

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE
QUALIDADE DA CASCA DO FRUTO DE *Punica granatum* L. (Romã) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATO E FRAÇÃO
RICA EM PUNICALAGINAS.**

BRUNO SLEIFER ALONSO

PORTO ALEGRE, 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE
QUALIDADE DA CASCA DO FRUTO DE *Punica granatum* L. (Romã) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATO E FRAÇÃO
RICA EM PUNICALAGINAS.

Dissertação apresentada por **BRUNO
SLEIFER ALONSO**, para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Amélia Teresinha Henriques

PORTO ALEGRE, 2017.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 31 de maio de 2017, pela banca examinadora constituída por:

Prof(a). Dr. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dr. Juliana Maria de Mello Andrade Fasolo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dr. Renata Biegelmeyer da Silva

Universidade Federal da Bahia

CIP - Catalogação na Publicação

Alonso, Bruno Sleifer

Desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade da casca do fruto de *Punica Granatum* L. (Romã) e avaliação da atividade anti-inflamatória de extrato e fração rica em Punicalaginas / Bruno Sleifer Alonso. -- 2017.

119 f.

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Punica Granatum* (Romã). 2. Controle de qualidade. 3. Atividade anti-inflamatória. I. Teresinha Henriques, Amélia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida neste período e ao Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que disponibilizaram os recursos, equipamentos e matérias necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração desta dissertação.

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor.”

Madre Teresa de Calcutá

Dedico esta dissertação à minha família e principalmente meus pais pela dedicação, incentivo e amor.

Agradecimentos

À professora Dr^a. Amélia T. Henriques pela oportunidade, estímulo, paciência e exemplo;

A todas as pessoas e órgãos que possibilitaram a realização deste trabalho, por meio de suporte financeiro, disponibilização de materiais e equipamentos;

A todos os professores do PPGCF – UFRGS e principalmente aos professores do laboratório de Farmacognosia, pela disponibilidade, discussões, incentivos e por despertar de curiosidades;

Aos funcionários do PPGCF – UFRGS, em especial para Maria Júlia L. dos Santos pela ajuda, disponibilidade e pelos bons momentos de convivência;

À minha sempre orientadora e amiga, profissional e pessoal, professora Dr^a. Fabiane Moreira Farias, pela inserção no meio científico e incentivo;

A todos os colegas do laboratório de Farmacognosia e em especial à Leticia J. Danielli, Mariana Koetz e Melissa Schwanz pelas discussões científicas, orientações, dicas e incentivos, de quem tive ajuda fundamental para realização deste trabalho;

Aos meus pais, Sandra e Júlio Solano Alonso, minha irmã Júlia, pelo suporte emocional, financeiro, por não medirem esforços em tudo que foi necessário e pelo grande amor que nos une, por terem partilhado comigo cada dificuldade e cada alegria e por serem os grandes responsáveis por mais esta conquista;

À todos meus familiares, avós, tios e primos sempre presentes, pelo suporte e incentivo, foram de fundamental importância;

A Ana Carolina Castoldi, pela dedicação e amor, por me estimular e fortalecer para concluir este trabalho;

Amigos e colegas, pela amizade e troca de experiências;

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	15
Lista de Figuras.....	17
Lista de Tabelas.....	19
Lista de Gráficos.....	21
Resumo.....	23
Abstract.....	25
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	27
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	31
II.1. Espécie <i>Punica granatum</i> L.	31
II.2. Controle de qualidade e validação de métodos analíticos.....	41
II.3. Processo inflamatório.....	46
III.OBJETIVOS.....	49
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
IV. 1. Material vegetal.....	51
IV.2. Perda por dessecação.....	52
IV.3. Determinação de cinzas totais.....	53
IV.4. Otimização do método extrativo.....	53
IV.5. Desenho fatorial.....	54
IV.6. Otimização por desenho experimental de Box-Behnken.....	55
IV.7. Análise das amostras.....	57

IV. 7.1 Extração.....	57
IV. 7.2. Desenvolvimento do método por CLAE.....	57
IV.7.3.Isolamento das Punicalaginas.....	58
IV.8.Validação do método por CLAE-UV para quantificação de punicalaginas totais.....	59
IV. 8.1. Linearidade.....	59
IV. 8.2. Limites de detecção (LD).....	60
IV. 8.3. Limites de quantificação (LQ).....	60
IV. 8.4. Repetibilidade e Precisão Intermediária.....	61
IV. 8.5. Exatidão.....	61
IV. 8.6. Robustez.....	61
IV. 9. Desenvolvimento de método analítico – CLUE.....	62
IV. 10. Determinação da atividade antiquimiotóxica <i>in vitro</i>	63
IV. 10.1. Obtenção do fator quimiotático.....	64
IV.10.2. Suspensões de neutrófilos.....	65
IV. 10.3. Determinação da atividade migratória de leucócitos.....	65
V. RESULTADOS.....	67
VI. DISCUSSÃO GERAL.....	91
VII. CONCLUSÃO.....	95
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
IX. ANEXOS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

