



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Araçatuba

LUNA MARES LOPES DE OLIVEIRA

***Punica granatum*: quantificação de polifenóis de
extratos e potencial antifúngico contra *Candida
albicans***

Araçatuba
2016

LUNA MARES LOPES DE OLIVEIRA

***Punica granatum*: quantificação de polifenóis de
extratos e potencial antifúngico contra *Candida
albicans***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Débora Barros Barbosa

Araçatuba
2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48p	<p>Oliveira, Luna Mares Lopes de. Punica granatum: quantificação de polifenóis de extratos e potencial antifúngico contra <i>Candida albicans</i> / Luna Mares Lopes de Oliveira. – Araçatuba, 2016 43 f. : il. ; tab.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Débora Barros Barbosa</p> <p>1. <i>Punica Granatum</i> 2. Compostos fenólicos 3. <i>Candida albicans</i> 4. Taninos hidrolisáveis I. T.</p> <p>Black D15 CDD 617.695</p>
------	---

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos, Jomara Lopes Cabral, Alina Mares Lopes de Oliveira, Daniel Lopes de Oliveira, ao meu Neto Theo Lopes Santos.

Pelo amor e paciência nas extensas horas em que estive ausente, absorva na realização deste sonho.

Ao meu amado esposo, Enoque Gonçalves de Oliveira

Pelo amor, incentivo e paciência ao ouvir as minhas lamentações e por orar comigo pela minha superação diária.

A minha mãe Stella Mares da Silva e Silva

Pelas orações e palavras doces de incentivo.

Ao meu pai Manoel Nascimento Lopes da Silva

Por sua benção e por esperar pacientemente pelo mínimo de atenção.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS

Porque Ele existe!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Débora Barros Barbosa

Por acreditar em minha capacidade, pelas palavras de incentivo e orientações pessoalmente, por email, por telefone e gravadas por meio de aplicativo.

Ao programa DINTER da FOA/Araçatuba

A FAPESP (Proc. 2014/08643-2)

A CAPES (Proc. 88881.030445/2013-1)

Aos laboratórios da empresa Apis Flora (Apis Flora Industrial e Comercial LTDA., Ribeirão Preto, SP) e a Dra. Andresa Berretta e Silva e a sua equipe

A diretoria do Centro Universitário São Lucas – UNISL e em especial a minha amiga Juliana Sousa Closs Corrêa

Aos Doutorandos, Gabriela Lopes Fernandes (Gabi) e Renan Fernandes

Pelo grande apoio.

A minha banca avaliadora, Dr^a Adelisa Rodolfo Ferreira Tiveron, Dr^a Elaine Cristina Guerbach Conti Veira, Dr^a Denise Pedrine e Dr^a Cristiane Duque.

Pela valiosa contribuição.

AGRADECIMENTOS

A minha irmã Mara Lúcia Lopes Cabral

Pela presença em nossa vida diária neste último ano.

Aos meus irmão e sobrinhos

Pela torcida.

Aos diretores do Centro de Medicina Tropical de Rondônia

Pelo apoio, confiança e liberações do trabalho sem questionar.

Às minhas colegas de profissão, nutricionistas: Ana Alice, Ane Moura, Aline Rézio, Aline Sodré, Danielli Almeida, Danielle Teles e Saiane

Pelas palavras de estímulo e suporte nas minhas ausências.

Ao meu colega de trabalho Dr^o Paulo Siriano, no Centro Universitário São Lucas

A todas as minhas colegas de trabalho, nutricionistas, docentes no Centro Universitário São Lucas – UNISL

Pelo laço de amizade que nos une, que, sem sombra de dúvidas é verdadeiro.

Aos DINTER'S: Ana Giselle, Dino, Gustav, Isabel, Jaime, Kátia (em especial), Maria Rosa, Paulo, Rainier e Rui

Pelo companheirismo, risadas e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológica do DINTER: Prof. Célio Percinoto, Prof. Juliano Pelim Pessan, Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra, Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Robson Federico Cunha, Prof. Eloi Dezan Junior, Prof^a. Débora Barros Barbosa, Prof^a. Mirela Sanae Shinohara, Prof João Eduardo Gomes Filho, Prof^a. Denise Pedrini, Prof^a. Lucianne Cople Maia e prof. *Heitor* Marques Honório.

Pelos ensinamentos recebidos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Liliam Sayuri Mada

Pelo excelente trabalho e atenção prestada.

À bibliotecária Ana Claudia Manzatti Grieger

Pela simpatia, aliada a excelente qualidade de atenção e competência ao nos orientar sobre normas de formatação e sobre bases de dados.

Aos meus alunos do curso de nutrição do UNISL

Em especial àqueles que estiveram comigo na clínica de nutrição durante os últimos meses, pelas palavras de apoio e incentivo.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Concentração média (DP) de ácido elágico (mg/g) e do teor de fenóis totais expressos em ácido gálico (mg/g) para os extratos das diferentes partes da romã, de acordo com o método de extração. Material coletado em maio de 2015. (n=3) 25
- Tabela 2. Concentração média (DP) de ácido elágico (mg/g) e Fenóis totais obtida da casca, pelo método de extração em Soxhlet e percolação utilizando solvente hidroalcolico (etanol 70%), em datas diferentes de coleta da romã (T1: janeiro de 2015 e T2: maio de 2015). (n=3) 25
- Tabela 3. Desdobramento da interação entre métodos de extração (Soxhlet e percolação) e três materiais vegetais (casca, folha e semente de romã) para a variável fenóis totais (mg/g extrato). Material coletado em maio de 2015. (n=3) 26
- Tabela 4. Desdobramento da interação entre métodos de extração (Soxhlet e percolação) e três materiais vegetais (casca, folha e semente de romã) para a variável ácido elágico (mg/g extrato). Material coletado em maio de 2015. (n=3) 26
- Tabela 5. Rendimento da casca, folhas e sementes de romã ao final dos processos extratores em massa seca para posterior isolamento dos compostos fenólicos ácido elágico e ácido gálico. Material coletado em maio de 2015. (n=3) 27
- Tabela 6. Média do diâmetro em milímetros e desvio padrão (DP) dos halos de inibição dos extratos de romã normalizados para 1 mg ácido elágico / mL água deionizada, contra *Candida albicans* SC5314. Extratos da casca com material coletado em T1 (janeiro de 2015) e T2 (maio de 2015). (n = 3) 28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Compara o teor de ácido elágico (mg/g) de casca obtido pelo método de extração Soxhlet e percolação utilizando solvente hidroalcoólico (etanol 70%) em datas diferentes de coleta da romã: T1 em janeiro e T2 em maio de 2015. (* $p = 0,054$, indica diferença significativa no teor do composto extraído por percolação) $n = 3$ 28
- Figura 2. Compara o teor de fenóis totais (mg/g) de casca obtido pelo método de extração Soxhlet e percolação utilizando solvente hidroalcoólico (etanol 70%) em datas diferentes de coleta da romã: T1 em janeiro e T2 em maio de 2015.(*** $p = 0,054$, indica diferença muito significativa no teor do composto extraído por ambos os Métodos) $n = 3$ 28
- Figura 3. Teste de difusão em ágar das diferentes amostras, identificadas na Tabela 6 28

Oliveira LML. *Punica granatum*: quantificação de polifenóis de extratos e potencial antifúngico contra *Candida albicans* [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

As propriedades antimicrobianas da romã são atribuídas aos compostos fenólicos, mais especificamente aos taninos hidrolisáveis (THs) galotaninos (ácido gálico) e elagitaninos (ácido elágico), substâncias naturais de defesa da planta. Os objetivos deste estudo foram avaliar os níveis de ácido elágico e fenóis totais, rendimento dos métodos de extração e o potencial inibitório sobre *Candida albicans* de extratos de partes da *Punica granatum*. Amostras em triplicata de cascas, sementes e folhas desidratadas, trituradas, pulverizadas, foram submetidas a dois métodos de extração: soxhlet tendo como solventes etanol e metanol e percolação tendo como solvente o etanol. Após a obtenção dos extratos, foram determinados os teores de ácido elágico por cromatografia líquida de alta eficiência e fenóis totais expressos em ácido gálico pelo método espectrofotométrico. A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pelo método de difusão em disco, seguindo-se as normas do *National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS document M2-A8, 2003a.)*. As maiores concentrações de fenóis totais e de ácido elágico foram encontradas nas folhas e na casca da romã. Verificou-se maior eficiência de rendimento por meio da percolação. Os resultados de difusão em disco revelaram maior sensibilidade da cepa de *C. albicans* aos extratos etanólicos da casca por ambos os métodos de extração. O método percolação alcoólica a 70% e 25°C e a casca da romã apresentaram a maior eficiência de extração e de atividade anti-fúngica contra uma cepa clínica de *C. albicans*.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Compostos fenólicos. *Candida albicans*. Taninos hidrolisáveis.

