

Ação Antimicrobiana do Extrato de *Punica granatum* linn. no Biofilme Dental e sua Aplicabilidade como Antisséptico para Resina Acrílica

Antimicrobial Action of *Punica granatum* linn. Extract on Dental Biofilm and its Applicability as an Antiseptic for Acrylic Resin

Sarah Negrão Sanches^{*a}; Leopoldo Sussumu Matsumoto^b; Luis Guilherme Sachs^c; Sophia Aparecida Morro Chamilete^c; Yana Cosendey Toledo de Mello Peixoto^d; Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto^b; Sandrine Bittencourt Berger^e

^aUniversidade Estadual do Norte do Paraná, curso de Medicina Veterinária. PR, Brasil.

^bUniversidade Estadual do Norte do Paraná, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia. PR, Brasil.

^cUniversidade Estadual do Norte do Paraná, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos. PR, Brasil.

^dUniversidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Ciências Odontológicas Aplicadas. SP, Brasil.

^eUnopar. PR, Brasil. Universidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia. MS, Brasil.

*E-mail: sarahxsanches@gmail.com

Resumo

O desequilíbrio do biofilme microbiano representa um dos principais fatores etiológicos da doença periodontal. Aparelhos ortodônticos, como placas miorelaxantes, podem ser fonte de contaminação para cavidade oral, caso não haja sua adequada antisepsia. A romã tem sido avaliada para o tratamento periodontal, bem como para antisepsia contra bactérias da cavidade oral. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana extrato aquoso (EAPg) e hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. (EHAPg), sobre o biofilme dental, além de seu potencial uso como antisséptico para placas miorelaxantes. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo teste de microdiluição, nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 e 0,78%. Os tratamentos EAPg, EHAPg e controle negativo, foram incubados, e os resultados avaliados em duplicada. EAPg apresentou atividade antibacteriana contra *Pseudomonas* sp. a partir de 50%, e o EHAPg a partir de 12,5%. Complementarmente, a fim de verificar possível alteração de coloração, foram confeccionadas placas de resina acrílica incolor, que foram submetidas ao EHAPg 12,5%. Os tratamentos foram realizados durante 21 dias consecutivos, das 8:00 às 20:00 horas, objetivando simular o uso terapêutico conforme recomendado pelos odontologistas. Embora tenha sido estatisticamente detectado escurecimento das placas submetidas ao EHAPg 12,5%, este escurecimento foi extremamente discreto, uma vez que não foi possível observá-lo visivelmente. Portanto, conclui-se que o EHAPg demonstrou atividade inibitória, in vitro, sobre *Pseudomonas* sp., apresentando adicionalmente importante potencial de uso como antisséptico, principalmente para aplicação em placas miorelaxantes por não alterar visivelmente a coloração das mesmas.

Palavras-chave: Bruxismo. Doenças Bucais. Plantas Medicinais. Produto Natural. Romã.

Abstract

*The imbalance of the microbial biofilm represents one of the main etiological factors of periodontal disease. Orthodontic devices, such as myorelaxing plaques, can be a source of contamination for the oral cavity, if there is not adequate antisepsis. Pomegranate has been evaluated for periodontal treatment as well as for antisepsis against oral cavity bacteria. Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of at the formulation of aqueous (EAPg) and hydroalcoholic extract of *Punica granatum* Linn. (EHAPg), on dental biofilm, besides its potential use as an antiseptic for myorelaxing plaques. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution test at 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 and 0.78%. The EAPg, EHAPg and negative control treatment were incubated and the results evaluated in duplicate. EAPg showed antibacterial activity against *Pseudomonas* sp. from 50%, and EHAPg from 12.5%. In addition, in order to verify a possible color change, colorless acrylic resin plaques were made, which were subjected to 12.5% EHAPg. Treatments were performed for 21 consecutive days, from 8:00 am to 8:00 pm, aiming to simulate the therapeutic use as recommended by dentists. Although it was statistically detected darkening of the plates submitted to EHAPg 12.5%, this darkening was extremely discreet, since it was not possible to observe it visibly. Therefore, it is concluded that EHAPg demonstrated inhibitory activity, in vitro, against *Pseudomonas* sp., additionally presenting important potential for use as an antiseptic, mainly for application in myorelaxant plaques, as it does not visibly change their color.*

Keywords: Bruxism. Oral diseases. Medicinal Plants. Natural Product. Pomegranate.

