valo (Ultradent), posicionado em contato com a matriz para padronização da distância. A contenção de cera utilidade foi retirada cuidadosamente com bisturi, a matriz bipartida foi aberta e uma fotoativação adicional de 10s foi realizada (Figura 8). O conjunto dentina/material restaurador foi armazenado em umidade relativa a 37°C por 24h, para a realização do teste de cisalhamento.

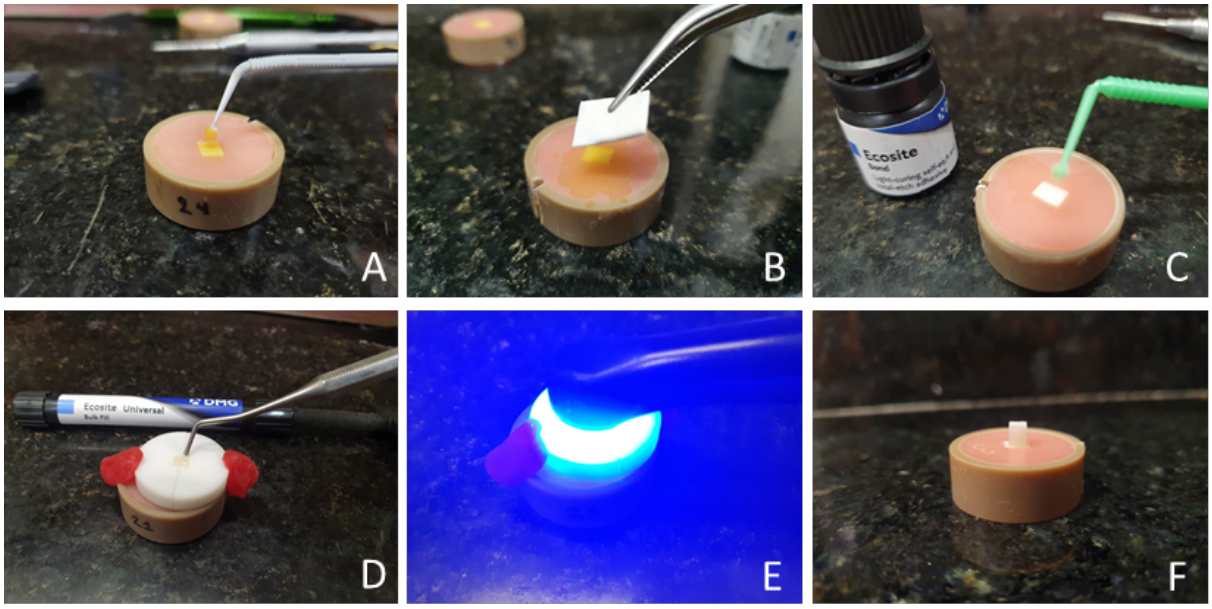

Figura 8. (A) Aplicação do extrato de romã. (B) Secagem com papel absorvente. (C) Aplicação de sistema adesivo. (D) Inserção da resina composta Bulk fill. (E) Fotopolimerização. (F) Aspecto final da restauração na superfície.

Envelhecimento da interface adesiva

Metade dos espécimes de cada grupo foi submetida à degradação térmica e hidrolítica da interface adesiva. As amostras foram submetidas a armazenamento em umidade relativa por 12 meses (37°C) e termociclagem em máquina termocicladora (Ética Odontológica, São

Paulo, SP, Brasil) a 5°C e 55°C em água. O tempo de imersão em cada banho foi de 30 segundos e o tempo de transferência entre os dois banhos foi de 2 segundos.

As amostras foram submetidas a 1000 ciclos térmicos por mês (2 x no mês) e foram mantidas em umidade relativa com gaze embebida em água destilada a 37°C entre os intervalos, totalizando 12.000 ciclos e 12 meses de armazenamento. As gazes embebidas água destilada foram trocadas a cada semana (Figura 9).

Figura 9. Máquina termocicladora (banhos de 5°C e 55°C) com compartimento para os espécimes.

Teste de resistência ao cisalhamento

Decorrido o período de 24 h após a confecção das restaurações, os corpos-de-prova foram posicionados na máquina universal de ensaios (Instron 4444; Instron Corporation, Canton, MA, EUA) fixados em dispositivo de aço inoxidável, permitindo a incidência de força de 90°, sem entrar em contato com a base de resina acrílica. A aplicação da força cisalhante foi realizada por meio de ponta de aço inoxidável retangular chanfrada com célula

de carga de 2 kN, à velocidade de 0,5 mm/min, até o deslocamento da restauração (Figura 10). Os dados foram tabulados e transformados em MPa para análise posterior.

As falhas ocorridas foram analisadas em lupa estereoscópica (40x) (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), e foram classificadas em adesiva, quando a superfície dentinária esteve coberta por fina camada de material adesivo; coesiva do material, quando a superfície estiver coberta por resina composta; coesiva do substrato, quando a falha ocorrer na dentina; e mista, nas situações em que houver a combinação dos tipos adesiva e coesiva.

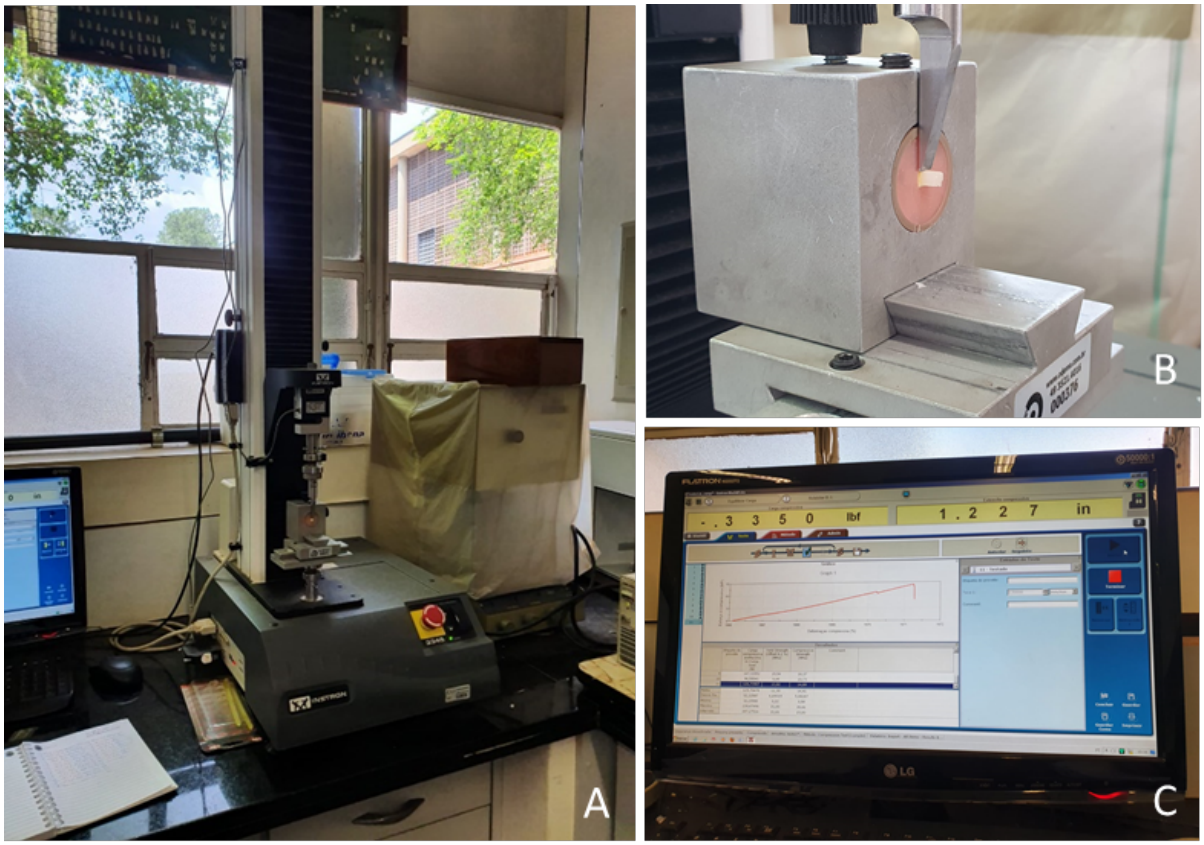

Figura 10. (A) Máquina universal de ensaios Instron 4444. (B) Corpo-de-prova posicionado para receber carga cisalhante. (C) Teste de cisalhamento em execução.

Análise morfológica da interface em Microscopia Eletrônica de Varredura

Quarenta e oito espécimes foram preparados para análise da interface adesiva, sendo metade desse destinados a cada tempo: imediato após 24h ou envelhecido após 12 meses (n=6). Sobre o fragmento de dentina (hígido ou erodido) tratado com os diferentes protocolos, foram realizadas as restaurações em resina composta como descrito anteriormente para o

ensaio de resistência ao cisalhamento, com exceção do embutimento em resina acrílica. O bloco dentina/resina foi seccionado ao meio em máquina de corte. A porção interna de uma das partes foi planificada com lixas de granulação de 600 e 1.200 (Norton; Lorena, SP, Brasil) por 30 s cada e polida com pasta de alumina de 0,3 µm e 0,05 µm por 5 min cada.