Oliveira LML. *Punica granatum*: quantification of extract of polyphenols and potential antifungal against *candida albicans* [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

The antimicrobial properties of pomegranate are attributed to the phenolic compounds, more specifically the hydrolyzable tannins (THs) galotaninos (gallic acid) and elagitaninos (ellagic acid), natural plant defense substances. The objectives of this study were to evaluate the levels of ellagic acid and total phenols, yield of the extraction methods and the inhibitory potential against *Candida albicans* of extracts from parts of *Punica granatum*. Samples of dried, peels, seeds and leaves were used in triplicates and the extracts were obtained by Soxhlet system and percolation using respectively ethanol, methanol and ethanol solvents. After obtaining the extracts, the ellagic acid contents were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and total phenols expressed in gallic acid by the spectrophotometric method. The antimicrobial activity was evaluated by the disc diffusion method, following the standards of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS document M2-A8, 2003a.). The highest concentrations of THs were found in leaves and pomegranate peel. Greater yield efficiency was verified by percolation. The results of diffusion on disc revealed higher sensitivity of the *C. albicans* strain to the ethanolic extracts of peels by both methods of extraction, presenting inhibition halos of approximately 10 mm. The alcoholic percolation method at 70% and 25°C and the pomegranate peel showed the highest extraction efficiency and antifungal activity against a clinical strain of *C. albicans*.

Keywords: *Punica granatum*. Phenolic compounds. *Candida albicans*. Hydrolysable tannins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 Origem do material vegetal, químicos, solventes e equipamentos.....	14
2.2 Extrações	14
2.3 Determinação do ácido elágico e dos fenóis totais.....	15
2.4 Atividade antifúngica dos extratos	16
2.5 Tratamento estatístico.....	16
3 RESULTADOS	18
3.1 Concentração de ácido elágico e de fenóis totais	18
3.2 Análise de desdobramento da interação entre métodos de extração e partes da planta por extrato obtido (fenóis totais e ácido elágico).....	18
3.3 Potencial antifúngico dos extratos	19
4 DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO.....	24
TABELAS E FIGURAS.....	25
REFERÊNCIAS	28
APENDICES.....	35
ANEXOS.....	37

1 INTRODUÇÃO*

Com a resistência de microrganismos às drogas convencionais houve um avanço nas pesquisas sobre o potencial antimicrobiano de extratos e de óleos naturais de plantas isolados ou combinados entre si ou com medicamentos anti-infecciosos tradicionalmente empregados^{1,2}. Bactérias e fungos patogênicos que desenvolvem biofilmes podem ser até 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que os seus homólogos planctônicos³. Portanto, a descoberta de agentes com atividades antibiofilmes e capazes de provocar desarranjos em biofilmes pré-formados para, desta forma, favorecer a ação dos antimicrobianos e evitar a seleção de organismos mais resistentes, é necessária⁴. Entre os microrganismos resistentes a drogas, as espécies de *Candida* têm levado os cientistas a prestar atenção às ervas da medicina tradicional, devido ao fato destes serem fungos oportunistas responsáveis por infecções em pacientes imunocomprometidos com doenças fúngicas invasivas⁵ e são considerados como os principais patógenos em casos de estomatites por dentaduras⁶.

O conhecimento sobre a aplicação de partes de plantas para fins medicinais na saúde humana primária são resultados de experiências práticas, observações e rituais sócios religiosos milenares, passados através de gerações⁷. A escolha de plantas empregadas na saúde humana ocorre inicialmente pelos achados etinobotânicos. No entanto, a seleção ideal deve ser baseada em extensos e desafiadores estudos sobre a sua evolução fitoquímica^{8,9}.

A romã é o fruto de uma planta cujo nome científico é *Punica granatum*. É o único parente congênere da *Punica protopunica*, nativa do Himalaia, do norte da Índia para o Iran¹⁰. Pertence ao reino *Plantae*, filo *Tracheopyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Myrtales*, família *Lythraceae*, foi difundida na Ásia central, no Cáucaso e no sudoeste Mediterrâneo¹¹. O fruto é popularmente consumido in natura, sucos naturais e industriais, doces e geléias.

As propriedades fitoquímicas da romã são avaliadas em estudo no mundo todo por meio dos extratos de partes frescas e desidratadas de toda a planta, devido ao potencial antioxidante in vivo¹², atividade antibacteriana, antifúngica e antiinflamatório¹³, antimalarial¹⁴, antitumoral e antimutagênico¹⁵. Estas propriedades terapêuticas são atribuídas aos compostos fenólicos, substâncias que ocorrem da raiz as folhas da planta para protegê-la do estresse ambiental¹⁶.

* Normalização segundo a Journal of Applied Oral Science (ANEXO)

O ácido elágico e o ácido gálico são polifenóis respectivamente descritos na categoria de elagitaninos e galotaninos produzidos a partir da hidrólise destes¹⁷. Assim como os demais taninos, eles são produzidos pelo sistema de defesa da planta contra o ataque microbiano e de animais¹⁸, apresentando reconhecidas propriedades antioxidantes, fungicida contra *C. albicans*, entre outras atividades biológicas^{17,19,20}.

O uso secular da romã e seu potencial bioativo a torna alvo de estudos para identificar os seus constituintes químicos e como especificamente estes agem sobre os microrganismos. Anibal et al.²¹ avaliaram os extratos dos arilos, sementes, pericarpo, casca e fruto inteiro da romã. Verificaram grande atividade inibitória dos extratos de pericarpo e da casca pelo desarranjo de estruturas celulares e hifas em 10 espécies de *Candida* após 24 e 48h de crescimento. No entanto, houve resistência aos extratos de arilos e sementes. Os autores encontraram mais de 30 compostos ativos no extrato, com destaque para os taninos punicalagina e galagildilactona como os principais compostos envolvidos na atividade antifúngica, porém não desconsideraram o efeito sinérgico dos compostos encontrados.

O efeito do extrato etanólico da casca desidratada da romã foi avaliado quanto à formação, arquitetura e desarranjo de biofilmes, formado por microrganismos patogênicos de *S. aureus* (ATCC 11632), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33591), *E. coli* (ATCC 10536) e de *C. albicans* (ATCC 90028) por Bakkiyaraj et al.¹⁰. O extrato se mostrou potente em inibir a formação de hifas em *C. albicans*, que é umas das principais características de virulência, mas não apresentou impacto significativo no seu crescimento, reduziu a espessura do biofilme acentuadamente de todos os patógenos e reduziu o biofilme pré-formado de *C. albicans* (90%) e das bactérias *S. aureus* e *E. coli* (70%). O elagitanino ácido elágico foi o principal componente com atividade anti biofilme.

Existem mais de 8000 polifenóis com base no peso molecular e polaridade, dentro da diversidade ecológica e em todas as partes das plantas¹⁶, que poderiam ser explorados e avaliados devido, em sua maioria, aos efeitos benéficos à saúde humana. Portanto, Os objetivos deste estudo foram avaliar os níveis de ácido elágico e fenóis totais, rendimento dos métodos de extração e o potencial inibitório sobre *Candida albicans* de extratos de partes da *Punica granatum*. Amostras em triplicata de cascas, sementes e folhas desidratadas, trituradas, pulverizadas, foram submetidas a dois métodos de extração: soxhlet tendo como solventes etanol e metanol e percolação tendo como solvente o etanol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem do material vegetal, químicos, solventes e equipamentos.

As plantas de romã procedentes da Fazenda SETUO NOMIZO (Mirandópolis, São Paulo) foram colhidas em janeiro (T1) e maio (tempo T2) de 2015. Uma exsicata da droga vegetal (casca desidratada) foi depositada no Herbário da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Foram separadas as cascas, sementes e folhas que foram completamente secas em estufa a 45°C por 72 horas, trituradas, pulverizadas utilizando-se peneira com abertura de 1,70 mm e malha de 12 *mesh*, separadas as amostras em triplicatas para as extrações e armazenadas em tubos Facon 50 mL. (apêndice A, figura 1). As amostras foram pesadas em porta amostras de papel filtro em triplicata (apêndice A, figura 2).