%CV	coeficiente de variação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	cromatografia líquida de ultra eficiência
DPR	desvio padrão relativo
FB	Farmacopéia brasileira
ICH	International Conference on Harmonisation
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MV	material vegetal
UV	ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Punica granatum</i>	32
Figura 2 -	Fruto de romã.....	32
Figura 3 -	Estrutura química da punicalagina α e β	38
Figura 4 -	Estrutura química dos principais compostos presentes em <i>P. granatum</i>	40
Figura 5 -	Cascas do fruto de romã em processo de secagem.....	52
Figura 6 -	Montagem da câmara de Boyden; (1) compartimento superior: suspensão de neutrófilos + amostra; (2) filtro de nitrato de celulose; (3) compartimento inferior: plasma + fator quimiotáxico.....	64
Figura 7 -	Sobreposição de cromatograma submetidos a mesmas condições de análise, avaliando extratos de casca do fruto de romã em dois tamanhos de partícula diferentes e adquiridos por diferentes técnicas extrativas. (1) maceração - 500 μ m; (2) maceração - 300 μ m; (3) ultrassom - 500 μ m; (4) ultrassom - 300 μ m; (5) ultraturrax - 500 μ m; (6) ultraturrax - 300 μ m; (7) refluxo - 500 μ m; (8) refluxo - 300 μ m.....	70
Figura 8 -	Cromatograma de análise do extrato alcoólico bruto de casca de <i>P. granatum</i> utilizando CLAE/DAD. Fase móvel: água:TFA 0,01% e acetonitrila:TFA 0,08%, fluxo 0,7mL/min, coluna Kromasil® C ₁₈ (5 μ m x 4.6mm x 150mm), guardada com pré coluna, detecção em 256nm e volume de injeção de 10 μ L.....	80
Figura 9 -	Espectros de UV dos anômeros punicalagina α e β , adquiridos por CLAE a partir da fração padrão interno e extrato bruto da casca do fruto de <i>P. granatum</i> , respectivamente.....	81
Figura 10 -	Cromatograma de análise do extrato alcoólico bruto de casca de <i>P. granatum</i> utilizando CLUE/DAD. Fase móvel: água:TFA 0,01% e acetonitrila:TFA 0,08%, fluxo 0,15mL/min, coluna Waters Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 μ m), guardada com pré coluna e detecção em 256nm.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividades biológicas descritas na literatura para diferentes extratos de <i>P. granatum</i>	35
Tabela 2 -	Outros metabólitos encontrados em <i>P. granatum</i> L.....	39
Tabela 3 -	Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência utilizados para identificação de compostos fenólicos presentes em <i>P. granatum</i> L.....	45
Tabela 4 -	Listagem das amostras de <i>P. granatum</i> L. e seus respectivos locais de coleta e/ou obtenção.	51
Tabela 5 -	Descrição dos níveis e fatores avaliados no planejamento meio fatorial 2^3	54
Tabela 6 -	Desenho experimental do tipo meio fatorial 2^3 avaliando cinco fatores: (A) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$);(B) relação massa vegetal:volume (g/mL); (C) % solvente; (D) Granulometria (mesh) e (E) Tempo (min).....	55
Tabela 7 -	Descrição dos três fatores avaliados na otimização da extração com Desenho fatorial – Box-Behnken e seus respectivos valores de teste.....	56
Tabela 8 -	Desenho Box-Behnken avaliando três fatores: (A) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); (B) relação massa vegetal:volume (g/mL); (C) % solvente.....	56
Tabela 9 -	Descrição do sistema gradiente com porcentagens da fase móvel utilizada para análise por CLAE.....	58
Tabela 10 -	Descrição do sistema gradiente com porcentagens da fase móvel utilizada para isolamento das punicalaginas por CLAE.....	58
Tabela 11 -	Concentração utilizada em cada ponto da curva de linearidade.....	60
Tabela 12 -	Parâmetros alterados e utilizados na etapa para verificar a robustez do método analítico.....	61
Tabela 13 -	Descrição do sistema gradiente com as porcentagens da fase móvel utilizada para análise por CLUE.....	62
Tabela 14 -	Resultados da determinação de água para as amostras coletas e amostras comerciais.....	68
Tabela 15 -	Resultados da determinação de cinzas totais para as amostras coletadas e amostras comerciais.....	69
Tabela 16 -	Descrição dos valores de rendimento (%) encontrados nas diferentes técnicas extrativas para casca do fruto de <i>P. granatum</i> e somatório da área dos picos de punicalaginas obtidos por CLAE.....	71

Tabela 17 - Delineamento experimental meio fatorial 2 ³ e somatório das áreas dos compostos fenólicos analisados.....	72
Tabela 18 - Delineamento experimental de superfície de resposta Box-Behnken e somatório das áreas dos compostos fenólicos analisados. Temperatura expressa em °C; a relação massa/volume de material vegetal/solvente representada em relação a proporção (0,75 = 1:75, 1,125 = 1:125, 1,5 = 1:150); solvente metanol representado em porcentagem.....	75
Tabela 19 - Valores de superfície de resposta encontrados na otimização da extração de <i>P. granatum</i> por Box-Behnken avaliando o somatório das áreas de punicalaginas obtidos por CLAE de três fatores, temperatura; massa/solvente e porcentagem de metanol.....	78
Tabela 20 - Valores de desvio padrão e coeficiente e variação a partir das áreas médias do somatório de punicalaginas utilizando metodologia definida como ótima através dos resultados anteriores da otimização da extração via Bom-Behnken.....	79
Tabela 21 - Média das áreas obtidas dos dias 1, 2 e 3 da linearidade por CLAE.....	82
Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos pela linearidade da curva padrão de punicalagina – CLAE.....	83
Tabela 23 - Valores obtidos para a determinação de LD e LQ para as punicalaginas do extrato bruto de romã.	83
Tabela 24 - Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação do teor de punicalaginas totais de <i>P. granatum</i> por CLAE.....	84
Tabela 25 - Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de punicalaginas totais de <i>P. granatum</i> por CLAE.....	85
Tabela 26 - Resultados do ensaio de exatidão (recuperação) para o método de quantificação de punicalaginas em amostra de <i>P. granatum</i> por CLAE.....	85
Tabela 27 - Resultados obtidos nos parâmetros avaliados na etapa de robustez.....	86
Tabela 28 - Resultados do teste da câmara de Boyden para padrão de ácido gálico, extrato bruto da casca de <i>P. granatum</i> e fração punicalagina em diferentes concentrações.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeitos principais de cada fator testado no meio fatorial com base no somatório de áreas referentes à punicalaginas.....	74
Gráfico 2 -	Resultados evidenciando os efeitos de cada fator sobre a extração expresso em gráfico de Pareto ($\alpha = 0,1$).....	74
Gráfico 3 -	Diagrama de superfície de resposta para a interação entre temperatura, porcentagem de solvente e razão massa/solvente.....	76
Gráfico 4 -	Resposta otimizada para extração a partir do planejamento fatorial 3^2 para a determinação do teor de punicalaginas totais em <i>P. granatum</i> , via Minitab 17.....	77
Gráfico 5 -	Curva padrão média de punicalagina, equação da reta e coeficiente de regressão, obtido nos dias 1,2 e 3 da linearidade obtida por CLAE.....	82
Gráfico 6 -	Resposta da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> das amostras (AG): padrão ácido gálico; (EXT): extrato bruto; (FRA): fração punicalagina e (IND): indometacina em diferentes concentrações, perante a migração leucocitária.....	90

