



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA EXTRATOS DE CASCAS DE ROMÃS (*PUNICA
GRANATUM L.*) SUBMETIDAS A DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE
SECAGEM.**

LIVIA BENOSSI MARCHI

Maringá

2014

Livia Benossi Marchi

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA EXTRATOS DE CASCAS DE ROMÃS (PUNICA
GRANATUM L.) SUBMETIDAS A DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE
SECAGEM.**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do grau de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Giriboni Monteiro

Maringá

2014

Orientador

Prof. Dr. Antônio Roberto Giriboni Monteiro

Biografia

Livia Benossi Marchi é natural de Campo Mourão, no Estado do Paraná, Brasil. Ingressou no ensino superior no curso de Tecnologia de Alimentos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná em 2002, obtendo o grau de tecnólogo em 2006. No mesmo ano iniciou o curso de especialização em Análise de Processos na Indústria Alimentícia na Universidade Estadual de Maringá, obtendo o título de especialista em 2007. Em 2012 ingressou para o Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, adquirindo experiência na área de tecnologia de cereais e desenvolvimento de produtos.

Dedico...

Ao meu filho Artur, meu marido Silivaldis
e a meus pais Reinaldo e Elizabet,
que são reflexos do amor de Deus em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelo dom de gerar a vida do meu amado filho Artur durante último ano de mestrado. Obrigado, Senhor!

Ao meu marido Silvaldís, pelo companheirismo, compreensão, motivação e apoio.

A meus pais Reinaldo e Elizabet, por toda a ajuda, motivação e orações.

A Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade e infra-estrutura.

Ao professor Antônio Roberto Giriboni Monteiro, a quem guardo admiração e respeito, obrigado pela orientação, conhecimento, doação, confiança e paciência, principalmente nos períodos finais do mestrado.

Aos professores Sílvio Cláudio da Costa e Jane Martha Graton Mikcha pela parceria na disponibilização de laboratórios, equipamentos e o conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico Antonio Sergio Dacome, pelo apoio constante com as metodologias, a convivência e amizade.

Às queridas mestrandas Adriele Rodrigues dos Santos, Paula Gimenez Milani, Cândyce Camile Fortuna Nalesso pela ajuda, amizade e presença nos momentos mais difíceis do mestrado.

A secretária do programa de Pós graduação, Marilda, pela ajuda e amizade.

A CAPES pelo apoio financeiro

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico.

Livia Benossi, Silvio Claudio da Costa, Antonio Sergio Dacome, Jane Martha Graton Mikcha, Adriele Rodrigues dos Santos, Antonio Roberto Giriboni Monteiro. Avaliação da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana de extratos de cascas de romãs (*Punica granatum* L.) submetidas a dois diferentes métodos de secagem. *Journal of Food Science & Technology*. Qualis B2.

GENERAL ABSTRACT

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ASSESSMENT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PEEL EXTRACTS POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM L.*) UNDER TWO DIFFERENT DRYING METHODS.

INTRODUCTION

Pomegranate (*Punica granatum L.*) is a fruit of the Middle East, belongs to the family Punicaceae. It is rich in phenolic compounds that exhibit strong antioxidant activity *in vitro*. Are popularly consumed in the forms in nature, juices, foods such as jams and jellies and extracts, which are used as botanical ingredients in herbal medicine and dietary supplements. Pomegranate peels are considered inedible or byproduct obtained during the processing of juice parties. It is characterized by significant presence of polyphenols such as ellagitannins, ellagic acid and gallic acid and flavonoids, which are associated with biological properties such as antioxidant and antimicrobial agent. The makers of pomegranate juice industries generate large amounts of by-products, which generate serious environmental pollution besides acting as a substrate for proliferation of insects and microorganisms. Processed pomegranate peels generally have high moisture content (approximately 66.3 %) and must be removed before production of products with high added value such as flavonoids and tannins. Drying has always been of great importance to the preservation of products and by-products of agriculture.

OBJECTIVE

Evaluate the application of two drying methods: conventional oven drying and freeze-drying on the antioxidant and antimicrobial potential of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel.

MATERIAL AND METHODS

The pomegranates were collected in local trade Maringá - Paraná - Brazil from September 2013. Immediately after collection, applied the process of cleaning with running water and sanitization of fruits with solution of sodium hypochlorite at 20 ppm for 15 minutes. The peel of pomegranates were separated manually into pieces of approximately 2 cm and then washed with deionized water and dried at room temperature water and under light, followed by storage in packaging laminated vacuum and frozen at -20°C until ready to process and analysis.

For the drying fractions of 100 grams of peels of pomegranates, in triplicate, were used. In kiln drying, samples of bark were placed in disposable aluminum trays, spaced approximately 1 cm between the pieces and dried in dehydrating air circulation (*Sparrow Technology for Agro Industry*) at temperatures of 40°C, 50°C and 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), until the peels obtain water activity 0,3 and humidity below 3% value, equivalent to the drying time of 35, 18 and 12 hours, respectively. For lyophilization, pomegranate peels were processed in a freeze dryer Alpha 1-4 LD plus Christ at -50°C and 0,040 mbar, for a period of 24 hours, whereas the same activity parameters and moisture to oven drying. Once processed, the husks were ground in a Wiley mill (*Marconi*), standardized with a particle size 60 mesh and stored in vacuum packaging laminated to a freezer at -20°C until the time of processing and analysis.

The determination of the chemical composition were performed according to AOAC methodology. For the determination of mineral extraction was used dry method,

solubilizing the ash in 50 ml of 2,5% nitric acid and the metals reading performed by means of atomic absorption spectrometer, Varian - SPECTRAA - 240FS.

For the preparation of extracts the crushed shells were homogenized and solvents deionized water and 80% ethanol solution at a ratio of 1:20, the mixture remained at rest for a period of 48 hours under light and at room temperature. The yellow color liquid was centrifuged (*Centrifio*) at 3500 rpm for 15 min and the supernatant filtered vacuum in Büchner funnel and filter 0.5 micrometre (*Zeta Plus*). The filtrate was rotaevaporado (*Büchi RE 120*) at 50°C, lyophilized and stored in amber bottle in a freezer at -20°C. The determination of total phenolic compounds was performed by spectrophotometry according to the colorimetric method with *Folin-Ciocalteu* reagent with gallic acid standard (20 to 200 µmol/ml). Determination of antioxidant activity was performed by capturing the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A antioxidant activity is expressed as Trolox equivalent /g extract. Trolox curve 0 - 75µmol / L, R² : 0.997. Determination of antioxidant activity by capturing the radical 2,2- azino -bis (3- ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). Antioxidant activity is expressed as Trolox equivalent /g extract of the calibration curve with Trolox (500- 2000 mMol/L) R²: 0.994.