O padrão de ácido elágico (lote BCBN4398V) e de ácido gálico (lote 071M0031V) foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, USA. O reagente Folin-Denis foi preparado utilizando-se reagente Fosfotúngstico-Fosfomolibdico (Qhemis - High Purity, Hexis, São Paulo, Brasil, lote 13081090), (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil, lote DCBD0807V) e carbonato de sódio (Cinética, São Paulo, Brasil - 99.5%, lote 22317). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) grau metanol adquirido da J.T. Baker (Mexico city, Mexico) e água purificada foi obtida usando-se o Milli-Q Direct Q-5 filter system (Millipore, Bedford, USA). Os reagentes analíticos ácido acético, hidróxido de sódio, ácido clorídrico foram adquiridos do Synth (Labsynth, Diadema, Brazil).

2.2 Extrações

A produção de extratos da casca, folhas e sementes ocorreu por meio de dois métodos: i) extração a quente (95°C) em sistema fechado Soxhlet, neste utilizou-se três amostras de 10 gramas do pó de cada parte da planta e como solvente o etanol a 70% (v/v) (figuras 3 e 4 do apêndice A), bem como a extração somente da casca para os testes de difusão em disco, utilizando-se como solvente metanol a 90% (v/v). ii) extração por maceração estática seguida de percolação²². Na etapa de maceração, utilizaram-se três amostras de 30 g de pó de cada parte da planta, adicionadas em frascos contendo 100 ml de solução de etanol a 70% (v/v), permanecendo em repouso por 1 hora, (figuras 6 do apêndice B). Após este período, 14 frações alcólicas foram obtidas por meio do percolador (figura 7 do apêndice B). A seguir,

os produtos das extrações por ambos os métodos, foram colocados em um balão volumétrico para evaporação do solvente e obtenção da massa do extrato bruto (extrato mole)²³ (Figuras 8 e 9 do Apêndice B). Alíquotas de 0,84 g, 0,167 g e 0,22 g do extrato mole, respectivamente extraídas pelos métodos de extração: metanólica por soxhlet, alcoólica por soxhlet e alcoólica por percolação, foram separadas para diluir em água na concentração de 1mg/ml de ácido elágico.

Foram obtidos extratos metanólico e etanólico por Soxhlet e etanólico por percolação a partir da casca de frutos coletados no período T1. E, apenas extratos etanólicos, tanto por Soxhlet quanto por percolação de casca, folhas e sementes de frutos coletadas no período T2.

2.3 Determinação do ácido elágico e dos fenóis totais

Os produtos das extrações das folhas, casca e semente foram preparados para a determinação do teor de taninos hidrolisáveis (THs). A determinação do teor de ácido elágico ocorreu por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, coluna de fase reversa Shimpack ODS C 18; 100 mm x 2,6 mm). Como fase móvel foram utilizados metanol grau HPLC em solução aquosa de ácido acético 2% com gradiente de eluição (0-7 min, 20-72,5% v/v metanol, 7-7,5 min, 72,5-95% v/v metanol, 7,5-8,5 min 95% v/v metanol, 8,5-9 min 95-20% v/v metanol, 9-10 min 20% v/v metanol) a um fluxo de 1,0 mL/min. A separação foi alcançada à 25°C. O volume de injeção foi de 5 µL e o comprimento de onda utilizado foi de 254 nm. A curva padrão de ácido elágico foi preparada em concentrações entre 6,25 e 100 µg/mL a partir de uma solução mãe a uma concentração de 200 µg/mL em metanol.

Os fenóis totais foram quantificados nos extratos da casca da romã, folhas e sementes pelo método espectrofotométrico com os resultados expressos em ácido gálico. Em balões volumétricos de 50 mL foram adicionados respectivamente 85, 95, 75 e 60 mg de extrato alcoólico por Soxhlet e alcoólico por percolação, completado o volume com água deionizada, homogeneizados em Vortex e agitados em banho de ultrassom por 30 min. Alíquotas de 0,5 ml receberam 2,5 mL de reagente de Folin-Denis e 5,0 mL de carbonato de sódio a 29% em balão de 50 mL, foram mantidas ao abrigo da luz e realizadas as leituras após 30 minutos em espectrofotômetro UV-Vis a 760 nm, todas analisadas em triplicata. A curva padrão de ácido gálico, foi preparada a partir de uma solução mãe (24,97mg/100ml de água destilada) em alíquotas de 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2 mL, adicionadas de 2,5 mL de reagente de Folin-Denis e 5,0 mL de carbonato de sódio 29%, lidas em espectrofotômetro UV-Vis a 760 nm.

2.4 Atividade antifúngica dos extratos

O método de difusão em disco foi utilizado para avaliar o potencial antifúngico dos extratos metanólicos e alcoólicos obtidos das diferentes partes da romã. Ele seguiu as normas do *National Committee for Clinical and Laboratory Standards (Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8, 2003a.)*²⁴. Para este ensaio utilizou-se uma cepa de *Candida albicans* (SC 5314) extraída de paciente com candidemia. Após ativação do microrganismo por 24 horas à 35°C em aerobiose, o inóculo foi preparado com turvação equivalente a 0,5 na escala MacFarland para posterior semeadura com swab de algodão em toda superfície do ágar Mueller Hinton (MH, Difco) contido em placa de Petri.

Os discos de papel filtro estéreis foram, então, embebidos em solução de cada amostra a ser testada por 5 minutos. O excesso da solução foi removido e o disco foi posicionado sobre o ágar inoculado, ficando a placa incubada em aerobiose por 20 horas à 35°C. A leitura da formação de halos de inibição foi realizada a olho nu e com o auxílio de uma régua milimetrada e fotografados. Foi interpretado como “sensível aos extratos” quando a zona de inibição formada a partir da borda do disco apresentou o diâmetro de 10 mm ou mais. Como “reação intermediária” em zona de inibição ≤ 9 mm e > 0 e não reagente se = 0. Esta interpretação foi adaptada de NCCLS, (2003)²⁴.

Todas as etapas dos processos metodológicos foram realizadas nas dependências dos laboratórios da empresa Apis Flora (Apis Flora Industrial e Comercial LTDA., Ribeirão Preto, SP) sob a supervisão da Dra. Andresa Barreta e Silva.

2.5 Tratamento estatístico

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os tratamentos para as extrações dispostos em esquema fatorial 2 x 3, sendo 2 métodos de extração (Soxhlet e percolação) e 3 materiais vegetais (casca, folha e semente de romã), com três repetições. A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas SISVAR e Graphpad PRISM 7.02 e todos os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP). Utilizou-se análise de variância ANOVA fator único, seguido do teste Tukey de comparação pareada mediante significância do teste f, o qual mostra a diferença entre as médias. Para avaliar o grau de interação ou relação de dependência entre as variáveis: método de extração e

parte da planta e procedeu-se o desdobramento pela média dos extratos. Os valores de probabilidade foram considerados estatisticamente significativos considerando-se o valor de $p < 0,05$. O rendimento de cada parte da planta em relação ao método em dois períodos de coleta (T1 e T2) foi discutido em valores proporcionais.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração de ácido elágico e de fenóis totais

O ácido elágico e fenóis totais (expressos em ácido gálico) foram encontrados em maior concentração nas folhas e na casca das amostras de romã e em concentrações muito baixas nas sementes pelos métodos de extração Soxhlet e percolação com solvente hidroalcoólico 70% ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Ao se comparar, a concentração de ácido elágico nas cascas de romã colhida em diferentes épocas do ano (janeiro e maio de 2015) e oriundas do mesmo produtor, não houve diferença na concentração de ácido elágico por percolação ($p = 0,054$) (Tabela 1 e Figura 1) e houve diferença significativa na concentração de fenóis totais por meio de ambos os métodos de extração (Tabela 1 e Figura 2).