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração dos compostos fenólicos presentes na casca do fruto de *Punica granatum* L. (romã) com diferentes locais de coletas e adquiridas comercialmente, bem como desenvolver e validar método analítico para separação e quantificação de punicalaginas totais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), ensaios de pureza como determinação de água e cinzas totais e testar a atividade anti-inflamatória pela avaliação antiquimiotóxica *in vitro* do extrato e fração enriquecida de punicalagina. Para a otimização da extração com amostra coletada em Alegrete/15, diferentes técnicas extrativas foram testadas, entre elas: maceração, ultrassom, ultraturrax e refluxo, sendo esta última à escolhida. Análises de fatores críticos que influenciam na resposta, sendo eles temperatura, granulometria, porcentagem do solvente extrator, relação massa vegetal/solvente e tempo, foram realizadas, utilizando software estatístico MiniTab[®]. O método por CLAE foi desenvolvido, permitindo a separação e quantificação dos anômeros punicalagina α e β , com o emprego de coluna cromatográfica Kromasil[®] C₁₈ – 5 μ m x 4.6mm x 150mm e fase móvel constituída por água acidificada com ácido trifluoroacético : acetonitrila acidificada com TFA.. O método pôde ser considerado eficiente e confiável, sendo linear, preciso, robusto, exato e específico, podendo ser utilizado para análise do extrato de *P. granatum*. O extrato bruto, bem como a fração de punicalaginas foram testados e reduziram significativamente a migração leucocitária nas concentrações mais elevadas (10 e 1 μ g/mL) em relação ao controle positivo, indicando potencial atividade inibitória da migração leucocitária.

Palavras chave: *Punica granatum*, casca, otimização, validação, CLAE, anti-inflamatório, punicalagina.

ABSTRACT

The objective of this work was to optimize the extraction of the phenolic compounds present in the fruit bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) with different collection sites and commercially acquired, as well as to develop and validate an analytical method for the separation and quantification of total punicalagins by liquid chromatography (HPLC) and ultra-high performance liquid chromatography (HPLC), purity tests such as water determination and total ashes, and to test the anti-inflammatory activity by the in vitro antichemotoxic evaluation of the extract and enriched fraction of punicalagin. For the optimization of the extraction with sample collected in Alegrete / 15, different extractive techniques were tested, among them: maceration, ultrasound, ultraturrax and reflux, the latter being chosen. Analysis of critical factors influencing the response, being temperature, particle size, solvent extractor percentage, vegetable mass / solvent ratio and time, were performed using MiniTab® statistical software. The HPLC method was developed allowing separation and quantification of the punicalagin α and β anomers using a Kromasil® C18 - 5 μ m x 4.6mm x 150mm chromatographic column and mobile phase consisting of water acidified with trifluoroacetic acid: acetonitrile acidified with TFA. The method could be considered efficient and reliable, being linear, precise, robust, exact and specific, and it can be used for the analysis of the extract of *P. granatum*. The crude extract as well as the fraction of punicalagins were tested and significantly reduced the leukocyte migration at the highest concentrations (10 and 1 μ g / mL) in relation to the positive control, indicating potential inhibitory activity of leukocyte migration.

Key words: *Punica granatum*, rind, optimization, validation, hplc, anti-inflammatory, punicalagin.

I. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais é uma das formas mais antigas utilizadas para o tratamento de enfermidades que acometem o homem. Seu uso, com fins terapêuticos, cura de doenças e sintomas, ocorre desde o início da civilização. Quando o homem começou a prestar mais atenção em suas atividades, passou a aprimorar os processos de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício. Com o crescimento linear da população, os altos índices de doenças que afligem a humanidade e o aumento do número de formas de patógenos que prejudicam a saúde e o bem-estar, a busca de efeitos terapêuticos das plantas tornou-se uma importante ferramenta (FERRAZ *et al.*, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população de países em desenvolvimento utiliza práticas tradicionais com plantas medicinais na atenção primária à saúde e para o tratamento de diversas enfermidades (ROSA *et al.*, 2011). O Brasil é um exemplo desta situação onde ainda, muitas vezes, o uso de plantas medicinais é importante recurso terapêutico para algumas comunidades e grupos étnicos (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Até metade do século XIX, a maior parte dos medicamentos comercializados era derivada de plantas. Após a Revolução Industrial, a indústria farmacêutica voltou seus interesses para fármacos sintéticos. Apesar disso, a etnofarmacologia como ferramenta para a descoberta de fármacos a partir de produtos naturais permaneceu gerando resultados importantes e, continua despertando interesse dos pesquisadores (GILANI & RAHMAN, 2005; PATWARDHAN, 2005).

O Brasil é um país de dimensões continentais, e apresenta quase um terço da flora mundial subdividida em dez biomas com uma biodiversidade extremamente rica, podendo ser fonte de novos medicamentos para tratamento de doenças. No entanto, mesmo com essa gama de possibilidades disponível de fontes naturais e o uso generalizado de plantas pela população, relativamente pouco tem sido realizado para transformar esse potencial em vantagens para os usuários. Apesar da importância dos vegetais para o desenvolvimento de novos fitoterápicos é indispensável a concomitante proteção e manutenção destes ecossistemas (AMARAL *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011; ALMEIDA & SCHEFFER, 2012).

II. Revisão Bibliográfica

II. 1. Espécie *Punica granatum* L.

A espécie *Punica granatum* L., conhecida popularmente no Brasil como romã ou romãzeira, é caracterizada como um grande arbusto ou uma pequena árvore, podendo atingir de um metro e meio a seis metros de altura (Figura 1 e 2). É uma espécie originária da Ásia e que, atualmente, é amplamente cultivada em todos continentes, principalmente em países de climas tropicais e subtropicais. É pertencente a uma família pequena, tendo apenas um único gênero e duas espécies: *Punica granatum* L. e *Punica protopunica* (WERKMAN *et al.*, 2008; TELES & COSTA, 2014; GULLON *et al.*, 2016;), sendo que para a última citada não há uma conclusão que representa uma espécie válida.