1 Introdução

Doenças bucais determinam importante impacto na qualidade de vida, envolvendo variadas faixas etárias. Dentre as doenças bucais, a periodontal é uma das mais recorrentes no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública (NASCIMENTO et al., 2021).

O biofilme microbiano, quando em desequilíbrio, representa um dos principais fatores etiológicos da doença periodontal. Os principais problemas observados referem-se

aos danos nos tecidos de proteção gengival e de sustentação dos dentes. Considerando a resposta inflamatória destrutiva, se não houver tratamento, em estágios avançados pode haver comprometimento da inserção dentária, ocasionando perda do dente acometido (TEIXEIRA et al., 2019). Além disso, a infecção periodontal pode alterar a evolução natural de condições sistêmicas, aumentando significativamente o risco de complicações mais severas, como observado em doenças cardiovasculares (SILVA et al., 2020).

Clorexidina a 0,12% tem sido frequentemente utilizada

no combate à formação do biofilme, porém a ocorrência de resistência bacteriana tem sido verificada (RIBAS; SANTOS; BOTELHO, 2020). Ademais, esse produto ainda foi associado a manchas amarronzadas, aroma desagradável, sensação de queimação, perda de paladar, descamação da mucosa, reações alérgicas, cálculo supra gengival, entre outros (KLUK et al., 2016).

Além disso, aparelhos ortodônticos removíveis, confeccionados com resina acrílica, também podem ser fonte de contaminação, que geralmente ocorre por negligência quanto à antisepsia, tempo de uso e fatores ligados a idade, como diminuição do fluxo salivar e comprometimento do sistema imune (VIJITA et al., 2016).

Dentre os aparelhos ortodônticos removíveis, a placa miorreaxante, também é conhecida como placa de mordida, de bruxismo, noturna, aparelho interoclusal, e placa de Michigan. Esta é frequentemente utilizada para reduzir a atividade dos músculos da mandíbula, para simulação de oclusão ideal, e alívio de dor. As placas miorreaxantes são indicadas para uso noturno, porém, os cirurgiões dentistas frequentemente recomendam que se evite a desidratação do material durante o dia, mantendo-o submerso em solução aquosa. Entretanto, a presença constante de umidade pode dar origem a colônias de fungos, bactérias, e outros microrganismos. Assim, dependendo das condições de armazenamento, essas placas miorreaxantes também podem ser fonte de contaminação microbiana oral. Dessa forma, a descontaminação adequada desses dispositivos é importante para prevenir não só complicações orais a partir de possíveis infecções locais, mas também infecções sistêmicas (ARENIUS et al., 2020). Para essa finalidade, têm-se valorizado o uso de produtos naturais a base de plantas medicinais, destacando-se a *Punica granatum* Linn., popularmente conhecida como romã.

Correspondendo a um arbusto lenhoso ramificado, apresenta folhas pequenas, sólidas, brilhantes e membranáceas, suas flores são vermelhas alaranjadas dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos esféricos (WERKMAN et al., 2008). A romãzeira é frequentemente cultivada nas regiões brasileiras, sendo popularmente utilizada devido às propriedades biológicas de seu fruto. A romã apresenta ação antioxidante (BARATHIKANNAN et al., 2016), anti-inflamatória (BASSIRI-JAHROMI, 2018), antifúngica (MADUGULA et al., 2017), antibacteriana contra microrganismos diversos (MOREIRA et al., 2014, SILVA et al., 2013) e inclusive aqueles específicos da cavidade oral (ABD-EL-AZIZ; SALLAM, 2020). Dessa forma, a romã tem sido utilizada para o controle da saúde bucal (SANTOS et al., 2019), especialmente no tratamento periodontal, bem como para antisepsia da cavidade oral, não somente por sua eficácia, mas sobretudo devido às questões de segurança, por ser um produto natural (SIMÕES et al., 2021).