3.2 Análise de desdobramento da interação entre métodos de extração e partes da planta por extrato obtido (fenóis totais e ácido elágico)

Verificou-se a relação de dependência entre as partes da planta e o método de extração na produção de compostos bioativos. A princípio avaliou-se o efeito da matéria prima sobre o rendimento em fenóis totais, neste caso, os valores da tabela 2 evidenciam que ocorreu efeito isolado da parte da planta sobre o rendimento de fenóis totais, com os maiores rendimentos observados para a folha em relação à casca e semente ($p < 0,05$), independente do método de extração. Não ocorreu efeito isolado do método de extração sobre a média de rendimento deste composto ($p < 0,05$), ou seja, o rendimento ocorreu independente do método. Entretanto, foi observada interação (influência mútua) significativa entre método de extração e as partes da planta utilizadas ($p < 0,05$).

Os valores da tabela 3 mostram que ocorreu efeito isolado da parte da planta sobre o rendimento de ácido elágico ($p < 0,05$), com os maiores rendimentos observados para a folha em relação à casca e semente, independente do método de extração, assim como observado para fenóis totais. Entretanto, diferente da concentração de fenóis totais, ocorreu efeito isolado do método sobre a média de rendimento de ácido elágico ($p < 0,05$). Com o desdobramento da

interação entre os métodos de extração e as partes da planta para a variável ácido elágico (mg/g extrato), verificou-se que houve interação significativa entre método de extração e a parte da planta utilizada ($p < 0,05$). Observou-se que a produção de fenóis totais da casca foi similar para ambos os métodos de extração ($p > 0,05$) (tabela 2), enquanto a folha apresentou diferença significativa no rendimento de ácido elágico entre os métodos (tabela 3) ($p < 0,05$). Houve maior eficiência de extração pelo método percolação comparada ao Soxhlet (Tabela 4).

3.3 Potencial antifúngico dos extratos

O ensaio de difusão em disco foi realizado com os extratos obtidos da casca no período T1 e novamente dela e das demais partes da planta (folhas e semente) no período T2. Os diâmetros da zona de inibição de crescimento do microrganismo variaram entre 0 e 10 milímetros em torno do disco (Tabela 5 e Figura 3).

A cepa testada com os extratos da casca em T1 foi resistente aos extratos da casca por Soxhlet e solvente metanólico, porém foi sensível aos extratos etanólicos da casca por ambos os métodos de extração (halo = 10 mm). Os extratos em T2, apresentaram halo de inibição entre 8 mm e 9 mm com os extratos da casca obtidos por ambos os métodos e com o extrato da folha por Soxhlet. Organismos com halos nestes diâmetros indicam reação intermediária, que remetem para a necessidade de novos testes²⁴. O extrato das sementes não inibiu o crescimento neste ensaio.

4 DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de antibióticos contribuiu e acelerou o processo emergente de microrganismos resistentes a antibióticos, em associação com os efeitos indesejados dos antifúngicos, têm provocado à busca de novos agentes antimicrobianos²¹. Os resultados da etnobotânica sobre o uso de plantas com efeito sobre microrganismos, elevou o número de estudos sobre identificação, isolamento e quantificação dos compostos bioativos naturais que possuem tal função^{1,2,21}, com destaque, para o ácido elágico e fenóis totais (padrão ácido gálico) presentes na romã pelos seus efeitos antioxidantes e antifúngicos^{17, 19,20}.

Todas as partes da romanzeira (da raiz às folhas), são aplicadas em uso popular e conseqüentemente às pesquisas científicas sobre antimicrobianos naturais¹²⁻¹⁶. No presente estudo, das três partes da planta avaliadas (folhas, cascas da fruta e sementes), a maior concentração de ácido elágico e fenóis totais foi encontrada nas folhas e na casca. Porém, a concentração em folhas, foi cerca de 4 vezes menor que a encontrada em sistema Soxhlet e solvente hidroalcoólico por Li et al.²⁵. Estes autores utilizaram folhas desidratadas à temperatura ambiente, o que diferiu do presente estudo onde a secagem ocorreu em estufa com temperatura aproximada de 45°C. De acordo com a literatura, as diferenças entre os resultados de extrações em plantas se devem às variações nas técnicas de extrações empregadas, na composição química e genotípica da planta, variedade, tipo de solo, local de origem, época da colheita, maturação, método de armazenamento²⁶⁻²⁹.

Outros estudos corroboram com o presente, em que os compostos bioativos da romã, como os polifenóis, elagitaninos e flavonoides concentraram-se principalmente no extrato da casca^{25,27,30}, a qual possui maior poder antioxidante comparado ao extrato de suco e sementes, incluindo-se a capacidade quelante de metais, importante no retardo da oxidação de espécies reativas de oxigênio catalisadas por metais²⁷. As menores concentrações destes compostos estão nas sementes, que apresentam de 12 a 20% de seu peso total composto de lipídeos²⁹. Isso também pode ser demonstrado no presente estudo, onde os valores de ácido elágico foram os mais baixos comparados aos encontrados nas demais partes da planta em ambos os métodos de extração empregados. Embora apresente baixa quantidade de THs, a maior concentração de óleo no extrato de sementes, comparado ao extrato de suco e da casca, eleva o poder antioxidante de seus fitoquímicos solúveis em óleo, tais como beta caroteno,

tocoferóis e flavonoide ácido punícico (ômega 5) que é um isômero do ácido graxo ômega 3²⁷.

Zhang et al.³¹ quantificaram polifenóis extraídos de diferentes partes da planta e também observaram maiores quantidades de polifenóis na casca (63,65 mg/g) e nas folhas (61,53 mg/g) e menores nas sementes (2,17 mg/g). Esses valores foram cerca de 5 vezes inferiores aos fenóis totais quantificados no presente estudo. Um dos fatores que pode ter determinado essa diferença, foi o congelamento da amostra a -80°C em nitrogênio líquido antes de ser pulverizada e ao método de extração em que os autores utilizaram água a 65°C como veículo extrator. A secagem e, tanto o congelamento quanto a estocagem em temperatura negativa por tempo prolongado (30 dias) afetam o teor de flavonóides em extrato de planta³².

Independente do método de extração, o extrato da casca tem sido aplicado pela concentração, diversidade e sinergismo de seus compostos fenólicos^{21,33}, como no caso da avaliação do extrato aquoso da casca de romã desidratada em temperatura ambiente, no efeito imunomodulador em fêmeas de ratos albinos suíços, infectadas para desenvolver hidatidose³⁴. Em seus resultados, os autores relatam que os animal do grupo infectado e tratado com o extrato, quando comparados aos controles não tratados e aos tratados com albendazol, também resposta imune moderada.

No presente estudo houve maior eficiência de extração pelo método percolação comparada ao Soxhlet, o que reforça a prioridade de utilização de extratos da casca de romã. Além disso, a casca é um subproduto do fruto com maior diversidade de compostos bioativos, onde mais de 30 foram identificados²¹ e grande potencial de aproveitamento destes¹⁰, além dos elagitaninos como seus principais fenóis³⁵. Embora a folha também se destaque por suas propriedades antioxidantes, é necessário maior volume de material biológico da planta para obter o mesmo peso, a ocorrência de metabólitos secundários em folhas de romã incluem limitações do tamanho da amostra, da variação geológica, das mudanças climáticas e difere em cada região da copa da árvore³⁶.

Ainda quanto aos métodos, a extração por Soxhlet consome menos tempo e solvente que a maceração e percolação. No entanto, a principal desvantagem de extração por Soxhlet é que o extrato é constantemente aquecido no ponto de ebulição do solvente, e este pode danificar compostos termolábeis e/ou iniciar a formação de artefatos. Enquanto a percolação

tem a vantagem de não degradar substâncias termolábeis, apesar da baixa solubilidade dos ativos a frio³⁷. Neste estudo, a percolação foi realizada sob baixa temperatura de aquecimento.

Quanto ao potencial antifúngico, no presente estudo a cepa de *C. albicans* foi resistente ao extrato metanólico e sensível ao extrato etanólico de casca obtido em T1, porém, houve reação intermediária aos extratos de casca e de folhas obtidos em T2. Estas são variações na concentração de compostos bioativos determinados pelo ambiente bem como pelo método de extração. Conforme verificado por Fawole et al.²³, os extratos metanólico e aquoso de cascas de romãs obtidas de sete diferentes cultivares na África dos Sul apresentaram potência antibacteriana variável contra duas bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 11775 e *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883) e duas bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6051 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12600). Somente o extrato metanólico foi efetivo. Segundo os autores, as diferenças de potência podem estar ligadas a variabilidade intra e inter-genética e variação espacial geo-ambiental, que geram heterogeneidade química, uma vez que as plantas enfrentam diferentes desafios abióticos e bióticos que alteram a expressão de metabólitos secundários.