Existem relatos da utilização de romã em várias tradições, que reportam desde a antiguidade. Nas diferentes partes do globo e também entre as diversas crenças e religiões, simboliza sanidade, renascimento, fertilidade e abundância. É citada na mitologia e arte egípcia, e também no antigo testamento e Babilônia (WERKMAN *et al.*, 2008).

A medicina popular em diferentes regiões do mundo utiliza diferentes partes da romãzeira, para tratar vários problemas de saúde, mas, predominantemente desordens gastrointestinais.

Diversos trabalhos mostram que *P. granatum* apresenta variadas atividades biológicas, tais como: antioxidante, antiviral, antibacteriana, antidiarreica, anti-helmíntica, prevenção de doenças crônicas que atingem grande parte da população mundial como, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças do trato digestivo e respiratório, e ainda atuando na restauração do sistema imunológico (SYED *et al.*, 2007; BOROCHOV-NEORI *et al.*, 2009; TEHRANIFAR *et al.*, 2010; MIDDHA *et al.*, 2013). Estudos realizados por Khan (2009) revelam ainda que *P. granatum* apresenta atividades anticâncer, enquanto que Medjakovic e Jungbauer (2012) observaram uma melhora frente a síndromes metabólicas.

Aslam e colaboradores (2006) descreveram o potencial dos extratos de *P. granatum* para a cicatrização da pele humana, com regeneração da derme e

epiderme, incluindo também potencial proteção frente a raios ultravioleta (UV-B) (AFAQ *et al.*, 2005).



Figura 1. *Punica granatum*.



Figura 2. Fruto de romã.

Diferentes grupos de pesquisa estudaram a ação de variados extratos de romã, preparados a partir das diferentes partes da planta, avaliando-se a atividade antimicrobiana frente às principais bactérias patogênicas e, inclusive, cepas resistentes a antibióticos. Os extratos mostraram-se ativos frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cepas de *Salmonella enterica* entre outros, onde os extratos de modo geral apresentaram grande potencial antibacteriano,

sendo testados isoladamente ou em associação com antibióticos convencionais, demonstrando atividade sinérgica. Alguns autores ainda sugeriram que os extratos ativos de *P. granatum* podem ser utilizados como conservantes em alimentos e medicamentos, prevenindo a contaminação e proliferação de microrganismos indesejáveis (ANESINI & PEREZ, 1993; PEREZ & ANESINI, 1994; NAVARRO *et al.*, 1996; DE *et al.*, 1999; NIMRI *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2000; AHMAD & BEG, 2001; PRASHANTH *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2003; VORAVUTHIKUNCHAI *et al.*, 2004; RANI & KHULLAR, 2004; BRAGA *et al.*, 2005; WAFA *et al.* 2017).

Guevara e colaboradores (1994) avaliaram o efeito *in vitro* de diversas plantas populares no Peru, entre elas a *P. granatum*, para o tratamento da diarreia e da cólera. A infusão e a decocção de casca de romã apresentaram o melhor efeito bactericida. Das *et al.* 1999, estudaram a ação de extratos das sementes frente a diversos modelos de diarreia em ratos, cujos resultados foram promissores na inibição deste quadro de desordem.

Vasconcelos e colaboradores (2003) concluíram que o extrato de *P. granatum* pode ser utilizado como agente antifúngico tópico, incorporado a um gel, para o tratamento da infecção por cândida associada à estomatite, causada pelo uso de dentadura. Entretanto, em 2006, Salgado e colaboradores desenvolveram e avaliaram *in vivo* a ação de um gel contendo extrato da casca de romã a 10%, onde este não se mostrou efetivo para uso contra formação de placa bacteriana gengival e gengivite.

Ainda, sobre as atividades frente a microrganismos, extratos de romã mostraram potencial atividade antiviral. Efeitos promissores foram obtidos frente ao vírus *Herpes simplex*, vírus Sindbis e poliovírus (MOUHAJIR *et al.*, 2001; LI *et al.* 2004). Testes *in vitro* realizados por Neurath e colaboradores (2004), mostraram que o suco de romã apresenta atividade inibitória contra HIV-1, sendo observada competição por receptores de células alvos para infecção.

O extrato aquoso da casca do fruto de *P. granatum* apresentou resultados promissores em testes realizados por Hukkeri e colaboradores (1993), nas quais avaliou a atividade anti-helmíntica frente a *Taenia solium*, *Ascaridia galli* e *Pheritima posthuma*, sendo mais potente que a substância padrão utilizada. Pesquisa realizada por Al-Megrin em 2016, revelou o extrato

da casca de romã como um tratamento alternativo importante para prevenção e tratamento da infecção causada por *Giardia lamblia* em modelo agudo *in vivo*, em ratos.

Trabalhos realizados com o óleo das sementes de romã apresentaram significantes resultados na inibição da angiogênese e diminuição da incidência de tumores, indicando este como um potente agente quimiopreventivo contra o câncer de mama humano, câncer de pele e câncer de cólon em ratos (KIM *et al.* 2002; HORA *et al.* 2003; TOI *et al.* 2003; MEHTA & LANSKY 2004). Outro estudo utilizando como farmacógeno as sementes do fruto da romã avaliou o efeito do extrato em ratos diabéticos, onde após 12h houve redução significativa dos níveis sanguíneos de glicose nos animais (DAS *et al.*, 2001). Avaliação feita com extratos a partir das flores de romãzeira em ratos normais e diabéticos mostrou resultados positivos, reduzindo a taxa de glicose sanguínea nos animais diabéticos e ainda, aumentando a tolerância/inibição da absorção intestinal de glicose nos animais normais (PEREIRA, 1997; JAFRI *et al.* 2000; HASONA *et al.* 2016).

Estudo realizado por Houston e colaboradores, (2016) objetivou avaliar a ação do extrato das cascas de *P. granatum* em aplicação tópica, utilizando modelo *ex vivo* em pele de porco, para atividade anti-inflamatória. Analisando os resultados frente à expressão da cicloxigenase (COX-2), o extrato isolado e principalmente associado com zinco, apresentou potencial para reduzir a inflamação e dor associadas a condições alteradas da pele, devido à significativa penetração pela via dérmica.

