



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ**  
**ODONTOLOGIA**

**MARIA EDUARDA MARTINS BENTES**

**EXTRATO ANTIOXIDANTE NATURAL DO CACAU (THEOBROMA CACAO L.) EM  
DIFERENTES VEÍCULOS REDUZ A EROÇÃO DENTINÁRIA IN VITRO?**

**BELÉM- PA**

**2025**



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ**  
**ODONTOLOGIA**

**MARIA EDUARDA MARTINS BENTES**

**EXTRATO ANTIOXIDANTE NATURAL DO CACAU (THEOBROMA CACAO L.) EM  
DIFERENTES VEÍCULOS REDUZ A EROSÃO DENTINÁRIA IN VITRO?**

Artigo apresentado ao curso de Odontologia do CESUPA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Odontologia.

Orientador(a): Prof.(a). Dr(a). Cristiane de Melo Alencar.

**BELÉM- PA**

**2025**

---

**Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)**  
**Biblioteca do CESUPA, Belém – PA**

---

\_\_\_\_\_ B475e Bentes, Maria Eduarda Martins.

Extrato antioxidante natural do cacau (*Theobroma cacao* L.) em diferentes veículos reduz a erosão dentinária in vitro? / Maria Eduarda Martins Bentes. — Belém, 2025.

24 p.: il. p&b.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro Universitário do Estado do Pará, Bacharelado em Odontologia, Belém, 2025.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane de Melo Alencar.

1. Dentes – Erupção. 2. Dentina. 3. Polifenóis. I. Alencar, Cristiane de Melo (orient.). II. Título.

CDD 617.675

---

\_\_\_\_\_ Regina Coeli Araújo Ribeiro CRB-2/739

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ

MARIA EDUARDA MARTINS BENTES

“ESTRATO ANTIOXIDANTE NATURAL DO CACAU (THEOBROMA CACAU L.) EM  
DIFERENTES VEÍCULOS REDUZ A EROÇÃO DENTINÁRIA *IN VITRO*?”.

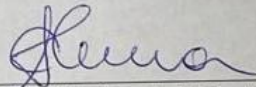
Trabalho de Curso apresentado para obtenção do grau de Cirurgião Dentista

da defesa: 05/06/2025  
Conceito:

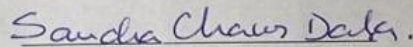
Aprovado

Aprovado com mudanças


Banca Examinadora



Prof.ª. Dra. Cristiane de Melo Alencar  
Centro Universitário do Pará



Prof.ª. MSc. Sandra Chaves Daher  
Centro Universitário do Pará



Prof. George Cley dos Santos Caracas  
Universidade Federal do Pará

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar o potencial anti-erosivo de uma solução e de um creme dental experimental enriquecidos com antioxidantes naturais derivados do cacau (*Theobroma cacao* L.) sobre a dentina erodida in vitro. Os grãos de cacau passaram pelos processos de fermentação, secagem, torrefação e moagem, seguidos de liofilização para obtenção do extrato aquoso de cacau. O extrato foi analisado quanto ao teor de polifenóis totais e potencial antioxidante utilizando o ensaio de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil). Posteriormente, foi desenvolvido um creme dental isento de ingredientes ativos, enriquecido com a solução concentrada de polifenóis de cacau. O potencial antioxidante do creme dental enriquecido foi avaliado por meio do método DPPH. Oitenta amostras de dentina bovina foram pré-erodidas em solução de ácido cítrico e randomizadas em quatro grupos (n=20): G1 (Controle negativo) – creme dental sem ingredientes ativos; G2 – solução concentrada de polifenóis de cacau; G3 – creme dental experimental enriquecido com solução concentrada de polifenóis de cacau; G4 (Controle positivo) – creme dental comercial anti-erosão Elmex Protect (Colgate). Após a aplicação dos materiais, os desafios erosivos foram realizados por três dias. A perda de superfície da dentina erodida (dSL-eroded) foi determinada por perfilometria óptica. A quantidade de colágeno degradado (dColl) foi calculada pela diferença entre a perda de superfície erodida (dSL-eroded) e a perda de superfície total (dSL-total) após imersão em solução salina contendo colagenase tipo VII. A liberação total de cálcio (CaR) foi avaliada por espectrometria de absorção atômica. Adicionalmente, uma análise qualitativa da superfície foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os resultados mostraram que o extrato de cacau apresentou maior teor de polifenóis totais em comparação ao creme dental enriquecido ( $p=0,037$ ). A atividade antioxidante diminuiu significativamente após a manipulação do creme dental ( $p=0,025$ ). O Grupo G2 apresentou os menores valores de perda de superfície dentinária erodida, colágeno degradado e perda total de superfície ( $p<0,05$ ). O Grupo G2 também apresentou a menor liberação de cálcio ( $p<0,05$ ). Nas imagens de MEV, o Grupo G3 exibiu um padrão de topografia com túbulos dentinários parcial ou totalmente ocluídos após o tratamento. Este estudo demonstrou que o extrato de cacau possui um maior conteúdo de polifenóis totais em comparação ao creme dental enriquecido, e que a solução experimental proposta exerceu efeito anti-erosivo, prevenindo o desgaste orgânico e inorgânico da dentina e promovendo a obliteração parcial dos túbulos dentinários.