A explicação para os resultados desta elevada atividade antimicrobiana, se deve ao teor de fenólicos e flavonóides 20 a 110 vezes maior no extrato de casca de romã que no suco³⁸. Além disso, a presença de compostos como epigallocatecna-3-galato, quercetina, ácido elágico, punicalagina e do ácido caféico agiriam, respectivamente, na efetividade contra microrganismos e na capacidade antioxidante da casca³⁹. Quanto às sementes, existe maior teor do ácido graxo poliinsaturado punicico (ômega 5) e esteróis com propriedades nefroprotetoras⁴⁰, além dos antioxidantes tocoferóis (vitamina E) e flavonóides, este último em menor quantidade²⁷.

Pagliarulo et al.⁴¹ avaliaram a atividade antimicrobiana do suco e do extrato alcoólico a 50% da casca de romã e identificaram as maiores quantidades de fenóis totais no extrato da casca. Pelo método de difusão em disco, os autores relataram que os extratos da casca, independente da concentração, demonstraram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*, formando zona de inibição de 15 – 30 mm semelhante ao controle com Ampicilina®. Estes resultados foram consideravelmente maiores que no presente estudo;

No que se refere ao solvente metanol, em contraste com o presente estudo em que a cepa de *C. albicans* foi resistente ao extrato metanólico, Al-Zoreky³³ relataram que fungos,

incluindo *Candida*, foram sensíveis aos extratos metanólico e aquoso utilizando o método ágar-difusão. Tayel e El-Tras⁴² avaliaram a atividade anti-*Candida* de aerossóis de extratos de casca de romã obtidos por sete diferentes solventes, em comparação com agentes antifúngicos tradicionais (Miconazol®, Tioconazol®, Terbinafin®) pelo ensaio de difusão em ágar, contra três cepas de *Candida*. Semelhante ao presente estudo, os autores observaram graus variados de atividade antifúngica dos extratos, por meio de zona de inibição variando entre 1,2 e 12,3 milímetros, bem como, dentre os solventes, as extrações metanólicas e etanolócas tiveram os maiores rendimentos e a melhor atividade anticandida.

Para explicar mecanismos de ação dos polifenóis da romã, existe a hipótese da sua atividade antioxidante direta contra patógenos que causam doenças na cavidade oral, pelo contato direto com os tecidos da mucosa oral antes de serem absorvidos e metabolizados e pela ativação de agliconas, porção não glicosídica dos taninos, por enzimas humanas e bacterianas. Além do envolvimento dos compostos bioativos no processo de transcrição genica e tradução de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular²⁹.

O teste de atividade antimicrobiana, difusão em disco, que foi realizado neste estudo, apesar de ser aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)²⁴ na pesquisa de novos agentes antimicrobianos, deve ser ampliando pelo teste de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (CFM), contra biofilmes desta e de outras cepas orais de *C. Albicans*. Sugerem-se estudos de atividade antimicrobiana dos extratos de romã dos compostos isolados, com espécies da microbiota oral e em biofilmes, assim como estudos in vivo.

5 CONCLUSÕES

Nas folhas e nas cascas da romã foram encontradas as maiores concentrações dos compostos fenóis totais (expressos em ácido gálico) e ácido elágico comparadas às sementes.

Apesar das folhas terem apresentado a maior média de rendimento para ambos os compostos, independente do método de extração, a casca apresentou a maior eficiência na produção de extrato por meio da percolação.

Não houve diferença de concentração de fenóis totais nos extratos obtidos da casca quando se estabelece a comparação entre os métodos soxhlet e percolação.

Existe potencial antimicrobiano do extrato de casca de romã contra a cepa de *Candida albicans* (SC 5314) e, recomenda-se a casca da romã e o método de extração percolação com solvente alcoólico a 70% como elegível para outros testes antimicrobianos.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Campara a concentração média (DP) de ácido elágico (mg/g) e Fenóis totais obtida da casca, pelo método de extração em Soxhlet e percolação utilizando solvente hidroalcolico (etanol 70%), em datas diferentes de coleta da romã (T1: janeiro de 2015 e T2: maio de 2015). (n=3).

Método de extração	Ácido elágico		Fenóis Totais	
	T1	T2	T1	T2
<i>Soxhlet</i>	5,963 (0,049) ^a	6,167 (0,172) ^a	326,56 (8,954) ^a	174,44(2,911) ^b
<i>Percolação</i>	4,542 (0,032) ^a	4,213 (0,097) ^a	372,33 (5,983) ^a	158,61 (4,525) ^b

*Letras sobrescritas representam as análises estatísticas: diferentes letras em linhas significam diferenças significativas, com $p < 0,05$ (Tukey).

Tabela 2. Desdobramento da interação entre métodos de extração (Soxhlet e percolação) e três materiais vegetais (casca, folha e semente de romã) para a variável fenóis totais (mg/g extrato). Material coletado em maio de 2015. (n=3).

Método de extração	Material			
	Folha	Casca	Semente	Média
<i>Soxhlet</i>	258,8 Ba	174,4 Ab	5,3 Ac	146,2 A
<i>Percolação</i>	286,5 Aa	158,6 Bb	6,2 Ac	150,4 A
Média	272,7a	166,4 b	5,8 c	CV (%) = 4,3

Valores seguidos de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). A, B, C: comparam a influencia do método sobre a parte da planta; a, b, c: comparam a influencia da parte da planta sobre o rendimento; Valores seguidos de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Ordem de valores estatísticos: $A > B > C$. CV: Coeficiente de variação.

Tabela 3. Desdobramento da interação entre métodos de extração (Soxhlet e percolação) e três materiais vegetais (casca, folha e semente de romã) para a variável ácido elágico (mg/g extrato). Material coletado em maio de 2015. (n=3).

Método de Extração	Material			
	Folha	Casca	Semente	Média
<i>Soxhlet</i>	8,9 Aa	6,2 Ab	0,8 Bc	5,3 A
<i>Percolação</i>	2,4 Bb	4,2 Ba	1,2 Ac	2,6 B
Média	5,7 a	5,2 b	1,0 c	CV (%) = 4,1

Valores seguidos de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ($p < 0,05$).

Tabela 4. Rendimento da casca, folhas e sementes de romã ao final dos processos extratores em massa seca para posterior isolamento dos compostos fenólicos ácido elágico e ácido gálico. Material coletado em maio de 2015. (n=3).

Parte da planta	Rendimento do processo em massa seca / método	
	Soxhlet	Percolação
<i>Folhas</i>	28,82%	29,20%
<i>Casca</i>	25,38%	35,71%
<i>Sementes</i>	4,67%	4,87%

Tabela 5 Média do diâmetro em milímetros e desvio padrão (DP) dos halos de inibição dos extratos de romã normalizados para 1 mg ácido elágico / mL água deionizada, contra *Candida albicans* SC5314. Extratos da casca com material coletado em T1 (janeiro de 2015) e T2 (maio de 2015). (n = 3)

Amostra	Parte da romã	Método de extração	Solvente	Diâmetro ± DP
T1				
CSM	Casca	Soxhlet à 95°C	Metanol 95%	R ± 0,00
CSE ₁	Casca	Soxhlet à 95°C	Etanol 70%	10 ± 0,00
CPE ₁	Casca	Percolação à 25°C	Etanol 70%	10 ± 0,00
T2				
CSE ₂	Casca	Soxhlet à 95°C	Etanol 70%	8 ± 0,00
CPE ₂	Casca	Percolação à 25°C	Etanol 70%	9 ± 0,58
FSE ₂	Folha	Soxhlet à 95°C	Etanol 70%	9 ± 0,58
FPE ₂	Folha	Percolação à 25°C	Etanol 70%	R ± 0,00
SSE ₂	Semente	Soxhlet à 95°C	Etanol 70%	R ± 0,00
SPE ₂	Semente	Percolação à 25°C	Etanol 70%	R ± 0,00
P	Suco	-	Água	R ± 0,00

R: resistente. Subscritos 1 e 2: tempo 1 e tempo 2; CSM: Casca Soxhlet metanólica; CSE₁: Casca soxhlet etanólica; CPE₁: Casca percolação etanólica; CSE₂: Casca soxhlet etanólica; CPE₂: Casca percolação etanólica; FSE₂: Folha soxhlet etanólica; FPE₂: Folha percolação etanólica; SSE₂: Semente soxhlet etanólica; SPE₂: Semente percolação etanólica.