A tabela 1 apresenta mais atividades biológicas descritas para diferentes extratos de *P. granatum* e, além disso, não apresentam toxicidade aguda e toxicidade subcrônica em estudos realizados *in vivo*, como também demonstraram que o extrato de *P. granatum* apresentou efeitos tóxicos em concentrações superiores as necessárias para se obter atividade antiviral, ou ainda ausência de toxicidade (CERDA *et al.* 2003; VIDAL *et al.* 2003).

Tabela 1. Atividades biológicas descritas na literatura para diferentes extratos de *P. granatum*.

<i>Punica granatum</i>			
Farmacógeno	Tipo de extrato	Atividade	Referência
Sementes - Suco	Hidroalcoólico (80% metanol)	Antioxidante	Borochoy-Neori <i>et al.</i> , 2009.
	Hidroalcoólico (60% metanol)	Antioxidante	Tehranifar <i>et al.</i> , 2010
	Acetona:água (70:30)	Anticâncer / antioxidante	Khan <i>et al.</i> , 2007.
	Metanólico	Síndromes metabólicas	Medjakovic & Jungbauer 2012
	-	Reparo e regeneração celular	Aslam <i>et al.</i> , 2006
	Aquoso	Antibacteriana	Moreira <i>et al.</i> , 2014.
	Hidroalcoólico	Antidiarreico / Antibacteriana	Rani & Khullar, 2004.
	Metanólico	Antidiarreica	Das <i>et al.</i> , 1999.
	-	HIV-1	Neurath <i>et al.</i> , 2004.
	Aquoso	Câncer de mama	Toi <i>et al.</i> , 2003.
	Fermentação	Antidiabética	Das <i>et al.</i> , 2001.
	Óleo da semente	Metanólico	Síndromes metabólicas
-		Antimicrobiana	Nascimento <i>et al.</i> , 2000.
Etanólico		Câncer de pele	Hora <i>et al.</i> , 2003.
-		Câncer de mama	Toi <i>et al.</i> , 2003.
-			

Tabela 1. Continuação.

Flor	-	Síndromes metabólicas	Medjakovic & Jungbauer 2012.
	Hidroalcoólico (etanol 50%)	Antidiabética	Jafri <i>et al.</i> , 2000.
Casca do fruto	Metanólico	Antidiabética	Middha <i>et al.</i> , 2013.
	-	Síndromes metabólicas	Medjakovic & Jungbauer 2012.
	Extrato incorporado a gel de carbopol	Antifúngica tópica	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2003.
	Aquoso	Herpes simples	Li <i>et al.</i> , 2004.
	Aquoso	Antibacteriana	Guevara <i>et al.</i> , 1994.
	-	Síndromes metabólicas	Medjakovic & Jungbauer 2012.
	Etanólico	Antibacteriana	Wafa <i>et al.</i> , 2017.
	Aquoso	Anti-helmíntica	Hukkeri <i>et al.</i> , 1993.
	Aquoso	Anti-inflamatória	Houston <i>et al.</i> , 2016.
	Metanol 70%	Tratamento contra Giardia	Al-Megrin, 2016.
Casca da árvore	Aquoso	Câncer de mama	Kim <i>et al.</i> , 2002.
	-	Síndromes metabólicas	Medjakovic & Jungbauer 2012.
	Aquoso	Reparo e regeneração celular	Aslam <i>et al.</i> , 2006.
Não descrito	Álcool 70%	Diarreia e disenteria / antibacteriana	Ahmad & Beg, 2001.
	Metanólico	Antiviral: herpes simples; poliovírus.	Mouhajir <i>et al.</i> , 2001.

Dentre os principais metabólitos secundários encontrados na espécie *P. granatum*, destacam-se flavonoides, antocianinas, taninos, alcaloides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados e ácido ursólico (JAIN *et al.*, 2011; FISCHER *et al.*, 2013; NUNCIO-JÁUREGUI *et al.*, 2014).

Classificadas como taninos hidrolisáveis, as punicalaginas (anômeros α e β) são os compostos majoritários no extrato hidroalcoólico das cascas do fruto de *Punica granatum* L. São polifenóis de alta massa molar apresentando características de adstringência, cor, sabor e sua estabilidade oxidativa (CHEN *et al.*, 2000; NACZK & SHAHIDI., 2004; GONÇALVES., 2008).

Esta classe de compostos apresenta notáveis atividades biológicas e é extensivamente utilizada pela medicina popular por suas propriedades adstringentes. Os taninos reagem com as proteínas das diversas camadas de tecidos, precipitam micro proteínas sendo úteis no tratamento de úlceras pépticas. Formam uma película protetora que previne a absorção de substâncias tóxicas, promovendo resistência para ação de enzimas proteolíticas (VASCONCELOS *et al.*, 2008).

O tanino punicalagina (Figura 3) se destaca como uma molécula funcional e relatos na literatura descrevem propriedades hepatoprotetora (LIN *et al.*, 1998 e LIN *et al.*, 2001), inibição do vírus da herpes simplex-1 (HIV-1) (LIN *et al.*, 2011), antitumoral (MATSUURA *et al.*, 1999; VILADOMIU *et al.*, 2013; ZAHIN *et al.*, 2014), antioxidante (LIN *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2001; AQIL, 2012), antígenotóxica (CHEN *et al.*, 2000) e anti-inflamatória (LIN *et al.*, 1998).