For the evaluation of the antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of pomegranate peel, *Escherichia coli* microorganisms were used ATCC 25922, *Salmonella* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, using ampicillin as a positive control. In this assay at concentrations extracts 5000-625 mg/ml were used.

RESULTS AND DISCUSSION

The peel of pomegranates in natura showed a value of 0.977 water activity. The efficiency of the drying process was 39% (± 0,35), 39,6 % (± 1,5) 38,3 % (± 0,81) and 32,6% (± 0,93) for drying in an oven at 40°C, 50°C, 60°C and lyophilization, respectively. The yield of aqueous and alcoholic extraction in all treatments showed values above 40 %. Proximate analysis gave 65,35 % moisture, 3,34 % ash, 0,41 % fat, 3,13% of total protein and 27,89 % of total carboidratods. The minerals present in the shells were 11,66 mg/kg magnesium, 0,162 mg/kg of iron, 0,067 mg/kg of copper, 0,270 mg/kg of manganese and 0,071 mg/kg zinc. The lyophilized extracts of pomegranate peel had a higher content of total phenolic compounds and also a higher antioxidant activity compared to other treatments s by conventional drying. Despite these losses, the extracts showed no bactericidal activity against *E. coli* and *Salmonella typhimurium*, but showed bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* at the minimum concentration of 625 µg/ml aqueous and ethanol extracts.

CONCLUSIONS

Despite significant losses in phenolic content and antioxidant capacity losses in the drying oven had the highest yield and shorter drying time and it is also a process of greater economic viabilit

Keywords: pomegranate peels; drying; antioxidante activity; phenolic compounds.

RESUMO GERAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EXTRATOS DE CASCAS DE ROMÃS (*PUNICA GRANATUM L.*) SUBMETIDAS A DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM.

INTRODUÇÃO

A romã (*Punica Granatum L.*) é uma fruta originária do Oriente Médio, pertencente à família Punicaceae. É rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante *in vitro*. São popularmente consumidas nas formas *in natura*, sucos, alimentos como doces e geléias e extratos, os quais são utilizados como ingredientes botânicos na medicina natural e suplementos alimentares. As cascas de romã são consideradas partes não comestíveis ou subproduto, obtido durante o processamento do suco. É caracterizado pela presença significativa de polifenóis como elagitaninos, ácido elágico e ácido gálico e de flavonóides, os quais estão associados a propriedades biológicas, como agente antioxidante e antimicrobiano. As indústrias fabricantes de suco de romã geram grandes quantidades de subprodutos, os quais geram séria poluição ambiental além de agir como substrato para proliferação de insetos e microrganismos. As cascas de romã processadas possuem geralmente alta quantidade de umidade (aproximadamente 66,3%) e precisa ser removida antes da extração de produtos de alto valor agregado como flavonóides e taninos. A secagem tem sido sempre de grande importância para preservação de produtos e subprodutos da agricultura.

OBJETIVOS

Avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos aquoso e etanólico de cascas de romã, submetidas a dois métodos de secagem: convencional em estufa e liofilização.

MATERIAL E METODOS

As romãs foram adquiridas no comércio local de Maringá-Paraná-Brasil no mês de setembro de 2013. Imediatamente após a coleta, se aplicou o processo de higienização com água corrente e sanitização dos frutos com solução de hipoclorito de sódio a 20 ppm por 15 minutos. As cascas das romãs foram separadas manualmente, em pedaços de aproximadamente 2 centímetros e então lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, seguido de armazenamento em embalagem laminada à vácuo e congeladas a -20°C até o momento de processo e análise.

Para os processos de secagem foram utilizadas frações de 100 gramas de cascas de romãs, em triplicata. Na secagem em estufa, as amostras de cascas foram dispostas em bandejas descartáveis de alumínio, com espaços de aproximadamente 1 centímetro entre os pedaços e submetidas à secagem em desidratadora com circulação de ar (Pardal Tecnologia para Agro Indústria) nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), até que as cascas obtivessem atividade de água 0,3 e umidade com valor inferior a 3%, o equivalente ao período de secagem de 35, 18 e 12 horas, respectivamente. Para a

liofilização, as cascas de romã foram processadas em liofilizador Alpha 1- 4 LD plus Christ, a -50°C e 0,040 mbar, por um período de 24 horas, considerando os mesmos parâmetros de atividade e umidade para secagem em estufa. Após processadas, as cascas secas foram trituradas em moinho de facas (Marconi), padronizadas com granulometria 60 mesh e armazenadas em embalagem laminada a vácuo sob congelamento a -20°C , até o momento de processamento e análise.

A determinação da composição centesimal foi realizada segundo metodologia AOAC. Para a determinação de minerais foi utilizada extração por via seca, solubilizando-se as cinzas em 50 ml de ácido nítrico 2,5% e a leitura dos metais realizada por meio de Espectrômetro de Absorção Atômica, Varian - SPECTRAA-240FS.

Para o preparo dos extratos foram homogeneizadas as cascas trituradas e os solventes água deionizada e solução etanólica a 80% na proporção 1:20, permanecendo a mistura em repouso por um período de 48 horas, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O líquido de coloração amarela foi centrifugado (*Centribio*) a 3500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante filtrado a vácuo, em funil de Büchner e filtro 0,5 μm (*Zeta Plus*). O filtrado foi rotaevaporado (*Büchi RE 120*) a 50°C , liofilizado e armazenado em frasco âmbar sob congelamento a -20°C , sendo assim identificados: extrato aquoso de cascas liofilizadas (LA), extrato etanólico de cascas liofilizadas (LE), extrato aquoso (40A) e extrato etanólico (40E) de cascas secas a 40°C , extrato aquoso (50A) e extrato etanólico (50E) de cascas secas a 50°C e por fim, extrato aquoso (60A) e extrato etanólico (60E) de cascas secas a 60°C .