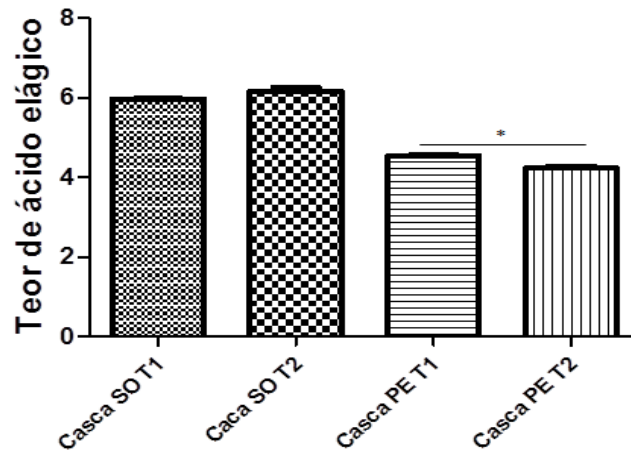


Figura 1. Compara o teor de ácido elágico (mg/g) de casca obtido pelo método de extração Soxhlet e percolação utilizando solvente hidroalcoólico (etanol 70%) em datas diferentes de coleta da romã: T1 em janeiro e T2 em maio de 2015. (* $p = 0,054$, indica diferença significativa no teor do composto extraído por percolação) $n = 3$.

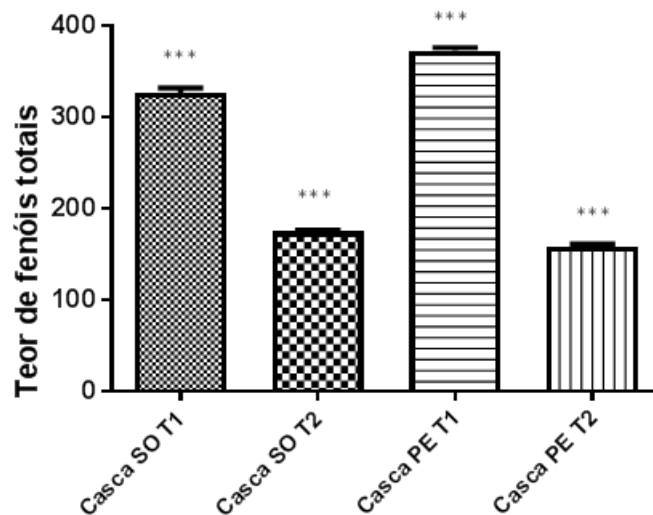


Figura 2. Compara o teor de fenóis totais (mg/g) de casca obtido pelo método de extração Soxhlet e percolação utilizando solvente hidroalcoólico (etanol 70%) em datas diferentes de coleta da romã: T1 em janeiro e T2 em maio de 2015. (***) $p = 0,054$, indica diferença muito significativa no teor do composto extraído por ambos os Métodos) $n = 3$.

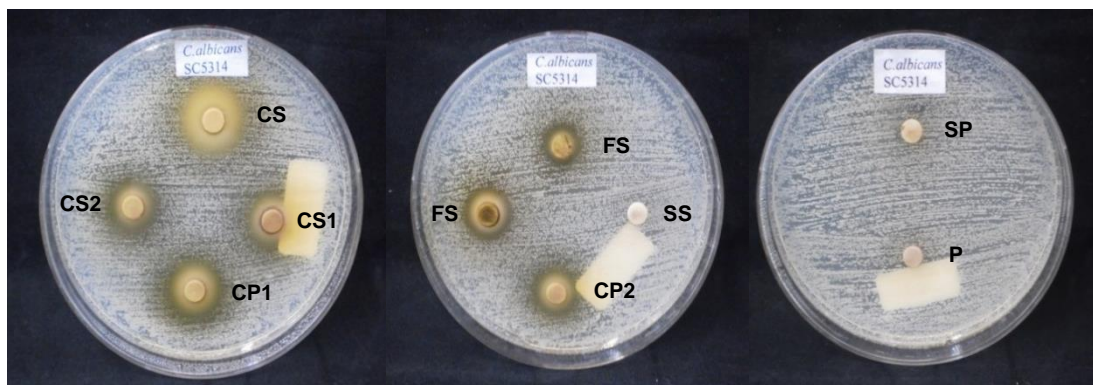


Figura 3. Teste de difusão em ágar das diferentes amostras, identificadas na Tabela 6.

REFERÊNCIAS

1. Aziz NAA, Ahmad MI, Naim DM. Molecular DNA identification of medicinal plants used by traditional healers in Malaysia. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):15937–47.
2. Das RK, Brar SK. Plant mediated green synthesis: modified approaches. *Nanoscale.* 2013;5(21):10155–62.
3. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 2005;100(1-2):80–4.
4. Verardo V, Garcia-salas P, Baldi E, Segura-carretero A, Fernandez-gutierrez A, Fiorenza Caboni M. Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. *FRIN* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;65:445–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.044>
5. Choudhury A, Lahiri Choudhury DK, Desai A, Duckworth JW, Easa PS, Johnsingh AJT, et al. The IUCN Red List Of Threatened Species [online]. 2016 [cited Ago10, 2016]. Available from: <http://www.iucnredlist.org/details/7140/0>
6. Emami A, Ganjkhanelou M, Nasri MHF, Zali A, Rashidi L. Pomegranate seed pulp as a novel replacement of dietary cereal grains for kids. *Small Rumin.* 2015;123(2–3):238–45.
7. Altuner EM. Investigation of antimicrobial activity of *Punica granatum* L . fruit peel ash used for protection against skin infections as folk remedies especially after male circumcision. *African J Microbiol Res.* 2011;5(20):3339–42.
8. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73(5):461–7.
9. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007;109(2):177–206.
10. Jadoon S, Karim S, Bin Asad MHH, Akram MR, Khan AK, Malik A, et al. Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:709628.

11. Usta C, Ozdemir S, Schiariti M, Puddu PE. The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64(7):907–13.
12. Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78(2):189–99.
13. Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol.* 2010;161(7):534–40.
14. Faria A, Calhau C. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(7):626–34.
15. Chinsembu KC. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Trop.* 2016;154:6–18.
16. Gul F, Shinwari ZK, Afzal I. Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of North West Punjab, Pakistan. *Pak J Bot.* 2012;44(5):1609–16.
17. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322–32.
18. Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling.* 2013;29(8):929–37.
19. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri A. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. *J Mycol Med.* 2014;24(4):e163–8.
20. Ferreira MAF, Pereira-Cenci T, Vasconcelos LMR, Rodrigues-Garcia RCM, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2):237–42.

21. Anibal PC, Teixeira IT, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):839-48.
22. Oliveira JR, Castro VC, Vilela PGF, Camargo SEA, Carvalho CAT, Jorge AOC, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:208.
23. Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:200.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard [online]. 2003 [cited Sept 4, 2016]. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Performance+Standards+for+Antimicrobial+Disk+Susceptibility+Tests;+Approved+Standard#0\nhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Performance+standards+for+antimicrobial+dis>
25. Li Y, Yang F, Zheng W, Hu M, Wang J, Ma S, et al. *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2016;80:227–35.
26. Fadavi A, Barzegar M, Azizi MH, Bayat M. Note: physicochemical composition of ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci Technol Int.* 2005;11(2):113–9.
27. Orak HH, Yagar H, Isbilir SS. 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(2):373–87.
28. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N. organic acids and phenolic compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J Food Compost Anal.* 2002;15(5):567–75.