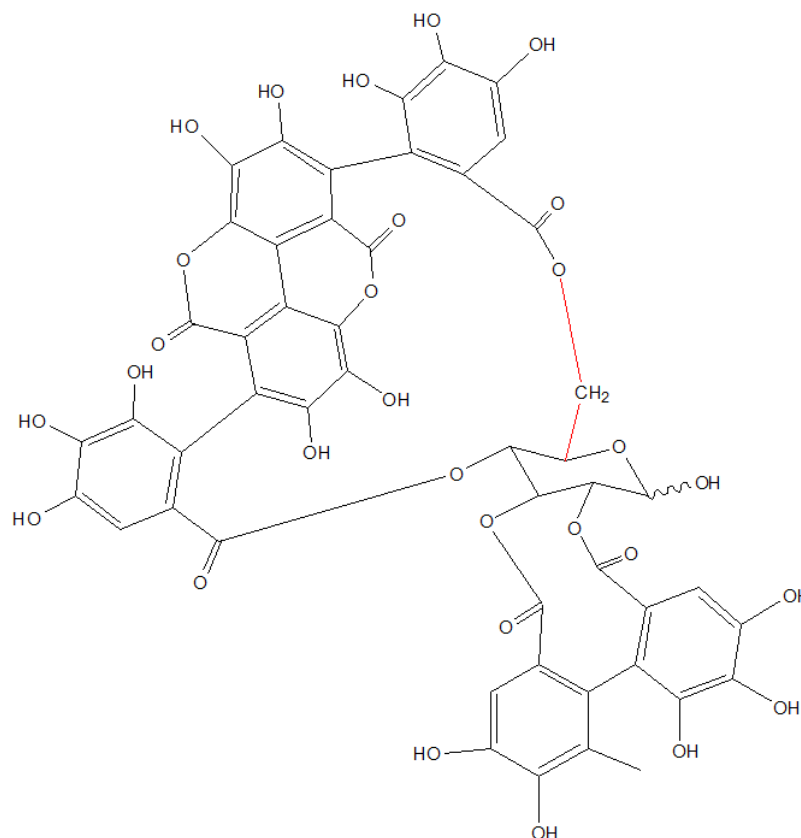


Figura 3. Estrutura química da punicalagina α e β .

Punicalagina mostrou-se não tóxica em estudo de toxicidade *in vivo*, onde altas doses (6% de punicalagina em suco de romã) foram administradas por via oral em ratos, durante 37 dias (CERDA *et al.*, 2003). Estudo de avaliação da biodisponibilidade de punicalaginas em ratos mostrou a presença da substância e de seus metabólitos nas fezes e urina, como também no plasma dos animais (CERDA *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que polifenóis como a punicalagina inibem o crescimento celular e induzem a apoptose em células cancerosas. Testes *in vivo*, realizados com ratos implantados com linhagem celular (PC-3) de câncer de próstata mostraram que a diminuição do crescimento celular ocorre pela modulação de proteínas que regulam a apoptose (MALIK *et al.*, 2005; MALIK & MUKHTAR, 2006).

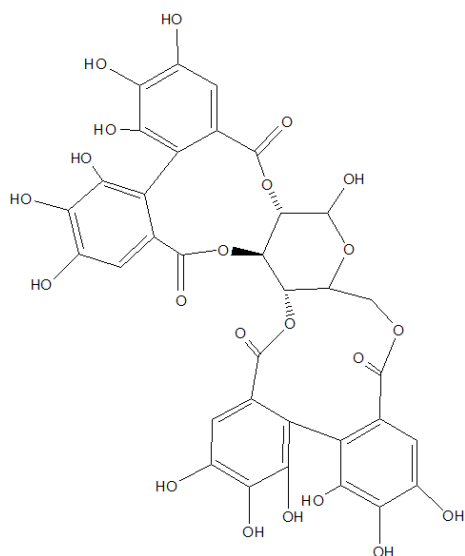
Estudo realizado na Espanha mostrou em experimentos *in vivo* que porcos que receberam suplementação de extrato de romã contendo punicalaginas, apresentaram melhora e prevenção na disfunção endotelial coronariana induzida pela hiperlipemia, prevenindo contra inflamação e dano oxidativo vascular (VILAHUR *et al.*, 2015). Li e colaboradores publicaram

estudo em 2015, relatando os efeitos do extrato e do suco de romã contendo punicalaginas, sobre o crescimento *in vitro* das bactérias intestinais e sugerem que a romã apresenta grande potencial para atuar como probiótico, aumentando a flora intestinal de bactérias consideradas benéficas (LI *et al.*, 2015).

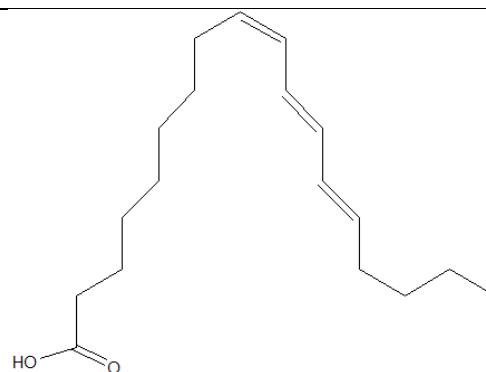
Tabela 2. Outros metabólitos encontrados em *P. granatum* L.

Metabólito	Fórmula química	Origem	Referência
Granatina	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	Pericarpo	Wafa <i>et al.</i> , 2017
Pedunculagina	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	Pericarpo	Wafa <i>et al.</i> , 2017
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Pericarpo	Aslam <i>et al.</i> , 2005
Canferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Pericarpo	Aslam <i>et al.</i> , 2006
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Pericarpo	Aslam <i>et al.</i> , 2005
Punicalina	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	Casca fruto/pericarpo/raízes	Wafa <i>et al.</i> , 2017
Punicalagina	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	Casca/pericarpo/folhas/raízes	Wafa <i>et al.</i> , 2017
Alcaloides piperidínicos	C ₅ H ₁₁ N	Raízes	Jasuja <i>et al.</i> , 2012
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	Casca fruto/pericarpo/ flores	Wafa <i>et al.</i> , 2017
Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	Casca fruto/pericarpo	Wafa <i>et al.</i> , 2017
Ácido punicílico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Óleo semente	Aslam <i>et al.</i> , 2006
Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Óleo semente	Aslam <i>et al.</i> , 2006
Testosterona	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Semente	Lansky & Newman, 2007
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	Suco/folha	Lansky & Newman, 2007
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Suco/folha	Lansky & Newman, 2007
Cianidida	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	Suco	Noda <i>et al.</i> , 2002
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Suco	Lansky & Newman, 2007
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Suco	Lansky & Newman, 2007