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada por meio de espectrofotometria, segundo método colorimétrico com reagente Folin-Ciocalteu, com padrão ácido gálico (20 a 200 $\mu\text{mol/ml}$). A determinação da atividade antioxidante foi realizada através da captura do radical livre 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A atividade antioxidante é expressa em equivalente Trolox/g de extrato. Curva Trolox 0-75 $\mu\text{mol/L}$, R^2 : 0,997. A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico (ABTS). A atividade antioxidante é expressa em equivalente Trolox/g de extrato. Curva de calibração com Trolox (500-2000 mMol/L). R^2 : 0,994.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e alcoólico de cascas de romãs, foram utilizados os microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, segundo metodologia proposta pela Clinical and Laboratory Standards Institute, utilizando ampicilina como controle positivo. Neste ensaio foram utilizados extratos nas concentrações de 5000 a 625 $\mu\text{g/ml}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cascas de romãs *in natura* apresentaram um valor de atividade de água de 0,977. O rendimento do processo de secagem foi de 39,0% ($\pm 0,35$), 39,6% ($\pm 1,5$), 38,3% ($\pm 0,81$) e 32,6% ($\pm 0,93$) para as secagens em estufa a 40°C , 50°C , 60°C e liofilização, respectivamente. O rendimento da extração aquosa e alcoólica em todos os tratamentos apresentou valores acima de 40%. Na análise centesimal obteve-se 65,35% de umidade, 3,34% de cinzas, 0,41% de lipídios, 3,13% de proteínas totais e 27,89% de carboidratos totais. Os minerais presentes nas cascas foram 11,66 mg/Kg de magnésio, 0,162mg/Kg de ferro, 0,067mg/Kg de cobre, 0,270mg/kg de manganês e 0,071mg/Kg de zinco. Os extratos de cascas de romã liofilizada apresentaram um maior conteúdo de compostos fenólicos totais e também uma maior atividade antioxidante em relação aos demais tratamentos por secagem convencional. Apesar destas perdas, os extratos não apresentaram ação bactericida contra *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, mas apresentaram ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* na concentração mínima de 625 $\mu\text{g/ml}$ de extratos aquoso e etanólicos.

CONCLUSÕES

Apesar das perdas significativas em teor de compostos fenólicos e perdas na capacidade antioxidante, a secagem por estufa apresentou maior rendimento e menor tempo de secagem e trata-se também de um processo de maior viabilidade econômica.

Palavras chaves: cascas de romã; secagem; atividade antioxidante; compostos fenólicos.

Abstract

The peel of pomegranate (*Punica granatum L.*) are considered fruit products, however have significant concentrations of polyphenols and flavonoids which may be used as antioxidants and antimicrobial agents. The drying process is of great importance and influence on the preservation of these products. The objective of this study was to evaluate the application of two drying methods: under glass and freeze-drying on the antioxidant and antimicrobial potential of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel. Pomegranates collected in local shops Maringa-Paraná-Brazil and were cleaned and sanitized. The shells were manually separated, washed, dried at room temperature and protected from light, stored in vacuum packaging and frozen at -20°C for analysis. In the drying oven peel samples were subjected to the dehydration process with air circulation at temperatures of 40°C, 50°C and 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) until the peel obtain water activity and humidity 0.3 with less than 3%. For lyophilization, pomegranate peels were processed in a lyophilizer for a period of 24 hours, whereas the same parameter activity and moisture to oven drying. Dry pomegranate peels were extracted with water and ethanol and evaluated for chemical composition, concentration of total phenolic compounds, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity. The results showed that drying oven has a higher yield and economic feasibility shorter drying time, but the values of phenolics and antioxidant activity were significantly reduced.

Resumo

As cascas de romã (*Punica granatum L.*) são consideradas produtos de fruta, no entanto, apresentam concentrações significativas de polifenóis e flavonóides que podem ser utilizados como antioxidantes e agentes antimicrobianos. O processo de secagem é de grande importância e influência sobre a preservação destes produtos. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de dois métodos de secagem: em estufa e de liofilização sobre o antioxidante e potencial antimicrobiano de extratos aquosos e etanol de casca de romã. As romãs foram coletadas em lojas locais de Maringá-Paraná-Brasil e foram limpas e higienizadas. As cascas foram separadas manualmente, lavadas, secas em temperatura ambiente e protegidas da luz, armazenadas em embalagens à vácuo e congeladas a -20°C para análise. Na secagem em estufa as amostras de cascas foram submetidas ao processo de desidratação com circulação de ar a temperaturas nas temperaturas de 40°C , 50°C e 60°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) até se obter uma atividade de água e umidade atingissem 0,3 e 3% respectivamente. Na liofilização, as cascas romã foram processadas durante um período de 24 horas, até que os mesmos parâmetros fossem atingidos. As cascas secas foram extraídas com água e etanol e avaliadas quanto à composição centesimal, a concentração de compostos fenólicos totais, avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados mostraram que a secagem em estufa apresentou rendimento e viabilidade econômica mais elevada e tempo de secagem reduzido, no entanto os valores de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram menores significativamente.

1. Introdução

A romã (*Punica Granatum* L.) é uma fruta originária do Oriente Médio, pertencente à família Punicaceae. É rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante *in vitro* (Saxena and Vikram, 2004). São popularmente consumidas nas formas *in natura*, sucos, alimentos como doces e geléias e extratos, os quais são utilizados como ingredientes botânicos na medicina natural e suplementos alimentares Mohagheghi *et al.* 2011; Goula and Adamopoulos, 2012). A romã é composta de três partes: cascas, sementes e suco. As cascas de romã são consideradas partes não comestíveis ou subproduto, obtido durante o processamento do suco. É caracterizado pela presença significativa de polifenóis como elagitaninos, ácido elágico e ácido gálico (Negi *et al.* 2003; Faria and Calhau, 2010) e de flavonóides, os quais estão associados a propriedades biológicas, como agente antioxidante e antimicrobiano (Glazer *et al.*, 2012; Doymaz, 2011).

As indústrias fabricantes de suco de romã geram grandes quantidades de subprodutos e o acúmulo destes resíduos pode causar séria poluição ambiental além de agir como substrato para proliferação de insetos e microrganismos. As cascas de romã processadas possuem geralmente alta quantidade de umidade (aproximadamente 66,3%) e precisa ser removida antes da extração de produtos de alto valor agregado como flavonóides e taninos. A secagem tem sido sempre de grande importância para preservação de produtos e subprodutos da agricultura (Sánchez-Zapata *et al.* 2009).

O desenvolvimento de sistemas de otimização para recuperação de compostos valiosos pode contribuir para a redução dos resíduos. No entanto, como etapa prévia, estes sub-produtos precisam ser caracterizados para otimizar os processos de recuperação (AOAC, 1997).

O presente estudo objetivou avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos aquoso e etanólico de cascas de romã, submetidas a dois métodos de secagem: convencional em estufa e liofilização.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

O reagente ácido gálico, reagente Folin- Ciocalteau, DPPH, TROLOX e ABTS foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e os meios de cultura para análise microbiológica adquiridos da empresa DIFCO. As romãs foram adquiridas no comércio local de Maringá- Paraná-Brasil no mês de setembro de 2013.

2.2 Preparo das amostras

As romãs foram adquiridas no comércio local de Maringá- Paraná-Brasil no período de setembro de 2013. Imediatamente após a coleta, as frutas foram levadas ao Laboratório de Análises Físico-Químicas de Alimentos, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, onde se aplicou o processo de higienização com água corrente e sanitização dos frutos com solução de hipoclorito de sódio a 20 ppm por 15 minutos. Com o auxílio de facas, as cascas das romãs foram separadas manualmente, em pedaços de aproximadamente 2 centímetros e então lavadas primeiramente com água corrente e depois com água deionizada para a retirada de resíduos da polpa, e então colocadas para secagem à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, seguido de armazenamento em embalagem laminada à vácuo e congeladas a -20°C até o momento de processo e análise.