29. Viuda-Martos M, Fernandez-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(6):635–54.
30. Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chem.* 2014;174:417-25.
31. Zhang LH, Li LL, Li YX, Zhang YH. In vitro antioxidant activities of fruits and leaves of pomegranate. *Acta Hortic.* 2008;765:31–4.
32. Diniz ACB, Astarita LV, Santarém ER. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. *Acta Bot Bras.* 2007;21(2):442–50.
33. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L .) fruit peels. *Int J Food Microbiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;134(3):244–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
34. Labsi M, Khelifi L, Mezioug D, Soufli I, Touil-Boukoffa C. Antihydatic and immunomodulatory effects of *Punica granatum* peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(3):211–20.
35. Li G, Xu Y, Wang X, Zhang B, Shi C, Zhang W, et al. Tannin-Rich Fraction from Pomegranate Rind Damages Membrane of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2014;11(4):313–9.
36. Zhang L, Gao Y, Zhang Y, Liu J, Yu J. Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves. *Sci Hortic.* 2010;123(4):543–6.
37. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural products isolation.* New Jersey: Humana; 2005.
38. Dey D, Debnath S, Hazra S, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum b-lactamase (ESBL) and metallo-b-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(12):4302-9.

39. Dey D, Ray R, Hazra B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharm Biol.* 2015;53(10):1474-80.
40. Prasad D, Kunnaiah R. *Punica granatum*: a review on its potential role in treating periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2014;18(4):428-32.
41. Pagliarulo C, De Vito V, Picariello G, Colicchio R, Pastore G, Salvatore P, et al. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chem.* 2016;190:824–31.
42. Tayel AA, El-Tras WF. Anticandidal activity of pomegranate peel extract aerosol as an applicable sanitizing method. *Mycoses.* 2010;53(2):117–22.
43. Assaf AM, Amro BI, Mashallah S, Haddadin RN. Antimicrobial and anti-inflammatory potential therapy for opportunistic microorganisms. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(5):494–505.
44. Foss SR, Nakamura C V, Ueda-Nakamura T, Cortez DA, ENdo EH, Dias Filho B. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13:32.
45. Finegold SM, Summanen PH, Corbett K, Downes J, Henning SM, Li Z. Pomegranate extract exhibits invitro activity against *Clostridium difficile*. *Nutrition.* 2014;30(10):1210–2.
46. Dabholkar CS, Shah M, Kathariya R, Bajaj M, Doshi Y. Comparative evaluation of antimicrobial activity of pomegranate-containing mouthwash against oral-biofilm forming organisms: An invitro microbial study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):65–9.
47. Medina MB. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agric Food Chem.* 2011;59(5):1565–71.

APENDICES

Apêndice A

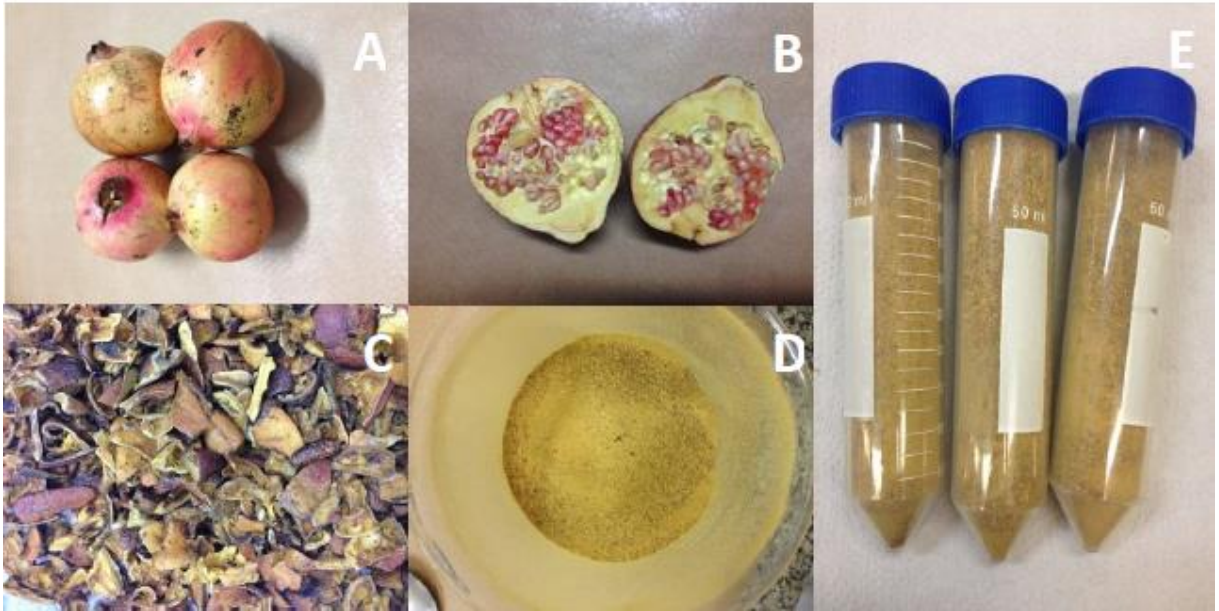


Figura 1. Seleção e preparo das amostras: (A e B) romãs selecionadas, (C) cascas secas em estufa a 45°C por 72 horas, (D) pó da casca, (E) armazenadas em tubo Falcon 50 mL.

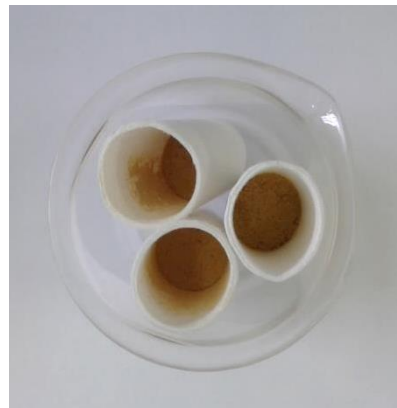


Figura 2. Pó da casca em porta amostras.

Apêndice B

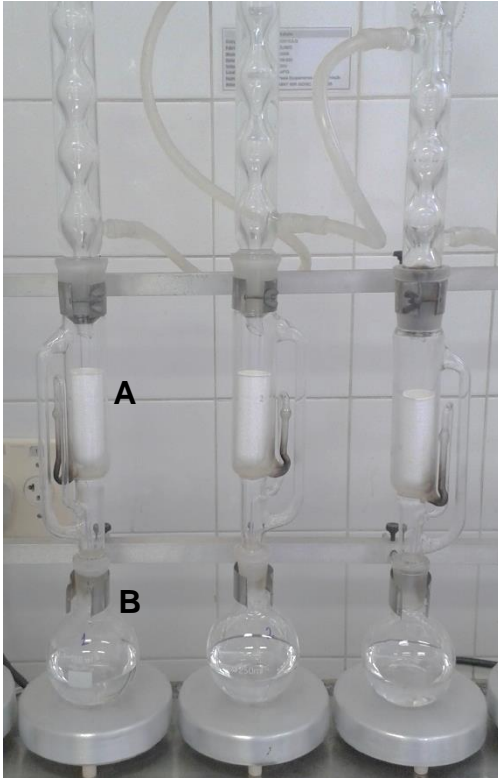


Figura 4. Aparelho Soxlet. A: Porta amostra contendo 10 g do pó das cascas (em triplicata). B: Balão contendo 90% de metanol em água (em triplicata) (v/v).



Figura 5. Extrato do pó das cascas sendo obtido.



Figura 6. Processo de Maceração.



Figura 7. Processo de Percolação.

Apêndice C



Figura 8. Extrato obtido sendo evaporado no rotoevaporador. A: Balão contendo os extratos obtidos em triplicata no aparelho Soxlet.



Figura 9. Massa obtida após a evaporação do extrato.

ANEXO - Journal of Applied Oral Science - Instructions to Author

Scope and policy

1 SCOPE

The **Journal of Applied Oral Science** is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental and speech-language pathology and audiology communities, according to the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations as well as invited case reports and invited reviews in the field of Oral Sciences, with emphasis in dentistry, speech-language pathology and audiology, and related areas.

This Journal adopts Creative Commons license CC-BY:

"This license lets others distribute, remix, tweak, and build upon your work, even commercially, as long as they credit you for the original creation. This is the most accommodating of licenses offered. Recommended for maximum dissemination and use of licensed materials."

There is no fee to authors for submitting to the JAOS nor Article Processing Charge (APC).

2 General Guidelines

2.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

2.2 Only papers written in the English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts, citations and references.

2.3 The Journal of Applied Oral Science has the right to submit all manuscripts to the Editorial Board, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.4 The Journal of Applied Oral Science will receive literature reviews and case reports only upon invitation by the Editor.

2.5 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.6 The dates of receipt of the original paper and its acceptance will be indicated in the occasion it is published.