Após o polimento, as seções receberam ácido fosfórico a 37% (Villevie, Joinvile, SC, Brasil) por 20 s, seguido de enxágue pelo mesmo tempo e, higienização em ultrassom por 10 min. Em seguida, os espécimes sofreram desidratação em etanol de 25°, 50°, 75°, 95° GL, mediante imersão por 20 minutos em cada solução. Posteriormente, foram imersos por 1 h em etanol 100° GL, e por fim, foram em HMDS por 10 minutos.

Os corpos-de-prova foram fixados em *stubs* metálicos (SCD 050 Bal-Tec, Nova Iorque, EUA) e analisados em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss EVO 50; Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) (Figura 11) e as áreas mais representativas foram fotografadas.

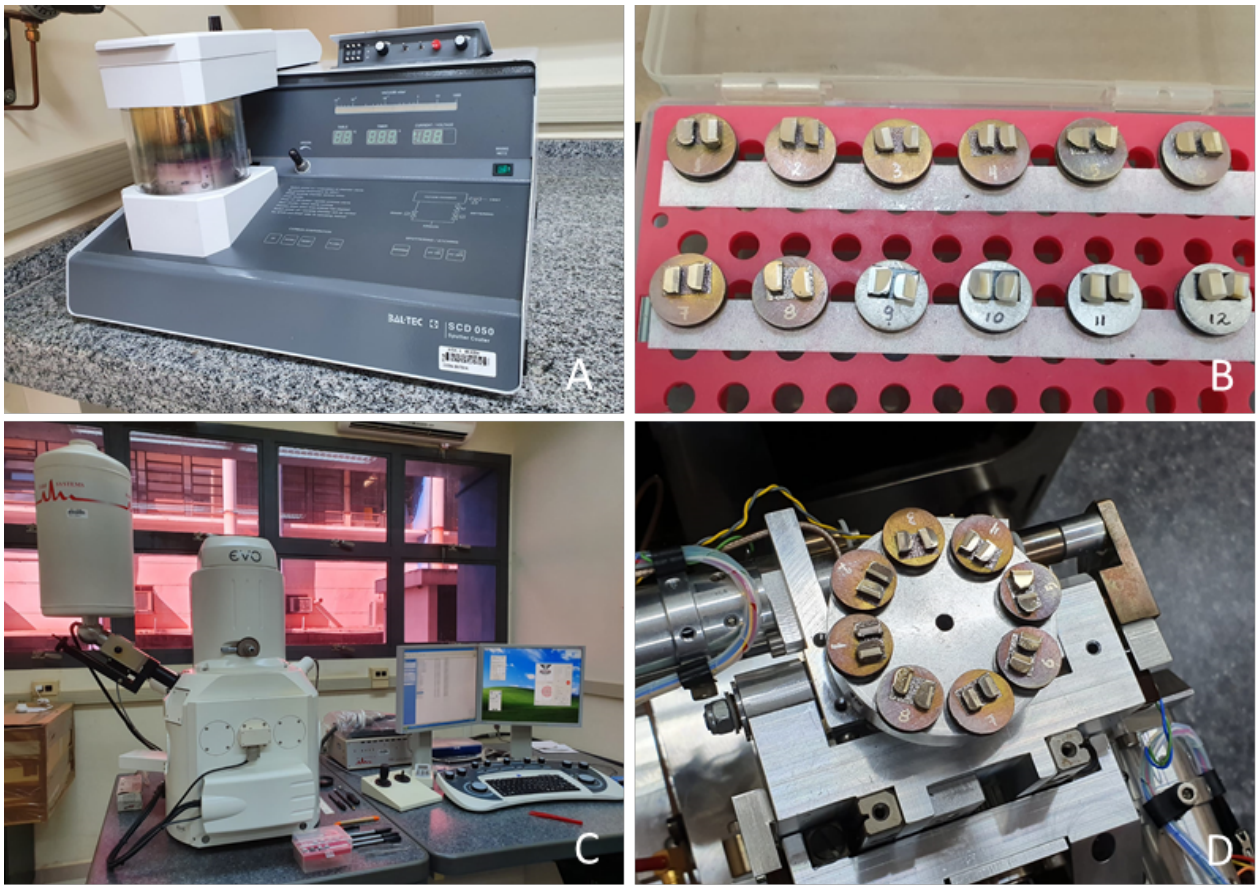

Figura 11. (A) Metalizadora Bal-Tec modelo SCD 050. (B) Corpos-de-prova fixados em stubs metálicos. (C) Microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50. (D) Espécimes metalizados para análise em MEV.

Análise dos dados

A análise estatística foi realizada no *software Statistical Package for Social Science* (SPSS 25; IBM Corp., NY, EUA) com alfa pré-estabelecido de 0,05. Os dados da ação antioxidante (µg/mL) foram analisados pelo teste não-paramétrico de Qui-quadrado. Os dados referentes à resistência ao cisalhamento (MPa) foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade, mostrando distribuição normal (teste Shapiro Wilk) e homogênea (teste Leveve). Em seguida, foram analisados por Análise de Variância a três critérios, considerando como fatores independentes o *substrato* (hígido ou erodido), o *tratamento* (experimental ou controle) e o *tempo* (imediato ou envelhecido). As falhas foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado. As fotomicrografias foram analisadas de modo qualitativo por 3 examinadores calibrados (kappa≥0,8).

Resultados

Potencial antioxidante do extrato hidroalcóolico de *P. granatum*

A atividade antioxidante do extrato experimental foi comparada com os padrões sintéticos BHA e BHT, e expressa em porcentagem (%AA). Não houve diferença significante nos valores de BHA, BHT e *P. granatum* 10% (p=0,2459) (Tabela 1), evidenciando o potencial antioxidante do extrato experimental.

Tabela 1. Médias e desvios-padrões (triplicatas) da concentração inibitória do radical DPPH (%AA) para atividade antioxidante dos padrões BHT, BHA e do extrato de *P. granatum*.

Amostras	BHT	BHA	*Extrato de P. granatum* 10%
1	(88,20 ± 0,24)	(85,81 ± 0,82)	(83,05 ± 0,52)
2	(81,69 ± 1,29)	(83,40 ± 0,66)	(83,60 ± 1,44)
3	(73,26 ± 1,67)	(76,30 ± 1,38)	(80,79 ± 2,65)
4	(64,67 ± 0,63)	(60,24 ± 1,26)	(67,47 ± 4,98)
5	(42,78 ± 1,68)	(35,46 ± 0,38)	(45,85 ± 9,96)
6	(27,78 ± 1,80)	(21,93 ± 3,46)	(32,41 ± 5,40)
Total	(63,06 ± 0,64) *	(60,52 ± 1,10) *	(65,52 ± 3,42) *

**sem diferença significante entre os valores médio de BHA, BHT e P. granatum (Teste Qui-quadrado, p=0,2459)*

Foi calculado o IC50 (µg/mL) de cada solução, que representa a quantidade necessária de uma substância para inibir um determinado processo biológico em 50% (nesse estudo, o radical DPPH). Encontrou-se os seguintes resultados: IC50 do BHA = 2,97 µg/mL, IC50 do BHT = 3,01 µg/mL e IC50 do extrato de *P. granatum* = 3,49 µg/mL (Figura 12).

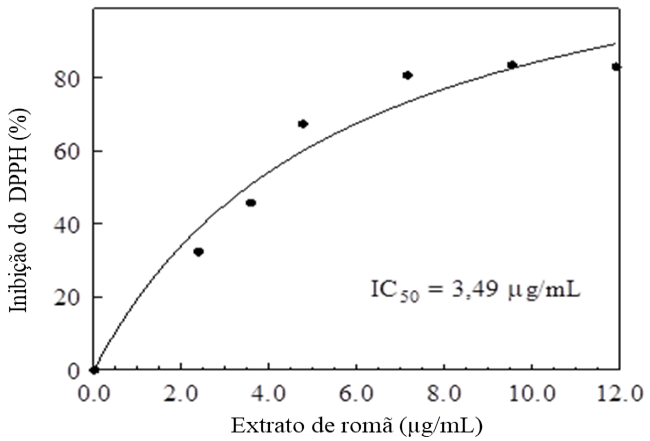

Figura 12. Curva IC_{50} do extrato *P. granatum*.

Resistência adesiva ao cisalhamento

A Tabela 2 contém o resultado da Análise de Variância para o ensaio de resistência adesiva ao cisalhamento.

Tabela 2. Análise de Variância a 3 critérios, considerando tratamento, substrato e tempo. Variável dependente: resistência de união (MPa) do material restaurador à dentina.