**Palavras-chave:** Polifenol antioxidante; Dentina; Erosão.

## ABSTRACT

This study aimed to develop and evaluate the anti-erosive potential of a solution and an experimental toothpaste enriched with natural antioxidants derived from cocoa (*Theobroma cacao* L.) on eroded dentin in vitro. The cocoa beans went through a process of fermentation, drying, roasting and grinding, followed by freeze-drying and obtaining aqueous cocoa extract. The extract was analyzed for total polyphenols and antioxidant potential using the DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) assay. After, an active ingredient-free toothpaste was developed and enriched with the concentrated cocoa-based polyphenol solution. The antioxidant potential of toothpaste enriched by DPPH. Eighty bovine dentin samples were pre-eroded in citric acid solution and randomized into three groups (n=20): G1 (Negative control) – toothpaste without active ingredients; G2 – concentrated cocoa-based polyphenol solution; G3: experimental toothpaste enriched with a concentrated cocoa-based polyphenol solution; and G4 (Positive control) – Elmex Protect anti-erosive commercial toothpaste (Colgate). After applying the materials, the erosive challenges were performed for 3 days, the eroded dentine surface loss (dSL-eroded) was determined by optical profilometer. The amount of degraded collagen (dColl) was calculated as the difference between (dSL-eroded) and (dSL-total - by immersing them individually in a saline solution containing type VII collagenase). Total calcium release (CaR) were evaluated by atomic absorption spectrometer. Additionally, qualitative surface analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ( $\alpha = 0.05$ ). The results showed that the cocoa extract presented a higher value of total polyphenols when compared to the toothpaste enriched with cocoa extract ( $p = 0.037$ ). The antioxidant activity data showed a significant decrease when the toothpaste was manipulated ( $p = 0.025$ ). Group G2 exhibited the lowest values for total dSL-eroded, dColl, and dSL-total when compared to other groups ( $p < 0.05$ ). Group G2 exhibited the lowest values for calcium released to the citric acid ( $p < 0.05$ ). In the SEM images, G3 showed dentine surface topography pattern with the presence of partially or total occluded dentinal tubules after treatments. This study demonstrated that the cocoa extract exhibited a higher total polyphenol content compared to the toothpaste enriched with cocoa extract. The proposed experimental solution showed an anti-erosive effect, preventing both organic and inorganic wear of dentin and promoting partial obliteration of dentinal tubules.

**Keywords:** Antioxidant polyphenol; Dentin; Erosion.

## 1 INTRODUÇÃO

O desgaste dental erosivo, caracterizado pela perda progressiva dos tecidos duros dentários devido a processos químicos que não envolvem ação bacteriana, tem se tornado cada vez mais prevalente em todo o mundo. Estudos indicam que sua ocorrência abrange diversas faixas etárias, com notável prevalência entre adolescentes e adultos jovens, principalmente devido a fatores alimentares e de estilo de vida. Uma revisão sistemática relatou que a prevalência de erosão dentária em crianças e adolescentes varia de 30% a 50% em diferentes populações<sup>1</sup>. A patogênese do desgaste dental erosivo envolve a desmineralização das superfícies de esmalte e dentina quando expostas a ácidos com pH abaixo do limiar crítico para dissolução da hidroxiapatita (aproximadamente pH 5,5). Este processo é agravado por fatores intrínsecos, como o ácido gástrico relacionado à doença do refluxo gastroesofágico, e fatores extrínsecos, incluindo o consumo frequente de alimentos e bebidas ácidas<sup>2,3</sup>. Com o tempo, a exposição repetida ao ácido leva ao amolecimento e subsequente perda da superfície do esmalte, progredindo para a exposição da dentina e aumento da sensibilidade dentária<sup>4</sup>.

As intervenções terapêuticas para o manejo do desgaste erosivo dental concentram-se em estratégias preventivas, terapias de remineralização e, quando necessário, procedimentos restauradores<sup>5</sup>. As medidas preventivas incluem o aconselhamento dietético para reduzir a ingestão de substâncias ácidas e o uso de agentes que estimulam o fluxo salivar, melhorando a capacidade de tamponamento natural do ambiente bucal. As abordagens de remineralização geralmente envolvem a aplicação de produtos contendo flúor, que favorecem a formação de uma fase mineral mais resistente à ação ácida na superfície dentária<sup>6</sup>. Além disso, o uso de complexos de caseína fosfopeptídeo-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) tem sido explorado pelo seu potencial em promover a remineralização e inibir a desmineralização. Em casos de perda significativa da estrutura dentária, tratamentos restauradores com materiais adesivos podem ser indicados para restabelecer a função e a estética<sup>7</sup>.

O tetraluoreto de titânio ( $TiF_4$ ) emergiu como um agente promissor na prevenção e no manejo da erosão dentária devido ao seu mecanismo de ação único<sup>8</sup>. Quando aplicado aos tecidos dentários, o  $TiF_4$  interage com a superfície do esmalte, levando à formação de uma camada protetora semelhante a um esmalte vitrificado.

Essa camada é composta principalmente de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e compostos de flúor, que, em conjunto, aumentam a resistência do esmalte aos ataques ácidos<sup>9,10</sup>. Entretanto, embora a maioria dos estudos indique um efeito positivo do TiF<sub>4</sub> na prevenção da cárie e da erosão dentária, ainda não é possível chegar a conclusões definitivas devido à alta heterogeneidade metodológica dos estudos e à baixa qualidade das evidências disponíveis<sup>11</sup>.

Mais recentemente, agentes antioxidantes naturais vêm sendo investigados e têm demonstrado resultados promissores na prevenção do desgaste erosivo dental<sup>12,15</sup>. Em estágios avançados, as lesões de erosão expõem o substrato dentinário, tornando sua matriz orgânica altamente suscetível à degradação por metaloproteinases (MMPs)<sup>16</sup>. Essas enzimas, que apresentam forte atividade degradadora de colágeno, são produzidas inicialmente na forma de zimógenos inativos e podem ser ativadas por ambientes ácidos associados à erosão ou a tratamentos adesivos<sup>17,18</sup>. Para mitigar esse processo, foi desenvolvido o conceito de biomodificação da dentina, visando melhorar a estabilidade da interface adesiva. Esse método utiliza substâncias capazes de inibir a atividade das MMPs, modificando biologicamente o substrato dentinário e fortalecendo o colágeno contra a degradação enzimática<sup>19</sup>.

O *Theobroma cacao* contém compostos fenólicos em sua composição fitoquímica, os quais apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e outros efeitos biológicos que ressaltam seu valor nutricional e terapêutico para a saúde humana<sup>20</sup>. Os compostos polifenólicos são abundantes nas sementes de cacau, destacando-se o ácido clorogênico, ácido protocatecuico, epigalocatequina, galocatequina, epicatequina e procianidinas, além de metilxantinas como a cafeína, teobromina e teofilina<sup>21,23</sup>. A forte atividade antioxidante dos polifenóis presentes no cacau despertou significativo interesse científico e farmacológico em Odontologia para o desenvolvimento de novos materiais dentários derivados de suas sementes. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-erosivo de uma solução e de um creme dental experimental enriquecidos com antioxidantes naturais derivados do cacau (*Theobroma cacao L.*) sobre a dentina erodida in vitro. As hipóteses nulas foram: (H<sub>01</sub>) a utilização da solução contendo extrato antioxidante de *Theobroma cacao L.* não tem efeito sobre o controle da dentina erodida; (H<sub>02</sub>) a utilização do creme dental contendo extrato antioxidante de *Theobroma cacao L.* não tem efeito sobre o controle da dentina erodida.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS**