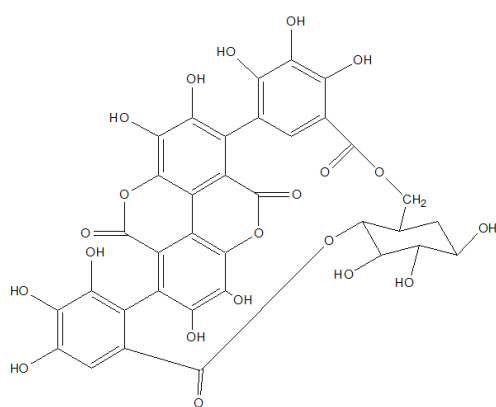
Ácido fumárico	$C_4H_4O_4$	Suco	Lansky & Newman, 2007
Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Suco	Jasuja <i>et al.</i> , 2012



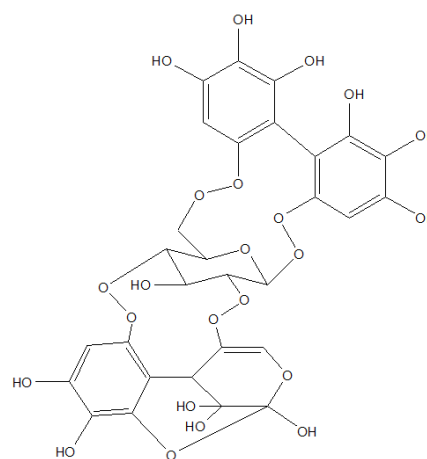
Pedunculagina



Ácido Punicíco



Punicalina



Granatina

Figura 4. Estrutura química dos principais compostos presentes em *P. granatum*.

A romã desperta interesse atualmente por ser uma matéria prima vegetal disponível e é reconhecida como produto funcional, benéfico à saúde, conforme demonstrados nos estudos citados anteriormente e, além disso,

devido ao potencial existente para utilização industrial das cascas dos frutos, subproduto que constitui resíduo na utilização da espécie, é necessário que haja a garantia da sua eficácia e segurança.

II. 2. Controle de qualidade e validação de métodos analíticos

Na obtenção de um produto fitoterápico, o processo de desenvolvimento tecnológico necessita estudos prévios como: estudos botânicos, estudos agrônômicos, químicos e pesquisa sobre sua atividade biológica, o que diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas pela medicina popular. Para se obter um novo medicamento a partir de uma planta medicinal, alguns estudos são necessários e podem ser divididos nas etapas:

- Botânica - identificação exata do material em estudo, viabilidade de cultivo ou de coletas;
- Química - obtenção de extratos, diretos ou concentrados, análise do perfil metabólico, variabilidade química (múltiplas coletas em diferentes locais, diversas épocas do ano, diferentes anos, altitudes, entre outros);
- Farmacêutica - formulação e garantia da qualidade do produto;
- Biológicas - ensaios pré-clínicos (ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos);
- Clínica - estudos realizados em humanos.

Para garantir um produto uniforme e eficaz é necessário que todos os insumos, desde a planta *in natura*, droga vegetal, tinturas, extratos até o produto acabado, sejam caracterizados através de seus constituintes químicos, ou atividades farmacológicas (DI STASI, 1996; SIMÕES *et al.*, 2003). Desta forma, em muitos casos, o produto final pode ser padronizado através da quantificação de marcadores, podendo ser compostos químicos característicos da espécie, ou compostos presentes em grandes quantidades.

A análise de marcadores químicos serve para avaliar a identidade de uma matéria-prima vegetal e a qualidade do fitoterápico obtido e, estes podem

ou não ser os responsáveis pelos efeitos farmacológicos. Entretanto este procedimento não garante a autenticidade do material, nos casos de falsificação em que o produto acabado pode ser adicionado de um marcador isolado (SCHANEBERG *et al.*, 2003). Como alternativa para a determinação da identidade de um material vegetal, além da identificação botânica, é importante a utilização do *fingerprint* cromatográfico (SCHANEBERG *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003).

O *fingerprint* ou impressão digital de um produto natural ou planta medicinal, é um cromatograma obtido representando todos os componentes químicos presentes ou detectáveis no extrato. Ajuda na autenticação e identificação de uma planta. Considerando múltiplos constituintes no extrato para avaliar a qualidade, em vez de apenas um ou dois marcadores (GONG *et al.*, 2003). Essas informações são obtidas levando-se em consideração fatores relacionados com a separação cromatográfica, com o número e com a concentração dos compostos presentes, proporcionando segurança e confiabilidade nos resultados.

Para este fim, metodologias desenvolvidas que utilizam técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), têm sido amplamente utilizadas tanto para estudos fitoquímicos, quanto na química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, proporcionando vantagens como alta eficiência e rapidez (SIMÕES *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade ou pesquisa de um produto, de forma geral, envolve a avaliação e otimização de vários parâmetros, desde o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação, devendo ser amplamente estudados e relacionados com o metabólito de interesse (CAUSON, 1997).

Outra etapa fundamental para o controle de qualidade é a validação das metodologias analíticas desenvolvidas, tendo por objetivo garantir que o método atenda corretamente aos propósitos a que foi proposto e possa ser implementado nos protocolos de qualidade do produto, assegurando desta forma sua ação terapêutica e a segurança na sua utilização (THOMPSON *et al.*, 2002; SIMÕES *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de métodos analíticos é uma ferramenta necessária para a confiabilidade dos resultados na implementação do sistema de qualidade, é justificada por razões legais, técnicas e comerciais, mesmo não existindo uma norma específica estabelecida nacional e internacionalmente. Órgãos como IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e ICH, apesar de apresentarem diferenças em suas normas, produzem diretrizes e recomendações para execução do procedimento de validação, requisito fundamental para o processo que irá demonstrar a competência da técnica (RIBANI *et al*, 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2010).

Desta forma, a validação de um método analítico, bem como os estudos rigorosos da segurança e qualidade são imprescindíveis para o registro de novos produtos (RIBANI *et al.*, 2004).

Em consequência das inúmeras atividades farmacológicas apresentadas pela espécie *P. granatum* e apesar de estudos anteriores publicados em periódicos, nenhum código oficial apresenta uma monografia para a droga vegetal, constituída pelas cascas. Assim, é fundamental a padronização do extrato hidroalcoólico, forma mais comumente empregada pela indústria para produção de fitoterápicos e, validação de métodos analíticos que garantam a quantificação de metabólitos-alvo, presentes no extrato.