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Modelo corrigido	1194,249[a]	11	170,607	21,256	0,000
Intercepto	15109,951	1	15109,951	1882,550	0,000
Tratamento	81,716	2	40,858	5,090	0,008
Substrato	0,000	0	.	.	0,000
Tempo	455,054	1	455,054	56,695	0,000
Tratamento * Substrato	0,000	0	.	.	.
Tratamento * Tempo	120,049	2	60,024	7,478	0,001
Substrato * Tempo	0,000	0	.	.	.
Tratamento * Substrato * Tempo	0,000	0	.	.	0,000
Erro	706,316	88	8,026		
Total	17010,517	96			
Total corrigido	1900,566	95			

A análise dos dados mostrou diferença significativa para os 3 fatores testados tratamento (p=0,008), substrato (p=0,000) e tempo (p=0,000), bem como para a interação deles (p<0,0001). O substrato hígido foi superior ao erodido. O extrato de *P. granatum* foi superior à água. A resistência de união imediata foi superior à envelhecida (Figura 13).

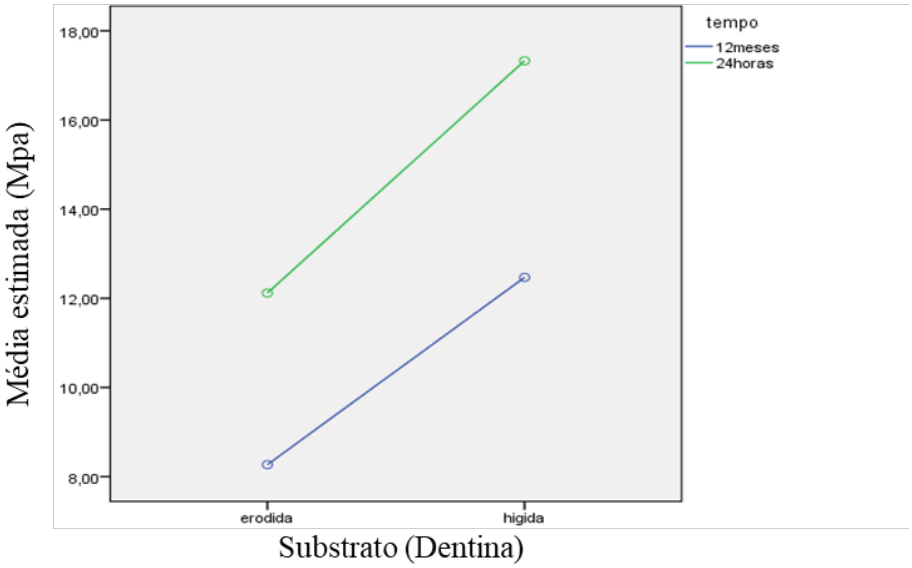

Figura 13. Média de força de RU correlacionada com substrato dentinário (hígido/erodido) e tempo de análise (24horas/12meses).

Os valores médios e desvios-padrões da resistência adesiva do material restaurador à dentina, considerando a interação das diferentes condições experimentais, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias e desvios-padrões (MPa) da resistência ao cisalhamento do material restaurador à dentina, considerando substrato, tratamento da superfície e a degradação da interface (n = 12).

	Dentina hígida		Dentina erodida	
	Água	*Extrato de P. granatum* 10%	Água	*Extrato de P. granatum* 10%
Imediata (24h)	(17,70 ± 2,40) Aa	(16,95 ± 4,60) Aa	(12,27 ± 2,28) Ab	(11,96 ± 3,24) Ab
Após 12 meses	(11,47 ± 1,82) Bb	(13,46 ± 3,42) Ba	(5,75 ± 1,65) Bc	(10,96 ± 1,90) Ab

Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significante dentro da mesma coluna (Tempo, p <0,05).
Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significante dentro da mesma linha (Tratamento, p <0,05)

De modo geral, verificou-se que o envelhecimento da interface adesiva (12.000 ciclos térmicos e 12 meses de armazenamento) reduziu a força de união ao cisalhamento, pois os corpos-de-prova não submetidos à degradação (teste imediato) apresentaram maior resistência de união que os degradados ($p<0,0001$).

Na análise imediata (sem envelhecimento da interface), verificou-se que os grupos que tiveram a dentina erodida apresentaram menor resistência de união que os com a hígida ($p<0,05$).

Após a degradação da interface, o extrato *P granatum* aplicado no substrato erodido manteve estável a resistência de união ($p<0,05$), pois os valores imediatos (11,96 ± 3,24 MPa) e envelhecidos (10,96 ± 1,90 MPa) não diferiram entre si. Os piores valores de adesão foram encontrados após 12 meses em dentina erodida, tratada apenas com água (5,75 ± 1,65 MPa).

Falhas após o teste de resistência adesiva

Na análise imediata (24h), houve predomínio de falha mistas (combinação do tipo adesiva e coesiva) para a dentina hígida, independentemente do tratamento (controle e extrato *P. granatum*). (Figura 14). Na dentina erodida, observou-se maior presença de falhas adesivas, independentemente do tratamento. Foi baixo o número de falhas coesivas (dentina e material) (Tabela 4, Figura 14).

Tabela 4. Falhas após o teste de cisalhamento imediato nos diferentes grupos experimentais (n=12).

	Dentina hígida		Dentina erodida	
	Água	Extrato de romã	Água	Extrato de romã
Adesiva	3/12 (25%)	4/12 (33,33%)	8/12 (66,66%)	6/12 (50%)
Mista	8/12 (66,66%)	7/12 (58,33%)	4/12 (33,33%)	5/12 (41,66%)
Coesiva (dentina)	1/12 (8,33%)	0	0	1/12 (8,33%)
Coesiva (material)	0	1/12 (8,33%)	0	0

Após o envelhecimento de interface, observou-se predomínio de falhas mistas na dentina hígida tratada com água ou extrato *P. granatum* e na dentina erodida tratada com *P. granatum.* No entanto, verificou-se predomínio de falhas adesivas na dentina erodida que recebeu apenas água (Tabela 5, Figura 15).

Tabela 5. Falhas após a degradação da interface adesiva nos diferentes grupos experimentais (n=12).

	Dentina hígida		Dentina erodida	
	Água	Extrato de romã	Água	Extrato de romã
Adesiva	5/12 (41,66%)	4/12 (33,33%)	8/12 (66,66%)	2/12 (16,66%)
Mista	6/12 (50%)	6/12 (50,0%)	3/12 (25%)	8/12 (66,66%)
Coesiva (dentina)	1/12 (8,33%)	1/12 (8,33%)	1/12 (8,33%)	1/12 (8,33%)
Coesiva (material)	0	1/12 (8,33%)	0	1/12 (8,33%)

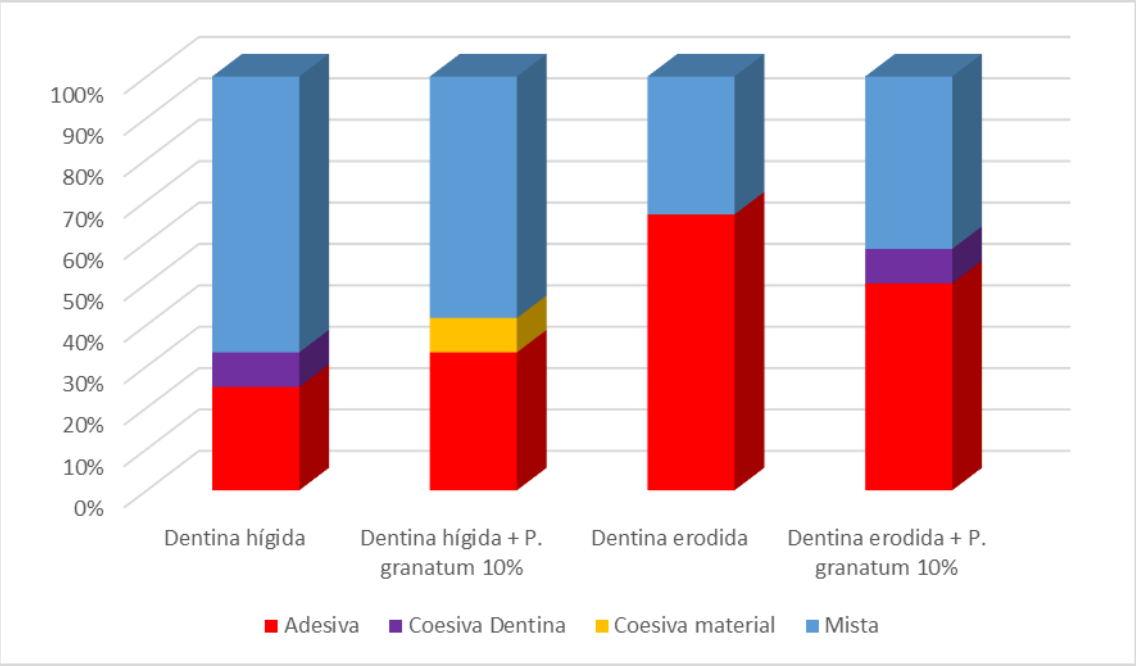

Figura 14. Representação gráfica dos valores percentuais do padrão de falhas dos grupos experimentais sem degradação de interface.