Cem incisivos bovinos foram seccionados transversalmente utilizando uma máquina automática de corte de precisão (Minitom, Struers, São Paulo, Brasil), a 1 mm apical à junção cimento-esmalte, para separar a coroa da raiz. A velocidade de corte foi ajustada manualmente para 350 rpm. Fragmentos de dentina radicular cervical da superfície vestibular foram seccionados com dimensões padronizadas de 4 mm de largura, 4 mm de comprimento e 2 mm de espessura. Um paquímetro foi utilizado para confirmar essas medidas. Os espécimes foram polidos com lixas de carbetto de silício (#600 e #1200 grãos, 3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) em movimentos circulares, sob refrigeração abundante com água, em uma politriz metalográfica (Arotec, São Paulo, Brasil). Para remoção dos detritos residuais gerados durante o polimento, os espécimes foram imersos em banho ultrassônico (Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil) por um ciclo conforme especificado pelo fabricante (3 minutos em água destilada). Em seguida, o perfil inicial das amostras foi medido utilizando um perfilômetro óptico 3D sem contato (Nanovea PS50 Optical, NANOVEA Inc., Irvine, CA, EUA), e metade da superfície de cada amostra foi protegida com esmalte de unha vermelho (Risqué®, São Paulo, Brasil), para servir como controle. Vinte blocos de dentina foram excluídos por apresentarem perfil inicial anômalo, e 80 amostras de dentina foram numeradas e randomizadas em quatro grupos (n=20). Dessa forma, os valores médios de rugosidade linear inicial não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (análise de variância [ANOVA];  $\alpha = 0,05$ ).

### **2.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO ANTIOXIDANTE BASE**

Os frutos de cacau de várzea foram colhidos em março de 2023 na região conhecida como Rio ou Furo Tauaré, localizada no município de Mocajuba, Pará (2° 35' 2" S, 49° 30' 25" W). Os frutos de cacau foram coletados e abertos de acordo com as práticas estabelecidas pelo produtor local. As amêndoas de cacau de várzea passaram por um processo de fermentação, secagem, torrefação e moagem das amêndoas ou nibs<sup>24</sup>,

seguido de transformação em polpa e armazenamento em freezer a -18 °C por 72 horas. Posteriormente, foi realizada a liofilização com modificações baseadas no estudo de Ioannone et al. (2015)<sup>25</sup>. Essa etapa foi conduzida em liofilizador (Liobras, modelo Liotop L101) por 72 horas a -54 °C, seguida de selagem a vácuo (FUNKITCHEN) e congelamento a -19 °C. Após a finalização desta etapa, o pó de amêndoa liofilizado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. Após a liofilização, as sementes foram moídas utilizando um moinho analítico (Ika®, modelo A11B) e desengorduradas com n-hexano. O material resultante foi homogeneizado com agitador tipo vortex em solução aquosa de etanol a 50% (v/v). Em seguida, foi realizado um banho ultrassônico (Solid Steel, modelo SSBu 3.8L) por 45 minutos, com temperatura inicial de 25 °C e final de 40 °C. Após a remoção do sobrenadante do banho ultrassônico, realizou-se a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos<sup>26</sup>. Para a remoção do solvente/sobrenadante, foi adicionada água destilada a um frasco de vidro, o qual foi colocado em banho-maria tipo Dubnoff para evaporação do teor alcoólico das amostras de 85 mL obtidas. Esse processo teve duração de 45 minutos por dois dias (48 horas) a uma temperatura de 59,9 °C. Ao final, foram obtidos 45 mL de extrato aquoso, sendo 35 mL armazenados em frasco de vidro fosco e 10 mL reservados para a análise de polifenóis totais.

### **2.3 ANÁLISE DE POLINEFÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – DPPH – 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL**

O conteúdo total de fenóis (TPC) foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, com auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis (SECOMAM, modelo UV Line 9400, Alès, França), em comprimento de onda de 750 nm<sup>27</sup>. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra, com base em uma curva de calibração de ácido gálico ( $y = 0,2213x - 0,1924$ ,  $R^2 = 0,9933$ ). O método do pH diferencial, adaptado de Mihai et al.<sup>28</sup> com pequenas modificações, foi utilizado. A mistura contendo 100 µL do extrato de cacau e 900 µL de soluções tampão (NaCl, pH 1,0, e C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, pH 4,5) foi preparada. As leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 530 nm e 700 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (GENESYS™, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em miligramas de cianidina-3-glicosídeo por 100 gramas de amostra.

## **2.4 OBTENÇÃO DO CREME DENTAL ENRIQUECIDO COM EXTRATO DE CACAU**

Um creme dental base, sem ingrediente ativo, foi desenvolvido com a seguinte composição: carboximetilcelulose (CMC), glicerina, metilparabeno, sorbitol, sílica abrasiva, dióxido de titânio, cocamidopropil betaína e água q.s. (manipulado na farmácia da UNESP). O creme dental base destinado ao grupo experimental foi diluído/enriquecido para formar uma pasta (slurry) na proporção de 1 parte de creme dental para 3 partes de solução de cacau. Nos grupos controle negativo e positivo, os cremes dentais foram diluídos para formar a pasta (slurry) na proporção de 1 parte de creme dental para 3 partes de água deionizada (em peso) para o tratamento. O pH das misturas foi medido em triplicata utilizando um medidor de pH previamente calibrado com padrões de pH 4,1 e 7,0 (Orion 3-Star pH Bench Top, Thermo Electron Corporation, EUA). Além disso, o creme dental base enriquecido com extrato antioxidante de cacau também foi submetido à análise de potencial antioxidante utilizando o método DPPH, da mesma forma que o extrato inicial.