2.3 Secagem em estufa e liofilização

Para os processos de secagem foram utilizadas frações de 100 gramas de cascas de romãs, em triplicata. Na secagem em estufa, as amostras de cascas foram dispostas em

bandejas descartáveis de alumínio, com espaços de aproximadamente 1 centímetro entre os pedaços e submetidas à secagem em desidratadora com circulação de ar (Pardal Tecnologia para Agro Indústria) nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C ($\pm 1^\circ$), até que as cascas obtivessem atividade de água 0,3 e umidade com valor inferior a 3%, o equivalente ao período de secagem de 35, 18 e 12 horas, respectivamente. Para a liofilização, as cascas de romã foram processadas em liofilizador Alpha 1- 4 LD plus Christ, a -50°C e 0,040 mbar, por um período de 24 horas, considerando os mesmos parâmetros de atividade e umidade para secagem em estufa. Após processadas, as cascas secas foram trituradas em moinho de facas (Marconi), padronizadas com granulometria 60 *mesh* e armazenadas em embalagem laminada à vácuo sob congelamento a -20°C, até o momento de processamento e análise.

2.4 Composição centesimal e mineral

Para a determinação de umidade foi utilizada a técnica de secagem em estufa a 105°C e para quantificação das cinzas, a incineração da amostra a 550°C em forno mufla. Para determinação de lipídios totais foi utilizado o solvente éter de petróleo no método Soxhlet e quantificação de proteína pelo método Kjeldahl, empregando o fator 6,25 para o cálculo de proteína total (AOAC, 1997). Para a determinação de minerais foi utilizada extração por via seca, onde 0,50 gramas de amostra seca foram incineradas em forno mufla a 550°C, até obter cinzas brancas. As cinzas foram solubilizadas em 50ml de ácido nítrico 2,5% e a leitura dos metais realizada por meio de Espectrômetro de Absorção Atômica, Varian - SPECTRAA-240FS.

Para a análise em CLAE dos açúcares, utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - Gilson 307, com sistema de bombeamento isocrático, válvula injetora tipo Rheodyne, alça de amostragem de 20µL de capacidade e detector de Índice de refração acoplado a software BORWIN 1.5 JMBS.

Para a separação dos compostos utilizou-se fase móvel acetonitrila/água (80/20). A vazão adotada foi de 0,5 ml/min e coluna cromatográfica de NH₂ Metasil, com partículas de 5 µm, com dimensões de 125 x 4,6 mm d.i.

A identificação de açúcares foi realizada através da comparação dos tempos de retenção dos padrões analisados com os tempos de retenção das amostras nas mesmas condições analíticas.

A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando-se sete níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

2.5 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos foram homogeneizadas as cascas trituradas e os solventes água deionizada e solução etanólica a 80% na proporção 1:20, permanecendo a mistura em repouso por um período de 48 horas, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O líquido de coloração amarela foi centrifugado (Centribio) a 3500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante filtrado a vácuo, em funil de Büchner e filtro 0,5µm (Zeta Plus). O filtrado foi rotaevaporado (Büchi RE 120) a 50°C, liofilizado e armazenado em frasco âmbar sob congelamento a -20°C, sendo assim identificados: extrato aquoso de cascas liofilizadas (LA), extrato etanólico de cascas liofilizadas (LE), extrato aquoso (40A) e extrato etanólico (40E) de cascas secas a 40°C, extrato aquoso (50A) e extrato etanólico (50E) de cascas secas a 50°C e por fim, extrato aquoso (60A) e extrato etanólico (60E) de cascas secas a 60°C.

2.6 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada através de espectrofotometria, segundo método colorimétrico com reagente Folin-Ciocalteu, com padrão ácido gálico (20 a 200µmol/ml) (Singleton and Rossi, 1965; Dewanto *et al.*

2002). Em um tubo de ensaio protegido contra a luz 125µl de extrato (100µg/ml) foram adicionados de 500µl de água deionizada e 125 µl de reagente Folin-Ciocalteu e agitado em vortex por 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 1,5ml de carbonato de sódio 7%, deixando reagir por 90 minutos na ausência de luz. Leitura realizada a 760 nanômetros em espectrofotômetro Cary 50 Sacan UV-Visible – Varian. Os resultados estão expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE/g). R^2 : 0,995.

2.7 Análise da atividade antioxidante

2.7.1 DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através da captura do radical livre 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH) (Brand-Williams *et al.* 1995), onde em um tubo de ensaio 2,5ml de extrato (100µg/ml) foram adicionados de 1 ml de DPPH 0,3 mmol/L, agitados em vortex e mantido ao abrigo da luz por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 518 nanômetros, utilizando um branco com 2,5 ml do extrato e 1 ml do solvente utilizado na extração e controle negativo 2,5ml do solvente utilizado na extração e 1 ml da solução de DPPH. A atividade antioxidante é expressa em equivalente Trolox/g de extrato. Curva Trolox 0- 75µmol/L, R^2 : 0,997.

2.7.2 ABTS

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) (Rufino *et al.* 2007) onde 30µl do extrato (100µg/ml) é adicionado de 3 ml da solução do radical ABTS (obtida pela mistura de 5 ml da solução estoque de ABTS 7mM com 88µl da solução de persulfato de potássio mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas e diluída em álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nanômetros). Após homogeneização em vortex, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 734 nanômetros. A atividade

antioxidante é expressa em equivalente Trolox/g de extrato. Curva de calibração com Trolox (500 a 2000mMol/L). R^2 : 0,994.

2.8 Atividade antimicrobiana dos extratos de cascas de romã

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e alcoólico de cascas de romãs, foram utilizados os microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, segundo metodologia proposta pela Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical And Laboratory Standards Institute, 2012), utilizando ampicilina como controle positivo. Neste ensaio foram utilizados extratos nas concentrações de 5000 a 625 µg/ml.

2.9 Avaliação estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) e cálculo de médias por Tukey ($p > 0,05$) através do software STATISTIC 6.0 (2001).

3. Resultados e Discussão

As cascas de romãs *in natura* apresentaram um valor de atividade de água de 0,977. O rendimento do processo de secagem corresponde à proporção entre a massa de material seco e a massa do material úmido. Nos processos de secagem do presente estudo, os rendimentos foram de 39,0% ($\pm 0,35$), 39,6% ($\pm 1,5$), 38,3% ($\pm 0,81$) e 32,6% ($\pm 0,93$) para as secagens em estufa a 40°C, 50°C, 60°C e liofilização, respectivamente. O rendimento da extração aquosa e alcoólica, dado pelo percentual de sólidos totais do extrato, apresentou valores acima de 40% em todos os tratamentos, resultados este semelhante ao rendimento de extração aquosa com aquecimento (50%). Na Tabela 1

estão apresentados os resultados da análise centesimal das cascas de romãs *in natura*, que apresentaram alto teor de carboidratos e cinzas.