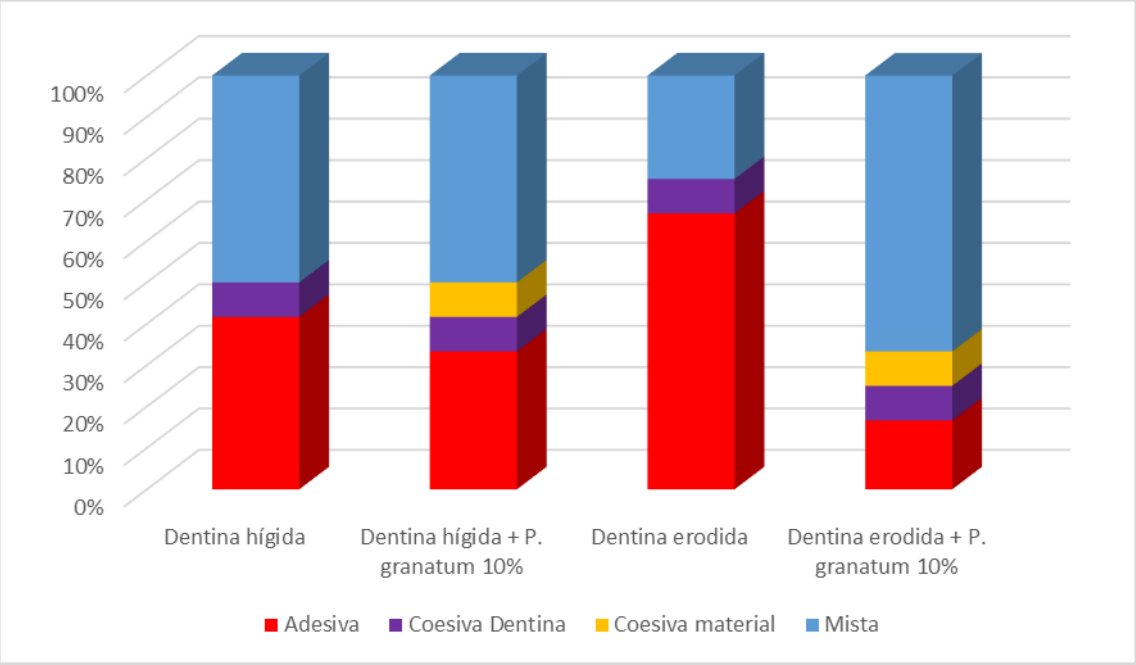

Figura 15. Representação gráfica dos valores percentuais do padrão de falhas dos grupos experimentais após a degradação de interface (12 meses).

Análise da morfologia da interface adesiva por MEV

A análise imediata (sem degradação) das seções restauradas permitiu a verificação de *tags* de resinosos e boa interface adesiva na dentina hígida, bem como na tratada com extrato experimental de *P. granatum*. Observou-se redução no número de *tags* resinosos na dentina erodida tratada com água, bem como desmineralização peritubular e intertubular, no entanto no geral, todos os tratamentos apresentaram uma camada adesiva uniforme (Figura 16 A-D).

Após o envelhecimento de 12 meses, verificou-se presença de camada híbrida e interface adesiva na dentina hígida (controle) (Figura 17 A), bem como na dentina tratada com *P. granatum,* observou-se formação de *tags* resinosos (Figura 17 B e D). Na dentina erodida foi possível observar a presença de desmineralização peritubular e intertubular (Figura 17 C e D). Observou-se redução no número de *tags* resinosos na dentina erodida tratada com água, seguindo o mesmo padrão da análise imediata.

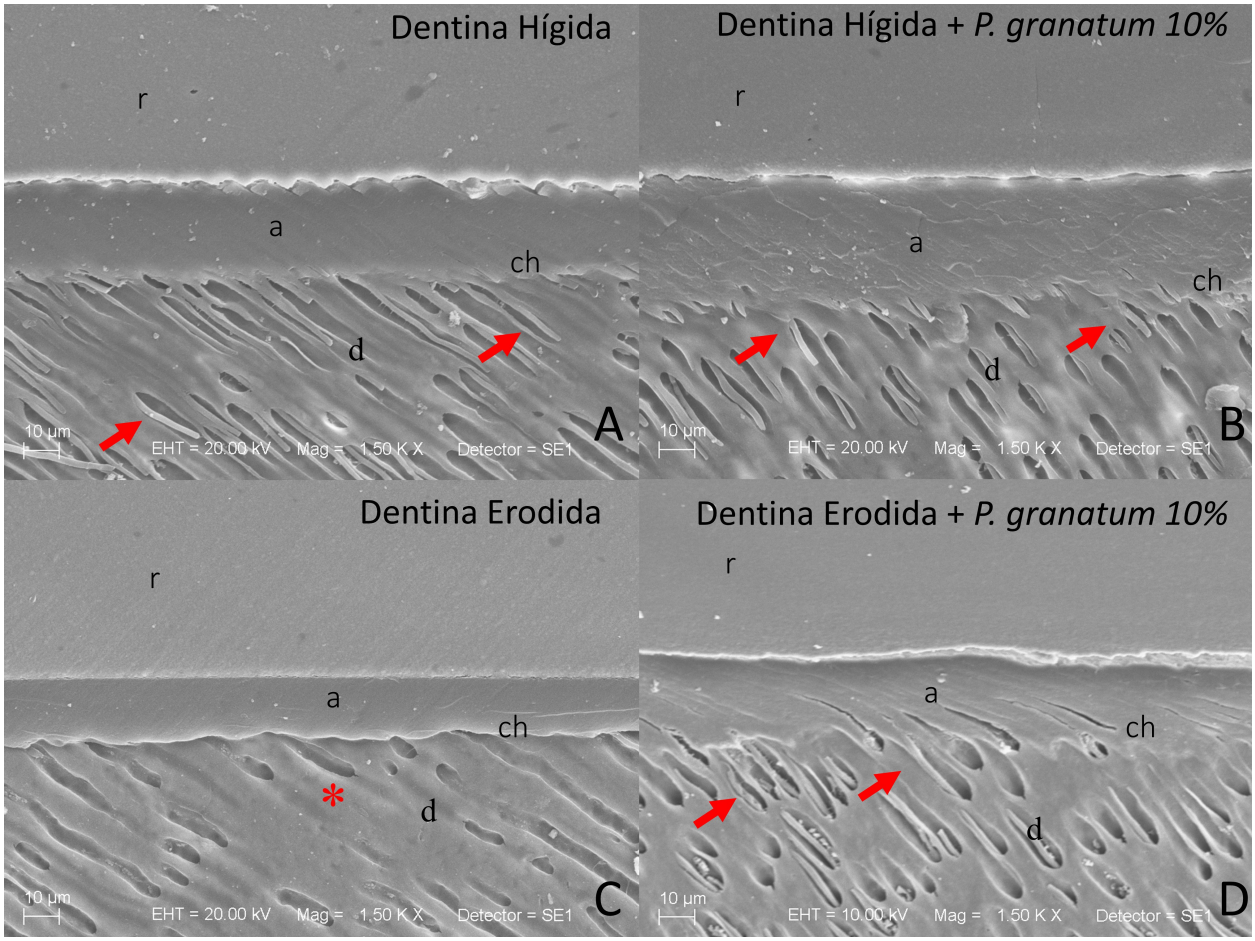

Figura 16. MEV da interface após o procedimento restaurador (sem degradação). (A) Dentina hígida (controle) observa-se a formação de *tags* resinosos (setas vermelhas); (B) Dentina hígida + *P. granatum a 10%* observa-se a formação de *tags* resinosos (setas vermelhas); (C)Dentina erodida verifica-se redução na formação de *tags* resinosos com padrão de desmineralização peritubular e intertubular (asterisco vermelho) e (D)Dentina erodida + *P. granatum a 10%* observa-se a formação de *tags* resinosos (setas vermelhas). No qual r=Resina, a=Adesivo, ch=Camada híbrida e d=Dentina.