2.7 Each corresponding author will receive one copy of the Journal. Additional reprints may be supplied upon request and must be paid by the authors.

2.8 Depending on the financial resources of the Journal of Applied Oral Science or the authors, color illustrations will be published at the discretion of the Editor-in-Chief.

3 Revision Criteria

3.1 Technical review: manuscripts will be firstly evaluated regarding presentation according to the instructions for authors and presence of mandatory documents required for submission. Manuscripts not in accordance with instructions will be returned to authors for adjustments before being reviewed by Associate Editors and referees.

3.2 Pre-evaluation: manuscripts in accordance with the instructions will be appreciated by Associate Editors regarding its adequacy to Journal scope and the presentation of all required documents. Papers considered inadequate will be rejected and returned to authors.

3.3 Merit and content evaluation: papers approved by Associate Editors will be evaluated in their scientific merit and methods by at least two ad hoc referees from different institutions of that of the authors, besides the Editor-in-Chief. Editor-in-Chief will decide on manuscript acceptance. When revision of the original is required, the manuscript will be returned to the corresponding author for modification. A revised version with modifications will be re-submitted by the authors, and that will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board, if necessary.

3.4 After approval of the scientific merit, manuscripts will pass through a final review performed by a professional assigned by the JAOS. The costs of this service will be under the authors' responsibility, and instructions regarding the necessary procedures, the value of the service and the payment directly to the professional will be forwarded to the corresponding author. If manuscripts are still considered inadequate, they will be returned to authors for revision.

3.5 Authors and referees will be kept anonymous during the review process.

3.6 Contents of the manuscript are the authors' responsibility and do not reflect the opinion of the Editor-in-Chief or Editorial Board.

4 Galley Proofs

4.1 Galley proofs will be sent to the corresponding author by electronic mail in pdf format for final approval.

4.2 Approval of galley proofs by the corresponding author should be returned with corrections, if necessary, within 72 hours.

4.3 If not returned within 72 hours, the Editor-in-Chief will consider the present version the final, and will not allow further modifications. Corrections in the galley proofs should be restricted to minor mistakes that do not modify the content of the manuscript. Major corrections will imply that the manuscript should enter the review process again.

4.4 Inclusion of new authors is not allowed at this phase of the publication process.

Form and preparation of manuscripts

1 Presentation of the Manuscript

1.1 Structure of the manuscript

Cover page (must be submitted as a supplementary file through the online submission system) which should contain only:

- Title of the manuscript in English.
- Names of the authors in direct order with their respective degrees and affiliations in English.
- Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including fax and phone number as well as e-mail address.

1.2 Text

- The paper must be previously translated or reviewed by professional or company responsible for English language. The costs of this service will be under the authors' responsibility. Authors with English as native language must submit as supplementary file a signed letter taking responsibility for the quality of the English language and editing of the text.
- Title of the manuscript and subtitle, if necessary, in English.

- Abstract: should comprise at most 300 words, highlighting a little introduction, objective, material and methods, results and conclusions.
- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and DeCS (Health Sciences Descriptors available at <http://decs.bvs.br/1/homepagei.htm/>). Authors must use periods to separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- Material and Methods: the material and the methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed, if applicable. Please refer to item 3 for ethical principals and registration of clinical trials.
- Results: presents the outcomes in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in the text, and only important findings should be highlighted.
- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings as well as their limitations.
- Conclusion(s) (if any).
- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants, scholarships and fellowships with respective names and identification numbers.
- References (please refer to item 2.3)

2 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests.

2.1 Illustrations and Tables

2.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numbers according to the order they appear in the text.

2.1.2 Photographs should be sent in original colors and digitized in .jpg or tif formats with at least 10 cm width and at least 300 dpi. These illustrations should be provided in supplementary files and not inserted in the Word document.

2.1.3 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a separate list preceded by the corresponding number.

2.1.4 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numbers. The legend shall be placed on the top of the tables. Tables should be open in the right and left laterals.

2.1.5 Footnotes should be indicated by asterisks and restricted to the least amount possible.

2.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: " and interfere with the bacterial system and tissue system^{3,4,7-10"}. References must be cited in a numeric ascending order within the paragraph.

2) or alphanumeric

- one author - Silva²³ (1986)
- two authors - Silva and Carvalho²⁵ (1987)
- three authors - Ferreira, Silva and Martins²⁷ (1987)
- more than three authors- Silva, et al.²⁸ (1988)
- Punctuation characters such as periods and commas must be placed after the numeric citation of the authors. Ex: Ferreira³⁸.

2.3 References

The references must follow the "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver" available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 All references must be cited in the text. They should be alphabetically ordered by the last name of the author and numbered in increasing order accordingly. The order of citation in the text should follow these numbers. Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE.

2.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date must not be included in the reference list.

2.3.3 Abstracts, monographs, dissertations and theses will not be accepted as references.

2.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex: Uhl, et al.

2.3.5 At most 30 references may be cited, except for invited reviews by the Editor-in-Chief.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton : CRC Press; 1986. p.95-152.

Papers published in journals

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. Caries Res. 1992;26:188-93.

Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al."

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. Br J Cancer. 1996;73:1006-12.

Papers without authors' names

Seeing nature through the lens of gender. Science. 1993;260:428-9.

Volume with supplement and/or Special Issue

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

Entire issue

Dental Update. Guildford 1991;18(1).

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

3 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS

3.1 Experimental procedures in humans and animals

The Journal of Applied Oral Science reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval.

3.1.1 Papers presenting **clinical trials** or **clinical studies in human volunteers or in animals** must contain the Ethical Committee approval of the reports of the **results** presented for publication as **mandatory supplementary file**.

3.2 Clinical Trial Registration - International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number, the ISRCTN, validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioral treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

3.2.1 Manuscripts presenting clinical trials in human volunteers must be submitted with the following mandatory supplementary files:

- CONSORT 2010 checklist (<http://www.consort-statement.org/>);
- registration number of the research in a database that meets the requirements of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)
- Suggestions: for Brazilian authors: <http://www.ensaiosclnicos.gov.br/>
- Suggestions for Brazilian and non-Brazilian authors: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) or <http://prsinfo.clinicaltrials.gov>.

3.3 The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

4 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE Editor-in-Chief AND EDITORIAL BOARD

Sending of manuscripts

1 MANUSCRIPT SUBMISSION

1.1 Articles must be submitted through the following address <http://www.scielo.br/jaos>

1.2 The original file containing the main manuscript must be submitted without the authors' identification and affiliations. The cover page must be submitted as a supplementary file containing the names of the authors, affiliations and correspondence address.

1.3 Figures must be submitted as supplementary files according to the specifications of item 2.1 regarding the form and preparation of manuscripts.

1.4 - Tables must be prepared in Excel format and must be submitted as a supplementary files.

1.5 Files such as registration number of clinical trial or Ethics Committee approval must be sent as mandatory supplementary files.

1.6 The letter from the author responsible for English language or from a professional or company responsible for translation or review must be submitted as mandatory supplementary file.

1.7 The submission form, signed by ALL the authors, must be submitted as a supplementary file containing the following text:

By signing the Submission Form, the authors state:

Copyright transfer: In the event of publication of the above mentioned manuscript, we, the authors, agree with the use of Creative Commons license CC-BY and transfer to the **Journal of Applied Oral Science** all rights and interest of the manuscript. This document applies to translations and any preliminary presentation of the contents of the manuscript that has been accepted, but yet not published. If any authorship modification occurs after submission, a document with of agreement of all authors is required to be kept by the Editor-in-Chief. Exclusion of authors may only be accepted by his/her own request.

Responsibilities of the authors:

I hereby state that:

The content is original and does not consist of plagiarism or fraud;

The work is not under consideration or will be submitted to other journal until a final decision is issued by this journal;

I have effectively contributed to this work and am familiar with its contents;

I have read the final version and assume the responsibility for its contents. I understand that if the work, or part of it, is considered deficient or a fraud, I take shared responsibility with the other authors.

Release of conflict of interest:

All my affiliations, corporate or institutional, and all sources of financial support to this research are properly acknowledged, except when mentioned in a separate letter. I certify that do not have any commercial or associate interest that represents a conflict of interest in connection with the submitted manuscript.
 PRINT NAME:_____ SIGNATURE:_____ DATE:_____