2 Material e Métodos

2.1 Coleta dos frutos

O material vegetal foi colhido de uma romãzeira localizada em Bandeirantes - BR (23° 07,02' 62"S e 50° 22,06' 75'O), ao final da manhã com temperatura aproximada de 25°C e umidade relativa do ar de 80%, no período da primavera entre setembro de 2020 à fevereiro de 2021. Em seguida, foi confeccionada uma excisada do material vegetal, que foi devidamente herborizada e depositada no Herbário do Instituto Florestal de Assis / SP, identificada pelo número SPSF 40136.

2.2 Elaboração do Extrato Aquoso da casca seca de *Punica granatum* Linn. (EAPg)

No laboratório do Núcleo de Ensino, Extensão e Pesquisa em Agroecologia, Sustentabilidade e Produção Orgânica – NEPASPLAB da Universidade Estadual do Norte do Paraná no Câmpus Luiz Meneghel – UENP/CLM, os frutos foram selecionados por não apresentarem alterações macroscópicas visíveis, lavados em água corrente, descascados, e secos em estufa de ventilação forçada de ar à 40 °C. Na sequência as cascas foram picadas.

Para obtenção do EAPg inicial, para posterior diluição, utilizou-se 50g do material vegetal picado em 200 mL de água destilada autoclavada. Após, realizou-se cocção em banho-maria à 70 °C por 60 minutos (OLIVEIRA et al., 2010), e filtragem através de algodão hidrófilo. Subsequentemente, o material foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, estéril.

2.3 Elaboração do Extrato Hidroalcoólico da casca seca da *P. granatum* Linn. (EHAPg)

Para obtenção do EHAPg inicial foram utilizados 30g do material vegetal picado em 190 mL de álcool P.A. e 80 mL de água destilada. Após, procedeu-se agitação mecânica constante por 24 horas consecutivas, com posterior filtração a vácuo. A fim de promover melhor extração dos compostos secundários do material vegetal, este procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, adicionando-se a cada uma delas o mesmo volume da solução hidroalcoólica supracitada. Posteriormente, o extrato foi concentrado por evaporizador rotativo, em temperatura de 60 °C. Em seguida, o extrato foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, estéril.

2.4 Avaliação Microbiológica

As amostras de saliva foram coletadas no Laboratório de Microbiologia do Solo – LABMICROS da UENP/CLM, utilizando procedimento devidamente aprovado conforme o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da referida Universidade, em conformidade com as atribuições definidas na Resolução CNS n.466 de 2012 e na Norma Operacional n.001 de 2013 do CNS, sob n. 5.434.598.

Foi realizado isolamento bacteriano, cultura em meio seletivo Ágar MacConkey, e incubação a 37°C por 24 horas. As colônias de *Pseudomonas* sp. foram identificadas e avaliadas

quanto à morfologia e coloração, sendo caracterizadas como circulares, de tamanho pequeno, esbranquiçadas, brilhantes, com textura lisa, elevação convexa e borda inteira, correspondendo com o descrito na literatura (RAMOS, 2004). Adicionalmente, realizou-se análises bioquímicas pelo sistema Bactray III, identificando-se *Pseudomonas* sp. Subsequentemente, realizou-se suspensão bacteriana em solução salina estéril, com turvação equivalente a 0,5 da escala MacFarland (1×10^8 UFC ml^{-1}), conforme Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (NCCLS, 2002).

