



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Obtenção e caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos.

SEAN TELLES PEREIRA

TERESINA - PIAUÍ

2015

SEAN TELLES PEREIRA

Obtenção e caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes.

Coorientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

TERESINA - PIAUÍ

2015

SEAN TELLES PEREIRA

Obtenção e caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Orientador)

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF/UFPI

Prof. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó (Examinador Interno)

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF/UFPI

Prof. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos (Examinador Externo)

Programa de Pós-graduação em Farmacologia – PPGF/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dra. Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dra. Lina Gomes dos Santos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

“Se quiser progredir na vida, esqueça a síndrome da perfeição. Ficar repetindo para si mesmo que não pode falhar, torna tudo mais difícil.”

Lair Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela companhia durante toda minha vida e que nos momentos mais difíceis me mostra uma saída;

Ao meu porto seguro, Sebastião, Solange e Seanne, por me incentivarem em todas as situações, em especial, acreditar nos estudos;

Ao meu amor, Kássia, pela companhia, apoio, compreensão e auxílio na discussão desta pesquisa;

Aos meus familiares, por confiarem no meu potencial e por toda a torcida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lívio César, pela orientação, paciência, críticas, debates e ensinamentos durante o curso;

Às professoras, Dra. Graça Citó e Dra. Francilene Silva pelos esclarecimentos durante a pesquisa;

Ao professor, Dr. Davyson Moreira, pela prontidão em ajudar incontáveis vezes;

À Universidade Federal do Piauí, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Curso de Farmácia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Aos amigos do LAPCOM, em especial, Alysson, Laisa, Ana Cristina, Thaisa, Bernardo, Lécia, Oskar, Rian, Rusbene e Edson pela ajuda durante os experimentos;

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho ou simplesmente torceram por mim, obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. CAPÍTULO I: Evidências científicas de <i>Punica granatum</i> como alternativa terapêutica: uma revisão	22
Resumo	23
Abstract	24
3.1 Introdução	25
3.2 Material e Métodos	25
3.3 Resultados e Discussão	26
3.4 Conclusão	35
Referências	42
4. CAPÍTULO II: Obtenção e caracterização de extrato etanólico e extrato seco por spray drying de <i>Punica granatum</i>	64
Resumo	65
Abstract	66
4.1 Introdução	67
4.2 Material e Métodos	68
4.3 Resultados e Discussão	75
4.4 Conclusão	88
Referências	88
5. CAPÍTULO III: Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato seco de <i>Punica granatum</i>	94
Resumo	95
Abstract	96

5.1 Introdução	97
5.2 Material e Métodos	98
5.3 Resultados e Discussão	102
5.4 Conclusão	108
Referências	108
6. CAPÍTULO IV: Obtenção e caracterização de comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco de <i>Punica granatum</i>.....	113
Resumo	114
Abstract	115
6.1 Introdução	116
6.2 Material e Métodos	117
6.3 Resultados e Discussão	122
6.4 Conclusão	129
Referências	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

'	Minuto (em georreferência)
“	Segundo (em georreferência)
5-FU	5-fluorouracil
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfônico)
ACN	Acetonitrila
AKT	Proteína quinase B
AMQ	água Milli-Q acidificada
ATCC	American Type Culture Collection
CCL-2	Ligante de quimiocina 2 (motif C-C)
CE50	Concentração efetiva para se obter 50% de atividade antioxidante estimada em 100%
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX2	Ciclooxigenase-2
Da	Densidade aparente
Dc	Densidade compactada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG/g	Equivalente de ácido gálico por grama de extrato
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-x
EUA	Estados Unidos da América
FeCl₃	Cloreto férrico
FH	Fator de Hausner
FRAP	Habilidade plasmática de reduzir o sal férrico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High Performance Liquide Chromatography</i>
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível

L1	Extrato seco por <i>spray drying</i> com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina
L2	Extrato seco por <i>spray drying</i> com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina
L3	Extrato seco por <i>spray drying</i> com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina
L4	Extrato seco por <i>spray drying</i> com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina
L5	Extrato seco por <i>spray drying</i> sem adjuvantes tecnológicos
LF	Extrato seco por liofilização sem adjuvantes tecnológicos
LPS	Lipopolissacarídeo
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
MAPKs	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
mPGES-1	Prostaglandina E sintase-1 microsomal
MPO	Mieloperoxidase
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
°	° Grau (em georreferência)
PAI-1	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio
PGE2	Prostaglandina E2
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
PPAR	Receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSADT	Tempo de duplicação do PSA
PT	Polifenóis totais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Sul
STAT3	Sinal do transdutor e ativador de transcrição 3
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

Trolox	6-hidroxi 2,5,7,8-tetrametilcromano 2-ácido carboxílico
UFC	Unidades formadoras de colônia
v/v	Volume/volume
W	Oeste

LISTA DE TABELAS

Tabelas do capítulo 1		Pág.
Tabela 1	Atividade antiproliferativa de <i>Punica granatum</i> .	36
Tabela 2	Atividade antimicrobiana de <i>Punica granatum</i> .	39
Tabela 3	Atividade anti-inflamatória de <i>Punica granatum</i> .	33
Tabela 4	Atividade anti-inflamatória intestinal de <i>Punica granatum</i> .	34
Tabela 5	Principais atividades terapêuticas pesquisadas de <i>Punica granatum</i>	34
Tabelas do capítulo 2		
Tabela 1	Matriz de planejamento fatorial 2 ² para a secagem do extrato etanólico de <i>Punica granatum</i> .	72
Tabela 2	Resíduo seco, pH e densidade relativa do extrato etanólico de <i>Punica granatum</i> .	75
Tabela 3	Triagem fitoquímica qualitativa de extrato etanólico de <i>Punica granatum</i> .	76
Tabela 4	Rendimento dos processos de secagem do extrato etanólico de <i>Punica granatum</i> .	78
Tabela 5	Densidade aparente, densidade compactada, fator de Hausner e índice de Carr dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	79
Tabela 6	Umidade residual dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	81
Tabelas do capítulo 3		
Tabela 1	Proporção de adjuvante de secagem presente nos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	98
Tabela 2	Conteúdo de polifenóis totais de extratos secos de <i>P. granatum</i> expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG/g).	103
Tabela 3	Capacidade antioxidante de extratos secos de <i>Punica granatum</i> e Trolox pelo método de DPPH.	105
Tabela 4	Halos de inibição (mm) do extrato seco de <i>Punica granatum</i> em diferentes concentrações obtidos pelo método de perfuração em ágar.	107
Tabelas do capítulo 4		
Tabela 1	Formulação de comprimidos mucoadesivos bucais de <i>Punica granatum</i> .	118
Tabela 2	Espessura e diâmetro das formulações.	123
Tabela 3	Peso médio, dureza e friabilidade das formulações.	124
Tabela 4	Teor de polifenóis das formulações	125

LISTA DE FIGURAS

Figuras do capítulo 1		Pág.
Figura 1	Distribuição do número de publicações em função do ano.	26
Figura 2	Nacionalidade das instituições vinculadas aos autores.	28
Figura 3	Proporção dos estudos em função da parte de <i>Punica granatum</i> utilizada.	28
Figura 4	Alguns componentes antioxidantes presentes em <i>Punica granatum</i> .	29
Figuras do capítulo 2		
Figura 1	Fruto de <i>Punica granatum</i> (A). Representação anatômica do fruto de <i>Punica granatum</i> (B).	69
Figura 2	Aspecto visual dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	77
Figura 3	Análise de superfície de resposta do rendimento dos processos de secagem de extratos etanólico de <i>Punica granatum</i> .	78
Figura 4	Densidade aparente, densidade compactada, fator de Hausner e índice de Carr dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	79
Figura 5	Higroscopicidade dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> frente à umidade relativa de 90%.	82
Figura 6	Extratos secos de <i>Punica granatum</i> antes (A) e após (B) teste de higroscopicidade.	83
Figura 7	Higroscopicidade associada à umidade residual dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	83
Figura 8	Fotomicrografias dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> .	85
Figura 9	Análise semi-quantitativa dos elementos químicos presentes em extrato seco por <i>spray drying</i> de <i>Punica granatum</i> .	86
Figura 10	Sobreposição do cromatogramas do L1 e dos adjuvantes tecnológicos utilizados na secagem por <i>spray drying</i> .	87
Figura 11	Sobreposição do cromatogramas dos extratos secos de <i>Punica granatum</i> no campo cromatográfico de eluição a punicalagina.	87
Figuras do capítulo 3		
Figura 1	Esquema da metodologia de perfuração em ágar para inoculação de extrato seco de <i>Punica granatum</i> .	102
Figura 2	Determinação do teor de polifenóis totais do extrato seco de <i>Punica granatum</i> (L5) com seu respectivo controle negativo.	103

Figura 3	Determinação da capacidade antioxidante do extrato seco liofilizado de <i>Punica granatum</i> .	104
Figura 4	Capacidade antioxidante de extratos secos de <i>Punica granatum</i> e Trolox pelo método de DPPH.	105
Figura 5	Atividade antimicrobiana de extrato seco de <i>Punica granatum</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (A), <i>Escherichia coli</i> (B) e <i>Candida albicans</i> (C).	106

Figuras do capítulo 4

Figura 1	Estrutura da hidroxipropilmetilcelulose.	117
Figura 2	Teste de mucoadesão utilizando texturômetro.	121
Figura 3	Aspecto macroscópico dos comprimidos de <i>Punica granatum</i> .	123
Figura 4	Perfil de intumescimento das formulações.	126
Figura 5	Intumescimento das formulações no tempo 10 e 120 min.	127
Figura 6	Força de mucoadesão das formulações.	128
Figura 7	Representação da fragmentação de F3 durante a análise do tempo de mucoadesão.	128
Figura 8	Representação da mucosa após o teste do tempo de mucoadesão.	129

Obtenção e caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos. SEAN TELLES PEREIRA. Orientador: Dr. Lívio César Cunha Nunes. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí, 2014.

RESUMO

Punica granatum, vulgarmente conhecida como romãzeira, corresponde a um vegetal que durante séculos, as cascas, folhas, flores e frutos têm sido utilizados para o tratamento de inúmeras doenças. O objetivo do presente trabalho foi otimizar a obtenção de extrato seco a partir de solução extrativa hidroetanólica do pericarpo do fruto de *Punica granatum* por secagem em *spray drying*, visando o desenvolvimento tecnológico de comprimidos mucoadesivos. No primeiro capítulo realizou-se um levantamento bibliográfico dos últimos dez anos (2005-2014) sobre o uso terapêutico de *Punica granatum*. Os resultados mostraram inúmeras propriedades biológicas desta espécie vegetal em ensaios *in vitro* e *in vivo*, comprovando a importância e viabilidade do seu uso. Destacam-se as atividades antiproliferativas, antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. O segundo capítulo apresenta a obtenção e caracterização de extrato etanólico e extrato seco do pericarpo do fruto de *Punica granatum*. O extrato seco foi obtido por secagem em *spray drying* tendo como parâmetro de comparação o extrato seco por liofilização. A secagem por *spray drying* utilizou adjuvantes tecnológicos a fim de melhorar as características dos pós secos. Após caracterização quanto às propriedades de fluxo, umidade residual, higroscopicidade, morfologia e perfis cromatográficos, determinaram-se o melhor processo de secagem. As propriedades reológicas dos pós sugerem que extratos sem uso de adjuvantes tecnológicos apresentam melhores características relacionadas ao fluxo e à compressão. Entretanto, a não utilização desses adjuvantes possui como desvantagem a alta higroscopicidade. A análise cromatográfica concluiu que o processo de secagem não altera quali ou quantitativamente os componentes químicos dos extratos. O terceiro capítulo apresenta uma avaliação da capacidade antioxidante dos extratos secos e avalia a atividade antimicrobiana do extrato eleito como melhor produto intermediário. Os resultados obtidos para esses ensaios confirmaram os relatos da literatura, que apontam a alta capacidade antioxidante e corrobora o uso etnofarmacológico desse vegetal no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. No último capítulo foi obtido e caracterizado comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco de *Punica granatum* produzidos a partir de uma mistura em diferentes proporções de hidroxipropilmetilcelulose e amido. Os comprimidos foram obtidos por compressão direta e apresentaram características físico-químicas adequadas em relação aos parâmetros farmacopeicos (dimensões uniformes, baixa variação de peso, dureza e friabilidade). Em relação às características adesivas (intumescimento, força e tempo de mucoadesão), a formulação com proporção equimolar entre hidroxipropilmetilcelulose e amido apresentou as melhores respostas. As formulações obtidas correspondem a um ponto de partida para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: *Punica granatum*; Punicaceae; *spray drying*; comprimidos mucoadesivos.

Obtaining and characterization of dry extract by spray drying of *Punica granatum* for development of mucoadhesive tablets. SEAN TELLES PEREIRA. Advisor: Dr. Lívio César Cunha Nunes. Master's Dissertation. Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Federal University of Piauí, 2014.

ABSTRACT

Punica granatum, commonly known as pomegranate, corresponds to a plant for centuries been used about husks, leaves, flowers and fruits for treating numerous diseases. This study has as object to optimize the achievement of dry extract from hydroethanolic extract of pericarp fruit of *Punica granatum* by spray drying, aiming technological development of mucoadhesive tablets. In first chapter we held a literature review of the last ten years (2005-2014) on the therapeutic use of *Punica granatum*. Results showed numerous biological properties in *in vitro* and *in vivo* assays demonstrating the importance and viability of their use. There are antiproliferative, antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity. The second chapter presents the obtaining and characterization of ethanolic and dry extracts of pericarp from *Punica granatum*. The dry extract was obtained by drying in spray dryer taking as control parameter the dry extract by lyophilization. The spray drying process used aids drying to improve powder characteristics. After characterization about flow properties, residual moisture, hygroscopicity, morphology and chromatographic profiles was determined the best drying process. The rheological properties of powders suggest that no use of aids drying show extracts with better characteristics related to flow and compression. However the use of these aids has the disadvantage of high hygroscopicity. Chromatographic analysis concluded that drying process does not alter the qualitative or quantitative chemical composition of extracts. The third chapter presents an evaluation of antioxidant capacity by dried extract and evaluate the antimicrobial activity of the elected extract as best intermediate product. The results for these tests confirmed the reports in the literature, pointing to high antioxidant capacity and corroborates the ethnopharmacological use of this plant to treat bacterial and fungal infections. In the last chapter were obtained and characterized mucoadhesive tablets with *Punica granatum* dry extract produced from a mixture in different ratios of hydroxypropyl methylcellulose and starch. The tablets were obtained by direct compression and showed physical and chemical characteristics appropriate in relation to pharmacopoeial parameters (uniform size, low weight variation, hardness and friability). Regarding the adhesive characteristics (swelling, strength and mucoadhesion time) the formulation with an equimolar ratio of hydroxypropyl methylcellulose and starch obtained the best answers. The obtained formulations correspond to starting point for further testing.

Keywords: *Punica granatum*; Punicaceae; spray drying; mucoadhesive tablets.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o gasto com medicamentos em todo o mundo aumentará de 1 trilhão de dólares em 2014 para 1,2 trilhões até o final de 2017 (IMS, 2013). O Brasil, que hoje ocupa a sexta colocação no *ranking* do comércio de medicamentos, alcançará a quarta colocação em 2016 (IMS, 2012).

O uso de medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais é denominado fitoterapia. Estima-se que pelo menos 25% dos medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012).

Os medicamentos fitoterápicos são responsáveis por uma parcela significativa do mercado, e o crescimento das vendas, mais de 15% ao ano contra 4% ao ano obtido com a venda de fármacos sintéticos, corresponde a principal atração. Assim, considerando tanto as vendas de produtos fitoterápicos como toda a cadeia de produção, o mercado brasileiro movimenta cerca de 1 bilhão de dólares por ano (CARVALHO et al., 2011). Paradoxalmente a parcela dos produtos fitoterápicos no mercado farmacêutico e a biodiversidade brasileira, praticamente toda a matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos é importada (BRASIL, 2012).

A formulação e implementação de políticas públicas, programas e legislação com vistas à valoração e valorização das plantas medicinais e derivados nos cuidados primários com a saúde e sua inserção na rede pública são avanços recentes (BRASIL, 2012). Atualmente, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos norteiam ações e programas com plantas medicinais e fitoterapia e buscam garantir à população brasileira o acesso seguro e seu uso racional (BRASIL, 2006a;2006b;2008). Em 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) com o objetivo de orientar estudos e pesquisas para subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinais e fitoterápicos a serem disponibilizados para uso da população. Dentre as 71 plantas de interesse ao Sistema Único de Saúde, está a *Punica granatum* L., popularmente conhecida como romãzeira.

Punica granatum é uma planta arbustiva originária do oriente médio, cultivada principalmente no Irã, Índia e países mediterrâneos como Egito, Turquia, Tunísia, Espanha, Marrocos, Afeganistão e Paquistão, mundialmente difundida. *Punica granatum* é pertencente

à família Punicaceae. Sua classificação morfológica é bem próxima às famílias Lythraceae e Onagraceae. É um vegetal tolerante à seca e de fácil cultivo em zonas áridas e semiáridas. É uma árvore espinhosa e pode crescer até 3 metros de altura. Seu tronco é reto com coloração acinzentada se avermelhando nos ramos mais novos e ramifica-se intensamente. As folhas são opostas, estreitas, oblongas com 3 a 7 cm de comprimento e 2 cm de largura. As flores possuem cor vermelha, laranja ou rosa com 3 cm de diâmetro, e contêm quatro a cinco pétalas. O fruto de *Punica granatum*, conhecida como romã, possui forma hexagonal arredondada, com 5 a 12 cm de diâmetro e peso médio de 200 g. Uma casca grossa envolve cerca de 600 arilos, que encapsulam as sementes (HAJIAHMADI; TALEBI; SAYED-TABATABAEI, 2013; LORENZI, 2002; MIDDHA; USHA; PANDE, 2013; ZARFESHANY; ASGARY; JAVANMARD, 2014).

Extratos de *Punica granatum* têm sido utilizados ao longo de séculos com diversas finalidades medicinais. São várias as propriedades terapêuticas comumente atribuídas as diferentes partes desse vegetal, dentre as quais se destacam as atividades antiproliferativa, antimicrobiana e anti-inflamatória (ZARFESHANY; ASGARY; JAVANMARD, 2014). Assim, é claro o interesse em desenvolver métodos, processos e formulações a base deste vegetal para a obtenção de formas farmacêuticas.

O processo de secagem de extratos vegetais corresponde a uma etapa importante no desenvolvimento tecnológico de fitomedicamentos, visto as inúmeras vantagens de trabalhar com extratos secos, tais como: maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, fácil padronização, maior concentração de compostos ativos, facilidade de transporte, menos espaço para armazenamento e elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas, sobretudo as sólidas (FERNANDES et al., 2014; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

É nesse contexto que a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) é amplamente aplicada na obtenção de extratos secos com melhores características tecnológicas. As propriedades físico-químicas dos produtos obtidos por *spray drying* são influenciadas por fatores relacionados ao processo, à formulação do material e ao equipamento utilizado (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Esta técnica possibilita a obtenção de produtos intermediários constituídos por partículas de pó mais homogêneas, estáveis e que apresentam um bom fluxo. A obtenção dessas características facilita o desenvolvimento de formulações farmacêuticas finais (CUNHA et al., 2010).

Desse modo, o desenvolvimento de produtos farmacêuticos oriundos de plantas medicinais é necessário e justificável. O presente trabalho foi organizado em quatro capítulos

e teve como objetivo obter e caracterizar o extrato seco por aspersão (*spray drying*) de *Punica granatum* para o posterior desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 119, 23 jun 2006a.

BRASIL. Portaria nº 971. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, n. 119, 4 mai 2006b.

BRASIL. Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, n. 240, 10 dez 2008.

BRASIL. **Cadernos de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares. Plantas medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica.** Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; COSTA E SILVA, L. V.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. D. O.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 467-473, 2011.

CUNHA, A.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

FERNANDES, M. R. V.; AZZOLINI, A. E. C. S.; MARTINEZ, M. L. L.; SOUZA, C. R. F.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; OLIVEIRA, W. P. Assessment of antioxidant activity of spray dried extracts of *Psidium guajava* leaves by DPPH and chemiluminescence inhibition in human neutrophils. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 10, 2014.

HAJIAHMADI, Z.; TALEBI, M.; SAYED-TABATABAEI, B. Studying genetic variability of pomegranate (*Punica granatum* L.) based on chloroplast DNA and barcode genes. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 249-259, 2013.

IMS. Institute for Healthcare Informatics. **The Global Use of Medicines: outlook through 2016**. 2012.

IMS. Institute for Healthcare Informatics. **The Global Use of Medicines: outlook through 2017**. 2013.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MIDDHA, S. K.; USHA, T.; PANDE, V. A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly *Punica granatum* peel waste. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-50, 2010.

ZARFESHANY, A.; ASGARY, S.; JAVANMARD, S. H. Potent health effects of pomegranate. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 100, p. 2277-9175, 2014.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

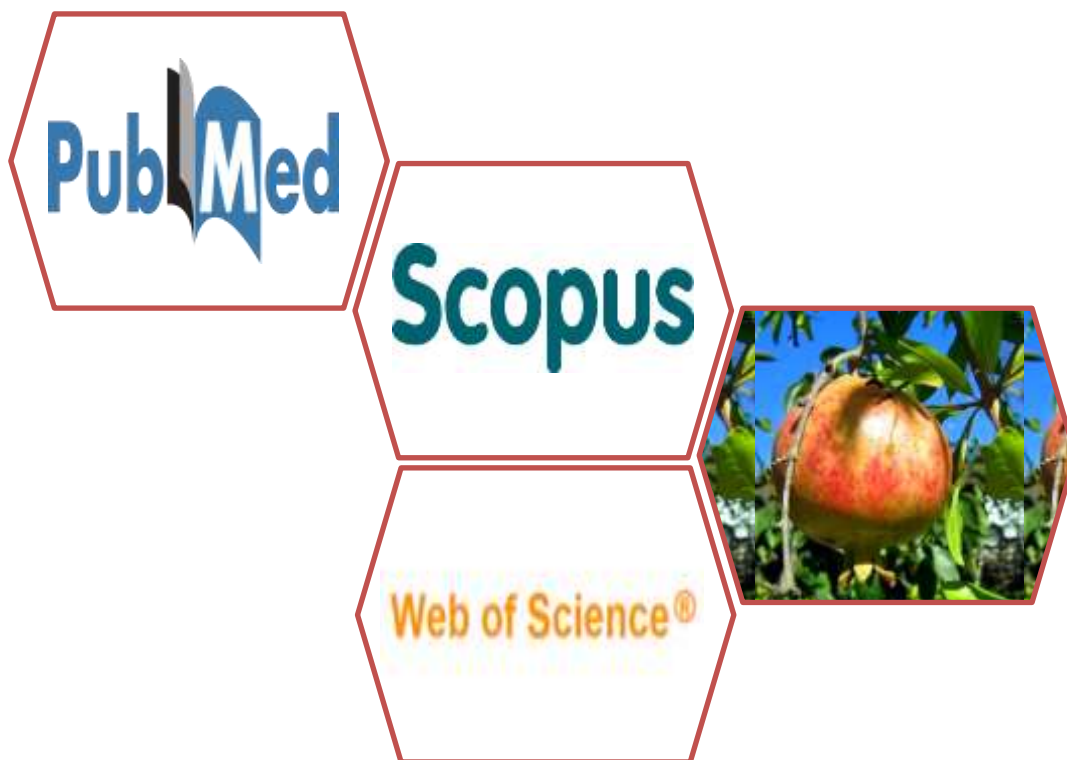
- ✓ Obter comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco por *spray drying* do pericarpo de *Punica granatum*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Obter extrato hidroalcólico do pericarpo do fruto de *Punica granatum*;
- ✓ Otimizar o processo de secagem do extrato hidroalcólico de *Punica granatum* utilizando a técnica por aspersão (*spray drying*);
- ✓ Caracterizar o extrato seco obtido a fim de determinar o melhor processo de secagem;
- ✓ Determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato seco de *Punica granatum*;
- ✓ Obter comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco de *Punica granatum*;
- ✓ Caracterizar os comprimidos mucoadesivos e determinar a melhor formulação.

3. CAPÍTULO I - Evidências científicas de *Punica granatum* como alternativa terapêutica: uma revisão

(Artigo submetido à *Phytochemistry Reviews*. Fator de Impacto: 2,407)



Evidências científicas de *Punica granatum* como alternativa terapêutica: uma revisãoPEREIRA, S.T.¹; MOREIRA, D.L.²; NUNES, L.C.C.¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64.049-550, Piauí, Brasil.

² Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brasil.

Resumo

Punica granatum é uma planta com tradição de uso medicinal em diversos países. As preparações de *P. granatum* são utilizadas há séculos com inúmeros propósitos medicinais. A literatura reporta essa planta, em particular o seu fruto, como uma rica fonte de polifenóis bioativos, compostos com características antioxidantes e diversas propriedades terapêuticas. Embora a existência de vários estudos, poucos têm sido realizados a fim de determinar a eficácia em humanos. Esta revisão resume o conhecimento científico atual sobre os aspectos farmacológicos desse vegetal, com destaque aos efeitos estudados extensivamente (antiproliferativo, antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório), a fim de proporcionar uma fonte de informação atualizada para os interessados em desenvolver pesquisas com a espécie.

Palavras-chave: planta medicinal; Punicaceae; romãzeira; *Punica granatum*; efeito terapêutico; propriedades farmacológicas.

Scientific evidence of therapeutic applications of *Punica granatum*: a review

PEREIRA, S.T.¹; MOREIRA, D.L.²; NUNES, L.C.C.¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64.049-550, Piauí, Brazil.

² Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil.

Abstract

Punica granatum L. (Punicaceae) is a plant with a history of medicinal use in several countries. For centuries, *P. granatum* (pomegranate) preparations have been used for countless medicinal purposes. The literature describes this plant and its fruit in particular, as a rich source of bioactive polyphenols, compounds with antioxidant characteristics and various therapeutic properties. Although many studies on the medicinal use of *P. granatum* exist, few have been performed with the aim of determining its efficacy in humans. The present review summarizes the current scientific knowledge on the pharmaceutical aspects of this plant, highlighting its extensively researched effects (antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory), with the purpose of providing an updated source of information for those interested in developing research on this species.

Keywords: medicinal plants; Punicaceae; pomegranate; *Punica granatum*; therapeutic effect; pharmacological properties.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso terapêutico de plantas aumentou progressivamente. O uso de *Punica granatum* (*P. granatum*) remonta a manuscritos bíblicos e relatos de sua qualidade terapêutica acompanha o homem desde a antiguidade. Para os babilônios, as sementes do fruto de *P. granatum* são consideradas um agente da ressurreição; os persas acreditavam que as sementes conferiam a invencibilidade nas batalhas, enquanto para os antigos chineses, as sementes simbolizavam longevidade e imortalidade (MINAIYAN et al., 2014; USTA et al., 2013; VIUDA-MARTOS; FERNANDEZ-LOPEZ; PEREZ-ALVAREZ, 2010).

Punica granatum pertence à família Punicaceae. É nativa da região do Irã, norte da Índia, países mediterrâneos, Malásia e, em certa medida, dos Estados Unidos, China e Brasil (LUCCI et al., 2015; MINAIYAN et al., 2014; VIUDA-MARTOS; FERNANDEZ-LOPEZ; PEREZ-ALVAREZ, 2010). Está disponível em diversos produtos comerciais, tais como suco, extratos secos, cápsulas, molhos, temperos, os quais são derivados principalmente da semente, arilos e pericarpo do fruto (ZARFESHANY; ASGARY; JAVANMARD, 2014). O seu uso etnofarmacológico é direcionado ao tratamento contra diarreias, parasitas e distúrbios inflamatórios (SHIRODE et al., 2015). O objetivo desta revisão é buscar evidências científicas dos efeitos terapêuticos atribuídos à *Punica granatum*, sobretudo relacionados aos problemas de saúde tratados com esta espécie bem como a parte da planta utilizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se uma pesquisa eletrônica nas bases de dados do *Pubmed*, *Web of Science* e *Scopus* utilizando como busca a expressão “((*punica granatum*) OR pomegranate) AND (therapeutic effects)”. A busca utilizando termos livres, sem uso de vocabulário controlado (descritores), foi escolhida como estratégia de obter maior número de manuscritos.

Os critérios de inclusão corresponderam aos trabalhos que propuseram avaliar algum efeito terapêutico de extratos, misturas vegetais e/ou produtos comerciais que continham em sua composição *Punica granatum* (trabalhos que utilizaram compostos isolados da planta também foram incluídos no estudo); manuscritos no formato de artigo; e trabalhos publicados nos últimos dez anos (2005-2014). Após a busca em cada base de dados mencionada, utilizou-se o *software* EndNote-X5 como ferramenta de gerenciamento dos artigos e suas referências.

Ao final da triagem, os artigos foram avaliados através de leitura e análise do título, resumo e texto completo. Patentes, capítulos de livros e editoriais foram deixados de fora dessa pesquisa.

Para a análise e/ou apresentação dos dados, utilizaram-se os *software* Microsoft Excel (versão 2010), TerraView-4.2.2, ACD/ChemSketch (versão gratuita), todos para o ambiente Windows.

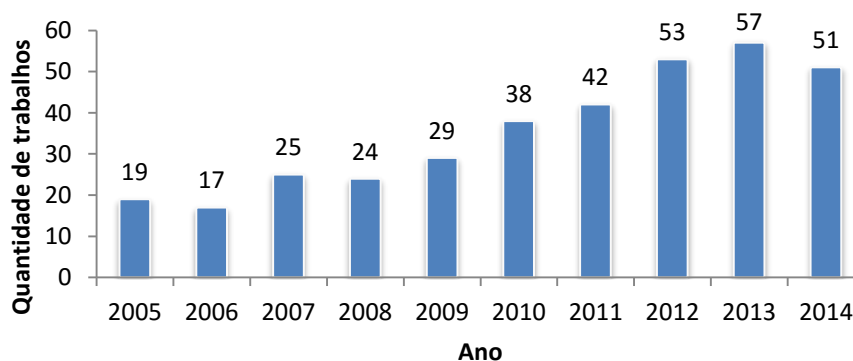
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 318 trabalhos foram encontrados na base *Pubmed*, sendo 4 livros e 35 publicados entre os anos de 1954 e 2004. Assim, desta base foram incluídos, 279 artigos. A busca na base *Scopus* retornou 100 trabalhos, dos quais 6 correspondiam a capítulos de livros e 3 publicados entre os anos de 2002 e 2004. Portanto, desta base foram incluídos 91 artigos. A busca na base *Web of Science* obteve 206 trabalhos, 24 patentes e 5 publicados entre 2002 e 2004. Da base *Web of Science* foram incluídos 177 artigos. Ao final, das três bases de dados utilizadas, obtiveram-se 547 manuscritos. Excluídos os duplicados (ou) triplicados restaram 418 trabalhos para avaliação. Ao final da leitura do título, resumo e texto completo, foram incluídos nessa revisão 355 artigos. Desse total, 77 (22%) corresponderam a revisões da literatura sobre o uso de *P. granatum* ou derivados para fins terapêuticos.