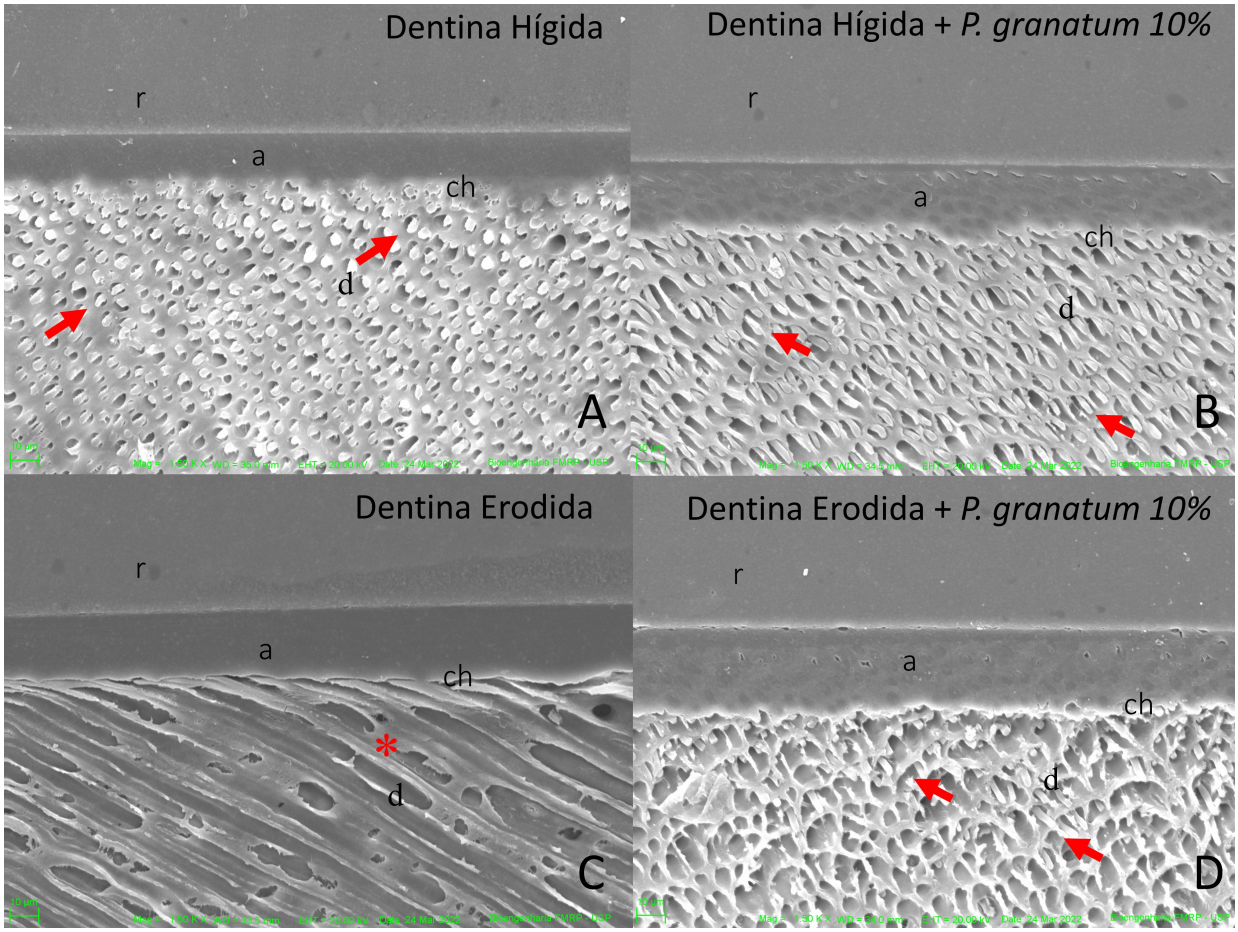

Figura 18. MEV da interface após degradação da interface adesiva (12 meses). (A) Dentina hígida (controle) observa-se a formação de *tags* resinosos (setas vermelhas); (B) Dentina hígida + *P. granatum a 10%* observa-se a formação de *tags* resinosos (setas vermelhas); (C)Dentina erodida verifica-se redução na formação de *tags* resinosos com padrão de desmineralização peritubular e intertubular (asterisco vermelho) e (D) Dentina erodida + *P. granatum a 10%* observa-se a formação de *tags* resinosos (setas vermelhas) bem como desmineralização peritubular. No qual r=Resina, a=Adesivo, ch=Camada híbrida e d=Dentina.

Discussão

A dentina exposta proveniente do desgaste dental erosivo necessita de tratamento restaurador, desde proteção de túbulos dentinários para reduzir sensibilidade, até reabilitação de desgastes mais severos, por meio de grandes reconstruções em resina composta ou procedimentos indiretos (Kanzow et al., 2019; Fradeani et al., 2021; Mortensen et al., 2021).

As técnicas restauradoras adesivas com resinas compostas permitem o restabelecimento da estrutura perdida pelo desgaste dental provenientes de lesões não cariosas, de modo a preservar os tecidos remanescentes, ou seja, com mínimo ou nenhum preparo dental (Pini et al., 2019; Mehta et al., 2021; Ramos et al., 2022). No entanto, a resistência de união da resina ao substrato erodido, ao longo do tempo, tem sido descrita como baixa (Zimmerli et al., 2012; Milosevic et al., 2016). O processo de degradação da camada híbrida ocorre devido principalmente à ação das MMPs, que permanecem aprisionadas dentro da matriz extracelular da dentina na forma inativa e são ativadas mediante desafio ácido (Almahdy et al., 2012; Niu et al., 2014, Favetti et al., 2017).

Sabe-se que os antioxidantes têm a capacidade de proteger contra danos causados pelos radicais livres (Eghbali et al., 2021). Além disso, na tentativa de melhorar a resistência de união na superfície dentinária, tem-se sugerido o pré-tratamento com substâncias biomodificadoras, como os extratos naturais (Autieri et al., 2018; Suratno et al., 2021), pois diminuem à degradação das fibrilas colágenas (Fakhri et al., 2020; Souza-Gabriel et al., 2020). Estudo *in vitro* demonstrou atividade antioxidante e alta concentração de flavonóides no extrato hidroalcóolico de romã (Hanafy et al., 2021).

Dessa forma, este estudo se propôs identificar o potencial antioxidante de um extrato hidroalcóolico experimental da casca de romã a 10% (*P. granatum*) e a analisar seu efeito na resistência adesiva do material resinoso ao substrato dentinário erodido.

Foram utilizados dentes bovinos devido à similaridade em sua estrutura, ao tamanho favorável da coroa dental, facilidade de obtenção dos dentes, e melhor padronização do

substrato (De Carvalho et al., 2018). Soares et al. (2016) verificaram ausência de diferenças significativas entre os substratos humanos e bovinos no que se refere aos valores de resistência de união em procedimentos restauradores adesivos.

O método de liofilização foi utilizado para o preparo do extrato hidroalcóolico da *P. granatum* 10%. O processo de liofilização consiste na remoção da água do material por sublimação, em baixas temperaturas, portanto, não ocorre alteração química (perda de constituintes voláteis) pelo calor (Rodriguez et al., 2019). O produto liofilizado apresenta resistência à microrganismos devido à concentração de água residual ser mínima e permite manipular de forma adequada as concentrações necessárias para o experimento (Rodriguez et al., 2019; Mitsagga et al., 2021).

Utilizou-se o pó liofilizado da casca da fruta, pois a literatura (Akhtar et al., 2015; Russo et al., 2018) e estudo prévio do nosso grupo (Gallas et al., 2018), verificaram que a maior concentração dos compostos fenólicos está na casca da romã. A concentração do extrato experimental foi padronizada em 10%, na tentativa de potencializar os efeitos dos flavonóides, visto que, a solução de romã em baixa concentrações não proporcionou resultados promissores na resistência de união (Ziotti et al., 2016; Souza-Gabriel, 2020).

A quantificação de punicalagina no extrato da casca da romã foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conhecido do inglês como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com UV/Vis, que emprega pequenas colunas, preenchidas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões (Salwe et al., 2015). Essa técnica realiza análise quantitativa de compostos de vários tipos de amostras com alta eficiência (Salwe et al., 2015; Russo et al., 2018). Nesse estudo, verificou-se que os picos dos isômeros de punicalagina do extrato de *P. granatum* e do padrão foram próximos, evidenciando a presença desse tanino antioxidante no extrato experimental.

Antioxidantes são compostos que possuem potencial de eliminação de radicais pela doação de um íon hidrogênio ao radical livre e posteriormente, ele próprio se torna um radical (Prior & Cao, 1999). Outro mecanismo seria pela doação de um elétron ao radical livre, tornando-se ele mesmo um cátion radical (Bendary et al., 2013). O DPPH é um radical livre estável de nitrogênio de cor violeta, que possui absorção entre 515 e 520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (Prior & Cao, 1999). O método de sequestro do radical DPPH é utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos, e tem sido amplamente empregado na indústria alimentícia (Mira-Sánchez et al., 2020; Lee et al., 2021).

No presente estudo, extrato de *P. granatum* demonstrou ser eficaz na remoção de radicais livres DPPH tanto quanto os padrões sintéticos BHA e BHT. Esse processo pode ser explicado pela presença de taninos, como a punicalagina na casca da fruta (Akhtar et al., 2015; Russo et al., 2018). Jalali et al. (2021) reportaram que a punicalagina presente na *P. granatum* possui atividade sequestradora do radical livre DPPH. Os antioxidantes estabilizam os elétrons para que a superfície a ser restaurada fique uniforme e não porosa, favorecendo os procedimentos adesivos (Suratno et al., 2021; Zhao & Yuan., 2021). Dessa forma, a análise da ação antioxidante dos extratos utilizados na superfície dental pode complementar os resultados obtidos nos ensaios de resistência de união.