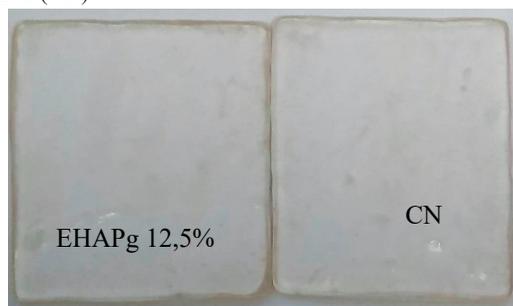
Para o teste de microdiluição foi utilizada microplaca Elisa com 96 orifícios, distribuídos em 12 colunas em 8 linhas. Em 150 μL de EAPg adicionou-se Caldo Triptona de Soja (TSB), sendo então realizada diluição do extrato inicial nas seguintes concentrações: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 e 0,78%. Por fim, adicionou-se 50 μL da solução bacteriana, exceto para o tratamento controle negativo, onde foi utilizada solução salina estéril. A microplaca Elisa foi então incubada a 37 °C por 24 horas, sendo os resultados avaliados em duplicata.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento dos inóculos, evidenciado pela ausência de alteração de densidade óptica comparada com o tratamento negativo (CLSI, 2015). Em relação ao EHAPg, os procedimentos microbiológicos foram realizados em conformidade, e nas mesmas condições descritas para o EAPg.

2.5 Análise de alteração de coloração

Placas testes com material das placas miorelaxantes foram confeccionadas utilizando resina acrílica auto polimerizante incolor (JET Clássico). Houve a necessidade de se confeccionar placas testes no formato plano, ao invés de placas convexas como rotineiramente se utiliza para acoplamento adequado na cavidade oral. Esta necessidade se deve ao fato de que o software utilizado para a avaliação da coloração (Software Conversor em Cor Média RGB), apresenta maior precisão ao avaliar objetos planos, ou seja, com a menor prevalência de sombras possível, minimizando assim os prejuízos na interpretação dos resultados (Figura 1).

Figura 1- Placas testes de resina acrílica auto polimerizante incolor (JET clássico) utilizadas no teste de coloração, e submetidas por 21 dias aos tratamentos: Extrato hidroalcoólico da casca seca da *P. granatum* Linn. (EHAPg 12,5%) e controle negativo (CN)



Fonte: dados da pesquisa.

Para a análise relativa à possível alteração da coloração foram avaliados em triplicada os seguintes tratamentos: EHAPg 12,5% (que correspondeu à concentração mínima em que se verificou o melhor resultado de inibição do crescimento bacteriano) e tratamento controle negativo utilizando-se água destilada. Os tratamentos foram realizados durante 21 dias consecutivos, no período das 8:00 as 20:00 horas do dia subsequente, a fim de simular a utilização prática da placa miorelaxante, que são utilizadas durante a noite e durante o dia podem ser mantidas submersas para que se evite a desidratação do material. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri estéreis, onde as placas de acrílico foram alocadas, sendo submersas em 40 mL dos respectivos tratamentos. Dessa forma, o presente ensaio objetivou verificar possível mudança na coloração das placas de acrílico após a realização dos tratamentos.

Foram avaliadas alterações da coloração das amostras utilizando câmera digital com resolução de 50 MP (megapixels), ultrawide de 8 MP, com lente macro de 2 MP e profundidade de 2 MP, cuja a lente foi posicionada em perpendicular à superfície das placas, que foram posicionadas uma ao lado da outra e então foram obtidas imagens digitais. Por meio do “Software Conversor em Cor Média RGB” essas imagens foram convertidas em valores médios das cores vermelho, verde e azul, obtendo-se assim os valores RGB (red, green, blue). As imagens foram avaliadas no formato Bitmap (BMP), uma vez que este formato descreve quantos pixels a imagem apresenta e qual é a cor de cada pixel. Para tanto, o arquivo incluiu, para cada pixel da imagem, três valores, ou seja, um para luz vermelha, outro para luz verde e outro para luz azul, além da avaliação do grau de escurecimento a partir dos valores da cor cinza. Uma imagem digital em tons de cinza é uma imagem na qual o valor de cada pixel corresponde à única amostra de um espaço de cores, variando entre o preto como a menor intensidade e o branco como maior intensidade, e as diferentes tonalidades da cor cinza (NOGUEIRA, 2016).