Aumento da pesquisa com *Punica granatum*

É notório que nos últimos anos ocorreu um aumento significativo de estudos cujo foco é a utilização de *P. granatum* ou derivados para alguma finalidade terapêutica. Percebe-se que mais da metade (57%) dos trabalhos incluídos foram publicados nos últimos quatro anos. A figura 1 apresenta esse crescimento.

Figura 1 – Distribuição do número de publicações em função do ano.



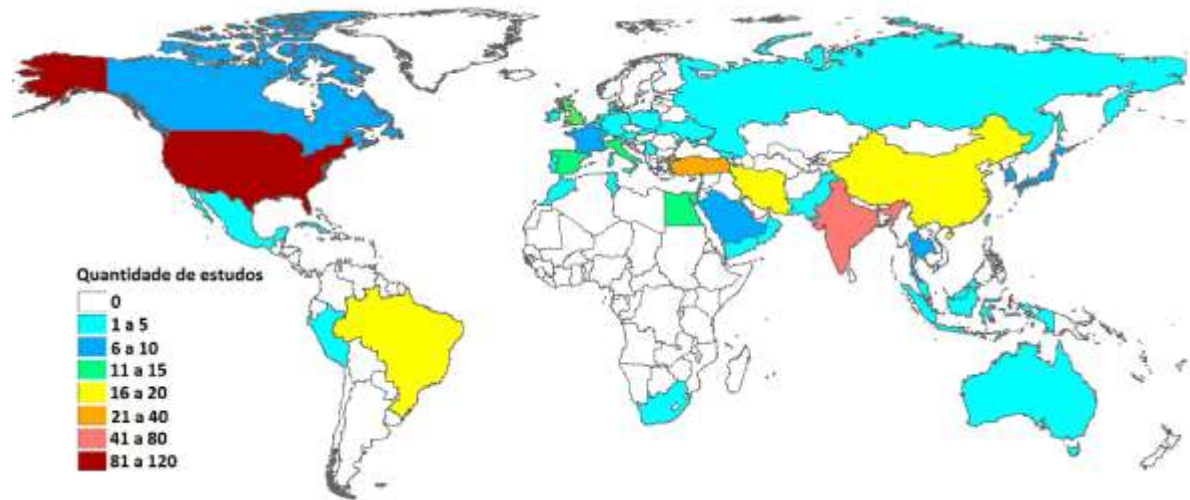
Centros de pesquisa

A análise dos artigos incluídos mostrou que a maior quantidade de trabalhos é de autores vinculados a instituições localizadas nos Estados Unidos da América (EUA), Índia, Turquia, Brasil e Irã. A grande quantidade de trabalhos de origem norte-americana (114) é compreendida pelo vasto interesse das instituições desse país na busca de alternativas obtidas a partir de *P. granatum* para o tratamento ou prevenção do câncer, visto que 50% (35 artigos) dos trabalhos que apresentaram esse efeito terapêutico eram de autoria de pesquisadores com filiação nos EUA. Destaca-se ainda o grande consumo do fruto de *P. granatum* pela população norte-americana devido a grande variedade de produtos disponíveis no mercado desse país.

Tem-se também um grande interesse de pesquisadores com vínculo a instituições indianas. Esse resultado reflete o interesse por fitoterapia desse país, justificado pela prática da medicina *ayurvédica*, que corresponde a um dos sistemas de saúde vigentes mais antigos do mundo. Com origem na Índia, essa medicina inclui dieta e fitoterapia, e enfatiza o uso do corpo, da mente e do espírito na prevenção e tratamento das enfermidades (FERNÁNDEZ et al., 2015).

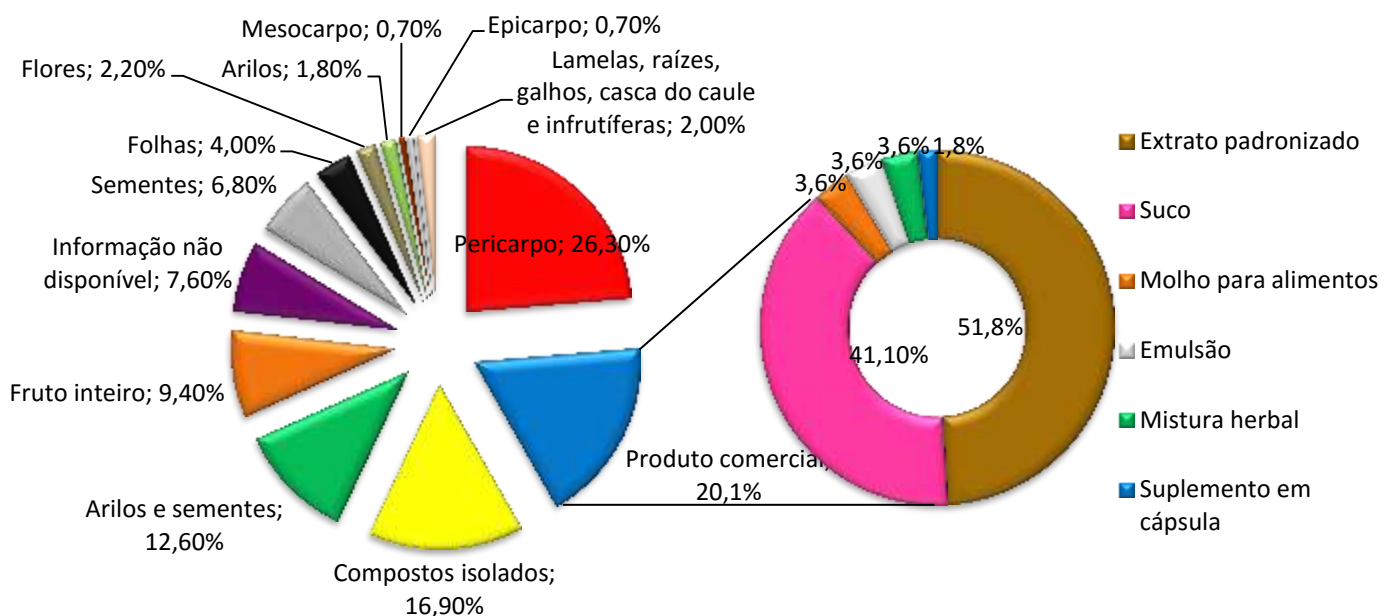
Em seguida, o maior número de autores é vinculado às instituições da Turquia, Brasil, Irã e China. Em relação à Turquia, Irã e China, justifica-se pelo fato da *P. granatum* ser uma planta nativa da região mediterrânea, em especial Irã, Afeganistão, Índia e, também, da China (LUCCI et al., 2015; MINAIYAN et al., 2014). Entretanto, é um vegetal cultivado em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil, confirmando o interesse em seu estudo nesse país. No Brasil, em especial, destaca-se a inclusão da *P. granatum* em uma lista de autoria do órgão máximo da saúde como de interesse do sistema de saúde do país (BRASIL, 2009). A figura 2 apresenta a nacionalidade das instituições com as quais os autores possuem vínculo (trabalhos desenvolvidos em mais de uma nacionalidade foram considerados individualmente para cada nação).

Figura 2- Nacionalidade das instituições vinculadas aos autores.



Partes da planta estudadas

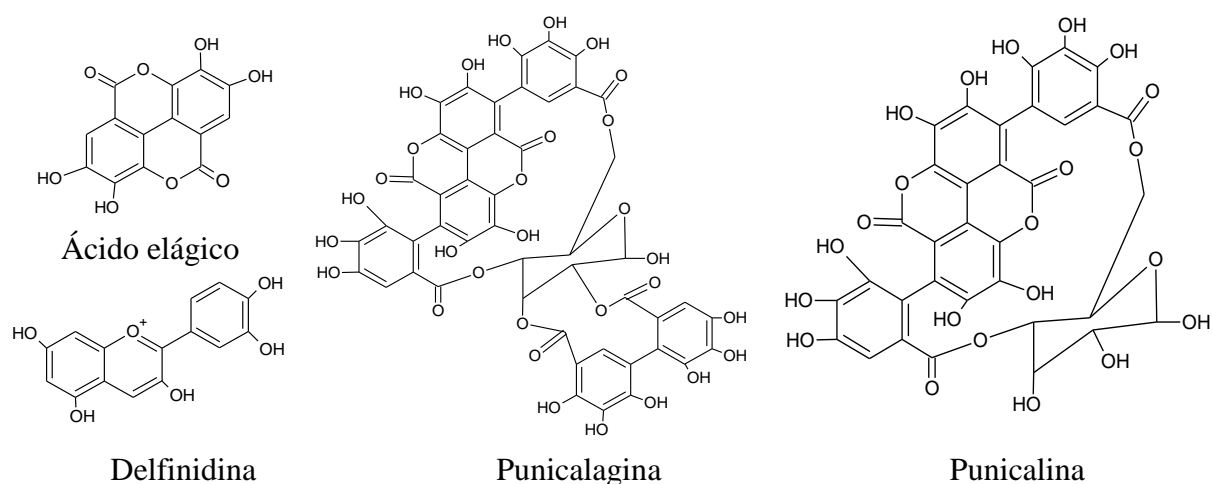
Praticamente todas as partes desse vegetal têm sido estudadas com diversos objetivos. Dos manuscritos incluídos no estudo, 26,30% (73) utilizaram o pericarpo do fruto, que corresponde ao epicarpo e mesocarpo; 20,10% (56), produtos comerciais e 16,90% (47), compostos isolados. Dentre os produtos comerciais, a maior parte utilizou extratos padronizados e/ou suco do fruto. Em seguida, existe uma predominância de estudos utilizando, simultaneamente, arilos e sementes (12,60%), matéria-prima utilizada praticamente em todas as metodologias de obtenção do suco desse vegetal, visto que é considerada a parte comestível da planta. Destaca-se ainda que 9,40% (26) dos estudos utilizaram o fruto inteiro nas pesquisas. A figura 3 apresenta a proporção dos estudos em função da parte de *P. granatum* utilizada.

Figura 3 – Proporção dos estudos em função da parte de *Punica granatum* utilizada.

Constituintes químicos

Diversos fitoquímicos podem ser encontrados nas diferentes partes de *P. granatum*. Além da parte do vegetal, a composição química sofre forte influência também das condições ambientais (LI, X. et al., 2015; WANG, L.; LI; et al., 2014). As folhas de *P. granatum* contêm principalmente esteróis, saponinas, flavonoides, alcaloides de piperidina e taninos (WANG, L.; LI; et al., 2014). Derivados de ácido gálico, ácidos graxos e triterpenóides (por exemplo, ácido ursólico, oleanólico, maslínico e asiático) foram isolados a partir das flores (BEKIR et al., 2013; WANG, L.; LI; et al., 2014). A investigação fitoquímica dos frutos tem sido feita com as três principais partes anatômicas: arilos, pericarpo e sementes. Os arilos e pericarpo contêm antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), que fornecem ao suco a sua cor vermelha, bem como ácido elágico e taninos hidrolisáveis, tais como punicalagina, punicalina e ácido galágico. Flavonoides (campferol, quercetina e luteolina) também foram isolados das arilos e pericarpo (JAGANATHAN et al., 2014; SREEKUMAR et al., 2014; ULLAH et al., 2014; WANG, L.; LI; et al., 2014). O óleo da semente é composto de ácidos graxos conjugados em que o ácido punícico é o componente principal. A Figura 4 apresenta alguns componentes antioxidantes isolados a partir de *P. granatum*.

Figura 4 - Alguns componentes antioxidantes presentes em *Punica granatum*.



Atividades terapêuticas

Antiproliferativa

A maior parte dos estudos (n=70) pesquisou a atividade antiproliferativa de *P. granatum*. A tabela 1 (final do texto) resume os trabalhos que tiveram esse objetivo. Segundo

Mclay e colaboradores (2012), as principais indicações para o uso de medicina alternativa era o bem-estar geral, a melhora do sistema imunológico e a profilaxia do câncer. De acordo com esse autor, os níveis de satisfação dos usuários que utilizam dessa medicina são altos. 38% dos pacientes dessa pesquisa utilizavam ervas, dentre elas, *P. granatum*. Isso explica o anseio da comunidade acadêmica de conseguir comprovar as informações etnofarmacológicas do uso desse vegetal não apenas para a prevenção, mas também para o tratamento do câncer.

Apesar do grande número de manuscritos comprovando a eficácia antiproliferativa de *P. granatum*, apenas três artigos correspondem a ensaios clínicos com humanos. Pantuk e coautores (2006) realizaram o primeiro ensaio clínico, no qual se comprovou que a utilização do suco de *P. granatum* conseguiu aumentar o tempo necessário para a duplicação do nível de PSA (PSADT). Apenas em 2013, mais dois ensaios clínicos demonstraram a eficácia do extrato padronizado no PSADT e a acumulação de um metabólito do extrato (urolithin-A), no tecido da próstata, capaz de reduzir os níveis de oxidação do DNA (FREEDLAND et al., 2013; PALLER et al., 2013). O grande interesse em estudos de câncer de próstata se explica pelo fato dos elagitaninos (compostos majoritários de *P. granatum*), no trato intestinal, sofrerem hidrólise a ácido elágico que é rapidamente metabolizado a urolithins. Os tecidos da próstata e cólon intestinal demonstram serem os únicos locais em que se confirmaram a presença desses metabólitos (GIMENEZ-BASTIDA et al., 2012; NUNEZ-SANCHEZ et al., 2014; PIWOWARSKI et al., 2014; SHIRODE et al., 2015).

MCDOUGALL et al. (2008) foram os únicos que demonstraram ineficiência da atividade antiproliferativa do extrato, obtido a partir do fruto inteiro, contra linhagens de células HeLa e CaCo-2. Uma possível explicação, segundo o autor, foi a baixa dose de extrato utilizada no ensaio quando comparado com outras pesquisas.

Antimicrobiana

Muitas pesquisas que relatam atividade antimicrobiana de plantas têm sido publicadas recentemente. Com a crescente resistência aos antibióticos, o desenvolvimento de novas estratégias para o combate de bactérias é válido (COPPO; MARCHESE, 2014). *P. granatum* é uma das diversas plantas com extensa pesquisa sobre esse efeito terapêutico. Sua atividade antimicrobiana é atribuída principalmente à presença de compostos polifenólicos (COPPO; MARCHESE, 2014).

A tabela 2 (final do texto) apresenta um resumo dos trabalhos que pesquisaram essa atividade. Foram 56 artigos que apresentaram em seus resultados a eficácia ou não de produtos obtidos da planta. Apenas quatro estudos apresentaram ensaios *in vivo*

(BHADBHADE et al., 2011; DISILVESTRO; DISILVESTRO, 2009; HAYOUNI et al., 2011; MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006). Hayouni e colaboradores (2011) demonstraram, além da atividade antimicrobiana *in vitro* contra fungos e bactérias, o potencial terapêutico de pomadas contendo extrato hidroalcolico do pericarpo de *P. granatum* em feridas dérmicas de porcos da Índia. Destaca-se também o interesse da utilização dessa planta em odontologia (GROPPO et al., 2008; OLIVEIRA, J. R. et al., 2013). Bhadbhade et al. (2011), Disilvestro e Disilvestro (2009) e Menezes, Cordeiro e Viana (2006) em seus resultados levantaram a possibilidade de utilização de extratos na confecção de produtos, em especial, enxaguatórios bucais para a profilaxia e tratamento de doenças da cavidade oral (gingivites e placa dentária, por exemplo).

Entre os trabalhos analisados, sobressaiu-se, também, a utilização de preparações dessa planta como descontaminante de alimentos, em especial, carnes, queijos e vegetais (alface, cebolinha, salsa). Para esses estudos, determinou-se a ação antibacteriana, principalmente, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Campilobacter jejuni* (AL-ZOREKY, 2009; BIRK et al., 2010; KARABIYIKLI; KISLA, 2012; SHAN et al., 2011; TAYEL et al., 2012).

O efeito sinérgico com antimicrobianos utilizados na clínica foi evidenciado em alguns estudos. Esse sinergismo melhorou a atividade quando se compara com aquela obtida pelas preparações vegetais ou antibióticos isolados. A atividade sinérgica foi observada com os antibióticos novobiocina, ciprofloxacino, fluconazol, tetraciclina, clorafenicol, gentamicina, ampicilina e oxacilina (AQIL, F.; AHMAD, 2007; BRAGA; LEITE; et al., 2005; DEY et al., 2012; ENDO et al., 2010; PHATTHALUNG; CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2012). Esses resultados indicam que a utilização de preparações vegetais corresponde a uma terapia alternativa barata capaz de melhorar a eficácia de um fármaco existente.

Dentre os patógenos sensíveis às preparações de *P. granatum* ressaltam-se as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*. Braga e coautores (2005), além de demonstrarem a inibição e morte de *S. aureus*, conseguiram que o extrato metanólico do fruto, em uma concentração de 0,05% (v/v), fosse capaz de inibir a produção da enterotoxina estafilocócica A.

O'may e Tufenkji (2011) mostraram que a punicalagina, um dos compostos majoritários dessa planta, foi capaz de bloquear a mobilidade "swarming" (mobilidade em meios sólidos e semi-sólidos mediada por múltiplos flagelos) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo o autor, esse resultado poderia ser estendido a outras cepas bacterianas com a finalidade de combater a colonização de superfícies por bactérias e a formação de biofilmes.

Antioxidante

A atividade antioxidante de *P. granatum* foi avaliada em 9% dos trabalhos (32 artigos) incluídos nessa pesquisa. Os resultados demonstrados comprovam a forte ação antioxidante da planta, dos seus derivados e compostos isolados. O fruto de *P. granatum* mostrou superioridade na ação antioxidante quando comparada à obtida pelo vinho tinto, cranberry e chá verde (ÁVILA et al., 2013).

Os artigos utilizaram diferentes metodologias na determinação dessa atividade. Os ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline - 6 ácido sulfônico), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), FRAP (habilidade plasmática de reduzir o sal férrico) foram os mais utilizados. A proteção contra compostos tóxicos como tetracloreto de carbono, alumínio, chumbo e ferro também foram avaliadas em estudos *in vivo* (AL-OLAYAN et al., 2014; LEIVA et al., 2011; MONEIM et al., 2013; SHEMA-DIDI et al., 2013).

Os principais compostos antioxidantes dessa planta correspondem a polifenóis encontrados no fruto, dentre os quais se destacam: ácido elágico, taninos hidrolisáveis, conhecidos como elagitaninos, alguns flavonoides e antocianinas (LI, G. et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Além disso, Orgil e colaboradores (2014) demonstraram que o pericarpo do fruto apresentava, significativamente, níveis de polifenóis mais elevados que as demais partes da planta.

Anti-inflamatória

A quarta atividade mais relatada nos artigos correspondeu à ação anti-inflamatória. Essa atividade foi comprovada em diferentes modelos de inflamação em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Apenas Shema-Didi e coautores (2012) demonstraram ação anti-inflamatória em humanos. Nesse estudo determinou-se que a ingestão prolongada do suco de *P. granatum* reduz os efeitos inflamatórios associados a pacientes em hemodiálise. A tabela 3 mostra um resumo da ação anti-inflamatória associada à planta e seus derivados.

Tabela 3 – Atividade anti-inflamatória de *Punica granatum*.

Modelo de inflamação	Tipo do estudo/ Linhagem de células	Mecanismo de ação	Referências
Adipócitos e macrófocos	<i>In vitro</i>	Diminuição da secreção de CCL-2 em ambas células, da expressão e secreção de IL-6 em adipócitos e da secreção de TNF α pelo macrófagos.	(WINAND; SCHNEIDER, 2014)
Pele	<i>In vivo</i> com camundongos	Inibição da atividade MPO;	(MO et al., 2014)
	<i>In vivo</i> com camundongos	Inibição da infiltração de leucócitos e modulação de IL-1 β e TNF- α ;	(MO et al., 2013)
	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> com camundongos	Ác. elágico diminuiu a produção de IL-1 β e IL-6 e bloqueou a infiltração de macrófagos inflamatórios.	(BAE et al., 2010)
Tecido nervoso	<i>In vivo</i> com ratos	Diminuição dos níveis de MDA, IL-1 β e TNF- α .	(CELIK et al., 2013)
Tecido hepático	<i>In vivo</i> com ratos	Supressão da cascata inflamatória através da modulação da via de sinalização NF-kB.	(BISHAYEE et al., 2013)
Pacientes em hemodiálise	<i>In vivo</i> com humanos	Diminuição dos níveis de IL-6, TNF- α , albumina, e o fibrinogênio.	(SHEMA-DIDI et al., 2012)
<i>In vitro</i> em linhagem de células	Células KU812	Diminuição da expressão do gene estimulado e da produção de IL-6 e IL-8; e inibição da ativação de MAP quinases e NF-kappa B;	(RASHEED et al., 2009)
	Células microgliais BV2	Supressão da produção de TNF α estimulada por LPS através da inibição da NF-kB;	(JUNG et al., 2006)
	Células THP-1 derivadas de macrófagos	Inibição da produção de TNF α ;	(PIWOWARSKI et al., 2014)
	Células MH7A	Delfenidina inibiu a acetilação de NF-kB;	(SEONG et al., 2011)
	Células 3T3-L1 e <i>in vivo</i> com camundongos	Ácido punícico suprimiu a ativação de NF-kB, a expressão de TNF- α e regulou positivamente genes alfa e gama PPAR no músculo esquelético e tecido adiposo;	(HONTECILLAS et al., 2009)
	Células CCD18-Co	Urolithins inibem a ativação de NF-kB e MAPK, sub-regulam a COX-2 e a expressão de mPGES-1;	(GONZALEZ-SARRIAS et al., 2010)
	Células Caco-2	Sub-regulação da transcrição de genes que codificam a IL-6 e MCP-1 e diminuição das quantidades de IL-6, IL-8 e MCP-1;	(HOLLEBEECK et al., 2012)
Lesão pulmonar aguda	<i>In vivo</i> com camundongos	Ácido elágico reduziu a inflamação induzida por COX-2, reduziu os níveis de IL-6 e aumentou os níveis de IL-10 no lavado broncoalveolar.	(FAVARIN et al., 2013)
Inflamação alérgica das vias aéreas	<i>In vivo</i> com camundongos	Ácido elágico reduz a concentração de IL-5, a atividade da eosinófilo peroxidase e a expressão de selectina-p.	(ALVES et al., 2013)

Dentre os trabalhos que apresentam ação anti-inflamatória, destacam-se aqueles com modelo de inflamação intestinal. No meio intestinal, os taninos hidrolisáveis, principais constituintes de *P. granatum*, são metabolizados a urolithins pela flora (GIMENEZ-BASTIDA et al., 2012). Estes são encontrados tanto no intestino como na circulação sanguínea sistêmica (GONZALEZ-SARRIAS et al., 2010). Logo, ao considerar o uso interno de preparações de *P. granatum*, a bioatividade de taninos hidrolisáveis é comprometida. Isso,

explica à atenção dada as atividades, não apenas anti-inflamatórias, no meio intestinal. A tabela 4 resume os ensaios que demonstraram ação anti-inflamatória no trato intestinal.

Tabela 4 – Atividade anti-inflamatória intestinal de *Punica granatum*.

Modelo da inflamação intestinal	Tipo de estudo	Mecanismo de ação	Referências
Modelo de doença de Crohn	<i>In vivo</i> com ratos	Redução da atividade de MPO, dos níveis de TNF- α , da expressão de COX-2 e iNOS, da fosforilação de MAPKs e inibição da translocação do NF-kB para o núcleo;	(ROSILLO et al., 2012; ROSILLO et al., 2011)
Células do cólon HT-29	<i>In vitro</i>	O suco suprimiu a expressão de COX-2 e aboliu a ativação de AKT induzidas por TNF α .	(ADAMS, L. S. et al., 2006)
Modelo de colite aguda e crônica	<i>In vivo</i> com camundongos	Ác. elágico regulou negativamente os mediadores COX-2 e iNOS e bloqueou as vias de sinalização p38 MAPK, NF-kB e STAT3;	(MARIN et al., 2013);
	<i>In vivo</i> com ratos	Ácido punícico inibiu a produção de ROS, a ativação de neutrófilos e o dano tecidual mediado por ROS/MPO.	(BOUSSETTA et al., 2009)
Células CC18-Co	<i>In vitro</i>	Urolithins regularam negativamente os níveis de GE2, PAI1 e IL-8.	(GIMENEZ-BASTIDA et al., 2012)

Outras atividades terapêuticas

A tabela 5 resume os efeitos terapêuticos pesquisados nos 278 artigos originais incluídos nesse estudo. As quatro atividades discutidas detalhadamente correspondem a aproximadamente 70% de todas as atividades pesquisadas.

Tabela 5 - Principais atividades terapêuticas pesquisadas de *Punica granatum*.

Efeito terapêutico pesquisado	Quantidade de trabalhos*	%	% acumulada
Antiproliferativo	70	25,18%	25,18%
Antimicrobiano	56	20,14%	45,32%
Antioxidante	32	11,51%	56,83%
Anti-inflamatório	29	10,43%	67,27%
Antidiabético	11	3,96%	71,22%
Antiviral	7	2,52%	73,74%
Hepatoprotetor	7	2,52%	76,26%
Antilipêmico	6	2,16%	78,42%
Antiprotozoário	6	2,16%	80,58%
Antiulceroso	6	2,16%	82,73%
Antimalárico	5	1,80%	84,53%

* Incluiu-se apenas as atividades com 5 ou mais referências.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que *P. granatum* corresponde a uma planta com grande potencial de uso na prevenção e tratamento de vários tipos de câncer, infecções, doenças inflamatórias, cardiovasculares, diabetes e outras doenças. A parte desse vegetal mais estudada, o fruto, contém diferentes compostos dos quais se destacam taninos (elagitaninos), flavonoides, antocianinas, ácido elágico e ácido puníco. As atividades terapêuticas são resultado da influência dos constituintes e seus metabólitos. Apesar dos diversos estudos *in vitro* e *in vivo* com animais que comprovam os efeitos terapêuticos de derivados e compostos isolados, são necessários mais estudos em humanos a fim de conhecer melhor o metabolismo, biodisponibilidade, toxicidade, dose/resposta desses produtos.

Tabela 1 – Atividade antiproliferativa de *Punica granatum*.

Tipo de câncer	Parte do vegetal utilizada	Preparação	Tipo do estudo	Resultado	Referências
Próstata	Produto comercial	Extrato padronizado	<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica; Diminuição da angiogênese associada ao tumor.	(RETTIG et al., 2008; WANG, Y.; ZHANG; et al., 2014); (SARTIPOUR et al., 2008).
			<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células PC3, C4-2 e ARCaP _M ;	(WANG, Y.; ZHANG; et al., 2014); (KOYAMA et al., 2010); (SARTIPOUR et al., 2008); (RETTIG et al., 2008).
			<i>In vivo</i> com humanos	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células LAPC4; Inibição da proliferação de células LNCaP e HUVEC; Inibição da proliferação de células LNCaP-AR e LAPC4.	(PALLER et al., 2013); (FREDLAND et al., 2013).
			<i>In vitro</i>	Evidência clínica que o uso do extrato aumenta o tempo do PSADT; Urolithin A, um metabólito do extrato, provavelmente se acumula no tecido da próstata e reduz os níveis de um dos principais produtos de oxidação do DNA.	(LEE, S.-T. et al., 2012; WANG, L. et al., 2011); (RETTIG et al., 2008); (PANTUCK et al., 2006); (SEERAM, N. P. et al., 2005).
			Suco	Indução de apoptose em células DU145 e LNCap, aumento da adesão celular e diminuição da migração de células que não morrem; Inibição da proliferação de células LNCaP-AR e LAPC4; Inibição da proliferação de células LNCaP; Inibição da proliferação e indução de apoptose de células 22Rv1 e RWPE-1;	(RETTIG et al., 2008).
		<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(PANTUCK et al., 2006).	
		<i>In vivo</i> com humanos	Evidência clínica que o suco prolonga o tempo de duplicação do PSA.	(JIANG et al., 2012).	
		<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2011).	
		<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células PC3.	(WANG, L.; LI; et al., 2014).	
		<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(SEERAM, N. P. et al., 2005).	
	Blend de plantas	<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(VANILLA et al., 2013).	
	Compostos isolados	Ác. elágico, ác. punícico e luteolina	<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(GASMI; SANDERSON, 2010;2013).
		Ác. elágico e punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células 22Rv1 e RWPE-1.	(KASIMSETTY et al., 2009).
		Ác. elágico	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células DU145 e LNCap.	(LANSKY; HARRISON; et al., 2005).
		Ác. punícico	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células LNCap, PC3 e RWPE-1.	(MING et al., 2014).
Urolithins, punicalagina e punicalina		<i>In vitro</i>	Inibição da atividade de CYP1 em células 22Rv1.	(GUERITAT et al., 2014).	
Fruto inteiro	Extrato etanólico	<i>In vivo</i> com camundongos e <i>in vitro</i>	Inibição da proliferação de células LNCaP e 22Rv1, fenômeno também manifestado <i>in vivo</i> .	(WANG, L. et al., 2012); (LANSKY; JIANG; et al., 2005).	
		<i>In vivo</i> com ratos	Evidência pré-clínica.	(ADHAMI et al., 2012; MALIK et al., 2005).	
	Arilos e sementes	Suco	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células 22Rv1 e RWPE-1; Inibição da proliferação de células DU145 e PC3.	(MALIK et al., 2005)
		Extrato em acetona	<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(SEERAM, NAVINDRA P. et al., 2007); (SEERAM, N. P. et al., 2005); (LANSKY; JIANG; et al., 2005).
			<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células PC3.	(SEERAM, NAVINDRA P. et al., 2007)
Pericarpo	Extrato enriquecido	<i>In vitro</i>	Metabólitos do extrato, ác. elágico e urolithins, inibem a proliferação de células DU145, LNCaP, 22Rv1 e LNCaP-AR; Inibição da proliferação e indução de apoptose de células 22Rv1 e RWPE-1; Inibição da proliferação de células DU145 e PC3.	(SEERAM, NAVINDRA P. et al., 2007)	
		<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(SEERAM, NAVINDRA P. et al., 2007)	

	Sementes	Óleo	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células DU145 e PC3.	(LANSKY; JIANG; et al., 2005)	
Cólon	Pericarpio	Extrato aquoso	<i>In vivo</i> com ratos	Evidência pré-clínica.	(WALY et al., 2014; WALY et al., 2012);	
		Extrato enriquecido	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células SW480, SW620, HT29 e HCT116.	(SEERAM, N. P. et al., 2005).	
	Composto isolado	Polissacarídeo;	<i>In vitro</i>	Inibição do crescimento de células HCT116.	(JOSEPH et al., 2013).	
		Elagitaninos e urolithins	<i>In vitro</i>	Inibição do crescimento de células HT-29.	(KASIMSETTY et al., 2010).	
		Ác. elágico e punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células SW480, SW620, HT29 e HCT116; Inibição da proliferação e de apoptose de células Caco-2.	(SEERAM, N. P. et al., 2005); (LARROSA; TOMAS-BARBERAN; ESPIN, 2006).	
		Ácido elágico	<i>In vivo</i> com ratos	Evidência pré-clínica.	(UMESALMA; SUDHANDIRAN, 2011).	
	Produto comercial	Suco	<i>In vivo</i> com ratos	Evidência pré-clínica (diminuição na formação de FCA).	(BANERJEE et al., 2013; BOATENG et al., 2007).	
			<i>In vitro</i>	Inibição da sulfoconjugação em células Caco-2; Inibição da proliferação e indução de apoptose de células SW480, SW620, HT29 e HCT116.	(SARUWATARI et al., 2008); (SEERAM, N. P. et al., 2005).	
			Extrato padronizado	<i>In vivo</i> com ratos	Evidência pré-clínica.	(SADIK; SHAKER, 2013).
	Produto comercial	Extrato padronizado	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e apoptose de células MCF-7; Inibição do crescimento de células WA4.	(SHIRODE et al., 2014); (DAI et al., 2010).	
Suco			<i>In vivo</i> com camundongos e <i>in vitro</i>	Evidência pré-clínica e inibição do crescimento de células BT479 e MDA BM-231.	(BANERJEE et al., 2012).	
	Pericarpio, epicarpio, mesocarpio, lamelas, arilos, sementes, folhas, flores, infrutífera, raízes, casca do caule e galhos	Extrato aquoso	<i>In vitro</i>	Pericarpio, seguido das lamelas, exibiram atividade maior que o epicarpio e mesocarpio em linhagem de células MCF-7.	(ORGIL et al., 2014).	
Mama	Sementes	Óleo da semente	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células MCF-7 e MDA-MB-231.	(COSTANTINI et al., 2014).	
	Pericarpio	Nanopartículas	<i>In vitro</i>	A concentração de nanopartículas inibição do crescimento (IC50) de células MCF-7 foi menor que o controle (5-FU).	(GANESHKUMAR et al., 2013).	
			<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução da apoptose de células MCF-7.	(DIKMEN; OZTURK; OZTURK, 2011; SREEJA et al., 2012).	
		Extrato metanólico	<i>In vivo</i> com camundongos	Evidência pré-clínica.	(SREEJA et al., 2012).	
			<i>In vitro</i>	Efeito antitumoral em células MCF-7.	(JOSEPH et al., 2012).	
	Flores	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células MCF-7.	(BEKIR et al., 2013).	
	Arilos e sementes	Suco	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células MCF-7 e MDA MB-23.	(JAYAKUMAR, R.; KANTHIMATHI, 2011; ROCHA et al., 2012).	
	Composto isolado	Punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células MCF-7.	(ADAMS, LYNN S. et al., 2010; AQL, FARRUKH et al., 2012).	
		Ácido elágico, ácido gálico e urolithins	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células MCF-7aro.	(ADAMS, LYNN S. et al., 2010).	
			Ácido punílico	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células MDA-MB-231 e MDA-ERalpha7.	(GROSSMANN et al., 2010).