Nesse estudo, a resistência de união do material ao substrato foi avaliada pelo teste de cisalhamento, no qual a restauração é rompida por uma força aplicada paralelamente à interface. O ensaio de cisalhamento tem sido amplamente empregado (Nivedita et al., 2019; Mishra et al., 2020; Souza-Gabriel 2020; Brauchli & Steineck et al., 2021) devido a possibilidade de padronizar os corpos-de-prova e permitir melhor distribuição das tensões na interface adesiva.

Optou-se por utilizar um sistema adesivo autocondicionante de um passo (Ecosite Bond, DMG) por dispensar o condicionamento ácido do protocolo restaurador, minimizando assim a sensibilidade pós procedimento restaurador (técnica de condicionamento seletivo) (Paken et al., 2021). Estudo recente, observou que a erosão dentinária reduz os valores de resistência adesiva, e que a interface adesiva pode ser aprimorada pelo uso do sistema adesivo autocondicionante em detrimento do condicionamento total (Kanniappan et al., 2022).

A resina composta selecionada foi nanohíbrida Bulk fill, a base de monômero DMA e Bis-GMA (Ecosite Bulk fill, DMG), por permitir a aplicação em incremento único e poupar tempo clínico, além de conferir contração de polimerização adequada (Cowen & Powers, 2018). No entanto, trata-se de uma marca comercial ainda pouco testada em estudos laboratoriais e clínico.

De modo geral, observou-se que a resistência de união da dentina erodida foi inferior à dentina hígida, o que está de acordo com a literatura (Cruz et al., 2015; Cersosimo et al., 2016; Belmar da Costa et al., 2021). Valores inferiores de resistência de união à microtração, bem como aumento da nanoinfiltração da interface resina/dentina foram observados na dentina erodida (Siqueira et al., 2018). Além disso, o condicionamento com ácido fosfórico na dentina erodida reduziu a resistência de união do adesivo universal/resina composta (Frattes et al., 2017).

Procedimentos restauradores adesivos em dentina erodida são significativamente prejudicados, independentemente da estratégia adesiva, pois a erosão causa queda do pH, aumenta a atividade de enzimas proteolíticas (Buzalaf et al., 2012) e gera infiltração incompleta do adesivo na matriz de colágeno (de Siqueira et al., 2018). A erosão dental causa degradação do colágeno não infiltrado e da camada híbrida com o passar dos anos (de Siqueira et al., 2018; de Siqueira et al., 2020). Recente revisão sistemática (Wiegand et al., 2021) demonstrou que a erosão dental interfere negativamente na resistência de união

imediata e após envelhecimento, principalmente na adesão à dentina, corroborando nossos resultados.

Os resultados do ensaio de resistência de união mostraram que a aplicação do extrato experimental a base de romã aumentou os valores de resistência de união em comparação ao controle, sem tratamento. Verificou-se que o protocolo de tratamentos com extrato de *P. granatum* foi capaz de manter a resistência adesiva do material à dentina erodida após envelhecimento. Em contrapartida, na dentina erodida e sem tratamento com o extrato, houve queda significativa dos valores de resistência de união após 12 meses de degradação.

Acredita-se que os flavonóides presentes nos extratos naturais sejam capazes de induzir ligações moleculares de colágeno e melhorar as propriedades mecânicas da dentina, bem como funcionar como inibidores de MMPs e impedir a degradação precoce da interface adesiva (Baldion & Betancourt, 2021; Paik et al., 2022). Além disso, os compostos naturais contendo bioativos melhoram a molhabilidade do substrato dental e deixam a superfície quimicamente preparada para os procedimentos adesivos (Ururahy et al., 2017).

Até o momento, a literatura traz apenas dois estudos de resistência adesiva da resina à dentina pré-tratada com extrato de *P. granatum* (Ziotti et al., 2016; Sajana et al., 2020), pois os demais se relacionam a pós-tratamento em substrato que recebeu clareamento (Sharafeddin & Farshad, 2015; Souza-Gabriel et al., 2020; Suratno et al., 2021; Abodahb et al., 2022). O estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Ziotti et al., 2016) não encontrou resultados promissores com a solução de romã, provavelmente devido ao método de preparo da solução (pó comercial aquecido em água), que ocasionou resíduos da solução na dentina, além da baixa concentração do bioativo (0,5%). Em contrapartida, Sajana et al. (2020) reportaram aumento na resistência adesiva quando a dentina hígida foi tratada com extrato de romã 20%.

Em relação aos tipos de falhas, verificou-se predomínio de falhas adesivas na análise imediata da dentina erodida tratada apenas com água e dentina erodida tratada com extrato de *P. granatum*. Esses achados estão em concordância com estudos prévios (Milosevic et al., 2016; Frattes et al., 2017) que relataram maior prevalência de falhas adesiva em dentes erodidos, sugerindo fragilidade na união do material ao substrato.

Na análise após 12 meses de envelhecimento da interface adesiva, observou-se maior índice de falhas mistas na dentina hígida tratada com água, e nas dentinas hígida e erodida tratadas com extrato de *P. granatum*. A literatura sugere que a maior porcentagem de falhas mistas representa melhor interface adesiva, e o que reflete em melhores valores de resistência de união (Fang et al., 2012).

A interface adesiva foi analisada qualitativamente por MEV, método pelo qual se consegue observar a topografia da superfície com adequado contraste e alta resolução de imagem (Salim et al., 2018; Paken et al., 2021). Observou-se, que o processo erosivo causou desmineralização da dentina peri e intertubular, e a degradação da matriz provavelmente causou redução no número de *tags* resinosos na dentina tratada apenas com água. Esses achados estão de acordo com estudos prévios em dentina (Siqueira et al., 2018; Giacomini et al., 2019), que sugerem que a alterações morfológicas causadas pela erosão possam refletir em valores menores de resistência de união do material restaurador. A redução dos *tags* resinosos nos grupos erodidos, reforça a ideia de que a matriz orgânica dentinária submetida a processo erosivo dificulta a penetração do sistema adesivo, devido à fragilidade das fibras, o que prejudica a hibridização e acelera a degradação da interface (Zimmerli et al., 2012; Belmar da Costa et al., 2021). Hanzen et al. (2022) observaram reduzida nanoinfiltração do adesivo universal em substrato erodido após envelhecimento de 12 meses.

De modo geral, os espécimes apresentaram boa interface adesiva, sugestiva de camada híbrida uniforme e com *tags* resinosos. A presença de boa interface adesiva observada nesse

estudo, está em concordância com os altos valores de resistência de união obtidos no ensaio de cisalhamento, provavelmente em decorrência do sistema restaurador selecionado, do cuidado durante a realização do protocolo restaurador e preparo das amostras para a análise me MEV.

Em suma, ressalta-se que esse estudo elucidou alguns benefícios do extrato hidroalcóolico de romã, aplicado na dentina, como potencial antioxidante e manutenção da resistência de união da resina ao longo do tempo. Todavia, por se tratar de um estudo que avaliou pela primeira vez o efeito do pré-tratamento da dentina erodida com extrato de romã na adesividade de uma resina composta bulk fill, torna-se difícil comparar diretamente os resultados observados com a literatura. Destaca-se, portanto, que os resultados encontrados foram promissores, e encorajam novas pesquisas laboratoriais e clínicas randomizadas, a fim de se esclarecer os reais benefícios do uso do extrato de romã no substrato dental.

Conclusões

Com base nos achados, e considerando as limitações metodológicas deste estudo, conclui-se que:

- O extrato experimental da casca de romã (*P. granatum*) apresentou potencial antioxidante comparados aos padrões sintéticos BHT e BHA;
- A dentina bovina erodida apresentou resistência adesiva ao cisalhamento inferior à dentina hígida;
- O processo erosivo influenciou negativamente a resistência adesiva imediata e envelhecida no cisalhamento do material resinoso.
- No decorrer de 12 meses de envelhecimento, o extrato experimental de *P. granatum* foi capaz de preservar a integridade da interface adesiva da dentina erodida;
- Em MEV verificou-se a presença boa interface adesiva com formação de *tags* resinosos, nos grupos controle e tratados com *P. granatum* 10%.

Referências

Abodahb SM, Nizay MA, ElKorashy ME. Effect of pomegranate and banana extracts on microshear bond strength of resin composite to bleached bovine enamel: An in vitro Study. ADJ. 2022;9(2):251-263.

Akhtar S, Ismail T, Fraternale D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and dietary characteristics. Food Chem. 2015;174:417-425.

Almahdy A, Koller G, Sauro S, Bartsch JW, Sherriff M, Watson TF, Banerjee A. Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. J Dent Res. 2012;91(6):605-611.

Autieri G, Mussano F, Petruzzi M, Carossa M, Genova T, Corsalini M, Carossa S. Proanthocyanidin may improve the shear bond strength at the composites/dentine interface. J Biol Regul Homeost Agents. 2018;32(4):1021-1025.

Baldion PA, Betancourt DE. Dataset on the effect of flavonoids on the stabilization of the resin-dentin interface. Data Brief. 2021;35:1-7.