## **2.5 CRIAÇÃO DAS LESÕES EROSIVAS INICIAIS, TRATAMENTO E DESAFIO EROSIVO**

Uma lesão erosiva inicial foi criada por meio da aplicação de ácido cítrico a 1% (pH 2,6), por 10 minutos<sup>29</sup>. Esse protocolo foi realizado em placas acrílicas de 24 poços, sendo que cada amostra foi inserida em um poço específico. Em seguida, cada amostra foi lavada com água destilada por 10 segundos utilizando uma pipeta milimetrada e, depois, seca com papel absorvente. Metade da superfície erodida das amostras foi coberta com fita de policloreto de vinila não plastificado (UPVC) para deixar descoberta uma janela de exposição de 4 × 2 mm<sup>30</sup>. Os espécimes de dentina foram divididos em 4 grupos (n=20): G1 (Controle negativo): creme dental sem ingredientes ativos; G2: solução concentrada de polifenóis à base de cacau; G3: creme dental experimental enriquecido com solução concentrada de polifenóis à base de cacau; G4 (Controle positivo): creme dental comercial anti-erosão Elmex Protect (Elmex® erosion protection, Colgate, GABA International AG, Grabetsmattaweg, Suíça). O protocolo de ciclagem erosiva foi realizado ao longo de um período de 3 dias, utilizando placas de 24 poços. Cada dia teve início com a aplicação do respectivo tratamento anti-erosivo de acordo com o grupo experimental. Após o tratamento, os

espécimes foram submetidos a dois desafios ácidos por dia, consistindo em imersão em solução de ácido cítrico a 1% (pH 2,6) por 10 minutos. Entre cada desafio ácido, as amostras foram imersas em saliva artificial (0,96 g/1000 mL – KCl; NaCl; MgCl<sub>2</sub>; KHPO<sub>4</sub>; CaCl<sub>2</sub>; carboximetilcelulose; sorbitol 70%; metilparabeno; propilparabeno e água deionizada) por 2 horas, para simular condições de recuperação. Ao final de cada dia, os espécimes foram armazenados em estufa a 37 °C. A solução de ácido cítrico foi trocada após cada exposição, e a saliva artificial foi renovada ao final do dia. Essa metodologia foi adaptada do estudo de Alencar et al. (2020)<sup>31</sup>.

## **2.6 PERDA DE SUPERFÍCIE DENTINÁRIA ERODIDA (DSL-ERODED)**

A perda de superfície dentinária erodida (dSL-eroded) foi determinada subtraindo-se a altura média da área exposta (2 mm) da altura média de ambas as áreas de referência, utilizando um perfilômetro 3D sem contato (Nanovea PS50 Optical, NANOVEA Inc., Irvine, CA, EUA). Os valores iniciais (superfície protegida com fita adesiva) foram subtraídos da superfície tratada e erodida para detectar a altura do degrau correspondente à perda de superfície. Em seguida, as amostras de dentina foram novamente protegidas com fita adesiva colocada nas mesmas áreas de referência utilizadas anteriormente. A matriz orgânica desmineralizada de todas as amostras foi removida por imersão individual em solução salina contendo colagenase tipo VII, proveniente da bactéria gram-positiva *Clostridium histolyticum* (100 U/ml; C0773, Sigma-Aldrich), por 96 horas a 37°C com agitação constante (70 rpm). Posteriormente, as fitas adesivas foram removidas, e a mesma área da superfície dentinária foi novamente medida com o perfilômetro, como feito anteriormente. A perda total de superfície dentinária (dSL-total) foi então determinada. A quantidade de colágeno degradado (dColl) foi calculada como a diferença entre dSL-eroded e dSL-total<sup>32</sup>.

## **2.7 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO NO ÁCIDO CÍTRICO**

Para quantificar a perda mineral da dentina, foi medida a quantidade de cálcio liberado no ácido cítrico após os ciclos erosivos. Para a liberação total de cálcio, 1 ml de ácido cítrico após cada ciclo erosivo foi misturado individualmente por amostra e analisado com um espectrômetro de absorção atômica (Aanalyst 400, Perkin-Elmer Analytical Instruments). A quantidade de cálcio medida foi normalizada pela área da superfície dentinária exposta<sup>33</sup>. A área foi medida usando um microscópio óptico conectado a

uma câmera (Leica, M420 e Leica DFC495, respectivamente), com ampliação de 20x e um software de análise (IM500). A quantidade total de liberação de cálcio (CaR) por amostra foi estimada considerando os três ciclos erosivos.

## **2.8 PADRÃO DE OBLITERAÇÃO- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

As imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT300 InTouchScope™ Scanning Electron Microscope, JEOL, Akishima, Tóquio, Japão). As amostras foram montadas em suportes de alumínio (12 mm de diâmetro) utilizando fita adesiva de carbono dupla face e recobertas com ouro por pulverização catódica durante 1,5 hora, depositando um filme com espessura média de 10 a 15 nm. As imagens foram geradas por detecção de elétrons secundários, utilizando uma voltagem de aceleração de 3,0 kV, distância de trabalho de aproximadamente 15 mm e ampliação de 1500x. As micrografias resultantes foram analisadas qualitativamente.

## **2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram avaliados com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, devido à distribuição normal dos grupos, foram utilizados testes paramétricos. Foi realizado um teste ANOVA One-way para comparação entre grupos para cada variável de resposta: análise de polifenóis totais, potencial antioxidante - DPPH, perda total de superfície dentinária (dSL-total), quantidade de colágeno degradado (dColl) e liberação de cálcio no ácido cítrico (CaR). Foi realizado o teste post hoc de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%, e as análises foram realizadas com o software SPSS, versão 13.0 (SPSS).

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 ANÁLISE DE POLIFENÓIS TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE – DPPH**

Os resultados mostraram que o extrato de cacau apresentou um valor mais elevado de polifenóis totais quando comparado ao creme dental enriquecido com extrato de cacau ( $p = 0,037$ ). Os dados da atividade antioxidante mostraram uma redução significativa quando o creme dental foi manipulado ( $p = 0,025$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Média (M) e desvio padrão ( $\pm$ DP) dos valores de teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH) do extrato de cacau e do creme dental enriquecido.

Compound	Cocoa extract	
	Total phenolics (mg GAE/100 g sample)	DPPH (IC <sub>50</sub> $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> )
Cocoa extract	324.18 ( $\pm$ 0.67) <sup>A</sup>	32.12 ( $\pm$ 2.97) <sup>A</sup>
Toothpaste enriched with cocoa extract	47.59 ( $\pm$ 0.88) <sup>B</sup>	135.41 ( $\pm$ 2.01) <sup>B</sup>

*Nota: Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).*

### 3.2 PERDA DE SUPERFÍCIE DE DENTINA ERODIDA (DSL-ERODED)

Os resultados estão apresentados na Tabela 2. O grupo G2 apresentou os menores valores de perda total de superfície dentinária, colágeno dentinário degradado e perda total de superfície dentinária ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos G3 e G4 em nenhuma das condições dentárias investigadas ( $p = 0,537$ ).

**Tabela 2.** Média (M) e desvio padrão ( $\pm$ DP) da perda de superfície de dentina erodida (dSLeroded), colágeno dentinário degradado (dColl) e perda total de superfície dentinária (dSLtotal) por perfilometria 3D.