Cervical	Fruto inteiro	Nanopartículas de ouro	<i>In vitro</i>	Atividade citotóxica em células HeLa.	(LOKINA et al., 2014).
	Composto isolado	Punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células CaSki, HeLa e SiHa.	(AQIL, FARRUKH et al., 2012).
Ossos	Pericarpo	Polissacarídeo	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução da apoptose de células U2OS.	(LI, J.; ZHANG; WANG, 2014).
Fígado	Arilos e sementes	Extrato em acetona	<i>In vitro</i>	Diminuição na proliferação de células HepG2.	(KARAASLAN et al., 2014)
	Composto isolado	Polissacarídeo galactomanana	<i>In vitro</i>	Inibição do crescimento de células HepG2.	(JOSEPH et al., 2013).
	Produto comercial	Emulsão	<i>In vivo com ratos</i>	Evidência pré-clínica.	(BISHAYEE et al., 2011).
	Sementes	Extrato aquoso	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células HepG2.	(NAVARRO et al., 2014).
Neuronal	Composto isolado	Ácido púnicico	<i>In vitro</i>	Curativos de polímeros com ácido linolênico conjugado impregnado e nanocristais de prata tem função antitumoral em células PC12.	(CAO et al., 2014).
Bexiga	Arilos e sementes	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução da apoptose de células T24 e J82.	(LEE, S. T. et al., 2013).
Melanoma	Composto isolado	Polissacarídeo galactomanana	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células A375.	(JOSEPH et al., 2013).
Leucemia	Pericarpo	Polissacarídeo isolado	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células K562.	(JOSEPH et al., 2012).
		Nanopartículas	<i>In vitro</i>	Efeito apoptótico maior de elagitantinos livres que encapsulados em células HL-60.	(LI, Z. et al., 2011).
	Arilos e sementes	Suco	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação em linhagem de células cancerígenas linfoides e mieloides.	(DAHLAWI et al., 2012).
	Folhas	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Inibição do crescimento em células K562.	(OLIVEIRA, L. P. et al., 2010).
	Fruto inteiro	Extrato etanólico	<i>In vivo com camundongos</i>	Eficácia contra o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich.	(OLIVEIRA, L. P. et al., 2010).
Pulmão	Pericarpo	Extrato metanólico	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células A549.	(JAYAKUMAR, S.; HARIDASS; KRISHNAMURTHY, 2012)
	Composto isolado	Punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células A549 e H1299.	(AQIL, FARRUKH et al., 2012).
			<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células A549.	(KHAN, N.; HADI; et al., 2007).
	Arilos e sementes	Extrato em acetona	<i>In vivo com camundongos</i>	Evidência pré-clínica em modelo xenográfico. Evidência pré-clínica em modelo induzido por Benzo(a)pireno [B(a)P] e N-nitroso-tris-cloroetilureia.	(KHAN, N.; HADI; et al., 2007); (KHAN, NAGHMA; AFAQ; et al., 2007).
Pâncreas	Produto comercial	Extrato padronizado	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação de células PANC-1 e AsPC-1.	(NAIR et al., 2011).
Pele	Arilos e sementes	Suco	<i>In vivo com camundongos</i>	Suco e dialil sulfeto, em combinação, possuem melhor atividade supressiva em modelo de câncer de pele que qualquer um dos dois isolados.	(GEORGE et al., 2011).
		Extrato em acetona	<i>In vivo com camundongos</i>	Evidência pré-clínica.	(AFAQ et al., 2005).
Oral	Pericarpo	Extrato enriquecido	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células KB e CAL27.	(SEERAM, N. P. et al., 2005).
	Produto isolado	Ácido elágico e punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células KB e CAL27.	(SEERAM, N. P. et al., 2005).
	Produto comercial	Suco	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células KB e CAL27.	(SEERAM, N. P. et al., 2005).
Cerebral	Composto isolado	Punicalagina	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e indução de apoptose de células U87MG.	(WANG, S.-G. et al., 2013).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de *Punica granatum*.

Micro-organismos	Parte vegetal	Patógeno	Referências	
Bactérias Gram-positivas	Pericarpo	<i>Listeria monocytogenes</i>	(AL-ZOREKY, 2009; LI, G. et al., 2014; SHAN et al., 2011).	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	(AL-ZOREKY, 2009; AQIL, F. et al., 2005; BAKKIYARAJ et al., 2013; DURAI PANDIYAN; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2006; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; GOULD; FIELDER; KELLY; NAUGHTON, 2009; HAYOUNI et al., 2011; MCCARRELL et al., 2008; QABAHA, 2013; SHAN et al., 2011; TAYEL et al., 2012).	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(DURAI PANDIYAN; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2006).	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	(DURAI PANDIYAN; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2006).	
		<i>Bacillus subtilis</i>	(DURAI PANDIYAN; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2006; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; QABAHA, 2013).	
		<i>Micrococcus luteus</i>	(QABAHA, 2013).	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(HAYOUNI et al., 2011).	
		<i>Streptococcus mutans</i>	(ROSAS-PINON et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2006).	
		<i>Streptococcus sanguis</i>	(VASCONCELOS et al., 2006).	
		<i>Streptococcus mitis</i>	(VASCONCELOS et al., 2006).	
	Produto comercial		<i>Staphylococcus aureus</i>	(KARABIYIKLI; KISLA, 2012; KISLA; KARABIYIKLI, 2013; REDDY et al., 2007; SU; HOWELL; D'SOUZA, 2012).
			<i>Mycobacterium intracellulare</i>	(REDDY et al., 2007).
		Ác. linolênico conjugado	<i>Bacillus subtilis</i>	(CAO et al., 2014).
		Ác. galágico	<i>Staphylococcus aureus</i>	(REDDY et al., 2007).
		Punicalagina	<i>Staphylococcus aureus</i>	(REDDY et al., 2007).
	Composto isolado	Pelargonidina; Cyanidina; Ácido gálico; Quercetina; Myricetina	<i>Bacillus subtilis</i> ,	
			<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	
			<i>Corynebacterium diphtheriticum</i>	
			<i>Micrococcus lysodieticus</i>	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			(NAZ et al., 2007).	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>				
<i>Enterococcus faecalis</i>				
<i>Enterococcus faecium</i>				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
		<i>Streptococcus pyogenes</i>		
Arilos e sementes		<i>Bacillus cereus</i>	(HAGHAYEGHI; SHETTY; LABBE, 2013).	
		<i>Bacillus megaterium</i>	(DUMAN et al., 2009).	
		<i>Clostridium perfringens</i>	(HAGHAYEGHI; SHETTY; LABBE, 2013).	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	(HAGHAYEGHI; SHETTY; LABBE, 2013; LUCAS; WERE, 2009).	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	(DUMAN et al., 2009; FAZELI et al., 2011; HAGHAYEGHI; SHETTY; LABBE, 2013).	
		<i>Corynebacterium xerosis</i>	(DUMAN et al., 2009).	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	(DUMAN et al., 2009; FAZELI et al., 2011).	
	<i>Micrococcus luteus</i>	(DUMAN et al., 2009).		
Fruto inteiro		<i>Staphylococcus aureus</i>	(BRAGA; LEITE; et al., 2005; BRAGA; SHUPP; et al., 2005; LOKINA et al., 2014; MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006).	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006)	
		<i>Staphylococcus B-hemolyticus</i>	(MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006)	
Sementes		<i>Staphylococcus aureus</i>	(GUL; SHINWARI; AFZAL, 2012)*	
Folhas		<i>Staphylococcus aureus</i>	(GHOSH et al., 2008)*	
		<i>Bacillus subtilis</i>		

Bactérias Gram-negativas	Pericarpo		<i>Escherichia coli</i>	(AL-ZOREKY, 2009; ALANIS et al., 2005; BAKKIYARAJ et al., 2013; DEY et al., 2012; DURAI PANDIYAN; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2006; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; HAYOUNI et al., 2011; MCCARRELL et al., 2008; QABAHA, 2013).
			<i>Shigella flexneri</i>	(ALANIS et al., 2005).
			<i>Shigella sonnei</i>	(ALANIS et al., 2005).
			<i>Salmonella sp.</i>	(ALANIS et al., 2005).
			<i>Salmonella enterica</i>	(SHAN et al., 2011).
			<i>Klebsiella pneumonia</i>	(DEY et al., 2012; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; HAYOUNI et al., 2011; QABAHA, 2013).
			<i>Yersinia enterocolitica</i>	(AL-ZOREKY, 2009).
			<i>Salmonella typhimurium</i>	(HAYOUNI et al., 2011; TAYEL et al., 2012).
			<i>Salmonella anatum</i>	(HAYOUNI et al., 2011).
			<i>Acinetobacter baumannii</i>	(PHATTHALUNG; CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2012).
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(QABAHA, 2013)*(DEY et al., 2012; GOULD; FIELDER; KELLY; EL SANKARY; et al., 2009; HAYOUNI et al., 2011; MCCARRELL et al., 2008).	
		<i>Helicobacter pylori</i>	(HAJIMAHMOODI et al., 2011).	
		<i>Proteus mirabilis</i>	(MCCARRELL et al., 2008).	
		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	(ROSAS-PINON et al., 2012).	
		Produto comercial	<i>Escherichia coli</i>	(KARABIYIKLI; KISLA, 2012; KISLA; KARABIYIKLI, 2013; REDDY et al., 2007).
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(REDDY et al., 2007).
		Ácido galágico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(REDDY et al., 2007).
		Punicalagina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(REDDY et al., 2007).
		Composto isolado		
		Pelargonidina; Cyanidina; Ácido gálico; Quercetina; Myricetina	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Shigella flexneriae</i>	(NAZ et al., 2007).
	Arilos e sementes	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Vibrio parahemolyticus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhi</i>	(HAGHAYEGHI; SHETTY; LABBE, 2013). (HAGHAYEGHI; SHETTY; LABBE, 2013). (DUMAN et al., 2009; FAZELI et al., 2011). (DUMAN et al., 2009; FAZELI et al., 2011). (FAZELI et al., 2011).	
	Fruto inteiro	<i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Escherichia coli</i>	(LOKINA et al., 2014). (LOKINA et al., 2014). (MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006). (MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006). (MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006). (MELENDEZ; CAPRILES, 2006; MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006).	
	Sementes	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(GUL; SHINWARI; AFZAL, 2012).* (GUL; SHINWARI; AFZAL, 2012).*	
	Folhas	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i>	(GHOSH et al., 2008).*	
Fungos	Pericarpo	<i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida krusei</i>	(ANIBAL et al., 2013; BAKKIYARAJ et al., 2013; DURAI PANDIYAN; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2006; ENDO et al., 2012; HAYOUNI et al., 2011; HOFLING et al., 2010; PAI et al., 2010; PONNUSAMY et al., 2010; QABAHA, 2013; TAYEL; EL-TRAS, 2010; VASCONCELOS et al., 2006). (ANIBAL et al., 2013; HOFLING et al., 2010). (ANIBAL et al., 2013; ENDO et al., 2012; HOFLING et al., 2010). (ANIBAL et al., 2013; HOFLING et al., 2010).	

		<i>Candida guilliermondii</i>	(ANIBAL et al., 2013; HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida utilis</i>	(ANIBAL et al., 2013; HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida parapsilosis</i>	(ANIBAL et al., 2013; ENDO et al., 2010; HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida lusitanae</i>	(ANIBAL et al., 2013; HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida glabrata</i>	(ANIBAL et al., 2013; ENDO et al., 2012; HAYOUNI et al., 2011; HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida rugosa</i>	(ANIBAL et al., 2013; HOFLING et al., 2010).
		<i>Aspergillus niger</i>	(HAYOUNI et al., 2011; PONNUSAMY et al., 2010; QABAHA, 2013).
		<i>Trichopyton rubrum</i>	(HAYOUNI et al., 2011; PONNUSAMY et al., 2010).
		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	(PONNUSAMY et al., 2010).
		<i>Trichophyton simii</i>	(PONNUSAMY et al., 2010).
		<i>Trichophyton tonsurans</i>	(PONNUSAMY et al., 2010).
		<i>Epidermophyton floccosum</i>	(PONNUSAMY et al., 2010).
		<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	(PONNUSAMY et al., 2010).
		<i>Cryptococcus sp.</i>	(PONNUSAMY et al., 2010).
Produto comercial		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Cryptococcus neoformans</i> ,	(REDDY et al., 2007).
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
Composto isolado	Puncialagina	<i>Candida albicans</i>	(ENDO et al., 2010).
		<i>Candida parapsilosis</i>	(ENDO et al., 2010).
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	(REDDY et al., 2007).
	Ác. galágico	<i>Cryptococcus neoformans</i>	(REDDY et al., 2007).
Arilos e sementes		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(DUMAN et al., 2009).
		<i>Rhodotorula rubra</i>	
Fruto inteiro		<i>Candida albicans</i>	(LOKINA et al., 2014; MENEZES; CORDEIRO; VIANA, 2006).
		<i>Candida dubliniensis</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida parapsilosis</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida tropicalis</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida guilliermondii</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida utilis</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida krusei</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida lusitanae</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Candida glabrata</i>	(HOFLING et al., 2010).
		<i>Aspergillus flavus</i>	(LOKINA et al., 2014).
Folhas		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	(FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009).

Legenda: * = sensibilidade não demonstrada.

REFERÊNCIAS

ADAMS, L. S.; SEERAM, N. P.; AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; SAND, D.; HEBER, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 980-985, 2006.

ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; HEBER, D.; CHEN, S. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells *in vitro*. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 1, p. 108-113, 2010.

ADHAMI, V. M.; SIDDIQUI, I. A.; SYED, D. N.; LALL, R. K.; MUKHTAR, H. Oral infusion of pomegranate fruit extract inhibits prostate carcinogenesis in the TRAMP model. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 3, p. 644-651, 2012.

AFAQ, F.; SALEEM, M.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; MUKHTAR, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 423-433, 2005.

AL-OLAYAN, E. M.; EL-KHADRAGY, M. F.; METWALLY, D. M.; ABDEL MONEIM, A. E. Protective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on testes against carbon tetrachloride intoxication in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 164, p. 1472-6882, 2014.

AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 244-248, 2009.

ALANIS, A. D.; CALZADA, F.; CERVANTES, J. A.; TORRES, J.; CEBALLOS, G. M. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 153-157, 2005.

ALVES, C. D. F.; ANGELI, G. N.; FAVARIN, D. C.; DE ANDRADE, E. L.; LAZO CHICA, J. E.; FACCIOLI, L. H.; DA SILVA, P. R.; ROGERIO, A. D. P. The effects of proresolution of ellagic acid in an experimental model of allergic airway inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

ANIBAL, P. C.; PEIXOTO, I. T.; FOGGIO, M. A.; HOFLING, J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 839-848, 2013.

AQIL, F.; AHMAD, I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 79-92, 2007.

AQIL, F.; KHAN, M. S.; OWAIS, M.; AHMAD, I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 106-114, 2005.

AQIL, F.; MUNAGALA, R.; VADHANAM, M. V.; KAUSAR, N.; JEYABALAN, J.; SCHULTZ, D. J.; GUPTA, R. C. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 345-353, 2012.

ÁVILA, R. I. D.; GUERRA, M. T.; BORGES, K. D. A. S.; VIEIRA, M. D. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. M. D.; FURTADO, H.; MOTA, M. F. D.; ARRUDA, A. F.; VALADARES, M. C. *Punica granatum* L. protects mice against hexavalent chromium-induced genotoxicity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 689-697, 2013.

BAE, J. Y.; CHOI, J. S.; KANG, S. W.; LEE, Y. J.; PARK, J.; KANG, Y. H. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 8, p. 1600-0625, 2010.

BAKKIYARAJ, D.; NANDHINI, J. R.; MALATHY, B.; PANDIAN, S. K. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. **Biofouling**, v. 29, n. 8, p. 929-37, 2013.

BANERJEE, N.; KIM, H.; TALCOTT, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 12, p. 2814-2822, 2013.

BANERJEE, N.; TALCOTT, S.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells *in vitro* and *vivo*: potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 1, p. 21-34, 2012.

BEKIR, J.; MARS, M.; VICENDO, P.; FTERRICH, A.; BOUAJILA, J. Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferation activities of pomegranate (*Punica granatum*) flowers. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 6, p. 544-550, 2013.

BHADBHADDE, S. J.; ACHARYA, A. B.; RODRIGUES, S. V.; THAKUR, S. L. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. **Quintessence International**, v. 42, n. 1, p. 29-36, 2011.

BIRK, T.; GRONLUND, A. C.; CHRISTENSEN, B. B.; KNOCHEL, S.; LOHSE, K.; ROSENQUIST, H. Effect of organic acids and marination ingredients on the survival of *Campylobacter jejuni* on meat. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 258-65, 2010.

BISHAYEE, A.; BHATIA, D.; THOPPIL, R. J.; DARVESH, A. S.; NEVO, E.; LANSKY, E. P. Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 6, p. 888-896, 2011.

BISHAYEE, A.; THOPPIL, R. J.; DARVESH, A. S.; OHANYAN, V.; MESZAROS, J. G.; BHATIA, D. Pomegranate phytoconstituents blunt the inflammatory cascade in a chemically

induced rodent model of hepatocellular carcinogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 178-187, 2013.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; SHACKELFORD, L.; WALKER, L. T.; KHATIWADA, J.; OGUTU, S.; WILLIAMS, D. S.; JONES, J.; GUYTON, M.; ASIAMAH, D.; HENDERSON, F.; GRANT, L.; DEBRUCE, M.; JOHNSON, A.; WASHINGTON, S.; CHAWAN, C. B. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 725-732, 2007.

BOUSSETTA, T.; RAAD, H.; LETTERON, P.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; MARIE, J. C.; DRISS, F.; EL-BENNA, J. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. 0006458, 2009.

BRAGA, L. C.; LEITE, A. A.; XAVIER, K. G.; TAKAHASHI, J. A.; BEMQUERER, M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 541-7, 2005.

BRAGA, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J. A.; CARMO, L. S.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 335-339, 2005.

BRASIL. **Relação de plantas medicinais de interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde 2009.

CAO, Y.; SHI, L.-H.; YU, X.-H.; WANG, C.-F.; WANG, H.-J. Conjugated linolenic acid polymer dressings impregnated with silver nano-crystals: Fabrication and dual inhibition functions assessment on tumor cells and microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 150-157, 2014.

CELIK, F.; GOCMEZ, C.; BOZKURT, M.; KAPLAN, I.; KAMASAK, K.; AKIL, E.; DOGAN, E.; GUZEL, A.; UZAR, E. Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced toxicity in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 22, p. 2988-2993, 2013.

COPPO, E.; MARCHESE, A. Antibacterial activity of polyphenols. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 380-390, 2014.

COSTANTINI, S.; RUSOLO, F.; DE VITO, V.; MOCCIA, S.; PICARIELLO, G.; CAPONE, F.; GUERRIERO, E.; CASTELLO, G.; VOLPE, M. G. Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil on breast cancer cell lines. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8644-8660, 2014.

DAHLAWI, H.; JORDAN-MAHY, N.; CLENCH, M. R.; LE MAITRE, C. L. Bioactive actions of pomegranate fruit extracts on leukemia cell lines *in vitro* hold promise for new therapeutic agents for leukemia. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 64, n. 1, p. 100-110, 2012.

DAI, Z.; NAIR, V.; KHAN, M.; CIOLINO, H. P. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of MMTV-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells *in vitro*. **Oncology Reports**, v. 24, n. 4, p. 1087-1091, 2010.

DEY, D.; DEBNATH, S.; HAZRA, S.; GHOSH, S.; RAY, R.; HAZRA, B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and metallo-beta-lactamase (MBL) producing gram-negative bacilli. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4302-4309, 2012.

DIKMEN, M.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The Antioxidantpotency of *Punica granatum* L. fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 12, p. 1638-1646, 2011.

DISILVESTRO, R. A.; DISILVESTRO, D. J. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 8, p. 1123-1127, 2009.

DUMAN, A. D.; OZGEN, M.; DAYISOYLU, K. S.; ERBIL, N.; DURGAC, C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1808-1817, 2009.

DURAIKANDIYAN, V.; AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 35, 2006.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534-40, 2010.

ENDO, E. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10094-10107, 2012.

FAVARIN, D. C.; TEIXEIRA, M. M.; DE ANDRADE, E. L.; ALVES, C. D. F.; LAZO CHICA, J. E.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; ROGERIO, A. P. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

FAWOLE, O. A.; MAKUNGA, N. P.; OPARA, U. L. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 200, p. 1472-6882, 2012.

FAZELI, M. R.; BAHMANI, S.; JAMALIFAR, H.; SAMADI, N. Effect of probiotication on antioxidant and antibacterial activities of pomegranate juices from sour and sweet cultivars. **Natural Product Research**, v. 25, n. 3, p. 288-297, 2011.

FERNÁNDEZ, S.; POLLIO, G.-A.; DOMÍNGUEZ, V.; NOGUÉ, S.; TORRA, M.; CARDELLACH, F. Brote de saturnismo asociado a un tratamiento basado en la medicina ayurvédica. **Medicina Clínica**, v. 144, n. 4, p. 166-169, 2015.

FREEDLAND, S. J.; CARDUCCI, M.; KROEGER, N.; PARTIN, A.; RAO, J.-Y.; JIN, Y.; KERKOUTIAN, S.; WU, H.; LI, Y.; CREEL, P.; MUNDY, K.; GURGANUS, R.; FEDOR, H.; KING, S. A.; ZHANG, Y.; HEBER, D.; PANTUCK, A. J. A Double-blind, randomized, neoadjuvant study of the tissue effects of POMx pills in men with prostate cancer before radical prostatectomy. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 10, p. 1120-1127, 2013.

FRIAS, D. F. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of plant extracts and eucalyptus oil on *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 216-220, 2009.

GANESHKUMAR, M.; SATHISHKUMAR, M.; PONRASU, T.; DINESH, M. G.; SUGUNA, L. Spontaneous ultra fast synthesis of gold nanoparticles using *Punica granatum* for cancer targeted drug delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 106, p. 208-216, 2013.

GASMI, J.; SANDERSON, J. T. Growth inhibitory, antiandrogenic, and pro-apoptotic effects of punicic acid in LNCaP human prostate cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12149-12156, 2010.

GASMI, J.; SANDERSON, J. T. Jacaric acid and its octadecatrienoic acid geoisomers induce apoptosis selectively in cancerous human prostate cells: a mechanistic and 3-D structure-activity study. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8-9, p. 734-742, 2013.

GEORGE, J.; SINGH, M.; SRIVASTAVA, A. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Synergistic growth inhibition of mouse skin tumors by pomegranate fruit extract and diallyl sulfide: Evidence for inhibition of activated MAPKs/NF-kappa B and reduced cell proliferation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1511-1520, 2011.

GHOSH, A.; DAS, B. K.; ROY, A.; MANDAL, B.; CHANDRA, G. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, n. 2, p. 259-62, 2008.

GIMENEZ-BASTIDA, J. A.; LARROSA, M.; GONZALEZ-SARRIAS, A.; TOMAS-BARBERAN, F.; ESPIN, J. C.; GARCIA-CONESA, M. T. Intestinal ellagitannin metabolites

ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8866-8876, 2012.

GONZALEZ-SARRIAS, A.; LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; DOLARA, P.; ESPIN, J. C. NF-kappaB-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 4, p. 503-512, 2010.

GOULD, S. W.; FIELDER, M. D.; KELLY, A. F.; EL SANKARY, W.; NAUGHTON, D. P. Antimicrobial pomegranate rind extracts: enhancement by Cu(II) and vitamin C combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **British Journal of Biomedical Science**, v. 66, n. 3, p. 129-132, 2009.

GOULD, S. W.; FIELDER, M. D.; KELLY, A. F.; NAUGHTON, D. P. Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 23, 2009.

GROPPO, F. C.; DE CÁSSIA BERGAMASCHI, C.; COGO, K.; FRANZ-MONTAN, M.; MOTTA, R. H. L.; DE ANDRADE, E. D. Use of phytotherapy in dentistry. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 8, p. 993-998, 2008.

GROSSMANN, M. E.; MIZUNO, N. K.; SCHUSTER, T.; CLEARY, M. P. Punicic acid is an omega-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. **International Journal of Oncology**, v. 36, n. 2, p. 421-426, 2010.

GUERITAT, J.; LEFEUVRE-ORFILA, L.; VINCENT, S.; CRETUAL, A.; RAVANAT, J.-L.; GRATAS-DELAMARCHE, A.; RANNOU-BEKONO, F.; REBILLARD, A. Exercise training combined with antioxidant supplementation prevents the antiproliferative activity of their single treatment in prostate cancer through inhibition of redox adaptation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 77, p. 95-105, 2014.

GUL, F.; SHINWARI, Z. K.; AFZAL, I. Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of north west Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 5, p. 1609-1616, 2012.

HAGHAYEGHI, K.; SHETTY, K.; LABBE, R. Inhibition of foodborne pathogens by pomegranate juice. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 5, p. 467-470, 2013.

HAJIMAHMOODI, M.; SHAMS-ARDAKANI, M.; SANIEE, P.; SIAVOSHI, F.; MEHRABANI, M.; HOSSEINZADEH, H.; FOROUMADI, P.; SAFAVI, M.; KHANAVI, M.; AKBARZADEH, T.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. *In vitro* antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 11, p. 1059-1066, 2011.

HAYOUNI, E. A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H.; OKU, H.; MATSUI, T.; LIMAM, F.; HAMDI, M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, v. 18, n. 11, p. 976-84, 2011.

HOFLING, J. F.; ANIBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A.; FURLETTI, V. F.; FOGGIO, M. A.; GONCALVES, R. B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HOLLEBEECK, S.; WINAND, J.; HERENT, M. F.; DURING, A.; LECLERCQ, J.; LARONDELLE, Y.; SCHNEIDER, Y. J. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an *in vitro* model of human intestine. **Food & Function**, v. 3, n. 8, p. 875-885, 2012.

HONTECILLAS, R.; O'SHEA, M.; EINERHAND, A.; DIGUARDO, M.; BASSAGANYA-RIERA, J. Activation of PPAR gamma and alpha by puniceic acid ameliorates glucose tolerance and suppresses obesity-related inflammation. **Journal of the American College of Nutrition's**, v. 28, n. 2, p. 184-195, 2009.

JAGANATHAN, S. K.; VELLAYAPPAN, M. V.; NARASIMHAN, G.; SUPRIYANTO, E. Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 16, p. 4618-4625, 2014.

JAYAKUMAR, R.; KANTHIMATHI, M. S. Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. **Food chemistry**, v. 126, n. 3, p. 956-960, 2011.

JAYAKUMAR, S.; HARIDASS, S.; KRISHNAMURTHY, V. Anticancer activity of *Punica granatum* rind extracts against human lung cancer cell line. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, suppl. 2, p. 204-210, 2012.

JIANG, J.; ELIAZ, I.; SLIVA, D. Suppression of growth and invasive behavior of human prostate cancer cells by ProstaCaid (TM): Mechanism of activity. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 6, p. 1675-1682, 2011.

JIANG, J.; LOGANATHAN, J.; ELIAZ, I.; TERRY, C.; SANDUSKY, G. E.; SLIVA, D. ProstaCaid (TM) inhibits tumor growth in a xenograft model of human prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 5, p. 1339-1344, 2012.

JOSEPH, M. M.; ARAVIND, S. R.; GEORGE, S. K.; VARGHESE, S.; SREELEKHA, T. T. A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1466-1475, 2013.

JOSEPH, M. M.; ARAVIND, S. R.; VARGHESE, S.; MINI, S.; SREELEKHA, T. T. Evaluation of antioxidant, antitumor and immunomodulatory properties of polysaccharide isolated from fruit rind of *Punica granatum*. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 2, p. 489-496, 2012.

JUNG, K. H.; KIM, M. J.; HA, E.; UHM, Y. K.; KIM, H. K.; CHUNG, J. H.; YIM, S. V. Suppressive effect of *Punica granatum* on the production of tumor necrosis factor (Tnf) in BV2 microglial cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 1258-1261, 2006.

KARAASLAN, M.; VARDIN, H.; VARLIKLIOZ, S.; YILMAZ, F. M. Antiproliferative and antioxidant activities of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 82-90, 2014.

KARABIYIKLI, S.; KISLA, D. Inhibitory effect of sour pomegranate sauces on some green vegetables and kisir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 211-216, 2012.