Batista AL, Lins RD, de Souza Coelho R, do Nascimento Barbosa D, Moura Belém N, Alves Celestino FJ. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. Complement Ther Clin Pract. 2014;20(1):93-98.

Belmar da Costa M, Delgado AHS, Pinheiro de Melo T, Amorim T, Mano Azul A. Analysis of laboratory adhesion studies in eroded enamel and dentin: a scoping review. Biomater Investig Dent. 2021;8(1):24-38.

Bendary E, Francis RR, Ali HMG, Sarwat MI, El Hady S. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. Ann of Agri Sci. 2013; 58:173-181.

BenSaad LA, Kim KH, Quah CC, Kim WR, Shahimi M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. BMC Complement Altern Med. 2017;17(1):1-10.

Betancourt DE, Baldion PA, Castellanos JE. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer. Int J Biomater. 2019;2019:1-11.

Bhandari PR. Pomegranate (*Punica granatum L*). Ancient seeds for modern healing? Review of potential therapeutic applications. Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis. 2012;2:171-184.

Boly R, Lamkami T, Lompo M, Dubois J and Guissou I. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Two Extracts from Agelanthus dodoneifolius (Loranthaceae) Leaves. Int J Toxicol Pharmacol Res. 2016; 8:29-34.

Brauchli L, Steineck M. Etching Patterns of Self-Etching Primers in Relation to Shear Bond Strength on Unground Enamel Samples. Dent J (Basel). 2021;9(11):138-145.

Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, Pashley DH, Tay FR, Mazzoni A. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. Dent Mater. 2018;34(1):78-96.

Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion Adv Dent Res. 2012;24(2):72-76.

Canali GD, Ignácio SA, Rached RN, Souza EM. One-year clinical evaluation of bulk-fill flowable vs. regular nanofilled composite in non-carious cervical lesions. Clin Oral Investig. 2019;23(2):889-897.

Cersosimo MC, Matos AB, Couto RS, Marques MM, de Freitas PM. Short-pulse Er:YAG laser increases bond strength of composite resin to sound and eroded dentin. J Biomed Opt. 2016;21(4):1-6.

Chan AS, Tran TTK, Hsu YH, Liu SYS, Kroon J. A systematic review of dietary acids and habits on dental erosion in adolescents Int J Paediatr Dent. 2020;30(6):713-733.

Chesterman J, Jowett A, Gallacher A, Nixon P. Bulk-fill resin-based composite restorative materials: a review. Br Dent J. 2017;222(5):337-344.

Correia AMO, Tribst JPM, Matos FS, Platt JA, Caneppele TMF, Borges ALS. Polymerization shrinkage stresses in different restorative techniques for non-carious cervical lesions. J Dent. 2018;76:68-74.

Cowen M, Powers JM. Comparison of Important Properties of Ecosite Bulk Fill and Competitive Materials. Dent Advisor. 2018; 120:1-4.

Cruz JB, Bonini G, Lenzi TL, Imparato JC, Raggio DP. Bonding stability of adhesive systems to eroded dentin. Braz Oral Res. 2015;29(1):1-6.

Danesi F, Ferguson LR. Could Pomegranate Juice Help in the Control of Inflammatory Diseases? Nutrients. 2017;9(9):1-23.

De Carvalho MFF, Leijôto-Lannes ACN, Rodrigues MCN, Nogueira LC, Ferraz NKL, Moreira AN. Viability of bovine teeth as a substrate in bond strength tests: a systematic review and meta-analysis. J Adhes Dent. 2018; 20:471-479.

De Siqueira F, Cardenas A, Gomes GM, Chibinski AC, Gomes O, Bandeca MC, Loguercio AD, Gomes JC. Three-Year Effects of Deproteinization on the In Vitro Durability of Resin/Dentin-Eroded Interfaces Oper Dent. 2018;43(1):60-70.

De Siqueira FSF, Hilgemberg B, Araujo LCR, Hass V, Bandeca MC, Gomes JC, Reis A, Loguercio AD, Cardenas AFM. Improving bonding to eroded dentin by using collagen cross-linking agents: 2 years of water storage. Clin Oral Investig. 2020;24(2):809-822.

Deepak JC, Samuel SR. Effectiveness of Pomegranate Mouthrinse in Reducing Bacterial Plaque, Gingival Inflammation and Total Salivary Proteins over a Period of 90 Days: A Double-Blind Randomized Trial. J Int Acad Periodontol. 2018;20(3):110-114.

Donovan T, Nguyen-Ngoc C, Abd Alraheam I, Irusa K. Contemporary diagnosis and management of dental erosion. J Esthet Restor Dent. 2021;33(1):78-87.

Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, Novellino E, Santini A. Polyphenols: A concise overview of chemistry, occurrence and human health. Phyther Res. 2019; 33:2221–2243.

Eghbali S, Askari SF, Avan R, Sahebkar A. Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. J Nutr Metab. 2021;1-22.

Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, Yousefi M, Tanomand A, Yousefi B, Mahmoudi S, Kafil HS. Chitosan biomaterials application in dentistry. Int J Biol Macromol. 2020;1(162): 956-974.

Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, Chen J. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. J Dent. 2012;40(6):458-466.

Favetti M, Schroeder T, Montagner AF, Correa MB, Pereira-Cenci T, Cenci MS. Effectiveness of pre-treatment with chlorhexidine in restoration retention: A 36-month follow-up randomized clinical trial. J Dent. 2017;60:44-49.

Fradeani M, Bacherini L, Turrini R, Buda M. Minimally Invasive Prosthetic Procedure (MIPP): Up to 12-Year Survival of Full-Mouth Rehabilitations in Patients with Severely Worn Dentition (Managed with Lithium Disilicate Ceramic Restorations). Int J Periodontics Restorative Dent. 2021;41(6):799-808.

Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. Dent Mater. 2016;32(2):41-53.

Frattes FC, Augusto MG, Torres CRG, Pucci CR, Borges AB. Bond Strength to Eroded Enamel and Dentin Using a Universal Adhesive System. J Adhes Dent. 2017;19(2):121-127.

Gallas, JA. Potencial antimicrobiano de extratos derivados da romã (Punica granatum L.) contra patógenos relacionados à infecção endodôntica [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018.

Ghavipour M, Sotoudeh G, Tavakoli E, Mowla K, Hasanzadeh J, Mazloom Z. Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in Rheumatoid Arthritis patients. Eur J Clin Nutr. 2017;71(1):92-96.

Giacomini C, Maurina R, Tomazoni F, Bellan MC, Alessandretti R, Galafassi D. Bond strength of restorations made using universal adhesive systems in teeth subjected to acid erosion. JOI. 2019;8(1):7-17.

Gillborg S, Åkerman S, Ekberg E. Tooth wear in Swedish adults-A cross-sectional study. J Oral Rehabil. 2020;47(2):235-245.

Hanafy SM, Abd El-Shafea YM, Saleh WD, Fathy HM. Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. J Genet Eng Biotechnol. 2021;19(1):80-90.

Hanzen TA, Gutiérrez MF, Matos TP, de Paula AM, de Siqueira FSF, Cardenas AFM, Garcia AV, Hernandez M, Loguercio AD, Reis A. A universal dental adhesive containing copper nanoparticles stabilizes the hybrid layer in eroded dentin after 1 year. Int J Adhes. 2022;113:1-10.

He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, Liang K, Gao Y, Yuan H, Li J, Li J, Cheng L, van Loveren C. Biomineralization of dentin. J Struct Biol. 2019;207(2):115-122.

Hoffmann L, Neuerer C, Heck K, Kunzelmann KH. Bulk-fill Composites Compared to a Nanohybrid Composite in Class-II Cavities - A Two-year Follow-Up Study. J Adhes Dent. 2021;23(5):389-396.

Jalali A, Kiafar M, Seddigh M, Zarshenas MM. Punica granatum as a Source of Natural Antioxidant and Antimicrobial Agent: A Comprehensive Review on Related Investigations. Curr Drug Discov Technol. 2021;18(2):207-224.

Kanniappan G, Hari P, Jujare RH. Comparative Evaluation of Resin Dentin Interface using Universal and Total- Etch Adhesive Systems on Sound and Eroded Dentin: In Vitro Study. Eur J Dent. 2022;16(1):153-160.

Kanzow P, Biermann J, Wiegand A. Questionnaire Survey on the Management of Erosive Tooth Wear. Oral Health Prev Dent. 2019;17(3):227-234.

Kawar N, Park SG, Schwartz JL, Callahan N, Obrez A, Yang B, Chen Z, Adami GR. Salivary microbiome with gastroesophageal reflux disease and treatment. Sci Rep. 2021;11(1):188-196.

Korkmaz E, Kaptan A. Cross-Sectional Analysis of Prevalence and Aetiological Factors of Dental Erosion in Turkish Children Aged 7-14 Years Oral Health Prev Dent. 2020;18(1):959-971.

Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Calvo Henriquez C, Mouawad F, Ristagno C, Barillari MR, Schindler A, Nacci A, Bouland C, Laino L, Saussez S. Laryngopharyngeal reflux, gastroesophageal reflux and dental disorders: A systematic review. PLoS One. 2020;15(8):1-16.