Tabela 1. Resultados da análise centesimal de cascas de romã *in natura* expressos na base úmida (%).

Umidade	Material Mineral	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
65,35 ±0,08	3,34±0,05	0,41±0,06	3,13±0,01	27,89±0,08

Estudos anteriores mostraram que bagaços de romãs obtidos do processamento de suco contendo cascas junto de sementes foram caracterizados e apresentaram altos teores de proteínas (10,9%), lipídios (20,9%) e cinzas (2,5%) (Viuda-Martos, 2010). Os valores dos minerais contidos nas cascas de romãs estão apresentados na Tabela 2. Os dados mostram que o potássio é o macro-elemento em maior abundância nas cascas de romã enquanto que o ferro é o micro-elemento predominante, sendo o manganês também encontrado em quantidade significativa na amostra. A concentração de minerais nos frutos é variável, e geralmente, há um significativo decréscimo nessas concentrações com o avanço do estágio de maturação, com exceção para o potássio, ferro, manganês e zinco (Fawole and Opara, 2013). A tabela 3 mostra os resultados referentes à quantificação de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Tabela 2. Composição mineral das cascas

Mineral	Concentration
P (g/Kg)	0,6 ± 0,35
K (g/Kg)	14,5 ± 0,89
S (g/Kg)	2,96 ± 0,75
Ca (g/Kg)	2,55 ± 0,93
Mg (g/Kg)	0,71 ± 0,55
Fe (mg/Kg)	64,29 ± 0,81
Cu (mg/Kg)	2,72 ± 0,45
Zn (mg/Kg)	25,52 ± 1,06
Mn (mg/Kg)	59,60 ± 0,79

Tabela 3. Composição em fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cascas de romã

Amostra	Compostos		
	Fenólicos (mgGAE/g)	DPPH (µmolTrolox/g)	ABTS (µmolTrolox/g)
LA	34,7±1,1 ^a	595,71±0,2 ^b	1056,34±0,4 ^a
LE	37,3±0,8 ^b	586,96±0,1 ^b	1035,98±0,2 ^a
40^a	35,1±0,5 ^a	356,71±0,1 ^a	865,23±0,1 ^b
40E	44,5±0,8 ^b	364,57±0,1 ^a	897,46±0,4 ^b
50^a	31,8±0,9 ^a	355,86±0,3 ^a	846,37±0,3 ^b
50E	41,0±1,1 ^b	358,86±0,3 ^a	865,70±0,2 ^b
60^a	39,4±1,1 ^b	351,36±0,2 ^a	871,73±0,2 ^b
60E	43,3±2,2 ^b	359,21±0,1 ^a	885,04±0,1

É possível observar que o emprego da secagem convencional não influenciou negativamente a concentração de compostos fenólicos presentes nas cascas, mas houve impacto sobre a atividade antioxidante das mesmas, em comparação com a liofilização.

A utilização da solução etanólica a 80% favoreceu a extração de compostos fenólicos em comparação com a extração com água deionizada. Tal fato também foi verificado em estudos anteriores com melhor eficiência de extração com acetona:água 50% (40,30 mg GAE/g) e etanol: água 50% (39,89 mg GAE/g) como solventes e que, apesar da extração aquosa apresentar o mesmo percentual de rendimento de extração mostrou menor concentração de fenólicos (25,97 mg GAE/g) (Wang *et al.* 2004). Outros autores ainda mostram que a quantidade de compostos fenólicos presentes nas cascas de romãs podem ser maiores do que os encontrados na polpa e sementes do fruto, com 242,9 mg GAE/G nas cascas, 62mg GAE/g nas sementes e 26,2 mg GAE/g de polpa (Salgado *et al.* 2012), assim como este composto pode estar presente nas cascas de romã em concentrações variadas, devido a o fato de que são compostos secundários de plantas e sua produção pode ser estimulada por outros fatores ambientais como stress abiótico ou contato com patógenos e pragas (Nasri *et al.* 2009). A Tabela 4 mostra os dados da atividade antimicrobiana dos extratos de romã. Não houve atividade inibitória e bactericida para *E. coli* e *S. tyhimurium* pelos extratos de cascas de romã, apresentando esta ação somente para *S. aureus* na concentração mínima de 650 µg/ml de extrato.

Tabela 4. Concentração Mínima Inibitória dos extratos de cascas de romãs ($\mu\text{g/ml}$)

Amostra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
LA	ND*	ND	625
LE	ND	ND	625
40^a	ND	ND	1250
40E	ND	ND	1250
50^a	ND	ND	1250
50E	ND	ND	1250
60^a	ND	ND	625
60E	ND	ND	625

*: atividade antimicrobiana não detectada.

Estudos semelhantes têm mostrado que extratos de romã são efetivos na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, especialmente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estudos anteriores mostram uma ação bactericida contra *S. aureus* com extratos metanólicos de cascas de romãs a uma concentração de 1% e a inibição da produção da toxina estafilocócica A a 0,01% (Braga *et al.* 2005). Também a inibição de *S. aureus* na aplicação de 0,01% de extrato aquoso de cascas de romã, mas não conseguiram inibição de *E. coli* na maior concentração utilizada, 0,1% (Oliveira *et al.* 2009).

O presente estudo evidenciou que o processo de secagem convencional ocasionou uma perda significativa nos teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos em comparação com o processo de liofilização, sem que este dado interferisse no desempenho do teste antimicrobiano.

4. Conclusão

Apesar das perdas significativas em teor de compostos fenólicos e perdas na capacidade antioxidante, a secagem por estufa apresentou maior rendimento e menor tempo de secagem e trata-se também de um processo de maior viabilidade econômica.

5. Referências

1. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1997.
2. Braga CL, Shuppb WJ, Cummingsb C, Jettb M, Takahashic AJ, Carmod S, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 335–339.
3. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25–30.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty- second Informational supplement. M100-S22, 32 (3).
5. Dewanto V, Wu X, Adom K, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasin total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3010–3014.
6. Doymaz I (2011) Experimental Study on Drying Characteristics of Pomegranate Peels. *Food Sci. Biotechnol.* 20(4): 965-970.
7. Faria A, Calhau C (2010) Pomegranate in human health: An overview. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits andVegetables*. Watson RR, Preedy VR (eds). Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 551-563.