KASIMSETTY, S. G.; BIALONSKA, D.; REDDY, M. K.; MA, G.; KHAN, S. I.; FERREIRA, D. Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2180-2187, 2010.

KASIMSETTY, S. G.; BIALONSKA, D.; REDDY, M. K.; THORNTON, C.; WILLETT, K. L.; FERREIRA, D. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10636-10644, 2009.

KHAN, N.; AFAQ, F.; KWEON, M.-H.; KIM, K.; MUKHTAR, H. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3475-3482, 2007.

KHAN, N.; HADI, N.; AFAQ, F.; SYED, D. N.; KWEON, M. H.; MUKHTAR, H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p. 163-73, 2007.

KISLA, D.; KARABIYIKLI, S. Antimicrobial effect of sour pomegranate sauce on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, p. 1750-3841, 2013.

KOYAMA, S.; COBB, L. J.; MEHTA, H. H.; SEERAM, N. P.; HEBER, D.; PANTUCK, A. J.; COHEN, P. Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. **Growth Hormone & Igf Research**, v. 20, n. 1, p. 55-62, 2010.

LANSKY, E. P.; HARRISON, G.; FROOM, P.; JIANG, W. G. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. **Investigational New Drugs**, v. 23, n. 2, p. 121-122, 2005.

LANSKY, E. P.; JIANG, W.; MO, H.; BRAVO, L.; FROOM, P.; YU, W.; HARRIS, N. M.; NEEMAN, I.; CAMPBELL, M. J. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. **Investigational New Drugs**, v. 23, n. 1, p. 11-20, 2005.

LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 611-625, 2006.

LEE, S.-T.; WU, Y.-L.; CHIEN, L.-H.; CHEN, S.-T.; TZENG, Y.-K.; WU, T.-F. Proteomic exploration of the impacts of pomegranate fruit juice on the global gene expression of prostate cancer cell. **Proteomics**, v. 12, n. 21, p. 3251-3262, 2012.

LEE, S. T.; LU, M. H.; CHIEN, L. H.; WU, T. F.; HUANG, L. C.; LIAO, G. I. Suppression of urinary bladder urothelial carcinoma cell by the ethanol extract of pomegranate fruit through cell cycle arrest and apoptosis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 364, p. 1472-6882, 2013.

LEIVA, K. P.; RUBIO, J.; PERALTA, F.; GONZALES, G. F. Effect of *Punica granatum* (pomegranate) on sperm production in male rats treated with lead acetate. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 21, n. 6, p. 495-502, 2011.

LI, G.; XU, Y.; WANG, X.; ZHANG, B.; SHI, C.; ZHANG, W.; XIA, X. Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 4, p. 313-319, 2014.

LI, J.; ZHANG, F.; WANG, S. A polysaccharide from pomegranate peels induces the apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway. **Tumor Biology**, v. 35, n. 8, p. 7475-7482, 2014.

LI, X.; WASILA, H.; LIU, L.; YUAN, T.; GAO, Z.; ZHAO, B.; AHMAD, I. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. **Food chemistry**, v. 175, p. 575-584, 2015.

LI, Z.; PERCIVAL, S. S.; BONARD, S.; GU, L. Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 7, p. 1096-1103, 2011.

LOKINA, S.; SURESH, R.; GIRIBABU, K.; STEPHEN, A.; LAKSHMI SUNDARAM, R.; NARAYANAN, V. Spectroscopic investigations, antimicrobial, and cytotoxic activity of green synthesized gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 129, p. 484-90, 2014.

LUCAS, D. L.; WERE, L. M. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of heat-treated lyophilized pomegranate juice in media and in ground top round beef. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2508-16, 2009.

LUCCI, P.; PACETTI, D.; LOIZZO, M. R.; FREGA, N. G. *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: antioxidant and antiproliferative activities. **Food chemistry**, v. 167, n. 0, p. 475-483, 2015.

MALIK, A.; AFAQ, F.; SARFARAZ, S.; ADHAMI, V. M.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 41, p. 14813-14818, 2005.

MARIN, M.; MARIA GINER, R.; RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 925-934, 2013.

MCCARRELL, E. M.; GOULD, S. W.; FIELDER, M. D.; KELLY, A. F.; EL SANKARY, W.; NAUGHTON, D. P. Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement

by addition of metal salts and vitamin C. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 64, p. 1472-6882, 2008.

MCDOUGALL, G. J.; ROSS, H. A.; IKEJI, M.; STEWART, D. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3016-3023, 2008.

MCLAY, J. S.; STEWART, D.; GEORGE, J.; RORE, C.; HEYS, S. D. Complementary and alternative medicines use by Scottish women with breast cancer. What, why and the potential for drug interactions? **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 811-819, 2012.

MELLENDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 272-6, 2006.

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

MINAIYAN, M.; ZOLFAGHARI, B.; TAHERI, D.; GOMARIAN, M. Preventive effect of three pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds fractions on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **International journal of preventive medicine**, v. 5, n. 4, p. 394-404, 2014.

MING, D.-S.; STEVEN, P.; DEB, S.; CHIN, M. Y.; KHARMATE, G.; ADOMAT, H.; BEHESHTI, E. H.; LOCKE, J.; GUNS, E. T. Pomegranate extracts impact the androgen biosynthesis pathways in prostate cancer models *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 19-28, 2014.

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; NITIRUANGJARAS, A.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 901-8, 2013.

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; SONGKRO, S.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory potential of standardized pomegranate rind extract and ellagic acid in contact dermatitis. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2014.

MONEIM, A. E. A.; OTHMAN, M. S.; MOHMOUD, S. M.; EL-DEIB, K. M. Pomegranate peel attenuates aluminum-induced hepatorenal toxicity. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 23, n. 8, p. 624-633, 2013.

NAIR, V.; DAI, Z.; KHAN, M.; CIOLINO, H. P. Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, v. 31, n. 9, p. 2699-2704, 2011.

NAVARRO, M.; AMIGO-BENAVENT, M.; MESIAS, M.; BAEZA, G.; GOKMEN, V.; BRAVO, L.; MORALES, F. J. An aqueous pomegranate seed extract ameliorates oxidative stress of human hepatoma HepG2 cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1622-1627, 2014.

NAZ, S.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S. A.; SAYEED, S. A. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. M341-M345, 2007.

NUNEZ-SANCHEZ, M. A.; GARCIA-VILLALBA, R.; MONEDERO-SAIZ, T.; GARCIA-TALAVERA, N. V.; GOMEZ-SANCHEZ, M. B.; SANCHEZ-ALVAREZ, C.; GARCIA-ALBERT, A. M.; RODRIGUEZ-GIL, F. J.; RUIZ-MARIN, M.; PASTOR-QUIRANTE, F. A.; MARTINEZ-DIAZ, F.; YANEZ-GASCON, M. J.; GONZALEZ-SARRIAS, A.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 6, p. 1199-1211, 2014.

O'MAY, C.; TUFENKJI, N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 3061-3067, 2011.

OLIVEIRA, J. R.; CASTRO, V. C.; GRAÇAS FIGUEIREDO VILELA, P.; CAMARGO, S. E.; CARVALHO, C. A.; JORGE, A. O.; OLIVEIRA, L. D. Cytotoxicity of brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 208, p. 1472-6882, 2013.

OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; VALADARES, M. C. Cytotoxic and antiangiogenic activities of *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 201-207, 2010.

ORGIL, O.; SCHWARTZ, E.; BARUCH, L.; MATITYAHU, I.; MAHAJNA, J.; AMIR, R. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 571-577, 2014.

PAI, M. B.; PRASHANT, G. M.; MURLIKRISHNA, K. S.; SHIVAKUMAR, K. M.; CHANDU, G. N. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an *in vitro* study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, n. 3, p. 334-336, 2010.

PALLER, C. J.; YE, X.; WOZNIAK, P. J.; GILLESPIE, B. K.; SIEBER, P. R.; GREENGOLD, R. H.; STOCKTON, B. R.; HERTZMAN, B. L.; EFROS, M. D.; ROPER, R. P.; LIKER, H. R.; CARDUCCI, M. A. A randomized phase II study of pomegranate extract for men with rising PSA following initial therapy for localized prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 16, n. 1, p. 50-55, 2013.

PANTUCK, A. J.; LEPPERT, J. T.; ZOMORODIAN, N.; ARONSON, W.; HONG, J.; BARNARD, R. J.; SEERAM, N.; LIKER, H.; WANG, H.; ELASHOFF, R.; HEBER, D.; AVIRAM, M.; IGNARRO, L.; BELLDEGRUN, A. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 13, p. 4018-4026, 2006.

PHATTHALUNG, P. N.; CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii* infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 56, p. 1472-6882, 2012.

PIWOWARSKI, J. P.; GRANICA, S.; ZWIERZYNSKA, M.; STEFANSKA, J.; SCHOPOHL, P.; MELZIG, M. F.; KISS, A. K. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 801-809, 2014.

PONNUSAMY, K.; PETCHIAMMAL, C.; MOHANKUMAR, R.; HOPPER, W. *In vitro* antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 349-54, 2010.

QABAHA, K. I. Antimicrobial and free radical scavenging activities of five Palestinian medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 4, p. 101-108, 2013.

RASHEED, Z.; AKHTAR, N.; ANBAZHAGAN, A. N.; RAMAMURTHY, S.; SHUKLA, M.; HAQQI, T. M. Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappa B in human KU812 cells. **Journal of Inflammation-London**, v. 6, 2009.

REDDY, M. K.; GUPTA, S. K.; JACOB, M. R.; KHAN, S. I.; FERREIRA, D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. **Planta Medica**, v. 73, n. 5, p. 461-467, 2007.

RETTIG, M. B.; HEBER, D.; AN, J.; SEERAM, N. P.; RAO, J. Y.; LIU, H.; KLATTE, T.; BELLDEGRUN, A.; MORO, A.; HENNING, S. M.; MO, D.; ARONSON, W. J.; PANTUCK, A. Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-kappa B-dependent mechanism. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 9, p. 2662-2671, 2008.

ROCHA, A.; WANG, L.; PENICHER, M.; MARTINS-GREEN, M. Pomegranate juice and specific components inhibit cell and molecular processes critical for metastasis of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 3, p. 647-658, 2012.

ROSAS-PINON, Y.; MEJIA, A.; DIAZ-RUIZ, G.; AGUILAR, M. I.; SANCHEZ-NIETO, S.; RIVERO-CRUZ, J. F. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 860-865, 2012.

ROSILLO, M. A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; CÁRDENO, A.; APARICIO-SOTO, M.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C. A. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 3, p. 235-242, 2012.

ROSILLO, M. A.; SANCHEZ-HIDALGO, M.; CARDENO, A.; DE LA LASTRA, C. A. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 7, p. 737-745, 2011.

SADIK, N. A. H.; SHAKER, O. G. Inhibitory effect of a standardized pomegranate fruit extract on wnt signalling in 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 9, p. 2507-2517, 2013.

SARTIPPOUR, M. R.; SEERAM, N. P.; RAO, J. Y.; MORO, A.; HARRIS, D. M.; HENNING, S. M.; FIROUZI, A.; RETTIG, M. B.; ARONSON, W. J.; PANTUCK, A. J.; HEBER, D. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Oncology**, v. 32, n. 2, p. 475-480, 2008.

SARUWATARI, A.; OKAMURA, S.; NAKAJIMA, Y.; NARUKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TAMURA, H. Pomegranate juice inhibits sulfoconjugation in caco-2 human colon carcinoma cells. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 4, p. 623-628, 2008.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y. T.; ZHANG, Y. J.; NAIR, M. G.; HEBER, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 6, p. 360-367, 2005.

SEERAM, N. P.; ARONSON, W. J.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; MORO, A.; LEE, R.-P.; SARTIPPOUR, N.; HARRIS, D. M.; RETTIG, M.; SUCHARD, M. A.; PANTUCK, A. J.; BELLDEGRUN, A.; HEBER, D. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7732-7737, 2007.

SEONG, A. R.; YOO, J. Y.; CHOI, K.; LEE, M. H.; LEE, Y. H.; LEE, J.; JUN, W.; KIM, S.; YOON, H. G. Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses inflammatory signaling via prevention of NF-kappaB acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7A cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, n. 3, p. 581-586, 2011.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 284-290, 2011.

SHEMA-DIDI, L.; KRISTAL, B.; ORE, L.; SHAPIRO, G.; GERON, R.; SELA, S. Pomegranate juice intake attenuates the increase in oxidative stress induced by intravenous iron during hemodialysis. **Nutrition Research**, v. 33, n. 6, p. 442-446, 2013.

SHEMA-DIDI, L.; SELA, S.; ORE, L.; SHAPIRO, G.; GERON, R.; MOSHE, G.; KRISTAL, B. One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: a randomized placebo-controlled trial. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 2, p. 297-304, 2012.

SHIRODE, A. B.; BHARALI, D. J.; NALLANTHIGHAL, S.; COON, J. K.; MOUSA, S. A.; RELIENE, R. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 475-484, 2015.

SHIRODE, A. B.; KOVVURU, P.; CHITTUR, S. V.; HENNING, S. M.; HEBER, D.; RELIENE, R. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 6, p. 458-470, 2014.

SREEJA, S.; KUMAR, T. R. S.; LAKSHMI, B. S.; SREEJA, S. Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 725-732, 2012.

SREEKUMAR, S.; SITHUL, H.; MURALEEDHARAN, P.; AZEEZ, J. M.; SREEHARSHAN, S. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SU, X.; HOWELL, A. B.; D'SOUZA, D. H. Antibacterial effects of plant-derived extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 6, p. 573-578, 2012.

TAYEL, A. A.; EL-TRAS, W. F. Anticandidal activity of pomegranate peel extract aerosol as an applicable sanitizing method. **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 117-122, 2010.

TAYEL, A. A.; EL-TRAS, W. F.; MOUSSA, S. H.; EL-SABBAGH, S. M. Surface decontamination and quality enhancement in meat steaks using plant extracts as natural biopreservatives. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 8, p. 755-761, 2012.

ULLAH, M. F.; BHAT, S. H.; HUSAIN, E.; ABU-DUHIER, F.; HADI, S. M.; SARKAR, F. H.; AHMAD, A. Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 811-833, 2014.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, n. 2-3, p. 249-258, 2011.

USTA, C.; OZDEMIR, S.; SCHIARITI, M.; PUDDU, P. E. The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 7, p. 907-913, 2013.

VANELLA, L.; BARBAGALLO, I.; ACQUAVIVA, R.; DI GIACOMO, C.; CARDILE, V.; ABRAHAM, N. G.; SORRENTI, V. Ellagic acid: cytodifferentiating and antiproliferative effects in human prostatic cancer cell lines. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 15, p. 2728-2736, 2013.

VASCONCELOS, L. C.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C.; PEREIRA MDO, S.; HIGINO, J. S.; PEIXOTO, M. H. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 3, p. 223-227, 2006.

VIUDA-MARTOS, M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 635-654, 2010.

WALY, M. I.; AL-RAWAHI, A. S.; AL RIYAMI, M.; AL-KINDI, M. A.; AL-ISSAEI, H. K.; FAROOQ, S. A.; AL-ALAWI, A.; RAHMAN, M. S. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 60, p. 1472-6882, 2014.

WALY, M. I.; ALI, A.; GUIZANI, N.; AL-RAWAHI, A. S.; FAROOQ, S. A.; RAHMAN, M. S. Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. **Asian Pacific Organization for Cancer Prevention**, v. 13, n. 8, p. 4051-4055, 2012.

WANG, L.; ALCON, A.; YUAN, H.; HO, J.; LI, Q.-J.; MARTINS-GREEN, M. Cellular and molecular mechanisms of pomegranate juice-induced anti-metastatic effect on prostate cancer cells. **Integrative Biology**, v. 3, n. 7, p. 742-754, 2011.

WANG, L.; HO, J.; GLACKIN, C.; MARTINS-GREEN, M. Specific pomegranate juice components as potential inhibitors of prostate cancer metastasis. **Translational Oncology**, v. 5, n. 5, p. 345-U120, 2012.

WANG, L.; LI, W.; LIN, M.; GARCIA, M.; MULHOLLAND, D.; LILLY, M.; MARTINS-GREEN, M. Luteolin, ellagic acid and puniceic acid are natural products that inhibit prostate cancer metastasis. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 10, p. 2321-2330, 2014.

WANG, S.-G.; HUANG, M.-H.; LI, J.-H.; LAI, F.-I.; LEE, H.-M.; HSU, Y.-N. Punicalagin induces apoptotic and autophagic cell death in human U87MG glioma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 11, p. 1411-1419, 2013.

WANG, Y.; ZHANG, S.; IQBAL, S.; CHEN, Z.; WANG, X.; WANG, Y. A.; LIU, D.; BAI, K.; RITENOUR, C.; KUCUK, O.; WU, D. Pomegranate extract inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells and enhances the *in vivo* efficacy of docetaxel chemotherapy. **Prostate**, v. 74, n. 5, p. 497-508, 2014.

WINAND, J.; SCHNEIDER, Y. J. The anti-inflammatory effect of a pomegranate husk extract on inflamed adipocytes and macrophages cultivated independently, but not on the inflammatory vicious cycle between adipocytes and macrophages. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 310-318, 2014.

ZARFESHANY, A.; ASGARY, S.; JAVANMARD, S. H. Potent health effects of pomegranate. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 100, p. 2277-9175, 2014.

ZHOU, B.; YI, H.; TAN, J.; WU, Y.; LIU, G.; QIU, Z. Anti-proliferative effects of polyphenols from pomegranate rind (*Punica granatum* L.) on EJ bladder cancer cells via regulation of p53/miR-34a Axis. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 415-422, 2015.

4. CAPÍTULO II – Obtenção e caracterização de extrato etanólico e extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum*

(Artigo a ser submetido à Food and Bioproducts Processing. Fator de impacto: 2,043)



Obtenção e caracterização de extrato etanólico e extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum*

PEREIRA, S.T.¹; OLIVEIRA, T.C.²; MOREIRA, D.L.³; NUNES, L.C.C.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64.049-550, Piauí, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50.740-520, Brasil.

³Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-900, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Punica granatum, popularmente conhecida como romãzeira, é uma planta com diversas propriedades terapêuticas e uso difundido na medicina popular de vários locais. Muitas dessas propriedades são evidenciadas por trabalhos científicos em todo o mundo. Esse trabalho teve como objetivo obter e caracterizar o extrato etanólico e o extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* a fim de obter um produto tecnológico intermediário com características viáveis de produção. Dentre os processos de secagem realizados, aquele que utilizou 15% de aerosil e 10% de maltodextrina obteve melhor rendimento. As propriedades reológicas dos pós sugerem que extratos sem uso de adjuvantes tecnológicos apresentam melhores características relacionadas ao fluxo e compressão. Entretanto, a não utilização de adjuvantes tecnológicos possui como desvantagem a alta higroscopicidade. A análise cromatográfica concluiu que o processo de secagem não alterou quali e quantitativamente os componentes químicos dos extratos. Assim, os extratos secos por *spray drying* mostram-se como uma alternativa viável na obtenção de um produto intermediário para produção de formas farmacêuticas.

Palavras-chave: *Punica granatum*; Punicaceae; *spray drying*; maltodextrina; aerosil.

Obtaining and characterization of ethanolic and dry extract by spray drying of *Punica granatum*.

PEREIRA, S.T.¹; OLIVEIRA, T.C.²; MOREIRA, D.L.³; NUNES, L.C.C.¹

¹Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

²Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Department of Natural Products, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract

Punica granatum, popularly known as pomegranate, is a plant with many therapeutic properties and widespread use in folk medicine from many places. Many of these properties are evidenced by scientific works throughout the world. This study aimed to obtain and characterize ethanolic and dried extract by spray drying of *Punica granatum* in order to get a technological intermediate product with viable production characteristics. Among the performed drying processes, the extract which utilized 15% of aerosil and 10% of maltodextrin had a better yield. The rheological properties of powders suggest that without use of aids drying the extracts have better flow and compression characteristics. However, no use of aids drying has disadvantage of high hygroscopicity. Chromatographic analysis concluded that drying process does not change qualitatively and quantitatively chemical components of extracts. Thus, extracts dried by spray drying are shown as viable alternative to obtain an intermediate product for the production of pharmaceutical forms.

Keywords: *Punica granatum*; Punicaceae; *spray drying*; maltodextrin; aerosil.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos comprovam propriedades benéficas de produtos derivados de vegetais para a saúde humana. Inúmeras moléculas foram isoladas e suas propriedades farmacológicas e físico-químicas foram estudadas. Entretanto, esses compostos e extratos devem ser adequadamente formulados de modo a atingir o alvo e exercer a atividade farmacológica esperada, visto que correspondem a misturas complexas de diferentes classes de compostos químicos (CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA; OLIVEIRA, in press-a).

Punica granatum (*P. granatum*), popularmente conhecida como romãzeira, é uma planta de múltiplas propriedades terapêuticas e uso difundido na medicina popular de vários locais. Estudos científicos destacam principalmente a atividade antioxidante, antilipêmica, antihiperlipemizante e antimicrobiana dos derivados desse vegetal (LORENZI; MATOS, 2008; MIDDHA; USHA; PANDE, 2013). É cultivada em quase todo o mundo, inclusive no Brasil, sendo provavelmente originária da Ásia e espalhada em toda a região do Mediterrâneo (LORENZI; MATOS, 2008). Além do seu uso medicinal, tem ampla aplicação na indústria de alimentos, na fabricação de sucos, geleias, aromatizantes, corante e na indústria de cosméticos, na fabricação de sabonetes, hidratantes, *shampoos*, e condicionadores (SILVA, 2013).

Preparações vegetais padronizadas são comercializadas principalmente sob a forma de extratos líquidos ou como pós secos de material vegetal ou de um extrato (FERNANDES, et al., 2014). A tendência na indústria farmacêutica é a utilização de extratos secos em detrimento às formas líquidas convencionais devido às vantagens significativas, dentre as quais se destacam a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, a fácil padronização, a maior concentração de compostos ativos e a elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (FERNANDES, M. R. V. et al., 2014; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Desse modo, o processo de secagem trata-se de uma técnica empregada no processamento de diversos materiais para a obtenção de pós e grânulos. O objetivo principal desse processo é a retirada da água, responsável por propiciar um meio reacional para reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Métodos como *spray drying*, leite de jorro, leite fluidizado e liofilização têm sido comumente empregados na produção de pó de extratos de plantas (CORTÉS-ROJAS, DIEGO FRANCISCO; SOUZA; OLIVEIRA, in press-b). A técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) consiste em três etapas. Na primeira fase, o líquido é disperso como gotículas,

produzindo uma grande área superficial. Na segunda etapa, ocorre contato das gotículas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (SEVERO et al., 2014).

O uso de adjuvantes na técnica de secagem por *spray drying* é uma prática bastante comum. Essa etapa visa melhorar o aspecto dos pós, desde suas características de fluxo até mesmo sua estabilidade. Alguns adjuvantes utilizados são: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose e maltodextrina (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

O dióxido de silício coloidal (aerosil), que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente corresponde a um dos principais adjuvantes tecnológicos de secagem. Seu uso apresenta excelentes resultados na obtenção de produtos secos por *spray drying* a partir de soluções extrativas de vegetais (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Já a maltodextrina, na indústria alimentícia, corresponde ao principal adjuvante de secagem utilizado. Esse componente é capaz de reduzir a higroscopicidade dos produtos secos (MISHRA; MISHRA; MAHANTA, 2014; WANG, W.; ZHOU, 2012).

Esse estudo teve como objetivo obter e caracterizar o extrato etanólico e o extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* a fim de obter um produto tecnológico intermediário com características viáveis de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato etanólico de *P. granatum*

Coleta do material vegetal

O fruto de *Punica granatum* (variedade molar) foi coletado em seu estágio de maturação, determinado visualmente com base na cor e tamanho dos frutos (coloração amarelo avermelhada – figura 1A), no período de janeiro a agosto de 2014 em uma horta comunitária do bairro Primavera Leste, zona nordeste da cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil, sendo a georreferência: S 5° 02' 53.9", W 42° 44' 33.9". Exsiccatas foram depositadas no acervo do herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí sob o número de registro TEPB 30120.

Preparação do extrato etanólico

Os frutos de *Punica granatum* foram previamente lavados com água corrente e conservados sob refrigeração (4 ° C) até a utilização. O intervalo entre a coleta do fruto e início do processo de extração não ultrapassou cinco dias. Aguardou-se que o fruto atingisse a temperatura ambiente antes do uso.

Determinou-se a massa dos frutos e, em seguida, realizaram-se dois cortes transversais perpendiculares a fim de permitir a separação manual entre o pericarpo (epicarpo e mesocarpo) e a parte comestível (arilos e sementes) do fruto (Figura 1B).

Figura 1 – Fruto de *Punica granatum* (A). Representação anatômica do fruto de *Punica granatum* (B).



A massa do pericarpo (epicarpo e mesocarpo do fruto) foi mensurada e esse material foi submetido à secagem em estufa (Biopar, modelo S805T) a uma temperatura de 45 ° C, durante 48h (CALÍN-SÁNCHEZ et al., 2013). Esse procedimento foi realizado para diminuir a percentagem de água do material, consequentemente garantir estabilidade microbológica até a sua utilização. O material seco foi triturado durante 2 minutos utilizando um liquidificador doméstico (Philips Walita, modelo RI2104, 550W de potência). O pó obtido foi mantido em dessecador até sua utilização.

O processo de extração foi realizado através de maceração com solução hidroetanólica 70% (v/v) a temperatura ambiente. Utilizou-se uma proporção de 20% (p/v) de material vegetal (pericarpo) nesse processo. A suspensão foi mantida por 72 horas em frasco de polietileno tereftalato protegida da luz com agitação diária durante 1 minuto. Após 72 horas, a suspensão foi filtrada à vácuo utilizando papel filtro qualitativo (J Prolab, modelo 15 cm), obtendo-se o extrato fluido de *Punica granatum*.

Caracterização do extrato etanólico de *P. granatum*

Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada utilizando picnômetro limpo e seco, previamente calibrado. A calibração consistiu na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida. A amostra foi transferida para o picnômetro e posteriormente realizou-se a pesagem. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O cálculo da densidade relativa foi determinado através da razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água (BRASIL, 2010).

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro Hanna Instruments® previamente calibrado.

Determinação do resíduo seco (p/v)

Para a determinação do resíduo seco, uma alíquota de 2 ml do extrato foi transferida para pesa-filtro limpo e desengordurado, previamente pesado em balança analítica (Bel Engineering®). Após evaporação em banho-maria (Nova Ética®, modelo 314/8), o pesa filtro foi colocado em estufa (Biopar, modelo S805T) a uma temperatura de 105 ° C durante três horas. Após esse período, o pesa-filtro foi colocado em dessecador até atingir temperatura ambiente e, só então, pesado novamente. Após pesagem, o pesa filtro retornou à estufa a 105 ° C por mais 30 minutos e ao final colocado em dessecador até atingir temperatura antes da pesagem final. O resíduo seco foi expresso em porcentagem sobre o volume do extrato.

Triagem fitoquímica

A pesquisa das principais classes de metabólitos secundários foi realizada por meio de reações qualitativas de coloração e precipitação baseadas nas propriedades químicas e físico-químicas dos principais grupos de constituintes químicos que compõem o material vegetal (MATOS, 1997; SIMÕES et al., 2010). Para esse ensaio utilizou-se extrato seco obtido através de liofilizador (Thermo MudulyoD Freeze Dryer) com temperatura de -50 ° C, pressão a vácuo de 2,5 mbar durante 72h (o etanol do extrato fluido foi previamente retirado através de evaporador rotativo (Fisatom 801) com banho-maria a 80 ° C, água do condensador a 10 ° C e pressão a vácuo de 200 mmHg).

Alcaloides (Reação de Mayer)

Dissolveram-se 10 mg do extrato seco em 5mL de solução de HCl a 5%. Em seguida, separou-se três porções de 1 mL em tubos de ensaio, e adicionou-se 5 gotas do reativo de Mayer (BARBOSA et al., 2004). Observou-se a formação de precipitado.

Flavonoides (Reação de Shinoda)

Dissolveram-se 10 mg do extrato seco em 10 mL de metanol. Em seguida, adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado e quatro fragmentos de fita de magnésio (0,5cm/cada) à solução. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva. (BARBOSA et al., 2004).

Quinonas (Reação de Bornträger)

Dissolveram-se 10 mg do extrato seco em 5 ml de clorofórmio e agitou-se. Após 15 minutos, recolheu-se a fase clorofórmica e adicionou-se 1 ml de hidróxido de sódio (NaOH) a 5% e verificou-se o aparecimento de coloração roxa, que é o indicativo da presença de quinonas (BESSA, 2007).

Saponinas (Reação de formação de espuma)

Dissolveram-se 10 mg do extrato seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15 mL em tubo de ensaio e agitou-se vigorosamente durante 2 min. Observou-se a formação de camada de espuma permanente por mais de meia hora (BARBOSA et al., 2004).

Taninos e polifenóis (Reação com cloreto férrico)

Dissolveram-se 10 mg do extrato seco em 5 mL de água purificada e adicionou-se 5 gotas de solução de FeCl₃ (cloreto férrico) a 1 % (BARBOSA et al., 2004). Observou-se possível mudança de coloração.

Obtenção do extrato seco de *P. granatum*

Adicionaram-se adjuvantes tecnológicos à solução extrativa e sob homogeneização, em agitador magnético, a preparação foi submetida à secagem por aspersão (*spray drying*) utilizando Mini Spray Dryer Büchi B-290 nas seguintes condições: temperatura de entrada de 170 ° C, velocidade de fluxo de 10 % (aproximadamente 3 mL/min), pressão de 0,6 barr e aspiração em 90% da capacidade do equipamento. Para escolha do melhor adjuvante

tecnológico a ser empregado, bem como sua concentração foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com dois adjuvantes tecnológicos, o dióxido de silício coloidal (aerosil) e a maltodextrina (fatores), ambos variando as concentrações de 15% (nível +) e 10% (nível -). A matriz de planejamento fatorial estabeleceu os experimentos (lotes) realizados combinando todos os fatores em todos os níveis. As combinações das variáveis em estudo podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 - Matriz de planejamento fatorial 2^2 para a secagem do extrato etanólico de *Punica granatum*.

Lotes	Maltodextrina (1)	Dióxido de silício coloidal (aerosil) (2)	Interação (1/2)
Lote 1 (L1)	+	+	+
Lote 2 (L2)	-	+	-
Lote 3 (L3)	+	-	-
Lote 4 (L4)	-	-	+
Lote 5 (L5)	x	x	x
Lote F (LF)	x	x	x

Legenda: +: concentração de 15%; -: concentração de 10%; x: ausente; L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

Os extratos secos foram armazenados em tubos Falcon fechados e as tampas envolvidas com Parafilm[®] M. Foram mantidos em dessecador provido de sílica gel. Realizou-se uma caracterização dos pós (aspectos visuais, rendimento, propriedades de fluxo, análise morfológica e perfil cronatográfico) a fim de determinar o melhor método de obtenção do extrato seco. Utilizou-se o extrato seco liofilizado como controle.