Os resultados foram obtidos pela comparação realizada entre a média de coloração de 10 áreas aleatórias das placas testadas no extrato e 10 áreas do controle negativo. Cabe ressaltar que menores valores numéricos representam maior escurecimento. Dessa forma, utilizando-se o referido software, foi realizada a leitura de cor pixel a pixel, possibilitando a comparação do nível de coloração entre os tratamentos (SACHS et al., 2005).

2.6 Análise do pH do EHAPg

Para a avaliação do pH do EHAPg foi utilizado pHgâmetro Tecnal, no Laboratório de Análise de Solo e Tecido Vegetal da UENP/CLM. Foram avaliados em triplicata o EHAPg inicial e o EHAPg diluído a 12,5%, que correspondeu à menor concentração capaz de apresentar efetiva atividade antimicrobiana.

2.7 Análise estatística

Foi realizada análise estatística dos dados com base no teste t para comparação das médias das amostras, sendo duas amostras presumindo variâncias equivalentes, e avaliação do resultado p ($T \leq t$) uni-caudal para avaliar se houve diferença entre as médias dos valores de coloração do escurecimento cinza entre as placas de resina acrílica teste submetidas aos tratamentos: EHAPg 12,5% e controle negativo.

3 Resultados e Discussão

A partir dos resultados obtidos pelo presente estudo, foi registrada atividade antibacteriana do EAPg contra *Pseudomonas sp.* nas concentrações a partir de 50%. Já o EHAPg foi capaz de apresentar efetiva atividade antibacteriana, contra *Pseudomonas sp.*, em menores concentrações, a partir de 12,5%.

Lee et al. (2010) verificaram que o extrato da casca seca da romã é capaz de inibir a enzima de digestão da sacarose e os organismos responsáveis pela formação do biofilme dental, sendo os flavonoides, presentes na *P. granatum*, os principais responsáveis pela manutenção da saúde bucal.

Sateriale et al. (2020), realizaram ensaios microbiológicos in vitro e demonstraram que extratos da casca da romã foram capazes de neutralizar as bactérias cariogênicas, *Streptococcus mutans* e *Rothia dentocariosa* verificando CIM de 10 µg/µL, para ambas as bactérias. Da mesma forma, Ferrazzano et al. (2017), também verificaram efeito antibacteriano do extrato hidroalcoólico da casca e do suco da romã verificando CIM correspondente à 10 µg/µL nas duas cepas, *S. mutans* e *R. dentocariosa*.

Corroborando com os efeitos antibacterianos do extrato da casca da romã, Silva et al. (2020) registraram eficácia contra *S. mutans* e Nobrega (2012) também concluiu que o enxaguatório de romã possui potencial de ação sobre o biofilme dental na redução da contagem de *Streptococcus* orais, além de eficácia anti-inflamatória.

Os estudos realizados por Menezes, Cordeiro e Viana (2006) avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico dos frutos da romã sobre a contagem de microrganismos do biofilme dental e constataram que ocorreu uma inibição de 84% da contagem de microrganismos, sendo esse percentual de redução similar ao da clorexidina. Os estudos in vitro de Pereira et al. (2006) e Vasconcelos et al. (2006) também constataram ação antimicrobiana sobre linhagens *Streptococcus*, além de ação antiaderente do extrato da casca do fruto da romã.

Bezerra (2018) demonstrou que quando utilizado um extrato hidroalcoólico de *P. granatum*, a 6,7% para higienização de próteses dentárias removíveis (PDRs), não houve alteração da massa deste material, porém ocorreu alteração de cor, havendo escurecimento dos espécimes, sugerindo mais estudos com o intuito de avaliar o efeito da imersão com tempos mais reduzidos e associados à escovação, para verificar se é possível contornar tal efeito sob este constituinte de PDRs.