8. Fawole AO, Opara LU (2013) Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. Ruby) fruit at five maturity stages. *Scientia Horticulturae*, 150: 37–46.
9. Glazer I, Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, Amir R (2012) Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 60: 4841–4848.
10. Goula MA, Adamopoulos GKA (2012) Method for pomegranate seed applications in food industries: seed oil encapsulation. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 639–652.
11. Kanatt RS, Chander R, Sharma A (2010) Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 216–222.
12. Mohagheghi M, Rezaei K, Labbafi M, Mousavi SME (2011) Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 730–736.
13. Nasri WE, Marzougui N, Thabti I, M'rabet A, Yahya Y, Lachiheb B, Guasmi F, Ferchichi A (2009) Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. *Int J Food Sci Nutr*, 60(2): 197–210.
14. Negi SP, Jayaprakasha KG, Jena SB (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80: 393–397.
15. Negi SP, Jayaprakasha KG (2003) Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, 68 (4).
16. Oliveira AC, Valentim IB, Silva CA, Bechara EJH, Barros MP, Mano CM, Goulartl MO (2009) Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115(2), 469–475.

17. Prashanth D, Asha KM, Amit A (2001) Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72: 171–173.
18. Rufino MSM, Alves ER, Brito SE, Moraes MS, Sampaio GC, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto DF (2007) Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. Comunicado técnico online. ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE.
19. Salgado MJ, Ferreira BRT, Biazotto OF, Dias STC. Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. *Plant Foods Hum Nutr.* 67: 39–43.
20. Sánchez-Zapata E, Fuentes-Zaragoza E, Fernández-López J, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Pérez-Alvarez JA (2009) Preparation of dietary fibre powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk (“horchata”) byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7719–7725.
21. Saxena A, Vikram NK (2004) Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: A review. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 10:369–378.
22. Singleton VL, Rossi JÁ (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
23. Ventura J, Alarcón-Aguilara F, Roman-Ramos R, Campos-Sepulveda E, Reyes-Vega ML, Boone-Villa VD, Jasso-Villagómez EI, Aguilar CN (2013) Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry*, 136(1):109–115.
24. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Sendra E, Sayas-Barberá, Pérez-Álvarez, AJ (2010) Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.)

bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 4: 1217–1223.

25. Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W (2004) Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). *Journal of Natural Products*, 67: 2096–2098.

Abstract

The peel of pomegranate (*Punica granatum L.*) are considered fruit products, however have significant concentrations of polyphenols and flavonoids which may be used as antioxidants and antimicrobial agents. The drying process is of great importance and influence on the preservation of these products. The objective of this study was to evaluate the application of two drying methods: under glass and freeze-drying on the antioxidant and antimicrobial potential of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel. Pomegranates collected in local shops Maringa-Paraná-Brazil and were cleaned and sanitized. The shells were manually separated, washed, dried at room temperature and protected from light, stored in vacuum packaging and frozen at -20°C for analysis. In the drying oven peel samples were subjected to the dehydration process with air circulation at temperatures of 40°C, 50°C and 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) until the peel obtain water activity and humidity 0.3 with less than 3%. For lyophilization, pomegranate peels were processed in a lyophilizer for a period of 24 hours, whereas the same parameter activity and moisture to oven drying. Dry pomegranate peels were extracted with water and ethanol and evaluated for chemical composition, concentration of total phenolic compounds, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity. The results showed that drying oven has a higher yield and economic feasibility shorter drying time, but the values of phenolics and antioxidant activity were significantly reduced.

Keywords: pomegranate peels; drying; antioxidante activity; phenolic compounds.

1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum L.*) is a native fruit of the Middle East, belonging to Punicaceae family. It is rich in phenolic compounds that exhibit strong antioxidant activity in vitro (Saxena and Vikram, 2004). Are popularly consumed in the forms in nature, juices, foods like jams and jellies and extracts, which are used as botanical ingredients in natural medicine and dietary supplements (Mohagheghi *et al.* 2011; Goula and Adamopoulos, 2012). The pomegranate is composed of three parts: bark, seeds and juice. The pomegranate peels are considered inedible parts or by-product obtained during the processing of juice. It is characterized by significant presence of ellagitannins and polyphenols, gallic acid and ellagic acid (Negi *et al.* 2003; Faria and Calhau, 2010) and flavonoids, which are associated with biological properties such as antioxidant and antimicrobial agent (Glazer *et al.*, 2012; Doymaz, 2011).

The pomegranate juice manufacturing industries generate large amounts of by-products, which generate serious environmental pollution in addition to acting as a substrate for proliferation of insects and microorganisms. Processed pomegranate peels usually have high amount of moisture (approximately 66.3%) and must be removed prior to production of high added value products such as flavonoids and tannins. Drying has always been of great importance to preservation of products and by-products of agriculture (Sánchez-Zapata *et al.* 2009).

The development of systems for optimizing the recovery of valuable compounds might contribute to the reduction of waste. However, as a preliminary step, these by-products need to be characterized to optimize the recovery processes (AOAC, 1997).

This study aimed to evaluate the application of two drying methods: conventional oven drying and freeze drying on the antioxidant and antimicrobial potential of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel.

2. Material and Methods

2.1 Reagent

The reagents gallic acid, Folin-Ciocalteu reagent, DPPH, ABTS and Trolox were purchased from Sigma-Aldrich and culture media for microbiological analysis purchased from DIFCO company analysis.

2.2 Sample collection

Pomegranates were bought locally and Maringa- of Paraná, Brazil from September 2013. Immediately after harvesting, the fruits were taken to laboratory analysis Physical and Chemical Food, Department of Food Engineering at the State University of Maringa where it is applied the cleaning process with running water and sanitizing fruits with sodium hypochlorite solution at 20 ppm for 15 minutes. With the aid of knives, the peels of pomegranates were separated by hand into pieces approximately 2 centimeters and then first washed with water and then with deionized water to remove residues of the pulp and then placed for drying at room temperature and under light, followed by storage under vacuum laminated packaging and frozen at -20°C until process and analysis.

2.3 Kiln drying and lyophilisation

For drying processes fractions were used in 100 grams of peels of pomegranates, in triplicate. In the oven drying, the samples peels were placed in disposable trays of aluminum, with spaces between about 1 centimeter pieces and dried in an air circulating dehydrating (Sparrow Agro Industry Technology) at temperatures of 40°C, 50°C and 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) until the peel obtain 0,3 water activity and moisture to below 3%, equivalent to the drying period of 35, 18 and 12 hours, respectively. For lyophilization, pomegranate peels were processed on lyophilizer *Alpha 1- 4 LD plus Christ* to -50°C

and 0.040 mbar for a period of 24 hours, whereas the same parameter activity and moisture to oven drying. After processed, dried shells were ground in a Wiley mill (Marconi), standard with a particle size 60 mesh and stored in laminated packaging to vacuum freezing at -20°C to date processing and analysis.