Como grupo controle, utilizou-se extrato seco de *P. granatum* por liofilização. Para esse ensaio utilizou-se liofilizador (Thermo MudulyoD Freeze Dryer) com temperatura de -50 ° C, pressão a vácuo de 2,5 mbar durante 72h (o etanol do extrato fluido foi previamente retirado através de evaporador rotativo (Fisatom 801) com banho-maria a 80 ° C, água do condensador a 10 ° C e pressão a vácuo de 200 mmHg).

Caracterização dos extratos secos de *P. granatum*

Aspectos visuais

As características macroscópicas foram avaliadas através da observação visual da cor e do aspecto dos pós. Esse resultado foi registrado fotograficamente.

Rendimento do processo de secagem

O rendimento bruto da operação de secagem dos extratos foi calculado em relação à massa teórica de sólidos totais presentes nas soluções extrativas. Os sólidos totais correspondem ao teor do resíduo seco da solução extrativa, somada ao peso do adjuvante adicionado, quando utilizado (VASCONCELOS et al., 2005).

Densidade aparente e densidade compactada

Para a determinação da densidade aparente, três gramas de amostras foram colocadas em provetas de 50 mL e o volume encontrado registrado. A densidade de compactação foi determinada com auxílio de um densímetro de sólidos Copley JV2000. O pó foi submetido à 1250 quedas, conforme preconizado na norma DIN 53194 e pela Farmacopeia Americana (BOLHUIS; ENGELHART; EISSENS, 2009; USA, 2011). A densidade aparente (d_a) e a de compactação (d_c) foram calculadas pelas equações:

$$\text{Densidade aparente}(d_a) = \frac{\text{massa da amostra}}{\text{volume aparente}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Densidade compactada}(d_c) = \frac{\text{massa da amostra}}{\text{volume compactado}} \quad (\text{Equação 2})$$

Determinação do fator de Hausner e índice de Carr

O fator de Hausner (FH) e o índice de Carr são parâmetros vinculados às propriedades de fluxo do pó. O fator de Hausner e o índice de Carr foram determinados através das equações abaixo (BHUSARI; MUZAFFAR; KUMAR, 2014):

$$\text{Fator de Hausner (FH)} = \frac{\text{Densidade de compactação}}{\text{Densidade aparente}} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Índice de Carr (\%)} = \frac{\text{Densidade de compactação} - \text{Densidade aparente}}{\text{Densidade de compactação}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Teor de umidade residual

A determinação da umidade residual foi realizada por meio do método gravimétrico de perda por dessecação. Um grama de cada extrato foi colocado em pesa-filtro, previamente tarado, e submetido à dessecação em estufa a 105 ± 2 ° C durante 2 horas. Após o resfriamento por 20 minutos em dessecador, o pesa-filtro foi pesado e recolocado em estufa por mais 30 minutos, repetindo o procedimento anterior antes da pesagem. O resultado foi expresso em perda percentual de umidade em massa (BRASIL, 2010).

Higroscopicidade

A higroscopicidade dos extratos secos foi analisada após submissão de 0,5g de cada extrato à atmosfera de umidade relativa de 90%, obtida com a diluição de 9,76 mL de ácido sulfúrico concentrado para 100 mL de água destilada. Essa solução foi transferida para dessecadores.

Nos dessecadores foram colocados béqueres de 20 mL previamente tarados, contendo 500 mg dos extratos secos. A cada 24 horas, o material foi retirado do dessecador de umidade relativa de 90% e colocado em dessecador com sílica gel por uma hora com a finalidade de retirar o excesso de umidade dos recipientes de acondicionamento. Em seguida, o material foi pesado e retornado ao dessecador de umidade relativa de 90%. A higroscopicidade foi determinada por gravimetria, através da diferença entre o peso inicial e a cada 24 horas (equação 5), durante 7 dias de ensaio. As alterações das características macroscópicas dos extratos foram avaliadas (GAUDY, 1984; VASCONCELOS et al., 2005).

$$\text{Higroscopicidade (\%)} = \frac{\text{Massa após 24h} - \text{Massa inicial}}{\text{Massa inicial}} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

Análise morfológica

Os extratos foram previamente revestidos com ouro através de metalizador HHV AUTO306 (espessura de recobrimento de 5nm). A análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, em microscópio eletrônico de varredura (MEV-EDS) Jeol JSM-7401F. A análise EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios-x) foi realizada com o propósito de obter o gradiente de composição de partículas da amostra e utilizou voltagem de aceleração igual a 10.0 kV e magnificação de 4000x. A morfologia, a superfície e homogeneidade de tamanho e forma das partículas foram observadas.

Perfil cromatográfico

Inicialmente as amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) em concentração final de 20mg/mL. Em seguida, a amostra obtida foi filtrada com filtro Millex-HV PVDF Durapore (0,45mm) e transferida para frasco de 1,8 mL para análise por HPLC. Os parâmetros da análise foram: volume de injeção de 20 µL, coluna ACE 5 AQ (25 cm x 4.8 mm x 5 µm), fase móvel água Milli-Q acidificada (AMQ) com ácido acético glacial (pH 3,0) e acetonitrila (ACN) com eluição em gradiente (tempo 0 min = 100 % AMQ / 0 % ACN; tempo 35 min = 0 % AMQ/ 100 % ACN; tempo 35,1 min = 100 % AMQ/ 0 % ACN; tempo 45 min = 100 % AMQ/ 0 % ACN), temperatura do forno igual a 50 ° C, e fluxo de 0,5 mL/min. A leitura das amostras foi realizada em comprimento de onda de 340 nm. Utilizou-se punicalagina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como padrão cromatográfico.

Análise estatística

Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata, exceto quando especificado diferentemente. Os resultados obtidos foram avaliados aplicando-se o teste estatístico ANOVA, seguido de teste Tukey, quando aplicável. A análise estatística e a obtenção dos gráficos foram realizadas com auxílio dos programas Statistica[®] 12, Excel[®] e GraphPad Prisma[®] 5, todos para ambiente Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do extrato etanólico de *P. granatum*

Os valores correspondentes ao resíduo seco, pH e densidade relativa podem ser visualizados na Tabela 2.1.

Tabela 2 - Resíduo seco, pH e densidade relativa do extrato etanólico de *Punica granatum*.

Parâmetros avaliados	Média ± DP
Resíduo seco (p/v)	8,48 ± 0,134
pH	6,32 ± 0,083
Densidade relativa (g/mL)	0,91 ± 0,002

Legenda: DP: desvio padrão.

O extrato apresentou densidade relativa igual a 0,91 g/mL, valor próximo à densidade da água. O resíduo seco correspondeu a 8,48% (p/v), o que caracteriza uma alta capacidade extrativa do método utilizado. O resíduo seco trata-se de uma resposta dependente de multifatores, dentre os quais se destacam a quantidade de material vegetal, o método de extração e os solventes utilizados. Rodríguez Chanfrau, González e López Armas (2013) determinaram que as condições ideais de extração de compostos polifenólicos do fruto de *P. granatum* correspondem à maceração por 72h utilizando 20% de material vegetal e solvente hidroalcolico (etanol:água) na proporção de 50%. Nesse estudo, não houve diferença significativa no uso do solvente (etanol:água) a 70% e 50%. No presente trabalho preferiu-se a utilização do solvente etanol:água a 70% com a finalidade de diminuir possíveis contaminações microbiológicas.

A determinação do pH apontou um extrato fracamente ácido, apresentando um valor de 6,32. Este quadro é importante para a estabilidade dos compostos nos diferentes processos futuramente empregados. O pH fornece informações sobre a natureza química dos compostos existentes na solução extrativa. As antocianinas, compostos pertencentes ao grupo dos flavanoides, por exemplo, apresentam diferentes estruturas em função do pH (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008; SOUZA et al., 2010). A triagem fitoquímica qualitativa revelou a presença de taninos, polifenóis, flavonoides e saponinas. Os resultados podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 3 – Triagem fitoquímica qualitativa de extrato etanólico de *Punica granatum*.

Classe de compostos	Reação utilizada	Resultado
Alcaloides	Reação de Mayer	Ausente
Taninos e polifenóis	Reação com FeCl ₃	Presente
Quinonas	Reação com NaOH	Ausente
Flavonoides	Reação de Shinoda	Presente
Saponinas	Formação de espuma	Presente

A presença de flavonoides nesta espécie é comprovada pela literatura e muitos estudos apontam a presença de tais substâncias nas folhas e arilos e pericarpo. Os principais flavanoides presentes em *P. granatum* são: campferol, quercetina e luteolina (DE OLIVEIRA et al., 2013; JAGANATHAN et al., 2014; LANSKY; NEWMAN, 2007; SREEKUMAR et al., 2014; ULLAH et al., 2014; WANG, L. et al., 2014).

Os polifenóis são os principais compostos a que se atribuem as propriedades biológicas dessa planta. Esses constituintes estão presentes em todas as partes do vegetal. Destaca-se a presença de ácido elágico e taninos hidrolisáveis, tais como punicalagina, peduncalagina, punicalina e ácido galágico (ANIBAL et al., 2013; DKHIL, 2013; LI, D. Q. et al., 2014; MINAIYAN et al., 2014; SHABAN et al., 2013; ZARFESHANY; ASGARY; JAVANMARD, 2014).

Caracterização dos extratos secos de *P. granatum*

Aspectos visuais

O aspecto visual dos extratos secos por *spray drying* mostrou a presença de pós finos, de coloração semelhante, apresentando uma tonalidade amarelo-clara (Figura 2). Por outro lado, o pó obtido por liofilização apresentou uma coloração mais escura, cor de caramelo. As características físicas visuais mostraram que os extratos com maior concentração aerosil (L1 e L2), apresentaram melhores propriedades, aderindo menos às paredes do recipiente em que foi armazenado e formando menos aglomerados. O Aerosil adicionado aos extratos proporcionou um aspecto de pó fino e solto. Esse resultado corrobora estudos realizados anteriormente utilizando esse adjuvante tecnológico na secagem de extratos vegetais (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; VASCONCELOS et al., 2005a).

Figura 2 - Aspecto visual dos extratos secos de *Punica granatum*.



Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

Rendimento do processo de secagem

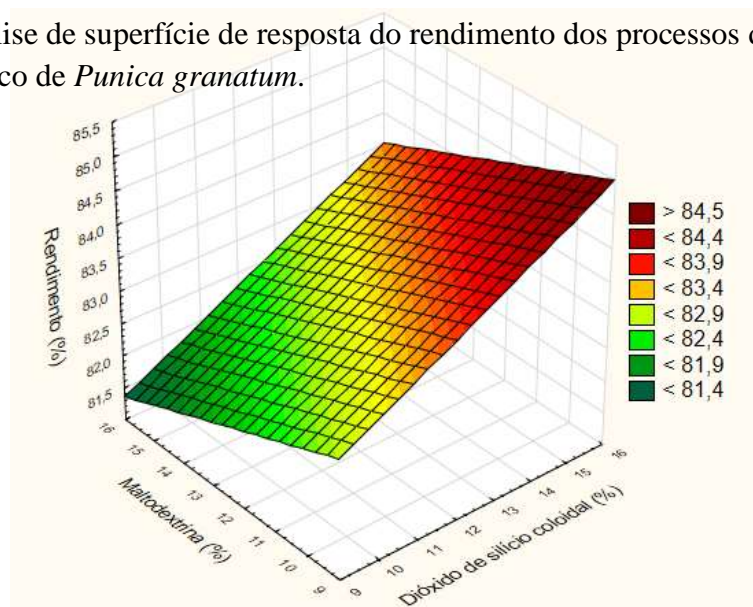
O rendimento do processo de secagem forneceu resultados superiores aos comumente encontrados para secagens por pulverização tradicionais, que ficam em torno de 50 a 70 % (LI, X. et al., 2010). Percebe-se que o processo de secagem por liofilização mostrou rendimentos bem próximo ao valor de 100%, uma característica inerente desse método. Apesar de L2 apresentar rendimento quantitativamente superior aos demais lotes (tabela 4 e figura 3), percebe-se que os rendimentos obtidos por *spray drying*, aparentemente, não sofreram influência dos adjuvantes tecnológicos nas concentrações estudadas. Provavelmente, a homogeneidade deste comportamento seja em função dos demais parâmetros de secagem, temperatura de entrada, pressão, aspiração e velocidade de fluxo que permaneceram constantes durante a secagem.

Tabela 4 - Rendimento dos processos de secagem do extrato etanólico de *Punica granatum*.

Lote	Rendimento (%)
L1	82,66
L2	85,24
L3	82,64
L4	82,16
L5	84,34
LF	99,80

Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

Figura 3 – Análise de superfície de resposta do rendimento dos processos de secagem de extratos etanólico de *Punica granatum*.



Densidade aparente, densidade compactada fator de Hausner e índice de Carr

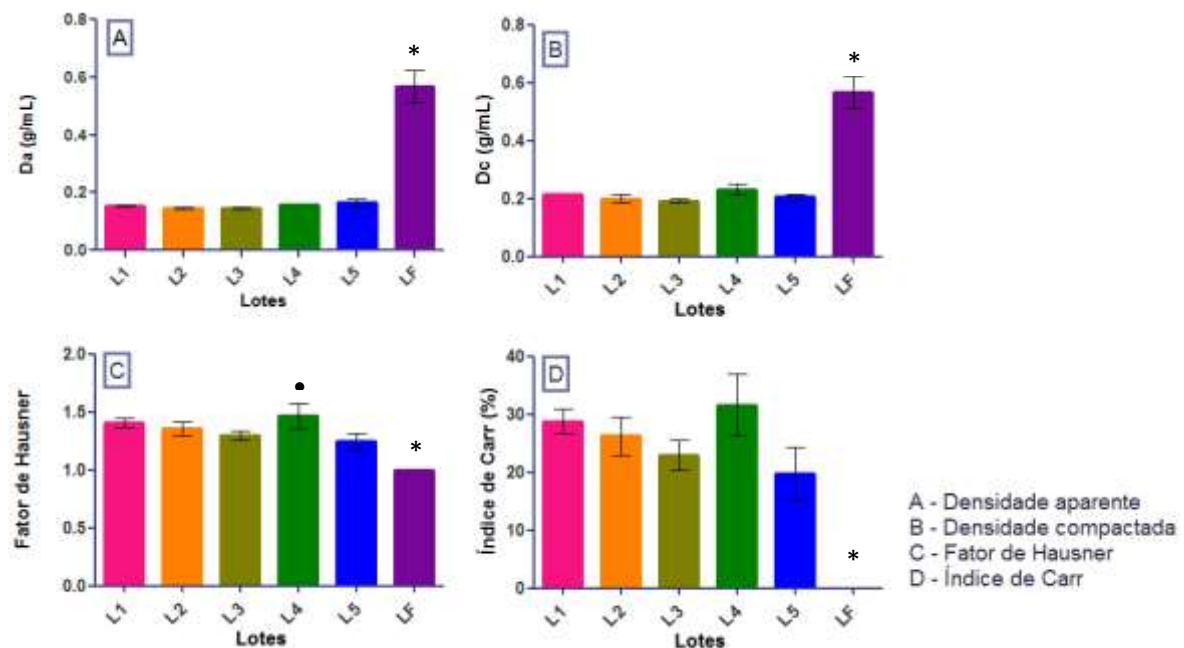
Na tabela 5 e figura 4 estão apresentados os resultados da densidade, antes e após compactação, fator de Hausner e índice de Carr de cada lote de extrato seco.

Tabela 5 - Densidade aparente, densidade compactada, fator de Hausner e índice de Carr dos extratos secos de *Punica granatum*.

Extratos	d_a (g/mL)	d_c (g/mL)	Fator de Hausner (FH)	Índice de Carr
L1	0,153 ± 0,005	0,214 ± 0,000	1,405 ± 0,041	28,772 ± 2,127
L2	0,148 ± 0,004	0,201 ± 0,013	1,358 ± 0,062	26,270 ± 3,285
L3	0,148 ± 0,004	0,192 ± 0,007	1,299 ± 0,043	22,937 ± 2,612
L4	0,158 ± 0,000	0,232 ± 0,018	1,467 ± 0,113•	31,579 ± 5,263•
L5	0,164 ± 0,013	0,205 ± 0,008	1,249 ± 0,073	19,771 ± 4,555
LF	0,567 ± 0,058*	0,567 ± 0,058*	1,000 ± 0,001*	0,000 ± 0,000*

Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes; d_a : densidade aparente; d_c : densidade compactada; *: estatisticamente diferente dos demais lotes; •: estatisticamente diferente de L5.

Figura 4 - Densidade aparente, densidade compactada, fator de Hausner e índice de Carr do extrato seco de *Punica granatum*.



Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes;

d_a – densidade aparente; d_c – densidade compactada; *: estatisticamente diferente dos demais lotes; •: estatisticamente diferente de L5.

O parâmetro densidade é um fator importante em relação à embalagem, transporte e comercialização de pós, portanto, seus resultados podem ser úteis em termos de massa do material que se encaixe em determinado recipiente. Um produto seco com alta densidade pode ser armazenado em recipientes menores, ao contrário de produtos com baixa densidade (FERNANDES, R. V. D. B.; BORGES; BOTREL, 2013). Percebe-se que as densidades aparentes dos extratos secos por spray drying foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). Apenas o extrato seco por liofilização apresentou características e resultados diferentes dos demais grupos para esse parâmetro.

Os resultados obtidos para o fator de Hausner são parâmetros vinculados às propriedades de fluxo do pó ($1,0 < FH < 1,1$, pó de fluxo livre; $1,1 < FH < 1,25$, pó de fluxo médio; $1,25 < FH < 1,4$, pó de difícil fluxo; e $FH > 1,4$, pó de fluxo muito difícil). Em relação ao índice de Carr, valores abaixo de 20% indicam facilidade no processo de compressão (BHUSARI; MUZAFFAR; KUMAR, 2014; FERREIRA, 2009). Os extratos secos por *spray drying* não apresentaram propriedades reológicas satisfatórias. Os resultados demonstram que LF, L5, L3 e L2, em ordem decrescente, apresentaram melhores características em relação a esses parâmetros. Entretanto, é visível a instabilidade de LF quando em contato com o ambiente, devido sua elevada capacidade de absorver água. Em relação ao L5, verificou-se uma elevada aderência ao recipiente de armazenamento quando comparado a L3 e L2, provavelmente devido, também, a sua alta higroscopicidade.

Teor de umidade residual

A umidade é um fator determinante na qualidade farmacotécnica de materiais sólidos pulverulentos, podendo interferir tanto nas características reológicas quanto na estabilidade físico-química (MENDEZ et al., 2011). Teores de umidade elevados possibilitam o desenvolvimento de fungos e bactérias, hidrólise e atividade enzimática com consequente deterioração de constituintes químicos (MARQUES et al., 2012).

Os valores de umidade residual dos extratos secos de *P. granatum* são exibidos na tabela 6. Os extratos secos por *spray drying* apresentaram umidade residual entre $1,29 \pm 0,21$ % e $3,61 \pm 0,08$ % (m/m). O extrato seco por liofilização apresentou valores estatisticamente superiores aos obtidos pela secagem por aspersão ($p < 0,05$). Esse resultado demonstra que o *spray drying* corresponde a um método eficiente de secagem de matéria prima vegetal.

Tabela 6 – Umidade residual dos extratos secos de *Punica granatum*.

Extratos	Umidade residual (% m/m)
L1	2,75 ± 0,20
L2	3,61 ± 0,08
L3	3,60 ± 0,14
L4	1,29 ± 0,21
L5	2,95 ± 0,15
LF	9,10 ± 0,26 *

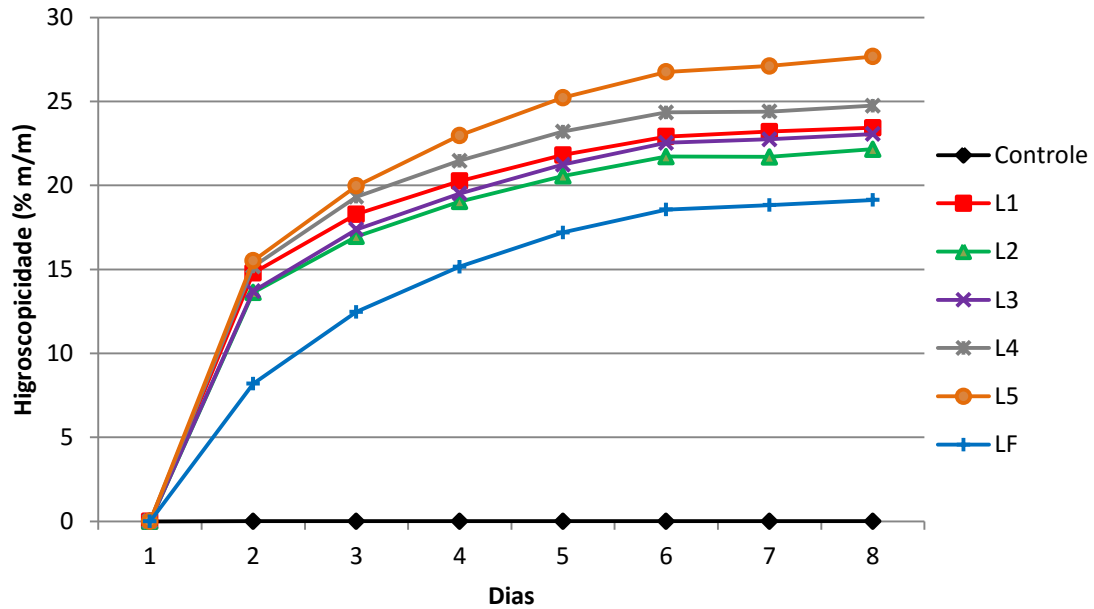
Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes; *: estatisticamente diferente dos demais lotes.

A análise estatística dos dados de umidade residual permite afirmar que L1 e L5 são estatisticamente iguais entre si e diferentes dos demais lotes de extratos secos ($p < 0,05$). L2 e L3, após análise estatística, também demonstraram serem iguais entre si. Logo, para esse ensaio, concluímos que L4, L1/L5, L2/L3 e LF, em ordem decrescente, correspondem aos extratos com menor teor de água.

Higroscopicidade

A higroscopicidade em extratos secos vegetais é um problema comum, uma vez que a elevada carga de constituintes vegetais e as reduzidas dimensões acarretam problemas de fluxo e causam aumento da superfície específica, favorecendo um comportamento desfavorável frente à umidade ambiental. O comportamento dos extratos frente à umidade está diretamente relacionado à estabilidade e às propriedades tecnológicas de manipulação dos extratos para obtenção de produtos finais (SOARES et al., 2005). O comportamento higroscópico dos extratos secos frente à umidade relativa controlada de 90% é apresentado na figura 5.

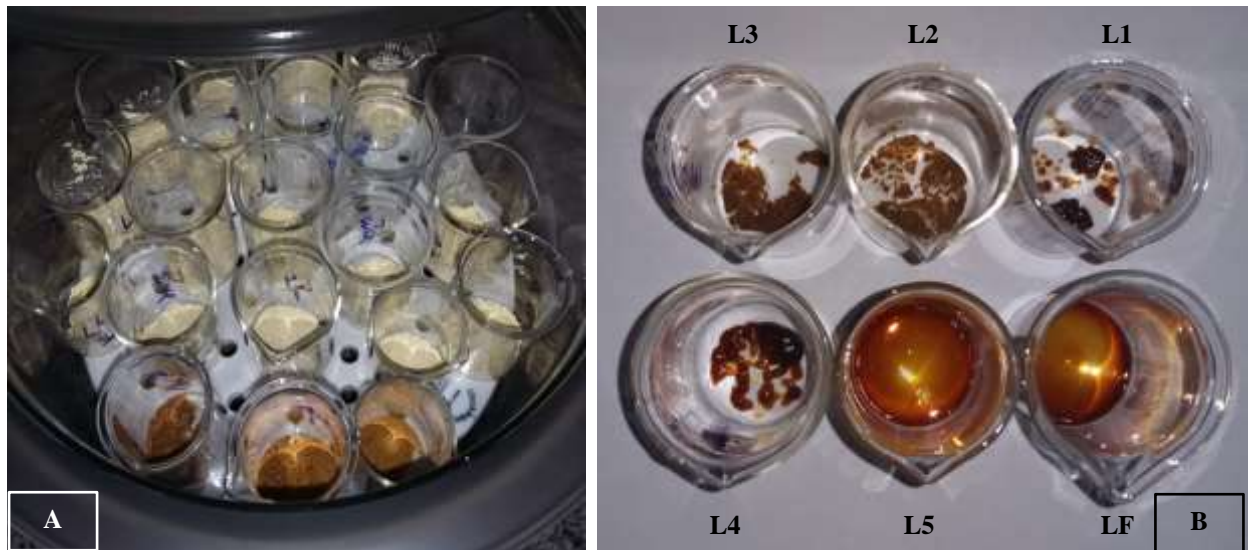
Figura 5 – Higroscopicidade dos extratos secos de *Punica granatum* frente à umidade relativa de 90%.



Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

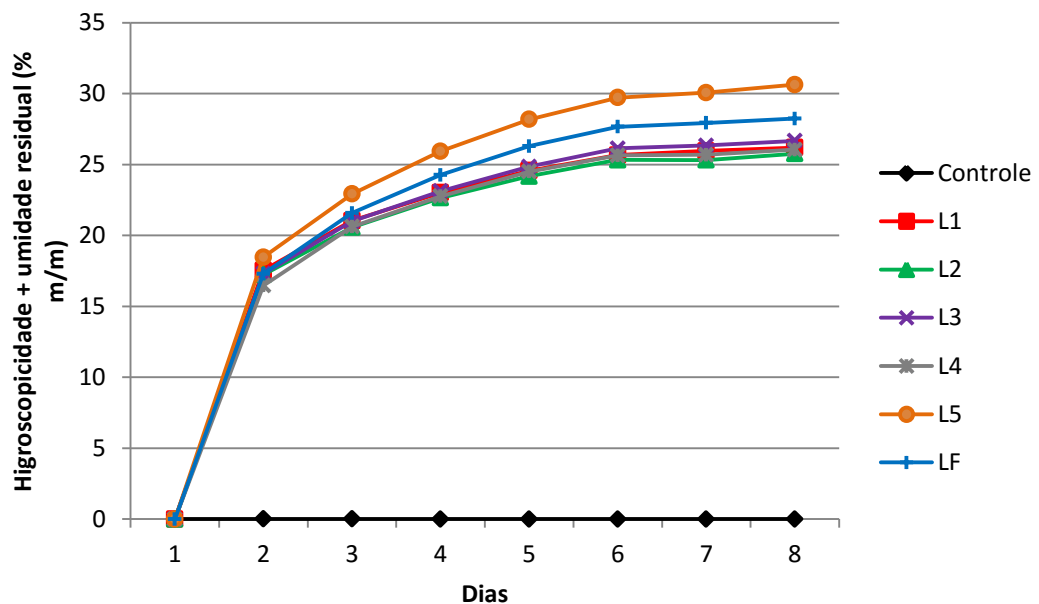
O ganho de massa dos extratos ocorreu de forma acentuada nas primeiras 72 horas de teste, seguindo a um platô para os demais dias de exposição. Ao final dos 7 dias de ensaio, apenas L1 e L3 tiveram valores estatisticamente semelhantes para o ganho de massa ($p < 0,05$). LF apresentou o menor ganho de massa entre os extratos. Entretanto, a capacidade de absorção da umidade do meio por LF e L5 são, aparentemente, as mais nítidas entre os extratos secos (figura 6). Assim, os resultados da higroscopicidade interpretados em associação aos dados de umidade residual fornecem melhor clareza da capacidade de absorção de umidade, visto que se leva em consideração a massa de água que já se encontra nas amostras. A figura 7 apresenta os valores de higroscopicidade e umidade residuais associados.

Figura 6 - Extratos secos de *Punica granatum* antes (A) e após (B) teste de higroscopicidade.



Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

Figura 7 – Higroscopicidade associada à umidade residual dos extratos secos de *Punica granatum*.



Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

L2, seguido de L4, L1, L3, LF e L5, corresponde à ordem decrescente de qualidade dos extratos, quando se analisa, simultaneamente, a umidade residual e a higroscopicidade.

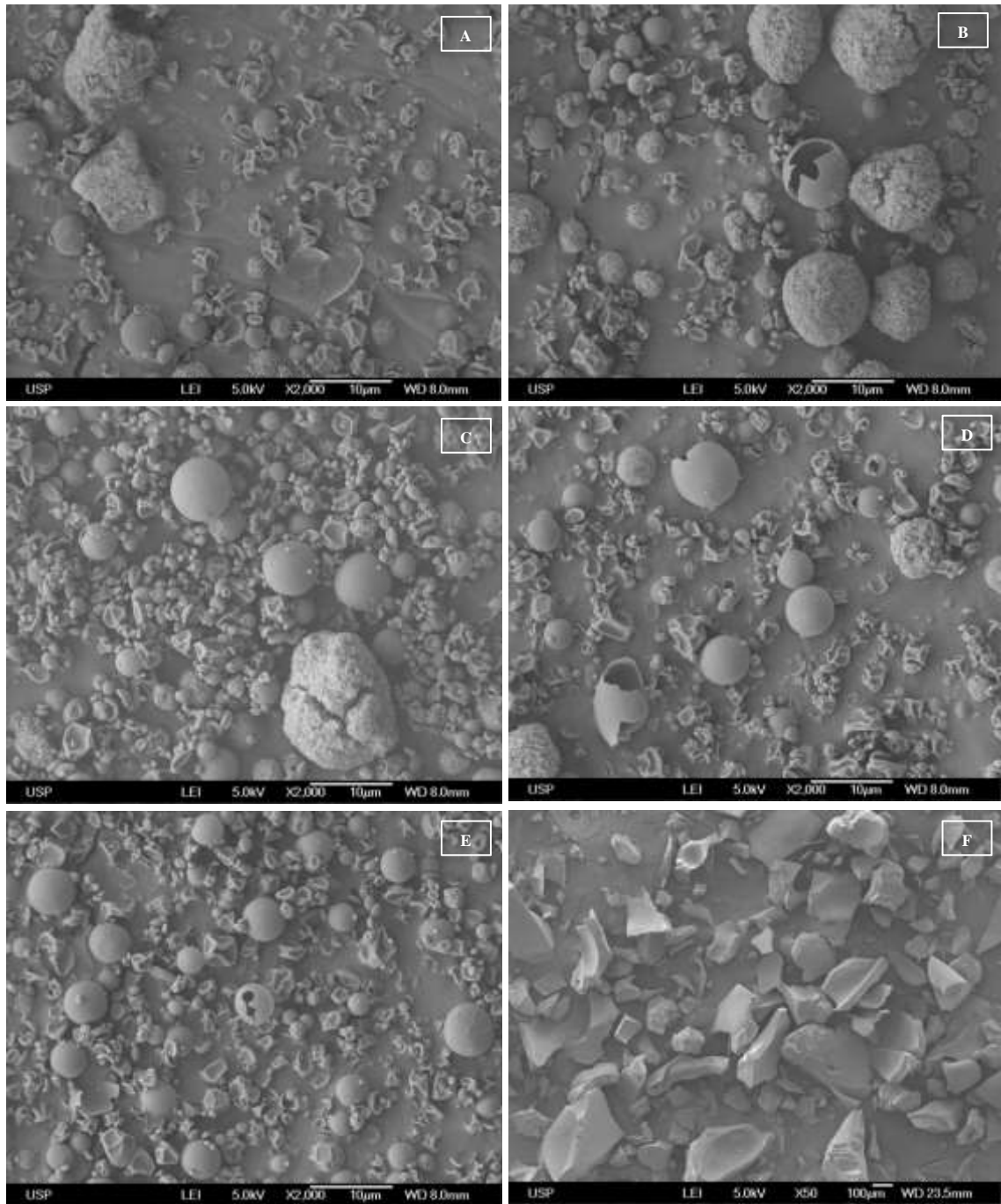
Estatisticamente, $L1 = L2$, $L1 = L3$, $L1 = L4$, $L2 = L4$ e $L3 = L4$. As demais comparações entre extratos foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Macroscopicamente, L2 correspondeu ao extrato seco com melhor aspecto, sem enegrecimento da coloração ou alteração da forma física de sólida para semissólida, fenômeno verificado para L1, L4, L5 e LF. Esses resultados permitem inferir que a presença dos adjuvantes tecnológicos (aerosil e maltodextrina) foi capaz de diminuir a elevada higroscopicidade dos extratos secos.