Group	(dSL-eroded)	(dColl)	(dSL-total)
G1	-3.72 ( $\pm$ 0.98) <sup>Aa</sup>	-2,07 ( $\pm$ 0.31) <sup>Aa</sup>	-5.79 ( $\pm$ 1.59) <sup>Aa</sup>
G2	-0.33 ( $\pm$ 0.10) <sup>Ba</sup>	-0.14 ( $\pm$ 0.03) <sup>Ba</sup>	-0.47 ( $\pm$ 0.08) <sup>Ba</sup>
G3	- 1.94 ( $\pm$ 0.57) <sup>Ca</sup>	- 0.72 ( $\pm$ 0.21) <sup>Ca</sup>	- 2.66 ( $\pm$ 0.54) <sup>Ca</sup>
G4	- 1.59 ( $\pm$ 0.76) <sup>Ca</sup>	- 0.94 ( $\pm$ 0.13) <sup>Ca</sup>	- 2.53 ( $\pm$ 0.48) <sup>Ca</sup>

*Nota: Letras maiúsculas representam diferenças intergrupais estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ); letras minúsculas representam diferenças intragrupois significativas ( $p < 0,05$ ).*

### 3.3 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO EM ÁCIDO CÍTRICO

Os resultados estão apresentados na Tabela 3. O grupo G2 apresentou os menores valores de cálcio liberado em ácido cítrico ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos G3 e G4 em nenhuma das condições dentárias investigadas ( $p = 0,871$ ).

**Tabela 3.** Média (M) e desvio padrão ( $\pm$ DP) dos valores de cálcio total liberado em ácido cítrico após desafio abrasivo (CaR).

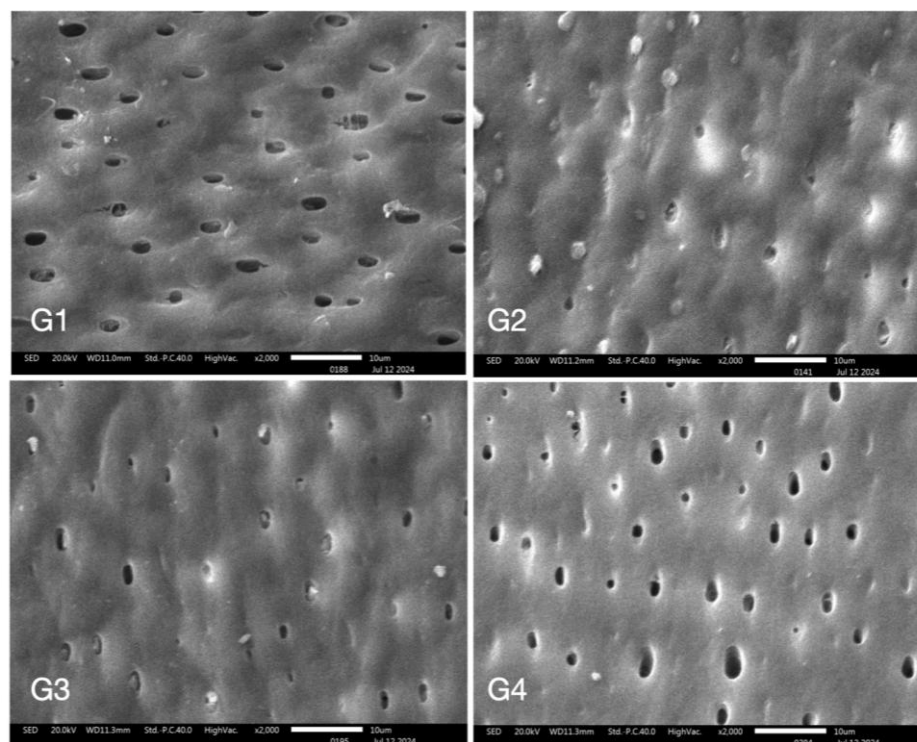
Group	(CaR)
G1	-72.41 ( $\pm$ 13.05) <sup>Aa</sup>
G2	-15.04 ( $\pm$ 08.02) <sup>Ba</sup>
G3	- 43.23 ( $\pm$ 18.77) <sup>Ba</sup>
G4	- 38.99 ( $\pm$ 16.98) <sup>Ca</sup>

*Nota: Letras maiúsculas representam diferenças intergrupais estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ); letras minúsculas representam diferenças intragrupois significativas ( $p < 0,05$ ).*

### 3.4 PADRÃO DE OBLITERAÇÃO – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nas imagens obtidas por MEV, o controle negativo apresentou a maior perda de estrutura dental, com maior número de túbulos dentinários expostos em comparação aos demais grupos. No entanto, o grupo G3 demonstrou proteção mais eficaz contra a erosão. Neste grupo, a topografia da superfície dentinária apresentou túbulos dentinários parcial ou totalmente obliterados após os tratamentos. Depósitos de

material foram observados sobre os túbulos dentinários em todos os grupos tratados,



exceto nos túbulos do grupo G3 (Figura 1).

**Figura 1.** Fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com aumento de 2000x.

#### 4. DISCUSSÃO

O cacau (*Theobroma cacao*) é amplamente reconhecido por sua rica composição química, especialmente no que diz respeito aos compostos fenólicos e à atividade antioxidante. Os principais compostos fenólicos presentes no cacau incluem flavonoides, como catequinas e epicatequinas, além de procianidinas. Esses compostos são responsáveis por diversas propriedades benéficas à saúde, incluindo uma potente atividade antioxidante, que auxilia na neutralização de radicais livres e na prevenção de danos celulares<sup>34</sup>. Por outro lado, a teobromina, principal metilxantina presente no *Theobroma cacao*, já demonstrou resultados promissores no aumento da dureza superficial e na melhoria da topografia do esmalte dentário humano<sup>35</sup>. Embora não existam estudos específicos sobre os efeitos do extrato de cacau na dentina erodida, uma revisão sistemática com metanálise recente, conduzida por da Silva et al. (2024)<sup>36</sup>, mostrou que a aplicação de *Theobroma cacao* pode aumentar a microdureza do esmalte dentário submetido a processos de

desmineralização, sendo eficaz na remineralização desse tecido, com resultados comparáveis ao uso de fluoreto.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o extrato de cacau apresentou um maior teor de polifenóis totais em comparação ao creme dental enriquecido com esse extrato. Por outro lado, os dados de atividade antioxidante obtidos pelo método de captura do DPPH mostraram uma redução significativa após a manipulação do creme dental, indicando perda da capacidade antioxidante em decorrência do manuseio. A elevada concentração de polifenóis na solução de cacau investigada está de acordo com pesquisas que relatam valores superiores a 300 mg GAE/100 g para derivados de cacau minimamente processados. No entanto, o teor desses compostos pode variar significativamente dependendo de fatores como a variedade do cacau, condições de cultivo, processos de fermentação, secagem e outros métodos de processamento<sup>37</sup>. Adicionalmente, a solução de cacau, com IC<sub>50</sub> de 32,12 µg/mL, indica uma atividade antioxidante potente, comparável à de outros compostos naturais ricos em polifenóis. Estudos mostram que extratos de cacau apresentam valores de IC<sub>50</sub> que variam conforme o processamento e a origem da amostra<sup>38,39</sup>.