2.4 Proximate and mineral composition

Measurements of moisture, ash, total lipids and total protein were carried out using the Kjeldahl factor of 6,25 and for total protein and total lipids calculation using petroleum ether as solvent (AOAC, 1997). For the determination of mineral extraction was used dry, in which 0,50 grams of dry sample were incinerated in a muffle furnace at 550°C, to give white ashes. The ashes were solubilized in 50 ml of nitric acid 2,5% and metals of the reading performed by means of atomic absorption spectrometer, Varian - SPECTRAA-240FS.

For the analysis of sugars on HPLC. We used a liquid chromatograph High Efficiency - Gilson 307, with isocratic pumping system, valve type injector Rheodyne, sampling loop 20µL capacity and refractive index detector coupled to software Borwin 1,5 JMBS.

For separation of the compounds we used a mobile phase acetonitrile/water (80/20). The chosen flow rate was 0,5 ml/min and Metasil NH₂ chromatography column with 5µm particles, with dimensions of 125 x 4.6mm i.d.

The identification of the sugars was performed by comparison of retention times of standards analyzed with the retention times of the samples under the same analytical conditions. The quantification was performed by external standardization, using seven levels of concentration, each point represented the mean of three determinations.

2.5 Preparation of extracts

For the preparation of extracts the crushed shells were homogenized and the solvents ethanol solution and deionized water to 80% at the 1:20 ratio, the mixture remained at rest for a period of 48 hours under light and at room temperature. The liquid yellow coloration was centrifuged (*Centribio*) at 3500 rpm for 15 minutes and the supernatant was vacuum filtered in Büchner funnel and 0,5µm filter (*Zeta Plus*). The filtrate was concentrated in rotatory evaporator (*Büchi RE 120*) at 50°C, lyophilized and stored in amber vial under freezing at -20°C, and identified as follows: lyophilized aqueous extract of bark (LA), the ethanol extract of peel liofilzadas (LE), aqueous extract (40A) and ethanol extract (40E) of dried bark to 40°C, aqueous extract (50A) and ethanol extract (50E) of dried bark to 50°C and finally aqueous extract (60A) and ethanol extract (60E) of dried bark to 60°C.

2.6 Determination of total phenolic compounds

The determination of total phenolic compounds was performed by spectrophotometry according colorimetric method with Folin-Ciocalteu reagent with standard gallic acid (20 to 200 µmol/ml) (Singleton and Rossi, 1965; Dewanto *et al.* 2002). In a test tube protected from light extract of 125µl (100 µg/ ml) were added to 500µl of deionized water and 125 uL of Folin-Ciocalteu reagent and vortexed for 1 minute. Then, it added 1.5 ml of 7% sodium carbonate, leaving to react for 90 minutes in the dark. Reading held to 760 nanometers in a spectrophotometer *Cary 50 UV-Visible Sacan - Varian*. The results are expressed in milligrams of gallic acid per gram of extract (mg GAE/g). R^2 : 0.995.

2.7 Analysis of antioxidant activity

2.7.1 DPPH

Determination of antioxidant activity was performed by free radical capture 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams *et al.* 1995), in which an extract of 2,5 ml tube (100 µg/ml) were added 1ml of DPPH 0,3 mmol/L, vortexed and kept away from light for 30 minutes. The reading was performed in a spectrophotometer at 518 nanometers, using a blank with 2,5 ml of extract and 1 ml of the solvent used in the extraction and negative control 2,5 ml of the solvent used in the extraction and diluição 1 mL of DPPH. The antioxidant activity is expressed in equivalent Trolox/g extract. Trolox curve 0-75 µmol/L, R^2 : 0.997.

2.7.2 ABTS

Determination of antioxidant activity by radical capture 2,2-azino-bis (3-ethyl-sulfonic-6-benzothiazoline acid (ABTS) (Rufino *et al.* 2007) on which the extract 30µl (100 µg/ml) is added ml of the solution of 3 ml of ABTS radical (obtained by mixing 5 ml of 7 mM ABTS stock solution with 88µl of potassium persulfate solution kept in the dark at room temperature for 16 hours and diluted with ethyl alcohol to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.05 to 734 nanometers) After homogenization in vortex, the reading is made in spectrophotometer at 734 nanometers. The antioxidant activity is expressed in equivalent Trolox/g extract calibration curve with Trolox (500 to 2000 mMol/L) R^2 : 0.994.

2.8 Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts

For the evaluation of the antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of pomegranate peel, the *Escherichia coli* microorganisms were used ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, according to the methodology proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical And Laboratory Standards Institute, 2012) using ampicillin as a

positive control. In this assay were used at concentrations of extracts 5000 the 625 ug/ml.

2.9 Statistical evaluation

The statistical analysis of results was performed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey calculating averages ($p > 0,05$) using SOFTWARE STATISTIC 6.0 (2001).

3. Results and Discussion

The peels of apples in natura showed a value of 0,977 water activity. The efficiency of the drying process corresponds to the ratio between the mass of dry material and the mass of the wet material. In the drying process of this study, the yields were 39.0% ($\pm 0,35$), 39,6% ($\pm 1,5$) 38.3% (± 0.81) and 32,6% ($\pm 0,93$) for drying in an oven at 40°C, 50°C, 60°C and lyophilization respectively. The yield of the aqueous and alcoholic extraction, given by the percentage of total extract solids, showed values above 40% in all treatments, results similar to this performance aqueous extraction with heating (50%) (Ventura *et al.* 2013). Table 1 shows the results of proximate analysis of pomegranate peels *in natura*, which showed high content of carbohydrates and ashes.

Table 1. Proximate analysis results of pomegranate peels in natura expressed on wet basis (%).

Humidity	Gray	Lipids	Protein	Carbohydrates
65,35 \pm 0,08	3,34 \pm 0,05	0,41 \pm 0,06	3,13 \pm 0,01	27,89 \pm 0,08

Previous studies show that cake obtained from the processing of apples containing juice from seed husks were characterized and showed high protein content (10,9%), lipid (20,9%) and ash (2,5%) (Viuda-Martos, 2010). The amounts of minerals

contained in peels of pomegranates are shown in Table 2. The data show that Potassium is the macro-element in greater abundance in pomegranate peels while the iron is the predominant micro-element, being also found in manganese significant amount in the sample. The concentration of minerals in the fruits is variable, and usually there is a significant decrease in these concentrations with the advance stage of maturity except for potassium, iron, manganese and zinco (Fawole and Opara, 2013). Table 3 shows the results regarding the quantification of phenolic compounds and antioxidant activity.

Table 2. Mineral composition of shells

Mineral	Concentration
P (g/Kg)	0,6 ± 0,35
K (g/Kg)	14,5 ± 0,89
S (g/Kg)	2,96 ± 0,75
Ca (g/Kg)	2,55 ± 0,93
Mg (g/Kg)	0,71 ± 0,55
Fe (mg/Kg)	64,29 ± 0,81
Cu (mg/Kg)	2,72 ± 0,45
Zn (mg/Kg)	25,52 ± 1,06
Mn (mg/Kg)	59,60 ± 0,79

Table 3. Composition of total phenolic and antioxidant activity of pomegranate peel extracts.