Análise da morfológica

A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a secagem por *spray drying* com presença de adjuvantes tecnológicos não resultou em produtos homogêneos (figura 8A, 8B, 8C e 8D). Essa característica é percebida quando se compara esses resultados com aquele obtido para L5 (figura 8E). Além disso, percebe-se a presença de aglomerados com grandes dimensões nas amostras L1, L2, L3 e L4 que, após o ensaio de EDS (Figura 9), confirmou que se tratava de aerosil.

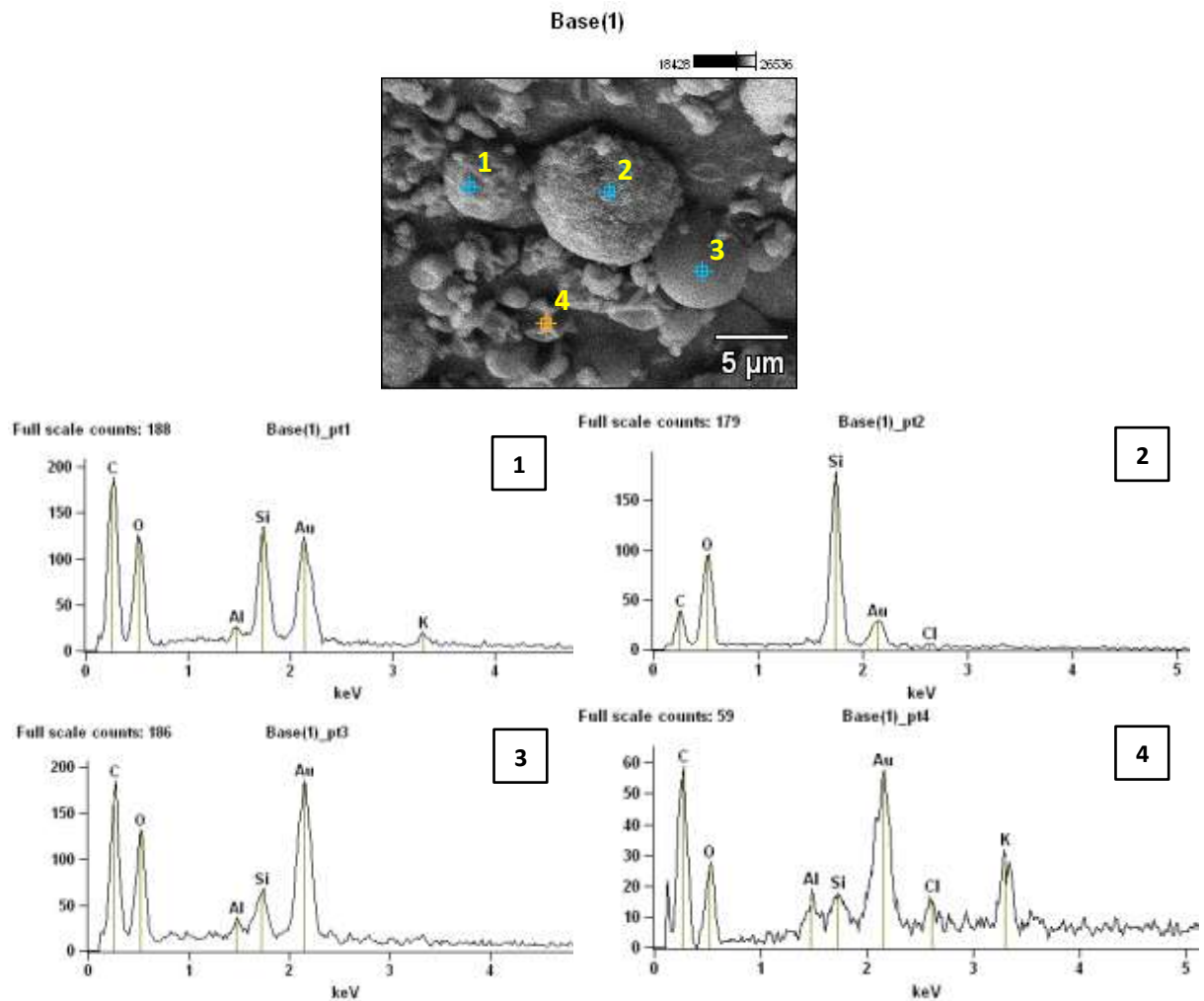
A presença de carbono, oxigênio e silício na composição de partículas da amostra, determinada através do ensaio de EDS, permite afirmar que o aerosil, apesar de sua má distribuição, foi capaz de recobrir partes do material vegetal (figura 9.1). Esse recobrimento é visualizado nas fotomicrografias dos extratos com presença de adjuvantes tecnológicos (figura 8A, 8B, 8C e 8D). Esse recobrimento, justifica as melhores características tecnológicas dos extratos com presença de adjuvantes.

Quanto à morfologia, todas as imagens apresentam partículas esféricas ocas, em menor quantidade, e em maior quantidade, partículas irregulares análogas a uma hemácia crenada. Esse resultado condiz ao processo de secagem por *spray drying*. Nessa técnica, a evaporação do solvente presente nas gotículas aspergidas leva à formação de esferas com diversas formas, desde esferas intactas, com superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas (PETROVICK, 2010).

Figura 8 – Fotomicrografias dos extratos secos de *Punica granatum*.

Legenda: A: L1; B: L2; C: L3; D: L4; E: L5; F: LF.

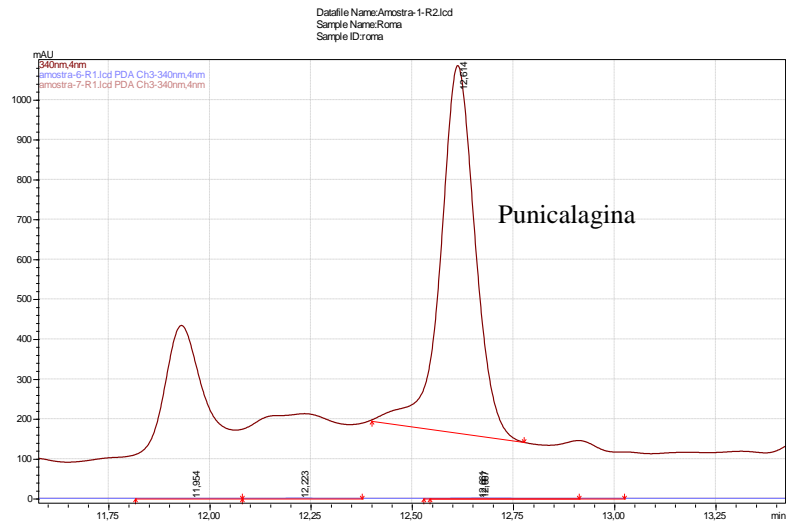
Figura 9 – Análise semi-quantitativa dos elementos químicos presentes em extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum*.



Perfil cromatográfico

A comparação entre os perfis cromatográficos dos adjuvantes tecnológicos utilizados na secagem por *spray drying* e os cromatogramas dos extratos secos determinou que os adjuvantes em nada interferem na análise cromatográfica, visto que, além de picos em um tempo diferente, a área de pico (mAU) é extremamente baixa. A figura 10 apresenta a sobreposição do cromatograma de L1 com aerosil e maltodextrina. Verificou-se que na janela cromatográfica do padrão, punicalagina, nem a maltodextrina e nem o aerosil contribuem para aumentar a área da substância analisada.

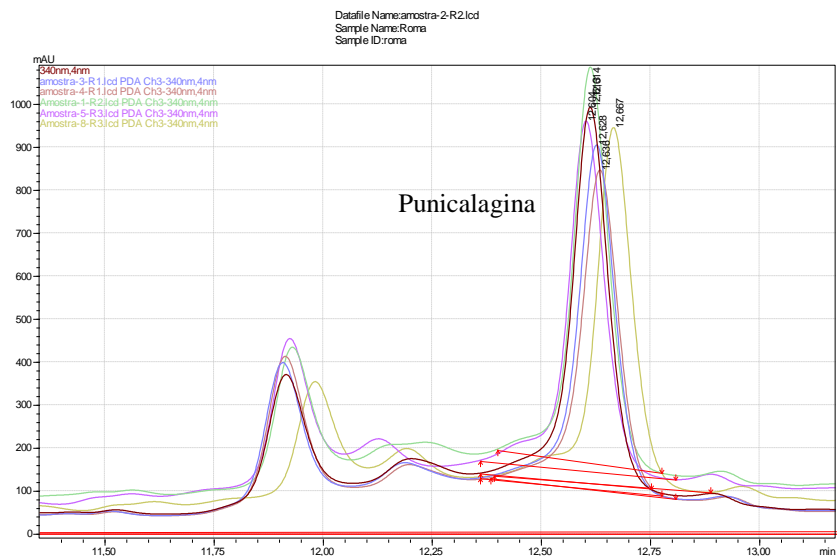
Figura 10 – Sobreposição do cromatogramas do L1 e dos adjuvantes tecnológicos utilizados na secagem por *spray drying*.



Legenda: linha azul: maltodextrina; linha vermelha: aerosil; linha marrom: L1.

A sobreposição dos cromatogramas demonstra que a secagem por *spray drying* não altera quali e quantitativamente os componentes químicos do extrato. A figura 11 apresenta a sobreposição dos cromatogramas no campo de eluição da substância padrão, punicalagina, (figura 11).

Figura 11 – Sobreposição do cromatogramas dos extratos secos de *Punica granatum* no campo cromatográfico de eluição a punicalagina.



Legenda: linha verde: L1; linha marrom: L2; linha azul: L3; linha marrom claro: L4; linha rósea: L5; linha mostarda: LF.

CONCLUSÃO

A partir da metodologia desenvolvida, dos resultados obtidos e da comparação com outros estudos, a obtenção de extrato etanólico do pericarpo do fruto de *Punica granatum* mostra-se como alternativa viável na obtenção de derivados vegetais com metabólitos secundários presentes. A secagem por *spray drying* correspondeu a uma alternativa viável na obtenção de um produto intermediário para produção de formas farmacêuticas. Os extratos secos tiveram bom rendimento de secagem e a adição de adjuvantes tecnológicos permitiu obter extratos secos com melhores características tecnológicas. Além disso, a secagem por *spray drying* não interferiu quali e quantitativamente nos compostos dos extratos.

REFERÊNCIAS

ANIBAL, P. C.; PEIXOTO, I. T.; FOGLIO, M. A.; HÖFLING, J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 839-848, 2013.

BARBOSA, W.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I.; PINTO, L.; OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, p. 12-18, 2004.

BESSA, T. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.

BHUSARI, S. N.; MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. **Powder Technology**, v. 266, n. 0, p. 354-364, 2014.

BOLHUIS, G. K.; ENGELHART, J. J. P.; EISSENS, A. C. Compaction properties of isomalt. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 621-625, 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

CALÍN-SÁNCHEZ, Á.; FIGIEL, A.; HERNÁNDEZ, F.; MELGAREJO, P.; LECH, K.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils and rind as affected by drying method. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 7, p. 1644-1654, 2013.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, in press-a.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research and Design**, in press-b.

DE OLIVEIRA, J. F.; GARRETO, D. V.; DA SILVA, M. C.; FORTES, T. S.; DE OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, F. R.; DA COSTA, F. B.; GRISOTTO, M. A.; NICOLETE, R. Therapeutic potential of biodegradable microparticles containing *Punica granatum* L. (pomegranate) in murine model of asthma. **Inflammation Research**, v. 62, n. 11, p. 971-980, 2013.

DKHIL, M. A. Anti-coccidial, anthelmintic and antioxidant activities of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2639-2646, 2013.

FERNANDES, M. R. V.; DIAS, A. L. T.; CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, n. 0, p. 39-44, 2014.

FERNANDES, R. V. D. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 171-178, 2013.

FERREIRA, M. D. S. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

GAUDY, D. **Contribution à l'optimisation des préparations galéniques à base de Noix vomique: mises au point technologiques et analytiques.** 1984. 258 p. Doctorat d'Etat es Sciences Pharmaceutiques (Doutorado). Montpellier.

JAGANATHAN, S. K.; VELLAYAPPAN, M. V.; NARASIMHAN, G.; SUPRIYANTO, E. Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 16, p. 4618-25, 2014.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177-206, 2007.

LI, D. Q.; ZHAO, J.; XIE, J.; LI, S. P. A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: case study of α -glucosidase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 130-135, 2014.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 2, p. 304-310, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; ROLIM-NETO, P. J. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997.

MENDEZ, A. S.; SIMIONATO, N.; VALDUGA, A.; REGINATTO, F. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MIDDHA, S. K.; USHA, T.; PANDE, V. A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly *Punica granatum* peel waste. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

MINAIYAN, M.; ZOLFAGHARI, B.; TAHERI, D.; GOMARIAN, M. Preventive effect of three pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds fractions on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **International journal of preventive medicine**, v. 5, n. 4, p. 394, 2014.

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 3, p. 252-258, 2014.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 641-650, 2010.

RODRÍGUEZ CHANFRAU, J. E.; GONZÁLEZ, M. L.; LÓPEZ ARMAS, M. Desarrollo de un proceso tecnológico a escala de laboratorio para la extracción de polifenoles totales del fruto de la *Punica granatum* L. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 47, p. 252-263, 2013.

SEVERO, A. D. A. L.; SOUZA, T. P. D.; ROLIM, L. A.; SOARES SOBRINHO, J. L.; MEDEIROS, F. P.; ROLIM-NETO, P. J. Otimização das condições de extração de senosídeos por soluções hidroetanólicas das folhas de *Senna alexandrina* MILL empregando planejamento fatorial. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 603-609, 2014.

SHABAN, N. Z.; EL-KERSH, M. A.; EL-RASHIDY, F. H.; HABASHY, N. H. Protective role of *Punica granatum* (pomegranate) peel and seed oil extracts on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatic injury in male rats. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1587-1596, 2013.

SILVA, I. M. B. R. **Biometria e qualidade da romã orgânica durante o armazenamento**. 2013. 36 p. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; SCHMIDT, P. C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. **Aaps PharmSciTech**, v. 6, n. 3, p. E359-E366, 2005.

SOUZA, A. P. T. B.; BARNI, S. T.; FERREIRA, R. A.; COUTO, A. G. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas hidroetanólicas das flores de *Calendula officinalis* L. empregando planejamento fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 13-21, 2010.

SREEKUMAR, S.; SITHUL, H.; MURALEEDHARAN, P.; AZEEZ, J. M.; SREEHARSHAN, S. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ULLAH, M. F.; BHAT, S. H.; HUSAIN, E.; ABU-DUHIER, F.; HADI, S. M.; SARKAR, F. H.; AHMAD, A. Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 811-833, 2014.

USA. Bulk density and tapped density of powder. In. **The United States Pharmacopeia**. 34 ed. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2011.

VASCONCELOS, E.; MEDEIROS, M.; RAFFIN, F.; MOURA, T. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 243-249, 2005.

WANG, L.; LI, W.; LIN, M.; GARCIA, M.; MULHOLLAND, D.; LILLY, M.; MARTINS-GREEN, M. Luteolin, ellagic acid and puniceic acid are natural products that inhibit prostate cancer metastasis. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 10, p. 2321-2330, 2014.

WANG, W.; ZHOU, W. Characterization of spray-dried soy sauce powders using maltodextrins as carrier. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 399-405, 2012.

ZARFESHANY, A.; ASGARY, S.; JAVANMARD, S. H. Potent health effects of pomegranate. **Advanced biomedical research**, v. 3, 2014.

**5. CAPÍTULO III – Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana
do extrato seco de *Punica granatum***

**(Artigo a ser submetido à African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Fator de
impacto: 0,27)**



Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato seco de *Punica granatum*

PEREIRA, S.T.¹; GONÇALVES, T. V. S. R.²; OLIVEIRA, E. H.²; NUNES, L.C.C.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

Resumo

Punica granatum, popularmente conhecida como romãzeira, é uma planta com diversas propriedades terapêuticas e uso difundido na medicina popular de vários locais. Muitas dessas propriedades são evidenciadas por trabalhos científicos em todo o mundo. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana do extrato seco de *Punica granatum*. O extrato seco apresentou alta capacidade antioxidante nos ensaios de DPPH e teor de polifenóis totais. A avaliação antimicrobiana preliminar demonstrou sensibilidade frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e ao fungo *Candida albicans*. O extrato na concentração de 5mg/mL obteve o melhor resultado, sendo estatisticamente semelhante com o controle positivo, gentamicina ($p < 0,05$). Assim, o extrato seco por *spray drying* mostra ser uma alternativa barata que pode corresponder a um produto intermediário para produção de produtos tecnológicos.

Palavras-chave: *Punica granatum*; Punicaceae; antioxidante; antimicrobiano.

Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of dry extract of *Punica granatum*
PEREIRA, S.T.¹; GONÇALVES, T. V. S. R.²; OLIVEIRA, E. H.²; NUNES, L.C.C.¹

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

²College of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

Abstract

Punica granatum, popularly known as pomegranate, is a plant with many therapeutic properties and widespread use in folk medicine from many places. Many of these properties are evidenced by scientific works throughout the world. This study aimed to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacity of dry extract of *Punica granatum*. The dry extract showed high antioxidant capacity in DPPH assays and total polyphenol content. The preliminary antimicrobial assessment showed sensitivity to bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and fungus *Candida albicans*. The extract at concentration 5mg/mL had the best result, being statistically similar to positive control, gentamicin ($p < 0.05$). Thus, dried extract by spray drying proves to be a cheap alternative which may correspond to intermediate product for the production of technological products.

Keywords: *Punica granatum*; Punicaceae; antioxidante; antimicrobial.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos comprovam propriedades benéficas de produtos derivados de vegetais para a saúde humana. Inúmeras moléculas de origem vegetal foram isoladas e suas propriedades farmacológicas e físico-químicas foram estudadas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, in press).

Neste contexto, a atividade antioxidante de vegetais é de grande interesse, visto que é amplamente conhecido que os radicais livres são responsáveis por danos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos das células. Atualmente, a busca por antioxidantes naturais para uso em produtos farmacêuticos ou alimentícios tem ganhado destaque a fim de limitar a utilização de antioxidantes sintéticos (TLILI et al., 2015). Da mesma forma, com a crescente resistência aos antibióticos, o desenvolvimento de novas estratégias para o combate de bactérias é válido (COPPO; MARCHESI, 2014). Assim a atividade antimicrobiana de plantas e suas preparações correspondem a uma terapia alternativa capaz de melhorar a eficácia de um fármaco existente.

Punica granatum corresponde a uma planta arbustiva originária do oriente médio, cultivada no mundo inteiro. Pertencente à família Punicaceae, as preparações das diferentes partes de *P. granatum* são utilizadas há séculos com inúmeros propósitos. A literatura reporta esse vegetal como uma rica fonte de polifenóis bioativos, compostos com características antioxidantes e diversas propriedades terapêuticas (ÁVILA et al., 2013). Dentre os efeitos terapêuticos, a atividade antimicrobiana dessa planta é atribuída principalmente à presença de compostos polifenólicos (COPPO; MARCHESI, 2014). Tais compostos são encontrados principalmente no fruto, dentre os quais se destacam: ácido elágico, taninos hidrolisáveis, conhecidos como elagitaninos, alguns flavonoides e antocianinas (LI et al., 2014; ZHOU et al., 2015). ORGIL et al. (2014) demonstrou que o pericarpo do fruto apresentava, significativamente, níveis de polifenóis mais elevados que as demais partes da planta.

Assim, esse estudo teve como objetivo investigar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos secos de *Punica granatum* (Punicaceae).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos secos

Os extratos secos de *Punica granatum* utilizados nesse estudo foram obtidos por secagem em *spray drying* e liofilização.

O extrato fluido correspondeu a extrato hidroetanólico a 70% (v/v) com proporção de 20% (m/v) de pericarpo do fruto de *P. granatum* (material vegetal) obtido por maceração durante 72 h com agitação diária durante 1 minuto.

Para secagem por *spray drying* foram adicionados ao extrato fluido adjuvantes tecnológicos e sob homogeneização, em agitador magnético, a preparação foi seca em Mini Spray Dryer Büchi B-290 nas seguintes condições: temperatura de entrada de 170 °C, velocidade de fluxo de 10% (aproximadamente 3 mL/min), pressão de 0,6 barr e aspiração em 90% da capacidade do equipamento. A proporção de adjuvante presente em cada lote de extrato seco é apresentada na tabela 1 e foi calculado de acordo com o resíduo seco do extrato fluido.

Para a secagem por liofilização não foi utilizado adjuvantes tecnológicos. Esse processo foi realizado a fim de comparação com o extrato seco por aspersão. Utilizou-se liofilizador Thermo MudulyoD Freeze Dryer. Inicialmente, o extrato etanólico teve o etanol retirado por meio de evaporador rotativo Fisatom 801 com banho-maria a 80 °C, água do condensador a 10 °C e pressão a vácuo de 200 mmHg, até eliminação completa do etanol. O extrato aquoso obtido foi seco por liofilização com temperatura de -50 °C, pressão a vácuo de 2,5 mbar, durante 72h.

Tabela 1 – Proporção de adjuvante de secagem presente nos extratos secos de *Punica granatum*.

Lotes	Maltodextrina (%)	Dióxido de silício coloidal (aerosil) (%)
Lote 1 (L1)	15	15
Lote 2 (L2)	10	15
Lote 3 (L3)	15	10
Lote 4 (L4)	10	10
Lote 5 (L5)	0	0
Lote F (LF)	0	0

Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

Determinação do teor de polifenóis totais dos extratos secos de *Punica granatum*

A determinação do teor de polifenóis totais presentes nas amostras de extratos secos foi realizada através de espectrofotometria de absorção no UV-Visível, utilizando o método de Folin–Ciocalteu adaptado (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA et al., 2007). Amostras contendo o equivalente a 100 mg de material vegetal de cada lote de extrato seco foram dissolvidas com metanol em balão volumétrico de 100 mL e o volume final completado com metanol. Uma alíquota de 40 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 μ L (80 μ g) desta última solução foi misturada com 500 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) e 6 mL de água destilada e agitada por 1 minuto; passado este tempo, 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos. Por fim, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada e passado 2 horas, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de quartzo, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos as amostras de extratos. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico, Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA, (20 a 140 μ g/mL) e expressos como mg equivalentes de ácido gálico por g de extrato (EAG/g). A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 98,626A - 5,9875$, onde C é a concentração do ácido gálico em μ g, A é a absorbância a 750 nm. O coeficiente de correlação foi igual a 0,9991.

O teor de polifenóis totais (PT) foi expresso como equivalente de ácido gálico em mg de ácido gálico por g de extrato seco (EAG/g), obtido a partir da aplicação da equação 1:

$$\text{EAG/g} = \frac{C}{m} \text{ (Equação 1)}$$

Onde, EAG/g = equivalentes ácido gálico por grama de extrato; C = concentração de ácido gálico em mg e m = massa do extrato utilizado em g.

Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos secos de *Punica granatum*

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada monitorando-se o consumo do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações de material vegetal (OLIVEIRA, G. L. D. S. et al., 2014). Utilizaram-se cinco concentrações de cada lote de extrato seco (10 µg, 20 µg, 40 µg, 80 µg e 160 µg) preparadas por diluição em etanol (ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010). Foi utilizado etanol como controle negativo e o antioxidante Trolox (6-hidroxi 2,5,7,8-tetrametilcromano 2-ácido carboxílico) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA), como controle positivo. A mistura de reação (0,3 mL da amostra em análise com 2,7 mL de solução de DPPH) foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos e a absorvância foi medida utilizando cubetas de quartzo em espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240 a 515 nm. Os valores de absorvância foram convertidos em percentagem da capacidade antioxidante (% CA) através da seguinte equação:

$$CA (\%) = \frac{[(\text{Absorbância do controle negativo} - \text{Absorbância da amostra reativa}) \times 100]}{\text{Absorbância do controle negativo}} \quad (\text{Equação 2})$$

A concentração efetiva para se obter 50% de atividade antioxidante estimada em 100% (CE50) dos extratos secos foi determinada por regressão de probit (OLIVEIRA et al., 2014).

Ensaio microbiológicos

Cepas bacterianas utilizadas e preparação do inóculo.

O estudo da atividade antimicrobiana do extrato seco de *Punica granatum* foi realizado frente à cepa padrão ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, ATCC 251922 de *Escherichia coli* e Newp 31 de *Candida albicans*. As cepas bacterianas foram cultivadas em meio ágar Müeller Hinton. Para padronização da densidade do inóculo para o teste de sensibilidade, utilizou-se a metodologia de acordo com o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Suspendeu-se as colônias em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1x10⁶ UFC/mL).

Diluição do Extrato Seco

O extrato seco utilizado nesse teste correspondeu a L2, extrato seco por *spray drying* escolhido como melhor dentre os lotes obtidos na pesquisa. O extrato seco foi ressuspensionado

em água purificada estéril na concentração inicial de 100 mg/mL. A partir dessa suspensão foram realizadas sete diluições: 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL e 0,78 mg/mL.

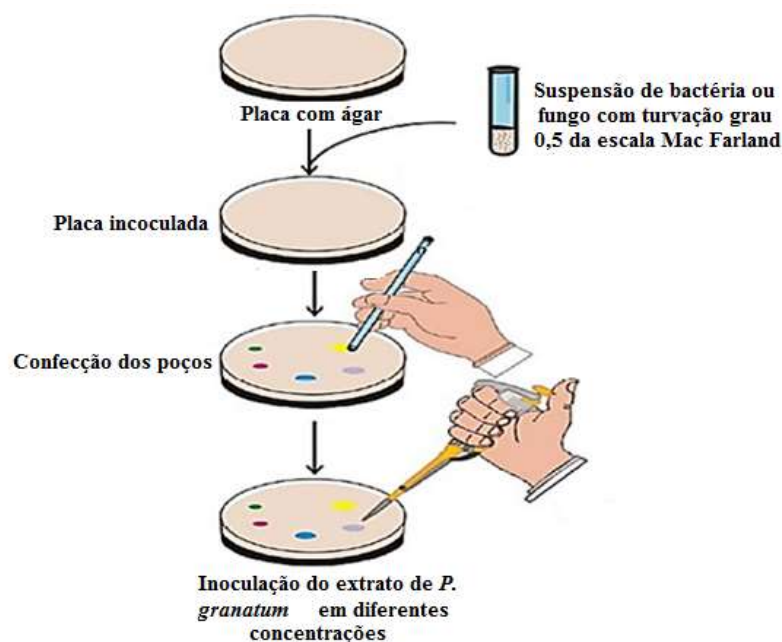
Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação do potencial antimicrobiano de *P. granatum* correspondeu a um ensaio preliminar. Placas de ágar Müeller Hinton foram preparadas antecipadamente e retiradas da refrigeração para atingir a temperatura ambiente antes do semeio. Com um *swab* estéril, os inóculos bacterianos e fúngico foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar até completar toda a superfície da placa. Em seguida, as placas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por 3 minutos.

A técnica de perfuração em ágar está esquematizada na figura 1. Nessa técnica, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008). Confeccionaram-se onze poços com 6 mm de diâmetro em cada placa para análise da atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e nove poços para o ensaio contra *Candida albicans*.

Em cada poço foi colocado 50 µL da suspensão de extrato de *Punica granatum* previamente diluído em diferentes concentrações. Oxacilina e gentamicina foram testadas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* como controle positivo. Como controle negativo para os três patógenos utilizou-se DMSO. As placas foram mantidas em estufa a 35 °C durante 24h.

Figura 1 – Esquema da metodologia de perfuração em ágar para inoculação de extrato seco de *Punica granatum*.



Adaptado de (OLIVEIRA, F. D. D. S., 2012)

Análise estatística

Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata, exceto quando especificado diferentemente. Os resultados obtidos foram avaliados aplicando-se o teste estatístico ANOVA, seguido de teste Tukey, quando aplicável. A análise estatística e a obtenção dos gráficos foram realizadas com auxílio dos programas Excel[®] e GraphPad Prisma[®] 5, todos para ambiente Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do teor de polifenóis totais dos extratos secos de *Punica granatum*

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, dentre as quais, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais utilizadas (MATHEW; SUBRAMANIAN, 2014; MINAIYAN et al., 2014). O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e

tungstênio azul (figura 2), nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA et al., 2007).

Figura 2 – Determinação do teor de polifenóis totais do extrato seco de *Punica granatum* (L5) com seu respectivo controle negativo.



Os resultados expressos como equivalentes de ácido gálico por 1 g de extrato seco (EAG/g) são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Conteúdo de polifenóis totais de extratos secos de *P. granatum* expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG/g).

Lotes de extratos	TPT (mg de EAG/g) \pm DP
L1	537,04 \pm 14,91
L2	528,41 \pm 27,71
L3	537,04 \pm 28,01
L4	535,40 \pm 19,84
L5	556,77 \pm 23,60
LF	531,29 \pm 2,57

Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes; PT: polifenóis totais; EAG/g: equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco; DP: desvio padrão.