Vantagens adicionais relativas as características

físico-químicas e microbiológicas de resíduos de cascas e sementes da *P. granatum*, que são subprodutos da indústria alimentícia, podem apresentar diversas possibilidades de aplicação na biomedicina, na produção de cosméticos e produtos farmacêuticos. Por se tratar de resíduos, apresentam importante aspecto econômico por contribuir para a economia e o desenvolvimento sustentável (KUPNIK et al., 2021). Ademais, por ser um produto constituído por substâncias naturais, especialmente flavonoides, compostos fenólicos e taninos, os produtos produzidos a partir da romã não apresentam os efeitos colaterais indesejáveis causados por produtos químicos sintéticos como a clorexidina 0,12%, (KLUK et al., 2016). Ao contrário, apresentam adaptação ao organismo, diminuindo os efeitos colaterais e reações adversas, além de proporcionar eficácia e possuir baixo custo (SANTOS et al., 2019).

Em relação à avaliação da coloração, a análise RGB foi capaz de detectar discreta alteração de coloração entre as placas teste submetidas ao EHAPg 12,5%, quando comparadas ao controle negativo, conforme resultados demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Valores médios das cores RGB (red, blue, green) referentes às imagens no formato Bitmap (BMP), das placas teste de resina acrílica submetidas por 21 dias aos seguintes tratamentos: Extrato hidroalcoólico da casca seca da *P. granatum* Linn. (EHAPg 12,5%) e controle negativo – água destilada (CN)

	Vermelho	Verde	Azul	Esc. cinza
CN	166,8	163,0	159,2	163,7
EHAPg 12,5%	160,0	155,7	149,6	156,33

Fonte: dados da pesquisa.

Em relação à análise estatística, o resultado p ($T \leq t$) uni-caudal demonstrou $2,3 * 10^{-5}$ ou seja, verificou-se que $p(T) < 0,05$. Dessa forma, houve diferença estatística de coloração entre os tratamentos avaliados pelo presente estudo. Entretanto, cabe ressaltar que este escurecimento foi extremamente discreto, uma vez que não é possível observar, visivelmente, tal diferença. Adicionalmente, considerando que as placas miorelaxantes removíveis, confeccionadas a partir de resina acrílica, normalmente apresentam indicação de uso apenas durante o período noturno, ou seja, durante o sono do usuário, essa discreta alteração de coloração pode não ser relevante pois, o discreto escurecimento não se caracteriza obrigatoriamente como fator estético impeditivo para o uso do EHAPg 12,5% como antisséptico para as placas noturnas.

Em relação à análise do pH, verificou-se que o EHAPg inicial e o diluído a 12,5% apresentaram 5,07 e 4,75 respectivamente. A maior parte dos sorotipos da *Pseudomonas sp.*, não cresce em meio inferior a 4,5 (RAMOS, 2004). Kharchoufi et al. (2018), estudaram extratos aquosos e metanólicos da romã, e embora não tenham relatado os valores referentes ao pH, observaram que os componentes encontrados na casca da romã foram eficazes contra bactérias gram-negativas, incluindo *Pseudomonas sp.*

Entretanto, a erosão ácida desgasta o esmalte do dente a longo prazo e, conseqüentemente, os dentes ficam mais suscetíveis à cárie e aos mais variados tipos de doenças (SANTANA et al., 2018). Além disso, uma vez que os tecidos dentários duros tenham sofrido erosão ácida, eles não se regeneram (GEORGE et al., 2014), o que pode prejudicar sua utilização como antisséptico bucal. Entretanto, a aplicabilidade do produto como antisséptico para aparelhos ortodônticos miorreaxantes, se mostra promissora em relação a utilização do extrato da romã, uma vez que o acrílico, material desses aparelhos, possui boa resistência a ácidos diluídos (POLYBRASIL, 2018). Dessa forma, o uso do EHAPg 12,5%, na placa miorreaxante, e não diretamente na cavidade oral e dentes, evitaria esse problema. Portanto, a produção de solução antisséptica à base do extrato da casca da *P. granatum* para higiene de placas miorreaxantes removíveis, é uma proposta inovadora e justificável pelo fato de que a romã apresenta importante ação antibacteriana.