O creme dental enriquecido, por sua vez, apresentou valor de 135,41 µg/mL, indicando menor capacidade antioxidante em relação à solução de cacau. Isso pode ser atribuído a diversos fatores: (1) Diluição dos compostos antioxidantes na matriz do creme dental, que contém agentes abrasivos, detergentes e espessantes, os quais podem reduzir a concentração efetiva de polifenóis disponíveis para neutralizar os radicais livres<sup>40</sup>; (2) Degradação dos polifenóis durante o processamento e armazenamento, por meio de oxidação ou interações com agentes estruturantes, o que pode dificultar a liberação e biodisponibilidade dos antioxidantes, tornando-os menos reativos no ensaio com DPPH<sup>41</sup>.

Com relação aos resultados de perda da superfície dentinária erodida, o grupo tratado com a solução de cacau apresentou os menores valores de perda total de superfície dentinária, colágeno dentinário degradado e perda total de superfície. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com creme dental experimental ou comercial em nenhuma das condições dentárias investigadas. Dessa forma, a hipótese H01 foi rejeitada e a H02 foi aceita. O processo de erosão dentária ocorre quando a exposição prolongada a ácidos de origem alimentar, gástrica ou bacteriana desequilibra o pH da superfície dentária e da saliva, reduzindo a

capacidade tamponante da saliva. Isso leva à perda de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) dos cristais de hidroxiapatita, tornando a dentina mais vulnerável e suscetível à erosão em comparação ao esmalte<sup>15</sup>. Além disso, a ação dos ácidos permite a liberação de enzimas como metaloproteinases da matriz (MMPs) e catepsina K, que degradam a matriz orgânica colagenosa, provocando o amolecimento da superfície dentária, intensificando a dissolução mineral, aumentando a rugosidade superficial e ocasionando perda de volume da dentina. Como consequência, podem surgir lesões superficiais no tecido dentário<sup>16</sup>.

Assim, o controle da atividade das MMPs e da ação dos ácidos sobre a estrutura dentária é essencial para evitar a progressão da degradação da matriz orgânica colagenosa e a perda adicional de minerais. Com esse objetivo, o presente estudo utilizou uma solução antioxidante extraída do cacau, que demonstrou eficácia significativa na prevenção do desgaste erosivo. O efeito promissor dessa solução pode ser atribuído à ação benéfica dos antioxidantes naturais na prevenção e controle da erosão dentinária, devido à sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibir enzimas que degradam a matriz orgânica<sup>42</sup>. Um estudo conduzido por Zanatta et al. (2017)<sup>43</sup> investigou especificamente o efeito de antioxidantes como polifenóis e flavonoides na inibição de MMPs, enzimas responsáveis pela degradação da matriz colagenosa da dentina. Ao bloquear a ação dessas enzimas, os antioxidantes naturais não apenas reduzem o amolecimento da superfície dentinária, como também evitam o aumento da rugosidade e a perda de volume tecidual, fatores que agravam a progressão das lesões erosivas.

Além disso, um estudo de Buzalaf & Pessan (2017)<sup>44</sup> destaca que muitos antioxidantes naturais, como os encontrados em extratos de chá verde e frutas cítricas, possuem propriedades anti-inflamatórias e remineralizantes, que podem complementar seus efeitos antierosivos. Esses compostos atuam sinergicamente na proteção da dentina, reduzindo a dissolução mineral e fortalecendo a estrutura dentária<sup>44</sup>. Outra explicação possível para o efeito antierosivo observado no grupo tratado com a solução antioxidante de cacau seria a presença da teobromina, um composto químico encontrado em plantas, particularmente nos grãos de cacau. A teobromina atua principalmente por dois mecanismos interligados: promoção da remineralização e inibição da desmineralização dos tecidos dentários. Estudos mostram que a teobromina facilita a incorporação de íons cálcio e fosfato na estrutura dental, fortalecendo a hidroxiapatita — principal componente mineral do esmalte e da

dentina<sup>45</sup>. Esse processo de remineralização é essencial para reparar microlesões e aumentar a resistência do dente aos ataques ácidos, o que poderia justificar os resultados promissores no controle da perda de íons cálcio observados no grupo tratado com a solução de cacau.

Paralelamente, a teobromina demonstrou capacidade de formar uma camada protetora sobre a superfície dentária, reduzindo a solubilidade do esmalte e da dentina em ambientes ácidos<sup>46</sup>. Isso poderia justificar os resultados das imagens de microscopia eletrônica de varredura deste estudo, que evidenciaram a obliteração parcial ou total dos túbulos dentinários nos grupos tratados com extrato de cacau em solução ou creme dental. Embora a quantificação da teobromina não tenha sido realizada nesta pesquisa, sua participação nos resultados observados pode ser inferida devido à sua alta concentração nos grãos de cacau<sup>43</sup>, produto utilizado neste estudo. A quantificação da teobromina é fortemente recomendada em investigações futuras, representando, portanto, uma limitação do presente estudo. A saliva é a principal aliada nos processos de desmineralização e remineralização. No entanto, a concentração disponível de íons fosfato e hidroxila livres é reduzida devido a alterações fisiológicas no pH, aumentando a solubilidade da apatita e, conseqüentemente, dificultando a formação de uma nova camada de hidroxiapatita. Isso reforça a necessidade do uso de dentifrícios remineralizantes para mitigar os efeitos do ataque ácido<sup>47</sup>. No presente estudo, utilizou-se saliva artificial, o que pode limitar os efeitos biomodificadores da película salivar no processo antierosivo. Os autores consideram essa uma limitação ao extrapolar os resultados in vitro desta pesquisa para condições clínicas reais.