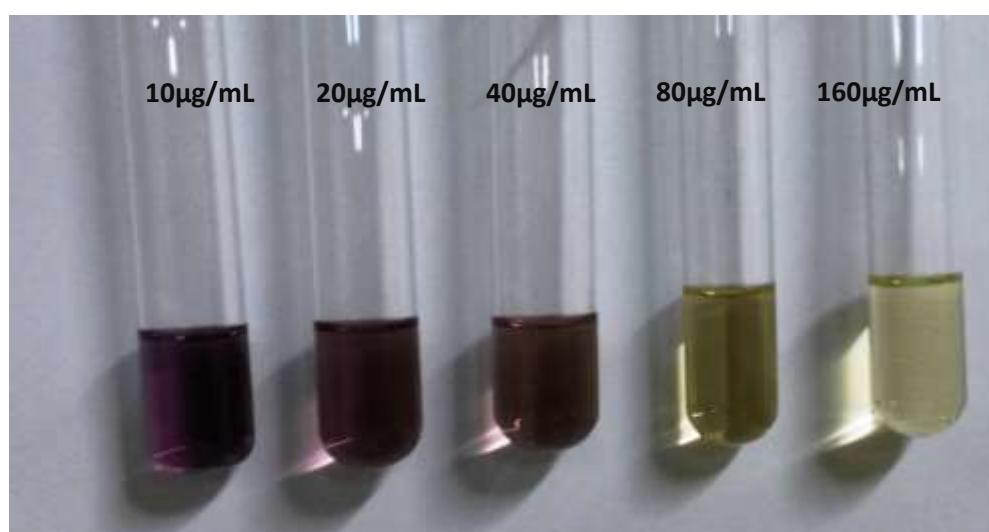
Todos os extratos avaliados apresentaram altos teores de compostos fenólicos de acordo com a classificação proposta por RUFINO et al. (2010) (baixo (<1000 mg GAE/100g), médio (1000-5000 mg GAE/100 g) e alto (>5000 mg GAE/100 g) para sólidos secos).

Os teores de PT dos diferentes extratos secos de *P. granatum* não tiveram diferença significativa ($p < 0,05$), o que garante que o processo de secagem não degrada os compostos fenólicos. Assim, considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos com *P. granatum*.

Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos secos de *Punica granatum*

O DPPH é um radical orgânico estável que tem sido amplamente utilizado em estudos para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais ou compostos puros (ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010). Neste método, a capacidade antioxidante é determinada pela análise da diminuição da absorbância da mistura reativa do reagente DPPH e a amostra em análise, em que o DPPH de cor roxa é reduzido para formar DPPH₂ de cor amarela (figura 2) (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

Figura 3 – Determinação da capacidade antioxidante do extrato seco liofilizado de *Punica granatum*.



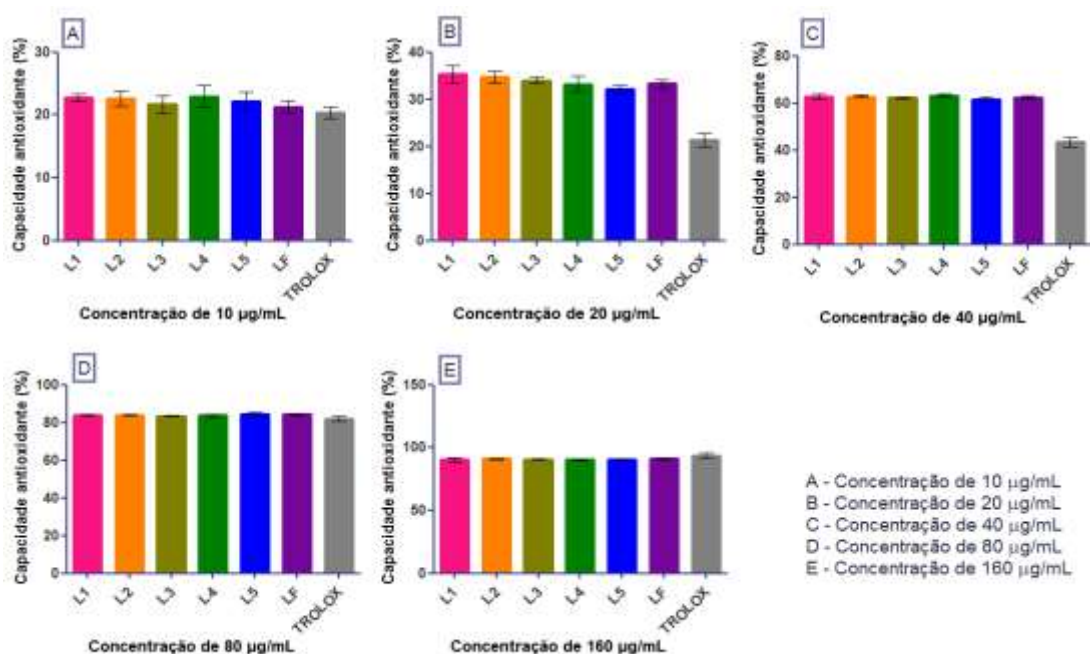
A tabela 3 e a figura 4 apresentam os resultados obtidos na determinação da capacidade antioxidante dos extratos secos de *P. granatum*.

Tabela 3 – Capacidade antioxidante de extratos secos de *Punica granatum* e Trolox pelo método de DPPH.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade antioxidante (%)						
	L1	L2	L3	L4	L5	LF	Trolox
10 $\mu\text{g/mL}$	22,80 \pm 0,62	22,63 \pm 1,16	21,67 \pm 1,40	22,93 \pm 1,76	22,16 \pm 1,48	21,27 \pm 1,10	20,32 \pm 0,89
20 $\mu\text{g/mL}$	35,27 \pm 1,93	34,67 \pm 1,27	34,00 \pm 0,72	33,20 \pm 1,67	32,12 \pm 0,72	33,27 \pm 0,90	21,25* \pm 1,40
40 $\mu\text{g/mL}$	62,60 \pm 1,15	62,80 \pm 0,70	62,30 \pm 0,40	63,00 \pm 0,75	61,55 \pm 1,07	62,40 \pm 0,82	43,58* \pm 2,00
80 $\mu\text{g/mL}$	84,03 \pm 0,47	83,97 \pm 0,47	83,57 \pm 0,46	83,67 \pm 0,86	84,53 \pm 0,67	84,17 \pm 0,76	82,03 \diamond \pm 1,38
160 $\mu\text{g/mL}$	90,37 \pm 1,81	90,90 \pm 0,66	90,33 \pm 0,67	90,13 \pm 0,21	90,67 \pm 0,57	91,10 \pm 0,40	93,65 \blacksquare \pm 1,90
CE50 (μg)	22,89	23,76	24,10	23,83	24,79	24,47	36,38

Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes; CE50: Concentração efetiva para se obter 50% de atividade antioxidante estimada em 100% do radical DPPH; *: diferente estatisticamente dos demais lotes; \diamond : diferente estatisticamente de L5; \blacksquare : diferente estatisticamente de L1, L3 e L4.

Figura 4 - Capacidade antioxidante de extratos secos de *Punica granatum* e Trolox pelo método de DPPH.



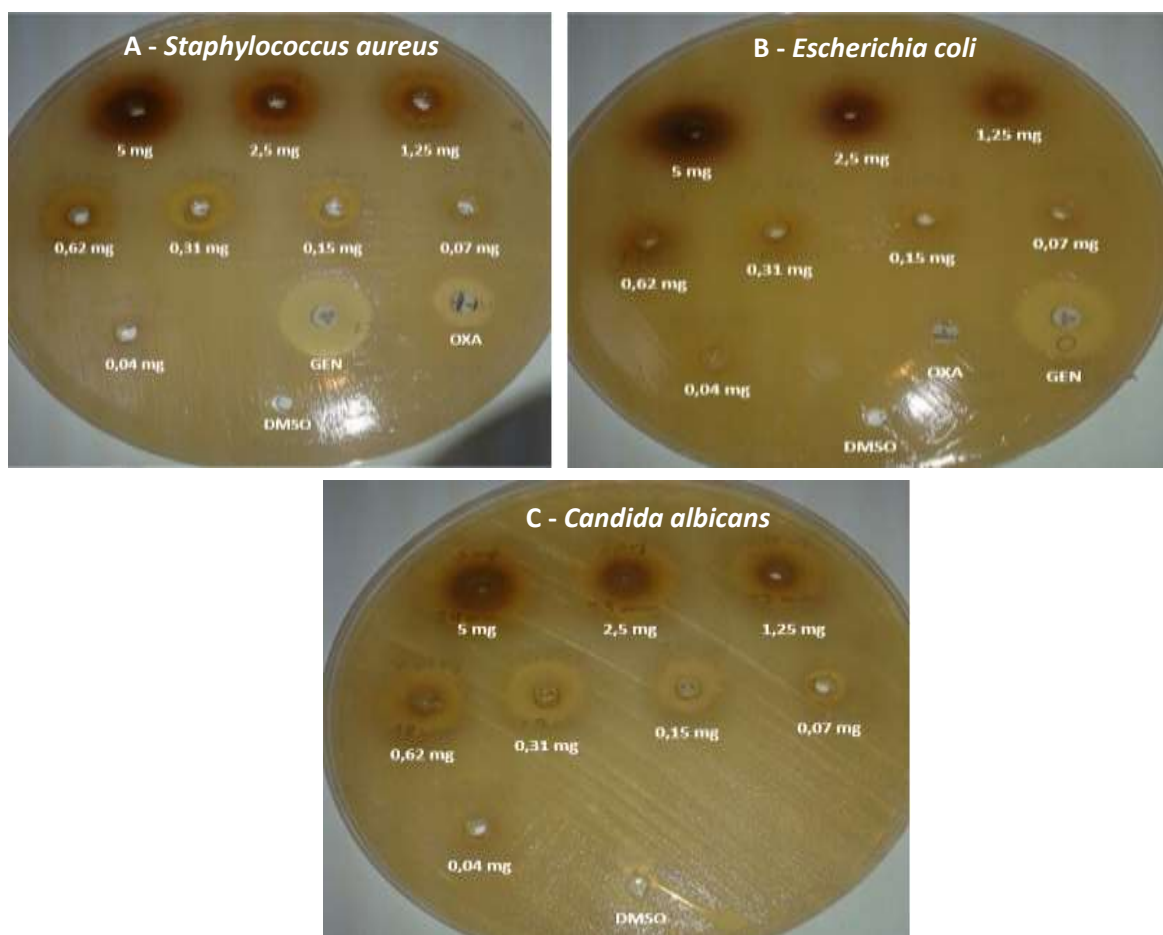
Legenda: L1: extrato seco com 15% de aerosil e 15% de maltodextrina; L2: extrato seco com 15% de aerosil e 10% de maltodextrina; L3: extrato seco com 10% de aerosil e 15% de maltodextrina; L4: extrato seco com 10% de aerosil e 10% de maltodextrina; L5: extrato seco sem adjuvantes; LF: extrato seco liofilizado sem adjuvantes.

Os resultados expostos na tabela 3 e figura 4 mostram que o extrato seco de *Punica granatum* possui boa capacidade antioxidante, reduzindo o radical DPPH numa forma dependente da concentração. Os valores da capacidade antioxidante dos extratos nas concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL foram estatisticamente superiores ao controle positivo (Figura 4B e 4C) ($p < 0,05$). Esse resultado demonstra uma alta ação antioxidante do extrato seco tanto por *spray drying* como por liofilização. Os resultados obtidos são semelhantes aos vários estudos que confirmam a atividade antioxidante de *P. granatum*, com destaque ao pericarpo e arilos do fruto (AMYRGIALAKI et al., 2014; HASNAOUI; WATHELET; JIMÉNEZ-ARAUJO, 2014; ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010).

Avaliação da atividade antimicrobiana

As placas de antibiograma obtidas na avaliação da atividade antimicrobiana de *P. granatum* são apresentadas na figura 5 e tabela 4.

Figura 5 - Atividade antimicrobiana de extrato seco de *Punica granatum* frente a *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B) e *Candida albicans* (C).



Legenda: DMSO: dimetilsulfóxido ; GEN: gentamicina ; OXA: oxacilina

Tabela 4 - Halos de inibição (mm) do extrato seco de *Punica granatum* em diferentes concentrações obtidos pelo método de perfuração em ágar.

Concentração do extrato (mg/mL)	Halo de inibição para <i>S.aureus</i> (mm) ± DP	Halo de inibição para <i>E. coli</i> (mm) ± DP	Halo de inibição para <i>C. albicans</i> (mm) ± DP
5,0	21,67 ± 0,58	19,33 ± 0,58	24,00 ± 0,00
2,5	20,67 ± 0,58	17,33 ± 0,58	23,00 ± 1,00
1,25	20,33 ± 0,58	15,67 ± 0,58	21,67 ± 0,58
0,62	19,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	18,67 ± 0,58
0,31	16,33 ± 0,58	R	17,00 ± 0,00
0,15	15,33 ± 0,58	R	15,67 ± 1,15
0,07	9,00 ± 1,00	R	9,67 ± 1,53
0,04	R	R	R
Controle positivo			
Oxacilina	R	R	ND
Gentamicina	22,33 ± 0,58	19,67 ± 1,15	ND
Controle negativo			
DMSO	R	R	R

Legenda: DP: desvio padrão; ND: não determinado; R: resistente.

Os primeiros antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por *S. aureus* foram as penicilinas. A oxacilina e a metecilina foram introduzidas na terapêutica apenas em 1960 e após alguns anos já foram encontradas cepas resistentes a esses dois antibióticos (MONCAYO-ORTIZ et al., 2015). Resultado semelhante pode ser constatado no resultado obtido neste estudo (figura 5A), em que frente a *S. aureus*, o poço de oxacilina apresentou halo de inibição menor que o de gentamicina. A inibição desse composto foi menor até mesmo que os poços referentes ao extrato de *P. granatum* nas concentrações de 5, 2,5 e 1,25 mg/mL. Além disso, devido à existência de crescimento bacteriano no diâmetro do halo de inibição, classificou-se a atividade para essa substância como sem inibição.

Por outro lado, a gentamicina corresponde a um antibiótico aminoglicosídeo de largo espectro. É eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*, e cepas de *Staphylococcus* resistentes (RADHAKUMARY; SREENIVASAN, 2014). Logo, os resultados observados nas figura 5A e 5B, em que os poços de inoculação de gentamicina apresentaram sensibilidade, eram esperados. Estatisticamente, a inibição obtida para a concentração de 5mg do extrato foi igual à obtida para gentamicina ($p < 0,05$).

A atividade antimicrobiana não se restringe apenas às bactérias. Ao considerar que um dos usos tradicionais de *P. granatum* é como dentífrico, é necessário considerar, além da ação bacteriana, as infecções causadas por fungos (MENEZES; PINTO; CORDEIRO, 2008). A atividade antifúngica do pericarpo de *P. granatum* é confirmada em diversos trabalhos (ANIBAL et al., 2013; HAYOUNI et al., 2011; HOFLING et al., 2010; PONNUSAMY et al., 2010).(ENDO et al., 2012). Nas placas com semeio de *C. albicans*, os poços de inoculação do extrato de *P. granatum* produziram halos de inibição consideráveis, sobretudo naqueles de maior concentração (5, 2,5, 1,25 e 0,62 mg), demonstrando atividade antifúngica (figura 5 e tabela 4).

Além da atividade antimicrobiana própria do extrato frente às cepas bacterianas, alguns estudos demonstram efeito sinérgico de preparações de *P. granatum* com antimicrobianos utilizados na clínica. Essa atividade sinérgica foi observada com novobiocina, ciprofloxacino, fluconazol, tetraciclina, clorafenicol, gentamicina, ampicilina e oxacilina (AQIL; AHMAD, 2007; BRAGA et al., 2005; DEY et al., 2012; ENDO et al., 2010; PHATTHALUNG; CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2012). Esses resultados indicam que a utilização de preparações vegetais corresponde uma terapia alternativa capaz de melhorar a eficácia de um fármaco existente.

Os resultados apresentados reiteram as evidências quanto à atividade antimicrobiana de *P. granatum* e demonstram a possibilidade de obtenção de produtos a base de *P. granatum* com finalidade bactericida e fungicida.

CONCLUSÃO

A partir da metodologia desenvolvida, dos resultados obtidos e da comparação com outros estudos, o extrato seco do pericarpo do fruto de *Punica granatum* demonstrou ter uma boa capacidade antioxidante e antimicrobiana. Essas atividades são atribuídas principalmente aos compostos polifenólicos presentes nesse vegetal. Desse modo, o extrato seco por *spray drying* mostra ser uma alternativa que pode corresponder a um produto intermediário para produção de produtos tecnológicos.

REFERÊNCIAS

AMYRGIALAKI, E.; MAKRIS, D. P.; MAUROMOUSTAKOS, A.; KEFALAS, P. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using

water/ethanol solvent systems and response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 216-222, 2014.

ANIBAL, P. C.; PEIXOTO, I. T.; FOGGIO, M. A.; HOFLING, J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 839-48, 2013.

AQIL, F.; AHMAD, I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 79-92, 2007.

ÁVILA, R. I. D.; GUERRA, M. T.; BORGES, K. D. A. S.; VIEIRA, M. D. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. M. D.; FURTADO, H.; MOTA, M. F. D.; ARRUDA, A. F.; VALADARES, M. C. *Punica granatum* L. protects mice against hexavalent chromium-induced genotoxicity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 689-697, 2013.

BRAGA, L. C.; LEITE, A. A.; XAVIER, K. G.; TAKAHASHI, J. A.; BEMQUERER, M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 541-7, 2005.

COPPO, E.; MARCHESE, A. Antibacterial activity of polyphenols. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 380-390, 2014.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, in press.

DEY, D.; DEBNATH, S.; HAZRA, S.; GHOSH, S.; RAY, R.; HAZRA, B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and metallo-beta-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4302-9, 2012.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534-40, 2010.

ENDO, E. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10094-107, 2012.

HASNAOUI, N.; WATHELET, B.; JIMÉNEZ-ARAUJO, A. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. **Food chemistry**, v. 160, p. 196-203, 2014.

HAYOUNI, E. A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H.; OKU, H.; MATSUI, T.; LIMAM, F.; HAMDI, M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, v. 18, n. 11, p. 976-84, 2011.

HOFLING, J. F.; ANIBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A.; FURLETTI, V. F.; FOGGIO, M. A.; GONCALVES, R. B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1065-8, 2010.

LI, G.; XU, Y.; WANG, X.; ZHANG, B.; SHI, C.; ZHANG, W.; XIA, X. Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 4, p. 313-9, 2014.

MATHEW, M.; SUBRAMANIAN, S. *In vitro* screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86804-e86804, 2014.

MENEZES, S. M. S.; PINTO, D. M.; CORDEIRO, L. N. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L.(romã). **RBM. Revista brasileira de medicina**, v. 65, n. 11, p. 388-391, 2008.

MINAIYAN, M.; ZOLFAGHARI, B.; TAHERI, D.; GOMARIAN, M. Preventive effect of three pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds fractions on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **International journal of preventive medicine**, v. 5, n. 4, p. 394, 2014.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MONCAYO-ORTIZ, J.-I.; CORREDOR-ARIAS, L.-F.; LULIGO-ESPINAL, J.-S.; ÁLVAREZ-ALDANA, A.; SANTACRUZ-IBARRA, J.-J. Correlación entre la detección de superantígenos y resistencia a oxacilina en aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus aureus*. **Infectio**, v. 19, n. 3, p. 109-114, 2015.

OLIVEIRA, F. D. D. S. **Atividade antifúngica do óleo de *Carapa guianensis* (Meliaceae) frente a cepas padrões de *Candida* spp.** 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá.

OLIVEIRA, G. L. D. S.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JUNIOR, A. L.; ARAUJO, A.; SOUZA, A. A. D. C. C. M.; FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L.(Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.

ORGIL, O.; SCHWARTZ, E.; BARUCH, L.; MATITYAHU, I.; MAHAJNA, J.; AMIR, R. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 571-577, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PHATTHALUNG, P. N.; CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii* infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 56, p. 1472-6882, 2012.

PONNUSAMY, K.; PETCHIAMMAL, C.; MOHANKUMAR, R.; HOPPER, W. *In vitro* antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 349-54, 2010.

RADHAKUMARY, C.; SREENIVASAN, K. Gentamicin induced formation of gold nanoparticles as an assay protocol for its detection. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 443, p. 326-330, 2014.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.; BRANDÃO, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

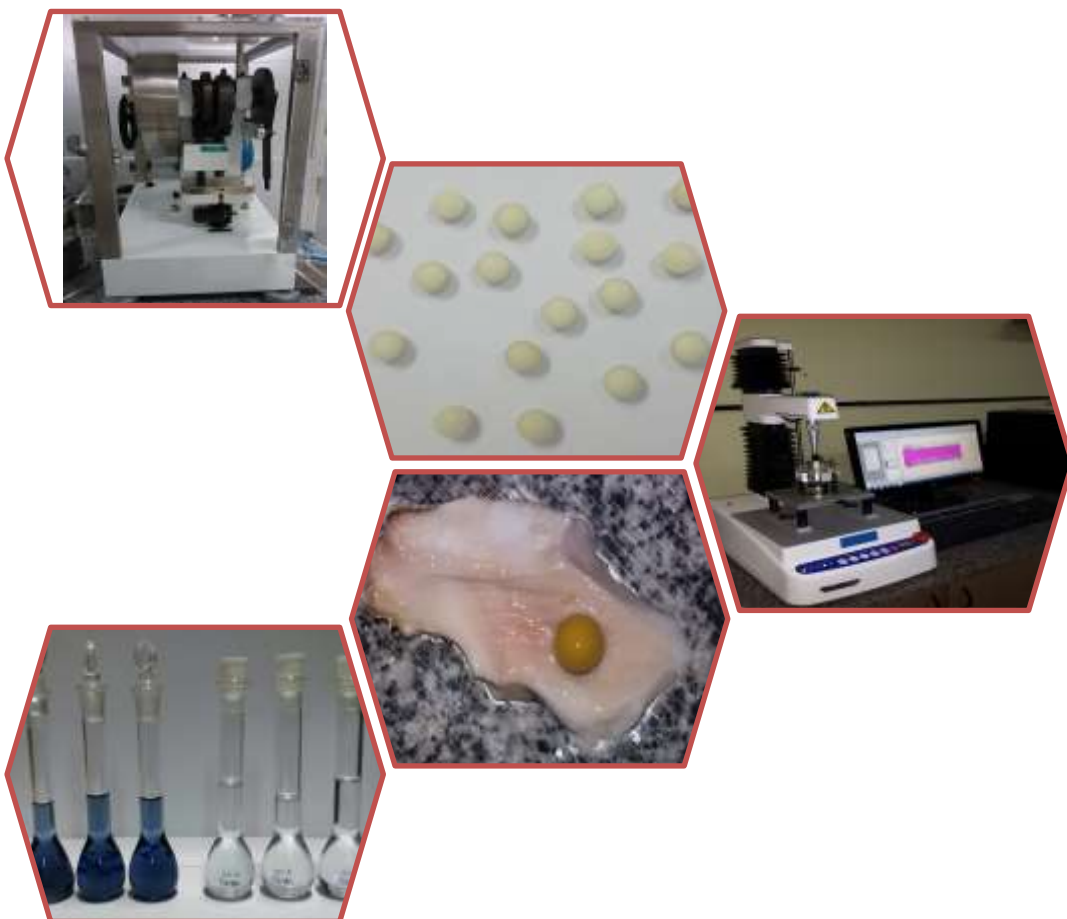
TLILI, N.; MEJRI, H.; ANOUER, F.; SAADAOU, E.; KHALDI, A.; NASRI, N. Phenolic profile and antioxidant activity of *Capparis spinosa* seeds harvested from different wild habitats. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 930-935, 2015.

ZAHIN, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. **Mutation Research**, v. 703, n. 2, p. 99-107, 2010.

ZHOU, B.; YI, H.; TAN, J.; WU, Y.; LIU, G.; QIU, Z. Anti-proliferative effects of polyphenols from pomegranate rind (*Punica granatum* L.) on EJ bladder cancer cells via regulation of p53/miR-34a axis. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 415-422, 2015.

6. CAPÍTULO IV - Obtenção e caracterização de comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco de *Punica granatum*

(Artigo a ser submetido à *Chemico-Biological Interactions*. Fator de impacto: 2,577)



Obtenção e caracterização de comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco de *Punica granatum*.

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Rede Nordeste de Biotecnologia, Renorbio, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

Resumo

Punica granatum, é uma planta com tradição de uso medicinal em diversos países. As preparações de *P. granatum* são utilizadas há séculos com inúmeros propósitos medicinais. Destaca-se o interesse da utilização dessa planta em odontologia. Estudos demonstram a possibilidade de utilização de extratos na confecção de produtos para a profilaxia e tratamento de doenças da cavidade oral (gingivites e placa dentária, por exemplo). Neste sentido, esse trabalho teve como objetivo obter e caracterizar comprimidos mucoadesivos contendo extrato seco por *spray drying* utilizando uma mistura de hidroxipropilmetilcelulose e amido em diferentes proporções. Os comprimidos foram obtidos por compressão direta e apresentaram características físico-químicas adequadas em relação aos parâmetros farmacopeicos (dimensões uniformes, baixa variação de peso, dureza e friabilidade satisfatórios). Em relação às características adesivas (intumescimento, força e tempo de mucoadesão), a formulação com maior proporção de hidroxipropilmetilcelulose em relação ao amido e aquela com proporção equimolar entre esses dois polímeros tiveram características melhores que a formulação com maior concentração de amido. Assim, dependendo da concentração, o amido em mistura com a hidroxipropilcelulose é capaz de alterar a adesão. As formulações obtidas correspondem a um ponto de partida para testes posteriores.

Palavras-chave: *Punica granatum*; Punicaceae; comprimidos mucoadesivos; hidroxipropilmetilcelulose; amido; liberação bucal; bioadesão.

Obtaining and characterization of mucoadhesive tablets containing dry extract of *Punica granatum*.

PEREIRA, S.T.¹; SÁ, L.L.F.¹; MELO NETO, B.²; NUNES, L.C.C.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Rede Nordeste de Biotecnologia, Renorbio, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

Abstract

Punica granatum, is a plant with medicinal use tradition in many countries. *P. granatum* preparations have been used for centuries with numerous medicinal purposes. Research also highlighted the interest in this plant in the dentistry field raised the possibility of using *P. granatum* extracts in the manufacture of products for the prevention and treatment of diseases in the oral cavity (gingivitis and dental plaque, for example). In this sense, this study aimed to obtain and characterize mucoadhesive tablets containing dry extract by spray drying using a mixture of hydroxypropyl methylcellulose and starch in different proportions. Tablets were obtained by direct compression and showed physical and chemical characteristics appropriate with pharmacopoeial parameters (uniform size, low weight variation, satisfactory hardness and friability). Regarding the adhesive characteristics (swelling, strength and mucoadhesion time), the formulation with higher concentration of hydroxypropyl methylcellulose and that with equimolar concentration of hydroxypropyl methylcellulose and starch had better characteristics than that with a higher concentration of starch. Thus, depending on concentration, the blend starch and hydroxypropyl methylcellulose is able to modify adhesion. The obtained formulations correspond to starting point for further testing.

Keywords: *Punica granatum*; Punicaceae; mucoadhesive tablets; hydroxypropyl methylcellulose; starch; oral release; bioadhesion.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso terapêutico de plantas aumentou progressivamente (CARVALHO et al., 2011). *Punica granatum* (Punicaceae) têm sido utilizada ao longo de séculos com diversas finalidades medicinais. O seu uso etnofarmacológico é direcionado ao tratamento contra diarreias, parasitas e desordens inflamatórias (SHIRODE et al., 2015).

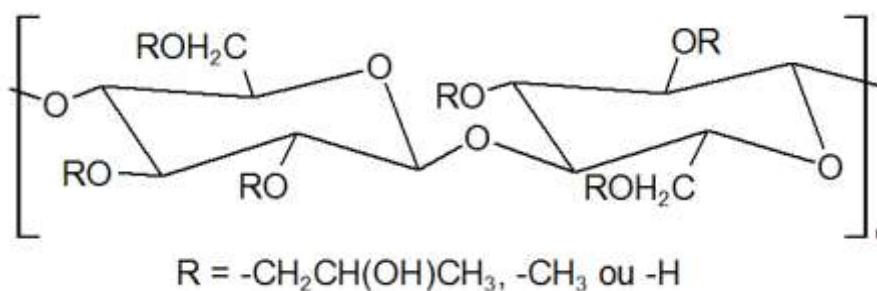
Destaca-se o interesse da utilização de *P. granatum* em odontologia. Bhadbhade et al. (2011); Disilvestro e Disilvestro (2009); Groppo et al. (2008); Menezes, Cordeiro e Viana (2006) e Oliveira et al. (2013) em seus resultados levantaram a possibilidade de utilização de extratos na confecção de produtos, em especial, enxaguatórios bucais, para a profilaxia e tratamento de doenças da cavidade oral (gingivites e placa dentária, por exemplo).

Desde 1980 tem crescido o interesse em formulações para liberação bucal utilizando polímeros mucoadesivos. A mucosa bucal é uma opção promissora devido às suas características biofarmacêuticas favoráveis. As principais vantagens desta via são a excelente acessibilidade, imobilidade relativa, acesso direto à circulação sistêmica (evitando-se o metabolismo hepático de primeira passagem), baixa atividade enzimática e administração indolor. O efeito da eliminação salivar, a propriedade de barreira e a deglutição acidental são as maiores limitações dessa via (DAL PIZZOL, 2009; PERIOLI; PAGANO, 2013; SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006; VINOD et al., 2012).

A escolha de polímeros mucoadesivos para aplicação bucal requer algumas características dentre as quais se destacam: o polímero e seus produtos não podem ser tóxicos ou irritantes, devem aderir rapidamente à mucosa bucal e possuir resistência mecânica adequada, ser solúvel em água e quando se encontrar na forma seca atrair água da superfície da mucosa e essa água proporcionar uma interação forte a partir de ligações de hidrogênio (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006).

Desse modo, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) corresponde a um polímero semissintético com potencial na produção de formas farmacêuticas adesivas para aplicação bucal (JAIPAL et al., 2015). A HPMC (Figura 1) é um éter de celulose cujos hidrogênios e grupos hidroxilas da celulose foram parcialmente substituídos por alquil ou por grupos alquil substituídos a fim de modificar as características da celulose. A diferença na massa molar (viscosidade), substituição química (proporção dos substituintes metóxi e hidroxipropi) e tamanho da partícula, permitem a seleção desse polímero para muitas propriedades desejadas (PEKEL et al., 2004; ZACCARON, 2005).

Figura 1 - Estrutura da hidroxipropilmetilcelulose.



O amido corresponde a um polímero natural composto por dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. É obtido de diversos vegetais (milho, batata, arroz, feijão e trigo, por exemplo). Os diferentes amidos possuem constituição química diferente que proporciona propriedades distintas (PRADO, 2013). Na indústria farmacêutica são utilizados principalmente como desintegrantes que são substâncias adicionadas às formulações a fim de facilitar a ruptura ou desintegração quando este entra em contato com a água (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O objetivo desse trabalho foi obter e caracterizar comprimido mucoadesivo contendo extrato seco de *P. granatum* obtidos a partir da mistura de dois polímeros, HPMC e amido, em diferentes proporções e, assim, entender e avaliar o efeito de cada polímero nas propriedades físico-químicas dessa forma farmacêutica.

MATERIAL E MÉTODOS

Extrato vegetal

O extrato seco de *P. granatum* utilizado neste trabalho foi obtido por secagem por aspersão (*spray drying*). O extrato foi obtido a partir de uma solução extrativa hidroalcoólica 20% (p/v) de pericarpo de *P. granatum* contendo 10% (p/p) de maltodextrina e 15% (p/p) de dióxido de silício coloidal como adjuvantes tecnológicos.

Matérias-primas

Hidroxipropilmetilcelulose (Methocel™ K15M Premium, EUA) e amido (CAAL, Brasil).