4 Conclusão

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que o extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* Linn. demonstrou atividade inibitória, in vitro, sobre a multiplicação de *Pseudomonas* sp., apresentando dessa forma, importante potencial de uso como antisséptico, principalmente para aplicação em placas ortodônticas miorreaxantes, além de não alterar visivelmente a coloração dessas placas.

Referências

ABD- EL- AZIZ, A.D. E.; SALLAM, R.A. Antibacterial effect of green tea and pomegranate peel extracts on *Streptococcus mutans* of orthodontic treated patients. *J. Radiation Res. Appl. Sci.*, v.13, n.1, 2020. doi: 10.1080/16878507.2019.1693733.

ARENIUS, I. et al. The relationship between oral diseases and infectious complications in patients under dialysis. *Oral Dis.*, v.26, n.5, p.1045-1052, 2020. doi: 10.1111/odi.13296.

BARATHIKANNAN, K. et al. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. *BMC Compl. Altern. Med.*, v.16, p.264, 2016. doi: 10.1186/s12906-016-1237-3.

BASSIRI-JAHROMI, S. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncol. Rev.*, v.12, p.345, 2018. doi: 10.4081/oncol.2018.345.

BEZERRA, M.R. Estabilidade de cor e massa de dentes de resina acrílica utilizados em próteses parciais removíveis após imersão em extrato hidroalcoólico de *punica granatum* Linne. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2018.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

GEORGE, R. et al. Dental erosion and dentinal sensitivity amongst professional wine tasters in South East Queensland, Australia. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/516975.

FERRAZZANO, G.F. et al. In Vitro Antibacterial Activity of Pomegranate Juice and Peel Extracts on Cariogenic Bacteria. *BioMed Research International*, v.2017, p.1-7, 2017. doi:10.1155/2017/2152749.

KHARCHOUFI, S. et al. Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts. *Ind. Crops Prod.*, v.111, p.345-352, 2018. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.037.

KLUK, E. et al. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. *Rev. Gestão Saúde*, v.14, n.1, p.7-13, 2016.

KUPNIK, K. et al. A Comprehensive Study of the Antibacterial Activity of Bioactive Juice and Extracts from Pomegranate (*Punica granatum* L.). Peels and Seeds. *Plants*, v.10, n.8, p.1554, 2021. doi: 10.3390/plants10081554.

LEE, C. et al. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem.*, v.118, n.2, p.315-322, 2010. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.123.

MADUGULA, P. et al. "Rhetoric to Reality"- Efficacy of *Punica Granatum* Peel Extract on Oral Candidiasis: an in vitro study. *J. Clin. Diagn. Res.*, v.11, n.1, p.114-117, 2017.

MENEZES, S.M.S.; CORDEIRO, L.N.; VIANA, G.S.B. *Punica granatum* (Pomegranate) extract is active against dental plaque. *J. Herbal Pharm.*, v.6, n.2, p.79-92, 2006.

MOREIRA, G.M.B. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, p.626-632, 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2014000700003.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. National Committee for Clinical Laboratory Standard -. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada - M27-A2. 2.ed. Wayne, 2002.

NASCIMENTO, J.M.B. et al. Impact of periodontal disease on quality of life: an integrative review. *Res. Soc. Develop.*, v.10, n.3, p.e17110313160, 2021. doi: 10.33448/rsd-v10i3.13160.

NÓBREGA, D.R.M. Avaliação clínica da efetividade de um enxaguatório à base da romã (*Punica granatum* Linn.) sobre o controle de biofilme dental e inflamação gengival em escolares. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2012.