## **5 CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato de cacau apresentou um maior teor total de polifenóis em comparação com o creme dental enriquecido com extrato de cacau. A solução experimental proposta mostrou um efeito antierosivo, prevenindo tanto o desgaste orgânico quanto o inorgânico da dentina e promovendo a obliteração parcial dos túbulos dentinários.

## **6 REFERÊNCIAS**

1. Dallavilla, G.G., da Silva Martins, D., Peralta-Mamani, M. et al. Prevalence of erosive tooth wear in risk group patients: systematic review. *Clin Oral Invest* 28, 588 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05963-1>
2. Martignon S, Bartlett D, Manton DJ, Martinez-Mier EA, Splieth C, Avila V. Epidemiology of Erosive Tooth Wear, Dental Fluorosis and Molar Incisor Hypomineralization in the American Continent. *Caries Res.* 2021;55(1):1-11. doi: 10.1159/000512483.
3. FDI World Dental Federation. Tooth Wear. *Int Dent J.* 2024 Feb;74(1):163-164. doi: 10.1016/j.identj.2023.10.007.
4. Oudkerk J, Grenade C, Davarpanah A, Vanheusden A, Vandemput S, Mainjot AK. Risk factors of tooth wear in permanent dentition: A scoping review. *J Oral Rehabil.* 2023 Oct;50(10):1110-1165. doi: 10.1111/joor.13489.
5. Donovan T, Nguyen-Ngoc C, Abd Alraheem I, Irusa K. Contemporary diagnosis and management of dental erosion. *J Esthet Restor Dent.* 2021 Jan;33(1):78-87. doi: 10.1111/jerd.12706.
6. Campus, G., Niu, J.Y., Sezer, B. et al. Prevention and management of dental erosion and decay. *BMC Oral Health* 24, 468 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12903-024-04257-y>
7. Né YGS, Souza-Monteiro D, Frazão DR, Alvarenga MOP, Aragão WAB, Fagundes NF, de Souza-Rodrigues RD, Lima RR. Treatment for dental erosion: a systematic review of in vitro studies. *PeerJ.* 2022 Nov 8;10:e13864. doi: 10.7717/peerj.13864.
8. Francese MM, Urasaki BAN, de Barros MC, Ferrari CR, Grizzo LT, Magalhães AC. Toothpaste containing TiF<sub>4</sub> and chitosan against erosive tooth wear in situ. *J Dent.* 2024 Jun;145:104977. doi: 10.1016/j.jdent.2024.104977.
9. Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Efficacy of TiF<sub>4</sub> and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive-abrasive wear. *Clin Oral Investig.* 2014 May;18(4):1097-1102. doi: 10.1007/s00784-013-1096-y.
10. Medeiros MID, Carlo HL, Santos RLD, Sousa FB, Castro RD, França RCS, Carvalho FG. TiF<sub>4</sub> varnish protects the retention of brackets to enamel after in vitro mild erosive challenge. *J Appl Oral Sci.* 2018 May 14;26:e20170222. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0222.
11. Chevitarese AB, França Leite KL, Marañón-Vásquez GA, Masterson D, Pithon M, Maia LC. What is the effectiveness of titanium tetrafluoride to prevent or treat dental

caries and tooth erosion? A systematic review. *Acta Odontol Scand.* 2022 Aug;80(6):441-456. doi: 10.1080/00016357.2022.2032329.

12. Grizzo IC, Ionta FQ, Carvalho TS, Buzalaf MAR, Rios D, Honório HM. Can the combination of proanthocyanidin and vitamin E or palm oil effectively protect enamel against in vitro erosive and abrasive challenges? *J Appl Oral Sci.* 2024 Jul 22;32:e20240100. doi: 10.1590/1678-7757-2024-0100.

13. Ionta FQ, Alencar CRB, Val PP, Boteon AP, Jordão MC, Honório HM, Buzalaf MAR, Rios D. Effect of vegetable oils applied over acquired enamel pellicle on initial erosion. *J Appl Oral Sci.* 2017 Jul-Aug;25(4):420-426. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0436.

14. Jiang NW, Hong DW, Attin T, Cheng H, Yu H. Quercetin reduces erosive dentin wear: Evidence from laboratory and clinical studies. *Dent Mater.* 2020 Nov;36(11):1430-1436. doi: 10.1016/j.dental.2020.08.013.

15. Rios D, Boteon AP, Di Leone CCL, Castelluccio TT, Mendonça FL, Ionta FQ, Buzalaf MAR, Carvalho TS. Vitamin E: A potential preventive approach against dental erosion-an in vitro short-term erosive study. *J Dent.* 2021 Oct;113:103781. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103781.

16. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res.* 2012 Sep;24(2):72-6. doi: 10.1177/0022034512455029.

17. Abreu BD, Scatolin RS, Corona SAM, Curylofo Zotti FA. Biomodification of eroded and abraded dentin with epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *J Mech Behav Biomed Mater.* 2023 Nov;147:106158. doi: 10.1016/j.jmbbm.2023.106158.

18. 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 Feb 3;2019:5268342. doi: 10.1155/2019/5268342.

19. Landmayer K, Liberatti GA, Farias-Neto AM, Wang L, Honório HM, Francisconi-Dos-Rios LF. Could applying gels containing chlorhexidine, epigallocatechin-3-gallate, or proanthocyanidin to control tooth wear progression improve bond strength to eroded dentin? *J Prosthet Dent.* 2020 Dec;124(6):798.e1-798.e7.

20. Decroix L, Tonoli C, Soares DD, Descat A, Driittij-Reijnders MJ, Weseler AR, Bast A, Stahl W, Heyman E, Meeusen R.. Acute cocoa Flavanols intake has minimal effects on exercise-induced oxidative stress and nitric oxide production in healthy cyclists: a randomized controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2017 Jan 14; doi.org/ 10.1186/s12970-017-0186-7.