Solventes e reagentes

Todos os solventes utilizados apresentam qualidade pró-análise (p. a.). A água empregada foi purificada por destilação. Fosfato de potássio monobásico (Vetec, Brasil); fosfato de potássio bibásico anidro (Vetec, Brasil); adesivo instantâneo de éster de cianoacrilato (Loctite, Brasil); metanol (Dinâmica, Brasil); ácido gálico (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA); reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA); mucina tipo II crua de estômago suíno (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA).

Material biológico

Para a realização do ensaio de tempo de mucoadesão foi utilizada mucosa bucal isolada de porco (*Sus domesticus*) obtida em frigorífico, situado na cidade de Regeneração, Piauí, Brasil.

Preparação dos comprimidos

A composição das formulações obtidas encontram-se na tabela 1.0.

Tabela 1 – Formulação de comprimidos mucoadesivos bucais de *Punica granatum*.

Componente	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Função na formulação
Extrato seco*	9,53 %	9,53 %	9,53 %	Matéria-prima ativa
Amido	27,14 %	45,23 %	63,33 %	Aglutinante e desintegrante
HPMC	63,33 %	45,23 %	27,14 %	Mucoadesivo e formador de matriz de liberação
Massa total do comprimido	70,00 mg	70,00 mg	70,00 mg	-

* A massa de extrato presente em cada comprimido corresponde a 5mg de material vegetal.

A técnica de preparação dos comprimidos correspondeu à compressão direta. Esse método constituiu-se das seguintes etapas:

- I) Mistura de pós por diluição geométrica, em gral de porcelana, seguida de homogeneização durante três minutos;

- II) Compressão da mistura dos pós com auxílio de máquina compressora Monopress LM-1 Lemaq. A câmara de compressão foi ajustada para conter 70 mg da mistura. Foi utilizada punção única circular de 5mm de diâmetro.

Durante o processo de compressão foram avaliados o peso dos comprimidos a fim de se obter comprimidos de cerca de 70mg.

Caracterização dos comprimidos

Avaliação da aparência e dimensões

Os comprimidos foram avaliados visualmente levando em consideração a homogeneidade de coloração, forma, rugosidade de superfície e defeitos físicos do processo de compressão. A espessura e diâmetro foram determinados com auxílio de um paquímetro digital Pantec® modelo 11112B-150.

Peso médio

Vinte comprimidos de cada formulação, escolhidos aleatoriamente, foram pesados individualmente. Calculou-se o peso médio, permitindo-se uma variação de $\pm 10\%$ (BRASIL, 2010).

Dureza

Foram submetidas dez unidades ao teste com a finalidade de verificar a resistência a uma força aplicada diametralmente através do durômetro Nova Ética modelo 298.

Friabilidade

Vinte comprimidos foram pesados e submetidos à ação do friabilômetro a uma velocidade de vinte e cinco rotações por minuto durante quatro minutos. Decorrido o prazo, removeu-se qualquer resíduo de pó da superfície dos comprimidos e estes foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o peso final dos comprimidos representa a friabilidade em função da porcentagem de pó perdido. Consideram-se aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso (BRASIL, 2010).

Teor de polifenóis nos comprimidos

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos comprimidos foi realizada através de espectrofotometria de absorção no UV-Visível, utilizando o método de Folin-Ciocalteu adaptado (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA et al., 2007). Cinco comprimidos foram finamente pulverizados. Uma quantidade do pó correspondente a um comprimido (70 mg) foi exatamente pesada, extraída com 50 mL de metanol duas horas sob agitação magnética. Em seguida, a solução obtida foi filtrada com papel filtro qualitativo. Uma alíquota de 800 µL (80 µg) dessa solução foi misturada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) e 6 mL de água destilada e agitada por 1 minuto; passado este tempo, 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos. Por fim, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada e passado 2 horas, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de quartzo, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos as amostras de comprimidos. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA), (20 a 140 µg/mL) e expressos como mg equivalentes de ácido gálico por g de extrato (EAG/g). A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 98,626A - 5,9875$, onde C é a concentração do ácido gálico em µg, A é a absorbância a 750 nm. O coeficiente de correlação foi igual a 0,9991. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teor de polifenóis foi expresso como equivalente de ácido gálico em mg de ácido gálico por g de extrato seco (EAG/g), obtido a partir da aplicação da equação 1:

$$EAG/g = \frac{C}{m} \text{ Equação 1}$$

Onde, EAG/g = equivalentes ácido gálico por grama de extrato; C = concentração de ácido gálico em mg e m = massa do extrato utilizado em g.

Avaliação do intumescimento dos comprimidos

O intumescimento dos comprimidos foi avaliado por gravimetria. O meio de intumescimento utilizado foi solução tampão fosfato pH $6,8 \pm 0,05$. Cada comprimidos foi pesado individualmente e imerso em solução tampão por tempos determinados (5min, 10min, 15min, 30min, 1h, 2h e 12h). Após imersão, o comprimido foi colocado sobre papel toalha

para retirada de excesso de solução tampão durante 1min. A capacidade de hidratação dos comprimidos foi avaliada utilizando a seguinte equação:

Equação 1:

$$H = \frac{M2 - M1}{M1 \times 100}$$

Em que:

H = capacidade de hidratação

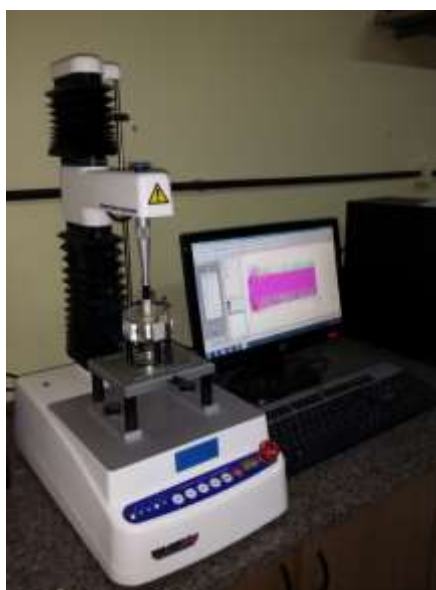
P1 = massa inicial do comprimido

P2 = peso do comprimido intumescido

Força de mucoadesão

A força de mucoadesão foi avaliada através de texturômetro TA.XT plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), Figura 2, utilizando discos produzidos através da compressão direta de 250 mg de mucina de estômago de porco em pó. Estes discos foram aderidos à prova analítica do equipamento com fita adesiva dupla face. O disco foi umedecido com 100 µL de solução tampão fosfato (pH = 6,8). No probe do equipamento, o comprimido foi fixado com éster de cianoacrilato. O teste iniciou no momento em que o probe encontrou uma força de 2 mN quando em contato com a amostra. O comprimido foi mantido em contato, sem aplicação de nenhuma força adicional, durante 60s. Em seguida, o probe foi deslocado a uma velocidade de 0,5 mm/s, e a força necessária para destacamento foi registrada (CARVALHO, F. C. et al., 2013).

Figura 2 – Teste de mucoadesão utilizando texturômetro.



Tempo de mucoadesão

Um segmento de mucosa bucal de porco foi fixado no lado interno da cuba do aparelho de dissolução Nova Ética (modelo 299) com cola de éster de cianocrilato. Um lado do comprimido foi umedecido com 100 µL de solução tampão fosfato (pH = 6,8) e pressionado contra a superfície da mucosa até adesão. A cuba foi preenchida com 500mL de solução tampão fosfato (pH = 6,8), agitado em uma velocidade de 150 rpm com temperatura controlada ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), simulando a cavidade bucal. O comportamento dos comprimidos foi então monitorado até desprendimento ou ao final de 120 minutos (PERIOLI et al., 2004).

Análise estatística

Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata, exceto quando especificado diferentemente. Os resultados obtidos foram avaliados empregando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visto que esse trabalho é pioneiro na incorporação de extrato de *P. granatum* em uma forma farmacêutica sólida mucoadesiva de aplicação na cavidade bucal, e que não existem registros científicos da quantidade de extrato seco do pericarpo de *P. granatum* para profilaxia e tratamento de doenças da cavidade bucal, o estudo preliminar da atividade antimicrobiana do extrato foi determinante na eleição da quantidade de 5mg de extrato de *P. granatum*. A massa final do comprimido foi determinada em 70mg considerando as características da via de administração, a qual não permite um comprimido com tamanho elevado.

Caracterização dos comprimidos

Avaliação da aparência e dimensões

Os comprimidos obtidos apresentavam coloração não homogênea, predominante amarelo pardo (cor influenciada pelo extrato incorporado), formato cilíndrico e não apresentavam *capping*. A figura 3 exhibe as três formulações. A formulação 3 foi a única que apresentou pequenas fissuras. As formulações utilizadas foram desenvolvidas tendo como finalidade principal produzir comprimidos mucoadesivos para aplicação na cavidade bucal. Sendo assim, a análise das dimensões dos comprimidos é parâmetro importante uma vez que

um dos requisitos para essa via de administração é o tamanho da forma farmacêutica, a qual deve ser pequena (DAL PIZZOL, 2009; SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006). As formulações apresentaram uma espessura média $3,55 \pm 0,02$ mm e $5,00 \pm 0,01$ mm de diâmetro (Tabela 2).

Tabela 2 – Espessura e diâmetro das formulações.

Formulações	Diâmetro (mm) \pm DP	Espessura (mm) \pm DP
Formulação 1	$5,00 \pm 0,012$	$3,49 \pm 0,012$
Formulação 2	$5,00 \pm 0,020$	$3,52 \pm 0,012$
Formulação 3	$5,01 \pm 0,010$	$3,49 \pm 0,006$

DP: desvio padrão.

Figura 3 - Aspecto macroscópico dos comprimidos de *Punica granatum*.



Peso médio, dureza e friabilidade

O peso médio de todas as formulações variou entre $69,28 \pm 0,59$ e $70,21 \pm 0,70$ mg, que corresponde a uma variação entre 0,3% a 1,03%, respectivamente. Apesar desses valores se encontrarem de acordo, por exemplo, com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5 ed, que permite variações de $\pm 10,0$ % para formas farmacêuticas com peso médio menor que 80 mg, percebe-se uma variação maior na formulação 3 quando comparada com as demais (tabela 3).

Tabela 3 – Peso médio, dureza e friabilidade das formulações.

Formulações	Peso médio (mg) ± DP	Dureza (KgF) ± DP	Friabilidade (%)
Formulação 1	69,99 ± 0,48	14,83 ± 0,29	0,28
Formulação 2	70,21 ± 0,70	14,67 ± 0,29	0,19
Formulação 3	69,28 ± 0,59	12,5 ± 0,87	0,44

DP: desvio padrão.

A dureza é a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial (BUTTOW et al., 2012). Como pode ser observado na tabela 3, a dureza média das formulações variou entre 12,5 e 14,83 Kgf. As diferenças encontradas entre as formulações podem ser explicadas pela concentração diferente dos polímeros presentes nas formulações. A dureza mais elevada pode ser atribuída à maior área superficial apresentada pelas formulações 1 e 2, que continham maior proporção de HPMC, resultando em uma maior área de ligações interparticulares, permitindo a obtenção de comprimidos mais resistentes (CURY; SILVA JÚNIOR; CASTRO, 2009).

A friabilidade pode ser conceituada como a falta de resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica (BUTTOW et al., 2012). A Farmacopeia Brasileira considera aceitável perda igual ou inferior a 1,5% do peso do comprimido (BRASIL, 2010). As formulações obtidas apresentam valores de friabilidade entre 0,28 e 0,44%. Mais uma vez, a formulação 3 apresentou maior perda de massa em comparação com as demais. Esse resultado, aliado à análise macroscópica e ao ensaio de dureza, coloca essa formulação em desvantagem quando comparada com as demais para os parâmetros apresentados até o momento.

Teor de polifenóis nos comprimidos

O extrato seco de *P. granatum* utilizado para a obtenção dos comprimidos mucoadesivos possui, de acordo com determinação realizada anteriormente, $535,40 \pm 20,37$ mg equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco. Portanto, espera-se que cada comprimido contendo 5 mg de extrato vegetal (desconsiderando a presença dos adjuvantes tecnológicos de secagem) possua 2,6421 mg de ácido gálico (teor teórico). Os valores obtidos para o teor dos comprimidos são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Teor de polifenóis das formulações

Formulações	EAG/g (mg) ± DP	EAG/c teórico ± DP (mg)	EAG/c real ± DP (mg)	% Teor ± DP
Formulação 1	548,14 ± 8,75	2,6421	2,7407 ± 0,04	103,73 ± 1,66
Formulação 2	547,73 ± 10,09	2,6421	2,7387 ± 0,05	103,65 ± 1,91
Formulação 3	556,36 ± 15,74	2,6421	2,7818 ± 0,08	105,29 ± 2,98

DP: desvio padrão; EAG/c: equivalente de ácido gálico por comprimido; EAG/g: equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

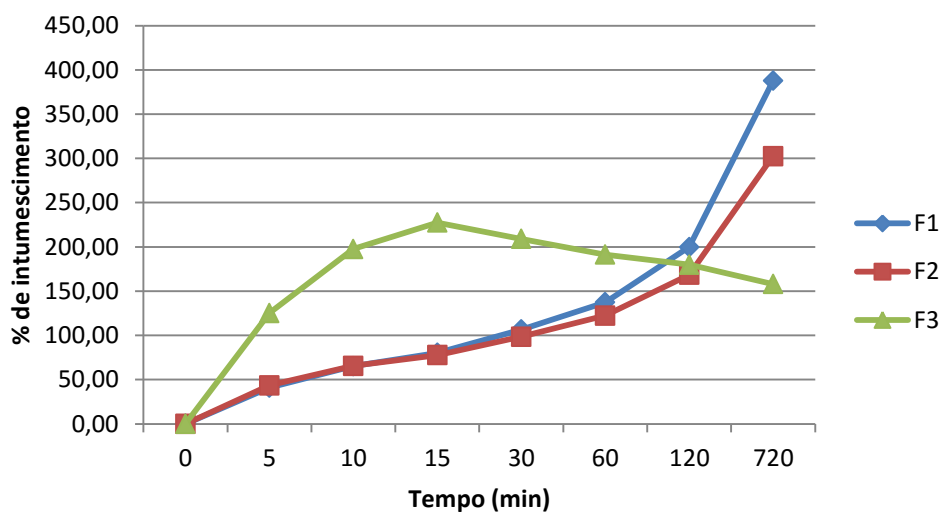
Apesar de não existir um procedimento padrão para análise do teor de polifenóis em extratos de *P. granatum*, a especificação oficial mais comum é de que a quantidade de ativo em formas farmacêuticas deve estar entre 90 e 110% da quantidade declarada. Assim, o teor de compostos fenólicos presentes nos comprimidos apresentaram valores entre $103,73 \pm 1,66$ e $105,29 \pm 2,98$ %, estando dentro do intervalo mais habitual.

Avaliação do intumescimento dos comprimidos

A hidratação polimérica é um processo importante envolvido na adesão do comprimido à superfície da mucosa. É um processo ativado por água que produz o inchaço do polímero e melhora a etapa de consolidação do processo de mucoadesão (PERIOLI; PAGANO, 2013). Esse processo favorece a flexibilidade das cadeias poliméricas e a interpenetração entre estas e mucina, principal glicoproteína que compõe o muco (CARVALHO et al., 2010; DAL PIZZOL, 2009).

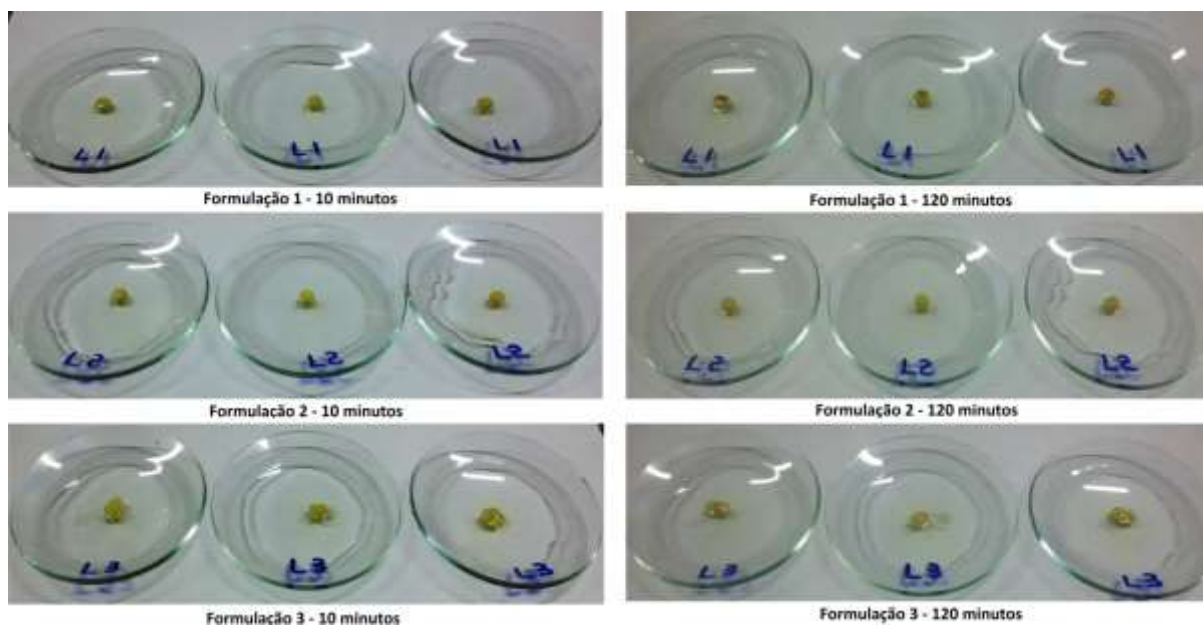
Os valores obtidos no teste de intumescimento são apresentados na figura 4.

Figura 4 – Perfil de intumescimento das formulações.



A partir da análise do perfil de intumescimento, três comportamentos distintos podem ser verificados. O primeiro representado pela formulação 3, em que o aumento do teor de água é estatisticamente superior ao das formulações 1 e 2 no intervalo de 5-60 min ($p < 0,05$). O segundo, no intervalo 60-120 min, em que se percebe a equivalência no grau de hidratação das três formulações, apesar da redução registrada para F3 justificar-se pela perda de fragmentos do comprimido. O amido, um dos desintegrantes mais utilizados na produção de comprimidos, por corresponder ao componente em maior concentração na formulação 3, explica a perda de fragmentos e a maior porcentagem de intumescimento dessa formulação. O terceiro comportamento foi observado após 720 min (12 horas) de teste, em que as três formulações apresentaram grau de hidratação estatisticamente diferente entre si. Enquanto F1 e F2 aumentaram o grau de hidratação, F3 reduziu. O mesmo fenômeno de desintegração foi observado nesse intervalo para F3. A figura 5 apresenta as formulações durante o teste de intumescimento.

Figura 5 – Intumescimento das formulações no tempo 10 e 120 min.

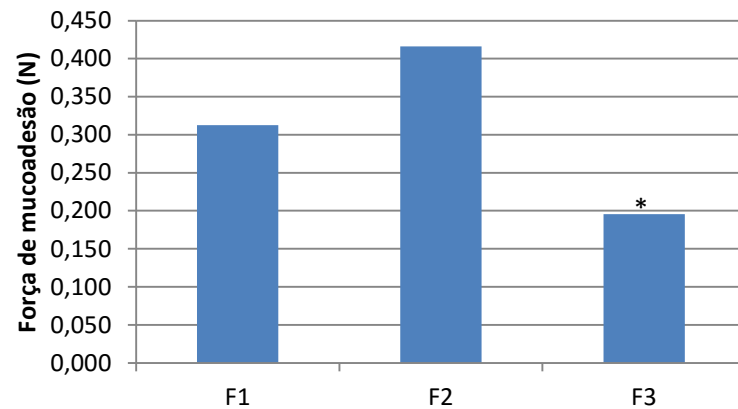


Dessa forma, o teste de intumescimento indicaria uma liberação mais rápida para comprimidos da formulação F3 e uma possível liberação contínua para as formulações F1 e F2. Todavia, essa afirmação só poderá ser confirmada em ensaios de liberação.

Força e tempo de mucoadesão

O resultado do ensaio de força de mucoadesão é apresentado na figura 6. As respostas de F1 e F2 foram mais favoráveis para esse quesito e F2, em especial, apresentou valores de força superiores. Entretanto, estatisticamente, a força de mucoadesão de F1 e F2 é semelhante, enquanto os valores obtidos para F3 são significativamente diferentes de F2 ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram uma perda da capacidade mucoadesiva dos comprimidos à medida que a concentração de amido é aumentada nas formulações. Apesar da mistura de polímeros ser uma alternativa mais econômica e rápida na obtenção de um novo material com propriedades intermediárias àquelas apresentadas pelos polímeros isolados, os resultados obtidos demonstram que concentrações elevadas de amido ocasionam diminuição da força de mucoadesão das formulações, enquanto concentrações elevadas de HPMC não resultam em forças de adesão superiores, por exemplo, a mistura em proporção equimolar de HPMC-amido (SILVA; ARAÚJO; MELO, 2012). A superioridade (quantitativa) da força de mucoadesão de F2 explica a importância do amido na formulação durante a fase de intumescimento. Essa fase é determinante na etapa de consolidação em que se aumentam as interações HPMC-amido e polímeros-mucina.

Figura 6 – Força de mucoadesão das formulações.



*: estatisticamente diferente de F2 ($p < 0,05$).

F1 e F2 permaneceram aderidos à mucosa durante todo o ensaio de tempo de mucoadesão, que teve duração de 120 minutos. Apesar de F3 também ter permanecido 120 minutos aderida à mucosa, duas das três amostras dessa formulação sofreram fragmentação rapidamente em 1min e 17 min, respectivamente (figura 7). Esse resultado era esperado quando se considera as análises realizadas anteriormente. A figura 8 apresenta a mucosa após o teste de tempo de mucoadesão.

Figura 7 – Representação da fragmentação de F3 durante a análise do tempo de mucoadesão.

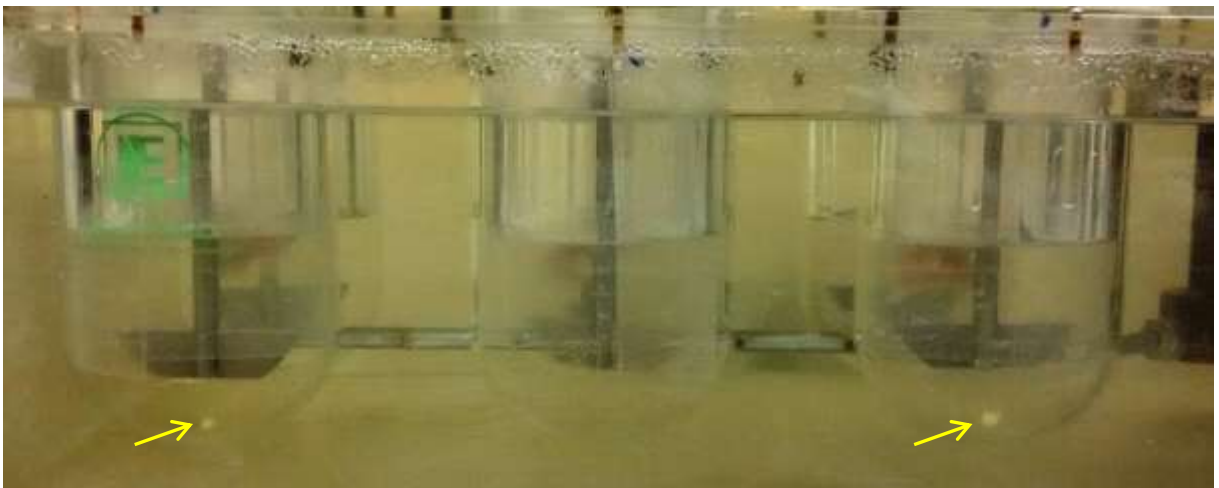
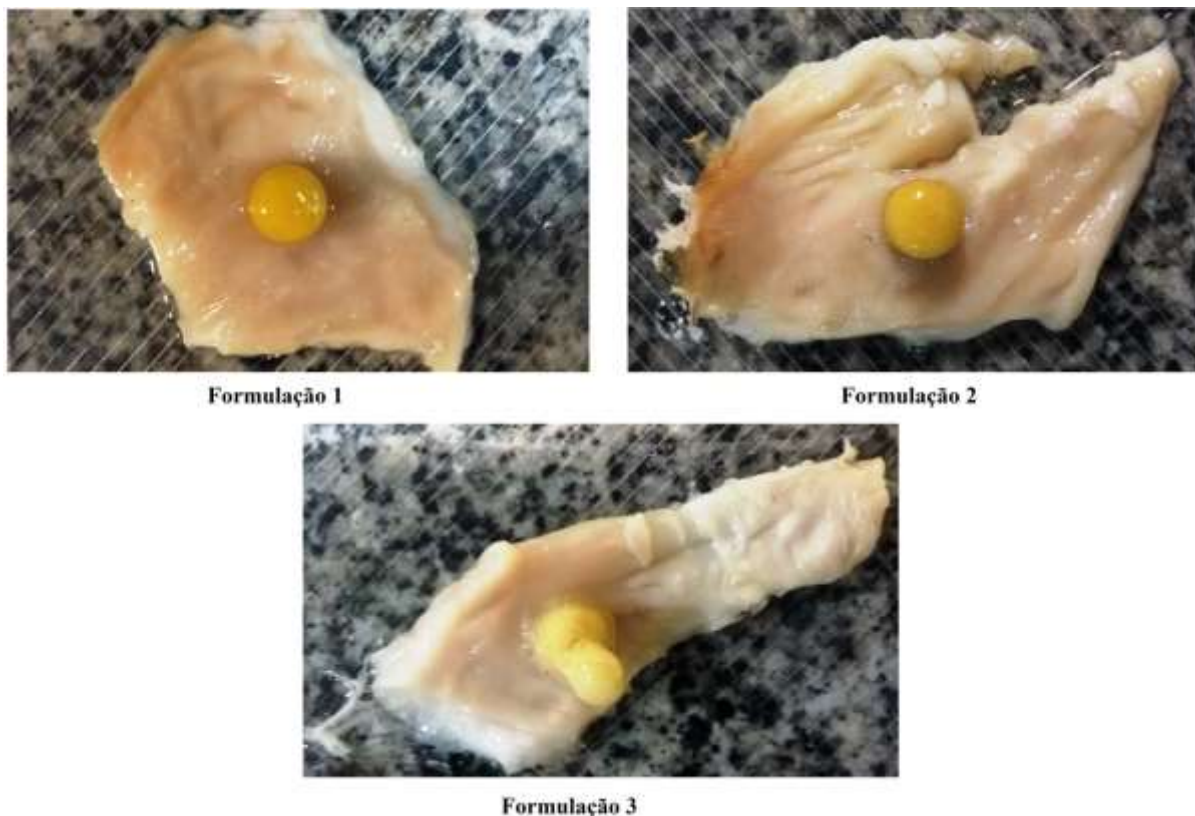


Figura 8 – Representação da mucosa após o teste do tempo de mucoadesão.



Dessa forma, os resultados das análises físico-químicas e da adesividade mostram F1 e F2 mais adequadas ao objetivo do estudo, e poderão ter sua formulação otimizada para melhorar esses resultados preliminares.

CONCLUSÃO

As fórmulas desenvolvidas apresentaram características físico-químicas adequadas em relação aos parâmetros farmacopeicos. Os comprimidos apresentaram dimensões uniformes, baixa variação de peso, dureza e friabilidade satisfatórios. Em relação às características adesivas (intumescimento, força e tempo de mucoadesão), F1 e F2 demonstraram características melhores que F3, logo dependendo da concentração, o amido em mistura com o HPMC foi capaz de alterar tais características o que faz dessas formulações preliminares o ponto de partida para testes posteriores.

REFERÊNCIAS

BHADBHADDE, S. J.; ACHARYA, A. B.; RODRIGUES, S. V.; THAKUR, S. L. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. **Quintessence International**, v. 42, n. 1, p. 29-36, 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

BUTTOW, A. D. A.; PRIMO, F. T.; ROCHA, A. D. S. R.; HERTZOG, G. I.; FERREIRA, M.; NOGUEIRA, B. B. Avaliação do processo de partição em comprimidos de hidroclorotiazida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 555-560, 2012.

CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; COSTA E SILVA, L. V.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. D. O.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 467-473, 2011.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIÃO, M. P. D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013.

CURY, B. S. F.; SILVA JÚNIOR, N.; CASTRO, A. Influência das propriedades de granulados de celulose nas características físicas dos comprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 37-44, 2009.

DAL PIZZOL, C. **Desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos contendo extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DD-Marcela**. 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DISILVESTRO, R. A.; DISILVESTRO, D. J. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 8, p. 1123-1127, 2009.

GROPPO, F. C.; DE CÁSSIA BERGAMASCHI, C.; COGO, K.; FRANZ-MONTAN, M.; MOTTA, R. H. L.; DE ANDRADE, E. D. Use of phytotherapy in dentistry. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 8, p. 993-998, 2008.

JAIPAL, A.; PANDEY, M. M.; CHARDE, S. Y.; RAUT, P. P.; PRASANTH, K. V.; PRASAD, R. G. Effect of HPMC and mannitol on drug release and bioadhesion behavior of buccal discs of buspirone hydrochloride: *in-vitro* and *in-vivo* pharmacokinetic studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 315-326, 2015.

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

OLIVEIRA, J. R.; CASTRO, V. C.; VILELA, P. G. F.; CAMARGO, S. E.; CARVALHO, C. A.; JORGE, A. O.; OLIVEIRA, L. D. Cytotoxicity of brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 208, p. 1472-6882, 2013.

PEKEL, N.; YOSHII, F.; KUME, T.; GÜVEN, O. Radiation crosslinking of biodegradable hydroxypropylmethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 2, p. 139-147, 2004.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; RUBINI, D.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI, C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 3, p. 521-533, 2004.

PERIOLI, L.; PAGANO, C. Preformulation studies of mucoadhesive tablets for carbamazepine sublingual administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 915-922, 2013.

PRADO, N. R. T. D. **Blendas de amido e hidroxipropil metilcelulose reforçadas com nanocristais de celulose**. 2013. 78 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipientes**. 6 ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SHIRODE, A. B.; BHARALI, D. J.; NALLANTHIGHAL, S.; COON, J. K.; MOUSA, S. A.; RELIENE, R. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 475-484, 2015.

SILVA, D.; ARAÚJO, E. M.; MELO, T. Desenvolvimento de blendas de poliamida 6/composto de borracha reciclada (SBRr). **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 104-110, 2012.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.; BRANDÃO, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery - a promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 15-40, 2006.

VINOD, K.; ROHIT REDDY, T.; SANDHYA, S.; DAVID BANJI, V. R. B. Critical review on mucoadhesive drug delivery systems. **Hygeia Journal for Drugs and Medicines**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2012.

ZACCARON, C. M. **Blendas de hidroxipropilmetilcelulose/poli (1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila) ou alginato de sódio: miscibilidade, propriedades mecânicas e**

estabilidade térmica. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.