NOGUEIRA, R.C.A. Análise de conversão de imagem colorida para tons de cinza via contraste percebido. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

PEREIRA, J.V. et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras. Farmacog.*, v.16, n.1, p.88-93, 2006. doi: 10.1590/S0102-695X2006000100016

POLYBRASIL. Acrílico - Chapas Cast e Extrudadas, p.1-27, 2018.

OLIVEIRA, L.P. et al. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Rev Bras. Farmacog.sia*, v.20, p.201-207, 2010. doi: 10.1590/S0102-695X2010000200011.

RAMOS, Juan-Luis. *Pseudomonas: Volume 1 Genomics, Life Style and Molecular Architecture*. New York: Springer Science & Business Media, 2004.

RIBAS, M.A.L.; SANTOS, B.M.; BOTELHO, M.P.J. Avaliação da propriedade bactericida do digluconato de clorexidina 0,12% e 0,2% em solução. *Brazilian Journal Of Development*, v.6, n.1, p.4621-4634, 2020. doi: 10.34117/bjdv6n1-331.

SACHS, L.G.; FELINTO, A.S.; PORTUGAL, A.P. SH 2.0.1 – Software Conversor em Cor Média RGB. Versão Shareware. s/d. 2005.

SANTANA, N.M.S. et al. Prevalência de erosão dentária e fatores associados em uma população de escolares. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.47, p.155-160, 2018. doi:

10.1590/1807-2577.03518.

SANTOS, E.P. et al. Punica Granatum L. (Romã) e atividade antimicrobiana contra o biofilme dental: uma revisão bibliográfica. *Ensaio Ciênc.*, v.23, n.2, p.88-93, 2019. doi: 10.17921/1415-6938.2019v23n2p88-93.

SATERIALE, D. et al. In vitro Synergy of polyphenolic extracts from honey, myrtle and pomegranate against oral pathogens, *S. mutans* and *R. dentocariosa*. *Frontiers Microbiol.*, v.11, p.1465, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01465.

SEDIGH-RAHIMABADI M. et al. A traditional mouthwash (*Punica granatum* var *pleniflora*) for controlling gingivitis of diabetic patients: a double-blind randomized controlled clinical trial. *J. Evidence Based Complem. Alternative Med.*, v.22, n.1, p.59-67, 2017. doi: 10.1177/2156587216633370.

SILVA, A.F. et al. O uso do aloe vera como coadjuvante no tratamento periodontal. *Res. Soc. Develop.*, v.10, n.1, 2021. doi: 10.33448/rsd-v10i1.11511.

SILVA, B.T. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. *Biosc. J.*, v.29, p.974-984, 2013.

SILVA, G.C.B. et al. Natural history of periodontal disease: a systematic review. *Res. Soc. Develop.*, v.9, n.7, p.1-15, 2020. doi: 10.33448/rsd-v9i7.4562.

SIMÕES, A.P.G.; OLIVEIRA, F.A.A. Plantas medicinais no combate ao biofilme dental: revisão da literatura. *Arch. Health Invest.*, v.10, n.3, p.385-391, 2021. doi: 10.21270/archi.v10i3.4697.

TEIXEIRA, F.C.F. et al. Perda de inserção periodontal e associações com indicadores de risco sociodemográficos e comportamentais. *Rev. Odont. UNESP*, v.48, 2019. doi: 10.1590/1807-2577.09519.

VASCONCELOS, L.C.S. et al. Minimum Inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz. Dent. J.*, v.17, n.3, p.223-227, 2006. doi: 10.1590/S0103-64402006000300009.

VIJITA V.N. et al. Microbial contamination of removable dental prosthesis at different interval of usage: An in vitro study. *J. Ind. Prosthodontic Soc.*, v.16, n.4, p.346-351, 2016. doi: 10.4103/0972-4052.176536.

WERKMAN C. et al. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.10, n.3, p.104-111, 2008.