21. Galvão EL, Silvestre JV, Cruz JN, Silva NCS. Cacao (*Theobroma cacao*): Uma visão geral de pesquisas atuais sobre os aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos. *Research, Society and Developmen*. 2024, 13 (5), doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v13i5.45810>
22. Jean-Marie, E., Jiang, W., Bereau, D., & Robinson, J. C. *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Botany, Composition and Pharmacological Activities of Pods and Seeds. *Foods*, 2022, 11(24), 3966. <https://doi.org/10.3390/foods11243966>
23. Ramos-Escudero, F., Casimiro-Gonzales, S., Fernández-Prior, Á., Chávez, K. C., Gómez-Mendoza, J., de la Fuente-Carmelino, L., & Muñoz, A. M. Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *LWT*, 2021, 147, 111629. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629>
24. PICKENHAGEN, W.; DIETRICH, P.; KEIL, B.; POLONSKY, J.; NOUAILLE, F.; LEDERER, E. Identification of the bitter principle from cocoa. *Helvetica Chimica Acta*, Basel, v. 58, n. 4, p. 1078-1086, 1975. PMID:1158737. <http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19750580411>
25. Ioannone F, Di Mattia CD, De Gregorio M, Sergi M, Serafini M, Sacchetti G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chem*. 2015 May 1;174:256-62. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.019.
26. Flores-Jiménez NT, Ulloa JA, Silvas JEU, Ramírez JCR, Ulloa PR, Rosales PUB, Carrillo YS, Leyva RG. Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. *Food Res Int*. 2019 Jul;121:947-956. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.025.
27. Melo, T.S.; Pires, T.C.; Engelmann, J.V.P.; Monteiro, A.L.O.; Maciel, L.F.; Bispo, E.d.S. Evaluation of the Content of Bioactive Compounds in Cocoa Beans during the Fermentation Process. *J. Food Sci. Technol*. 2020, 58, 1947–1957
28. Mihai, R.A.; Abarca, P.A.L.; Romero, B.A.T.; Florescu, L.I.; Catană, R.; Kosakyan, A. Abiotic Factors from Different Ecuadorian Regions and Their Contribution to Antioxidant, Metabolomic and Organoleptic Quality of *Theobroma cacao* L. Beans, Variety “Arriba Nacional”. *Plants* 2022, 11, 976
29. Buzalaf MA, Charone S, Tjanderhane L. Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion. *Caries Res*. 2015; 49 Suppl 1:30–7.

<https://doi.org/10.1159/000380885> PMID: 25871416]

30. ALENCAR, C. M. et al. Morphological and chemical effects of in-office and at-home desensitising agents containing sodium fluoride on eroded root dentin. *Arch Oral Biol*; v. 110, 104619. Feb. 2020. Zhu Z. P., Chen J., Chen Y., Ma Y. T., Yang Q. S., Fan Y. Q., et al. (2022). Extraction, structural characterization and antioxidant activity of turmeric polysaccharides. *LWT-Food Sci. Technol.* 154, 112805. [10.1016/J.LWT.2021.112805](https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112805)
31. Alencar CDM, Ribeiro MES, Zaniboni JF, Leandrin TP, Silva AM, Campos EAD. Anti-erosive profile of an experimental 5% SnCl<sub>2</sub> varnish containing different concentrations of NaF. *Braz Dent J.* 2022;33:68–76.
32. Niemeyer SH, Baumann T, Lussi A, Scaramucci T, Carvalho TS. Plant extracts have dual mechanism on the protection against dentine erosion: action on the dentine substrate and modification of the salivary pellicle. *Sci Rep.* 2023 May 1;13(1):7089. doi: [10.1038/s41598-023-34256-y](https://doi.org/10.1038/s41598-023-34256-y).
33. Carvalho TS, Pham K, Rios D, Niemeyer S, Baumann T. Synergistic effect between plant extracts and fluoride to protect against enamel erosion: An in vitro study. *PLoS One.* 2022;17(11):e0277552
34. Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Nov 15;15(10):2779-811. doi: [10.1089/ars.2010.3697](https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697). Epub 2011 Jun 13. PMID: 21470061; PMCID: PMC4696435.
35. Kargul B, Özcan M, Peker S, Nakamoto T, Simmons WB, Falster AU. Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: a pilot study. *Oral Health Prev Dent.* 2012;10(3):275-82. PMID: 23094271.
36. Silva AD, Gonçalves RDS, Catão MV. Theobromine for Remineralization of White Spot Lesions on Dental Enamel: A Systematic Review and Meta-analysis. *Oper Dent.* 2024 Jul 1;49(4):376-387. doi: [10.2341/23-153-LIT](https://doi.org/10.2341/23-153-LIT). PMID: 38987932.
37. Efraim, P., Alves, A. B., & Jardim, D. C. P.. (2011). Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(3), 181–201. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140300023>
38. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
39. Darwish AG, El-Sharkawy I, Tang C, Rao Q, Tan J. Investigation of Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Chocolate Fortified with Muscadine Grape Pomace.

Foods. 2023 Aug 22;12(17):3153. doi: 10.3390/foods12173153. PMID: 37685084; PMCID: PMC10487172.

40. Emmulo E, Ceccantoni B, Bellincontro A, Mencarelli F. Use of water and ethanol extracts from wine grape seed pomace to prepare an antioxidant toothpaste. *J Sci Food Agric*. 2021 Nov;101(14):5813-5818. doi: 10.1002/jsfa.11232. Epub 2021 May 3. PMID: 33792066; PMCID: PMC8519093.

41. Rosales TKO, Fabi JP. Valorization of polyphenolic compounds from food industry by-products for application in polysaccharide-based nanoparticles. *Front Nutr*. 2023 May 24;10:1144677. doi: 10.3389/fnut.2023.1144677. PMID: 37293672; PMCID: PMC10244521.

42. Hegde, M. N., & Hegde, P. (2013). Role of antioxidants in dental enamel protection: A review. *Journal of Dental Research and Review*, 1(1), 10-14. DOI: 10.4103/2348-2915.115000

43. Zanatta, R. F., Caneppele, T. M. F., & Torres, C. R. G. (2017). Antioxidant agents in the prevention of dental erosion: A literature review. *Brazilian Dental Journal*, 28(5), 497-506. DOI: 10.1590/0103-6440201701495

44. Buzalaf, M. A. R., & Pessan, J. P. (2017). Natural products as a strategy to control dental erosion. In *Bioactive Compounds and Oral Health* (pp. 123-136). Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-50023-7\_8

45. Amaechi, B. T., Porteous, N., Ramalingam, K., Mensinkai, P. K., & Ccahuana-Vasquez, R. A. Remineralization of artificial enamel lesions by theobromine. *Caries Research*, (2018) 52(1-2), 88-92. DOI: 10.1159/000484083

46. Ramos, A. P., Buzalaf, M. A. R., & Pessan, J. P. (2020). Theobromine as a promising agent for the prevention of dental erosion. *Journal of Dentistry*, 95, 103-109.

47. Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2014). Erosive tooth wear: A multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monographs in Oral Science*, 25, 1-15. DOI: 10.1159/000360380