Lee J, Sung JM, Cho HJ, Woo SH, Kang MC, Yong HI, Kim TK, Lee H, Choi YS. Natural Extracts as Inhibitors of Microorganisms and Lipid Oxidation in Emulsion Sausage during Storage. Food Sci Anim Resour. 2021;41(6):1060-1077.

Mehta SB, Lima VP, Bronkhorst EM, Crins L, Bronkhorst H, Opdam NJM, Huysmans MDNJM, Loomans BAC. Clinical performance of direct composite resin restorations in a full mouth rehabilitation for patients with severe tooth wear: 5.5-year results. J Dent. 2021;112:1-8.

Michou S, Vannahme C, Ekstrand KR, Benetti AR. Detecting early erosive tooth wear using an intraoral scanner system. J Dent. 2020;100:1-7.

Milosevic A, Burnside G. The survival of direct composite restorations in the management of severe tooth wear including attrition and erosion: A prospective 8-year study. J Dent. 2016;44:13-19.

Mira-Sánchez MD, Castillo-Sánchez J, Morillas-Ruiz JM. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. Food Chem. 2020;309:1-10.

Mishra A, Koul M, Upadhyay VK, Abdullah A. A Comparative evaluation of shear bond strength of seventh- and eighth-generation self-etch dentin bonding agents in primary teeth: an in vitro study. Int J Clin Pediatr Dent. 2020;13(3):225-229.

Mitsagga C, Petrotos K, Giavasis I. Antimicrobial Properties of Lyophilized Extracts of Olive Fruit, Pomegranate and Orange Peel Extracts against Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria and Fungi In Vitro and in Food Matrices. Molec. 2021;26(22):7038-7054.

Mortensen D, Mulic A, Pallesen U, Twetman S. Awareness, knowledge and treatment decisions for erosive tooth wear: A case-based questionnaire among Danish dentists. Clin Exp Dent Res. 2021;7(1):56-62.

Niemeyer SH, Baumann T, Lussi A, Meyer-Lueckel H, Scaramucci T, Carvalho TS. Salivary pellicle modification with polyphenol-rich teas and natural extracts to improve protection against dental erosion. J Dent. 2020;105:1-8.

Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. Dent Mater. 2014;30(1):77-96.

Nivedita L, Prakash V, Mitthra S, Pearlin Mary NSG, Venkatesh A, Subbiya A. Evaluation of the effect of collagen stabilizing agents like chitosan and proanthocyanidin on the shear bond strength to dentin and microleakage of resin composite at enamel and cemental walls: An in vitro study. J Conserv Dent. 2019;22(5):483-489.

Orak H.H, Yagar H, Isbilir S.S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (Punica granatum L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. Food Sci Biotechnol 2012;21:373–387.

Paken G, Çömlekoğlu ME, Sonugelen M. Detection of the hybrid layer biodegradation initiation factor with a scanning electron microscope. Microsc Res Tech. 2021;84(9):2166-2175.

Paik Y, Kim JH, Yoo KH, Yoon SY, Kim YI. Dentin Biomodification with Flavonoids and Calcium Phosphate Ion Clusters to Improve Dentin Bonding Stability. Materials (Basel). 2022;15(4):1494-1507.

Peng SY, Hsiao CC, Lan TH, Yen CY, Farooqi AA, Cheng CM, Tang JY, Yu TJ, Yeh YC, Chuang YT, Chiu CC, Chang HW. Pomegranate extract inhibits migration and invasion

of oral cancer cells by downregulating matrix metalloproteinase-2/9 and epithelial-mesenchymal transition. Environ Toxicol. 2020;35(6):673-682.

Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. J Esthet Restor Dent. 2013;25(4):219-241.

Peršurić Ž, Saftić Martinović L, Malenica M, Gobin I, Pedisić S, Dragović-Uzelac V, Kraljević Pavelić S. Assessment of the Biological Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of Pomegranate (Punica granatum L.) Peels. Molec. 2020;25(24):5916-5929.

Pini NP, De Marchi LM, Ramos AL, Pascotto RC. Minimally Invasive Adhesive Rehabilitation for a Patient With Tooth Erosion: Seven-year Follow-up. Oper Dent. 2019;44(1):45-57.

Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radic Biol Med. 1999;27(12):1173-1181.

Ramos RQ, Coelho NF, Lopes GC. Three-year Follow-up of Conservative Direct Composite Veneers on Eroded Teeth. Oper Dent. 2022 *in press.*

Rana R, Kaushik M, Sharma R, Reddy P, Mehra N. Comparative evaluation of effects of natural antioxidants on the shear bond strength of composite resin to bleached enamel. Indian J Dent Res. 2019;30(1):112-116.

Rauber BF, Milani DC, Callegari-Jacques SM, Fornari L, Bonadeo NM, Fornari F. Predictors of dental erosions in patients evaluated with upper digestive endoscopy: a cross-sectional study. Odontol. 2020;108(4):723-729.

Rodriguez ES, Julio LM, Henning C, Diehl BW, Tomás MC, Ixtaina VY. Effect of natural antioxidants on the physicochemical properties and stability of freeze-dried microencapsulated chia seed oil. J Sci Food Agric. 2019;99(4):1682-1690.

Russo M, Fanali C, Tripodo G, Dugo P, Muleo R, Dugo L, De Gara L, Mondello L. Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (Punica granatum) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. Anal Bioanal Chem. 2018;410(15):3507-3520.

Sajana EM, Akhil YB, Lekshmy SD, Sreeja S, Lakshmi A. Effect of pomegranate peel extract on the shear bond strength of composite resin to dentin using etch& rinse adhesive system. JMSCR. 2020;08(11):123-129.

Salim Al-Ani AA, Mutluay M, Stape THS, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. Effect of various dimethyl sulfoxide concentrations on the durability of dentin bonding and hybrid layer quality. Dent Mater J. 2018;37(3):501-505.

Salwe KJ, Sachdev DO, Bahurupi Y, Kumarappan M. Evaluation of antidiabetic, hypolipedimic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of Punica granatum in male Wistar albino rats. J Nat Sci Biol Med. 2015;6(1):56-62.

Sharafeddin F, Farshad F. The Effect of Aloe Vera, Pomegranate Peel, Grape Seed Extract, Green Tea, and Sodium Ascorbate as Antioxidants on the Shear Bond Strength of Composite Resin to Home-bleached Enamel. J Dent (Shiraz). 2015;16(4):296-301.

Sarialioglu Gungor A, Donmez N. Dentin erosion preventive effects of various plant extracts: An in vitro atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and nanoindentation study. Microsc Res Tech. 2021;84(5):1042-1052.

Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on Punica granatum L. J Evid Based Complementary Altern Med. 2016;21(3):221-227.

Siqueira FSF, Cardenas AM, Ocampo JB, Hass V, Bandeca MC, Gomes JC, Reis A, Loguercio AD. Bonding Performance of Universal Adhesives to Eroded Dentin. J Adhes Dent. 2018;20(2):121-132.

Soares FZ, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. Dent Mater. 2016;32(11):1385-1393.

Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD, Scatolin RS, Corona SAM. Durability of resin on bleached dentin treated with antioxidant solutions or lasers. J Mech Behav Biomed Mater. 2020;104:1-11.

Suratno, IR, Dwiandhono I, Purnama, RB. Pomegranate (Punica granatum L.) gel extract as an antioxidant on the shear bond strength of a resin composite post-bleaching application with 40% hydrogen peroxide. Dent Jour (Gigi). 2021; 54(2):87-91.

Tulek A, Mulic A, Refsholt Stenhagen K, Galtung HK, Saeed M, Utheim TP, Khuu C, Galteland P, Sehic A. Dental erosion in mice with impaired salivary gland function. Acta Odontol Scand. 2020;78(5):390-400.

Ururahy MS, Curylofo-Zotti FA, Galo R, Nogueira LF, Ramos AP, Corona SA. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. Arch Oral Biol. 2017;75:68-73.

Vučić V, Grabež M, Trchounian A, Arsić A. Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review. Curr Pharm Des. 2019;25(16):1817-1827.

Warreth A, Abuhijleh E, Almaghribi MA, Mahwal G, Ashawish A. Tooth surface loss: A review of literature. Saudi Dent J. 2020;32(2):53-60.

Wiegand A, Lechte C, Kanzow P. Adhesion to eroded enamel and dentin: systematic review and meta-analysis. Dent Mater. 2021;37(12):1845-1853.

Zhao X, Yuan Z. Anthocyanins from Pomegranate (Punica granatum L.) and Their Role in Antioxidant Capacities in Vitro. Chem Biodivers. 2021;18(10):1-21.

Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res. 2014;3:1-8.

Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. Clin Oral Investig. 2012;16(5):1451-1461.

Ziotti IR, Palma-Dibb RG, Cornona SAM, Souza-Gabriel AE. Viability of using natural extracts in dental restorative treatment. Eur J Pharm Med Res. 2016;3:53-61.