Sample	Total Phenolics (mgGAE/g)	DPPH (µmolTrolox/g)	ABTS (µmolTrolox/g)
LA	34,7 ± 1,1 ^a	595,71 ± 0,2 ^b	1056,34 ± 0,4 ^a
LE	37,3 ± 0,8 ^b	586,96 ± 0,1 ^b	1035,98 ± 0,2 ^a
40^a	35,1 ± 0,5 ^a	356,71 ± 0,1 ^a	865,23 ± 0,1 ^b
40E	44,5 ± 0,8 ^b	364,57 ± 0,1 ^a	897,46 ± 0,4 ^b
50^a	31,8 ± 0,9 ^a	355,86 ± 0,3 ^a	846,37 ± 0,3 ^b
50E	41,0 ± 1,1 ^b	358,86 ± 0,3 ^a	865,70 ± 0,2 ^b
60^a	39,4 ± 1,1 ^b	351,36 ± 0,2 ^a	871,73 ± 0,2 ^b
60E	43,3 ± 2,2 ^b	359,21 ± 0,1 ^a	885,04 ± 0,1

It can be seen that the use of conventional drying does not adversely influence the concentration of phenolic compounds present in the bark, but there was an impact on the antioxidant activity of the same, compared with lyophilization. The use of ethanolic 80% solution favored the extraction of phenolic compounds in comparison with the extraction with deionized water. This was also observed in previous studies with better extraction efficiency with acetone: 50% water (40,30 mg GAE/g) and ethanol: water 50% (39,89 mg GAE/g) as solvents and, although aqueous extraction have the same percentage extraction yield showed lower concentration of phenolics (25,97 mg GAE/g) (Wang *et al.* 2004).

Other authors also show that the amount of phenolic compounds present in peel of pomegranate may be higher than those found in the pulp of the fruit and seeds with 242,9 mg GAE/L in the shells, 62 mg GAE/g and 26,2 in seeds mg GAE/g of pulp (Salgado *et al.* 2012) and this compound may be present in pomegranate peels in varying concentrations, due to the fact that they are secondary metabolites of plants and their production can be stimulated by other environmental factors such as abiotic stress or contact with pathogens and pests (Nasri *et al.* 2009). Table 4 shows the data of the antimicrobial activity of pomegranate extracts. No inhibitory and bactericidal activity for *E. coli* and *S. tyhimurium* the peel of pomegranate extracts, with this action only for *S. aureus* at a minimum concentration of 650 µg/ml of extract.

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration of pomegranate peel extracts (mg/ml)

Sample	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
LA	ND*	ND	625
LE	ND	ND	625
40^a	ND	ND	1250
40E	ND	ND	1250
50^a	ND	ND	1250
50E	ND	ND	1250
60^a	ND	ND	625
60E	ND	ND	625

*: Antimicrobial activity undetected.

Similar studies have shown that pomegranate extracts are effective in inhibiting the growth of gram-positive and gram-negative bacteria, especially *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Previous studies showed bactericidal activity against *S. aureus* in methanolic extracts from pomegranate peels at a concentration of 1% and the inhibition of the production of staphylococcal toxin A at 0,01% (Braga *et al.* 2005). Also inhibition of *S. aureus* in the application of 0,01% aqueous extract of pomegranate peels, but failed to inhibit *E. coli* at the highest concentration used 0,1% (Oliveira *et al.* 2009).

4. Conclusions

This study showed that the conventional drying process caused a significant loss in total phenolics content and antioxidant activity of the extracts compared to the freeze-drying process, without the latter interfere with the performance of antimicrobial test. Despite significant losses in phenolic content and antioxidant capacity losses in the drying oven had the highest yield and shorter drying time and it is also a process of greater economic viability.

5. References

1. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1997.
2. Braga CL, Shuppb WJ, Cummingsb C, Jettb M, Takahashic AJ, Carmod S, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 335–339.
3. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25–30.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty- second Informational supplement. M100-S22, 32 (3).
5. Dewanto V, Wu X, Adom K, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasin total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3010–3014.
6. Doymaz I (2011) Experimental Study on Drying Characteristics of Pomegranate Peels. *Food Sci. Biotechnol.* 20(4): 965-970.
7. Faria A, Calhau C (2010) Pomegranate in human health: An overview. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits andVegetables*. Watson RR, Preedy VR (eds). Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 551-563.
8. Fawole AO, Opara LU (2013) Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. Ruby) fruit at five maturity stages. *Scientia Horticulturae*, 150: 37–46.
9. Glazer I, Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, Amir R (2012) Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 60: 4841–4848.

10. Goula MA, Adamopoulos GKA (2012) Method for pomegranate seed applications in food industries: seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Technology*, 90: 639-652.
11. Kanatt RS, Chander R, Sharma A (2010) Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 216–222.
12. Mohagheghi M, Rezaei K, Labbafi M, Mousavi SME (2011) Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 730–736.
13. Nasri WE, Marzougui N, Thabti I, M'rabet A, Yahya Y, Lachiheb B, Guasmi F, Ferchichi A (2009) Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. *Int J Food Sci Nutr*, 60(2): 197–210.
14. Negi SP, Jayaprakasha KG, Jena SB (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80: 393–397.
15. Negi SP, Jayaprakasha KG (2003) Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, 68 (4).
16. Oliveira AC, Valentim IB, Silva CA, Bechara EJH, Barros MP, Mano CM, Goulartl MO (2009) Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115(2), 469–475.
17. Prashanth D, Asha KM, Amit A (2001) Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72: 171–173.
18. Rufino MSM, Alves ER, Brito SE, Morais MS, Sampaio GC, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto DF (2007) Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. Comunicado técnico online. ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE.

19. Salgado MJ, Ferreira BRT, Biazotto OF, Dias STC. Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. *Plant Foods Hum Nutr.* 67: 39–43.
20. Sánchez-Zapata E, Fuentes-Zaragoza E, Fernández-López J, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Pérez-Alvarez JA (2009) Preparation of dietary fibre powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk (“horchata”) byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7719–7725.
21. Saxena A, Vikram NK (2004) Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: A review. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 10:369–378.
22. Singleton VL, Rossi JÁ (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
23. Ventura J, Alarcón-Aguilara F, Roman-Ramosa R, Campos-Sepulveda E, Reyes-Vega ML, Boone-Villa VD, Jasso-Villagómez EI, Aguilar CN (2013) Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry*, 136(1):109–115.
24. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Sendra E, Sayas-Barberá, Pérez-Álvarez, AJ (2010) Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 4: 1217–1223.
25. Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W (2004) Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). *Journal of Natural Products*, 67: 2096–2098.