A validação de um procedimento analítico tem como objetivo demonstrar que o método é adequado para a sua finalidade, incluindo assim, as características aplicáveis à identificação, controle de impurezas e testes quantitativos (ICH, 2005). Deve ser utilizada para métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, ampliações e modificações dos métodos normalizados ou ainda, para métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos. A determinação das características de desempenho do método é uma parte do processo de validação e os critérios de aceitação são baseados no seu uso intencional (BARROS, 2002).

De acordo com a ANVISA (Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003), a validação tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado

para a finalidade proposta, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

Nas últimas décadas houve uma grande evolução na instrumentação analítica e com o desenvolvimento de técnicas de extração mais robustas, possibilitando a detecção e identificação de novos compostos em faixas de concentração mais baixas (SILVA & COLLINS, 2011).

Um método analítico para ser validado, na maior parte dos casos, deve apresentar parâmetros determinados para linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, robustez, especificidade e precisão, sendo esta última considerada em dois níveis: precisão intra-corrída (repetibilidade) e precisão inter-corrídas (intermediária). Estes parâmetros devem ser realizados antes da implementação de um método analítico para quantificação de um composto. Complementarmente, substâncias de referência oficializadas em farmacopeia devem ser utilizadas na validação do método ou, na ausência delas, um padrão de trabalho pode ser utilizado, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2010).

Embora validar um método analítico seja trabalhoso e minucioso, é extremamente importante para a garantia de resultados eficientes e proveitosos, pois representa confiabilidade nos dados obtidos. Além disso, conhecer as diretrizes da legislação vigente auxilia para que o estudo tenha êxito, atendendo conhecendo as exigências de uma determinada aplicação ou área de aplicação, possibilitando ter um processo com qualidade assegurada (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2010).

A romã é cultivada para uso na alimentação e assim pode constituir uma matéria-prima vegetal disponível para produção de fitoterápicos. Alguns métodos para controle de qualidade de extratos de casca de romã foram propostos e estão apresentados na Tabela 3. Estes métodos foram tomados como base para o estudo desenvolvido neste trabalho.

Tabela 3. Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência utilizados para identificação de compostos fenólicos presentes em *P. granatum* L.

Método	Condições	Fase móvel	Referência
CLAE/DAD	Coluna: C18, 25cm Fluxo: 1mL/min Tempo: 40 min	A: água/ácido acético B: metanol	Çam, M.& Içyer, 2015
CLAE/DAD	Coluna: C18, 15cm Fluxo: 1mL/min Tempo: 25 min	A: metanol B: água/ácido acético	Mo <i>et al.</i> , 2013
CLAE /DAD	Coluna: C18, 25cm Fluxo: 1mL/min Tempo: 60 min	A: água/ácido fórmico B: acetonitrila	Gullon <i>et al.</i> , 2016
CLAE /DAD	Coluna: C18 Fluxo: 1,5mL/min Tempo: 30 min	A: água/fosfato monopotássico/ácido fosfórico B: acetonitrila	Jain, <i>et al.</i> , 2011
CLAE /DAD	Coluna: C18, 25cm Fluxo: 1 mL/min Tempo: 80 min	A: água deionizada/ácido acético glacial B: metanol	Li <i>et al.</i> , 2015
CLAE /DAD	Coluna: C18, 25cm Fluxo: 1 mL/min Tempo: 25 min	A: acetonitrila B: acetonitrila/água/ ácido fosfórico/ácido acético	Turkyılmaz & Ozkan, 2014
CLAE /DAD	Coluna: C18, 25cm Fluxo: 0,2 mL/min Tempo: 50 min	A: água/TFA B: acetonitrila/TFA	Pagliarulo <i>et al.</i> , 2016
CLAE/DAD	Coluna: C18, 10cm Fluxo: 1 mL/min Tempo: 25 min	A: acetonitrila B: água/ácido fórmico	Santiago <i>et al.</i> , 2014

II. 3. Processo inflamatório

A inflamação é um processo fisiológico que constitui a resposta de um tecido vivo a um estímulo lesivo em que um agente agressor físico, químico ou biológico, que ultrapassa a barreira primária de defesa do corpo humano, envolvendo assim uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido que sofreu a lesão. Uma das principais etapas da inflamação é a liberação de leucócitos (neutrófilos) da corrente sanguínea para o local da lesão, migração esta conhecida como diapedese ou quimiotaxia, um mecanismo de defesa do organismo, onde começam os processos de reparação, com a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (RANG *et al.*, 2004; COTRAN *et al.*, 2006).

A resposta na área da lesão caracteriza a área inflamada, que representa sinais clínicos como rubor, calor, edema, dor e perda de função. A inflamação tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação dos componentes específicos (anticorpos) e não específicos da imunidade (células fagocíticas e mediadores) (CRUVINEL *et al.*, 2010).

De modo geral, o processo inflamatório compreende cinco fases: irritativa, vascular, exsudativa, degenerativa e reparativa. A fase aguda caracteriza-se pelos eventos vasculares, observando-se a vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular, a migração celular, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a crônica, onde ocorre degeneração tecidual e fibrose (LEES *et al.*, 2004).

Trabalhos descritos na literatura utilizando modelos com animais e também ensaios *in vitro* apontam que os extratos oriundos de diferentes partes de *P. granatum*, incluindo as sementes, cascas, flores, apresentam importante potencial antioxidante, bem como anti-inflamatório. Os efeitos anti-inflamatórios como também analgésicos, são descritos em estudos nos quais avaliou-se a inflamação em tecidos pulmonares e do trato gastrointestinal com extratos de romã e também ácido elágico (composto marcador antioxidante). Os resultados foram promissores na fitomedicina para o tratamento de doenças inflamatórias, alcançados através da inibição da migração leucocitária e da modulação de

citocinas pró-inflamatórias (PANICHAYUPAKARANANT *et al.*, 2010; MO *et al.*, 2013; KAMALI *et al.*, 2015).

III. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo principal a quantificação de marcadores químicos nos extratos da casca dos frutos de *Punica granatum* L. (romã), obtidos de regiões distintas do estado do Rio Grande do Sul, bem como adquiridas no comércio local, otimização dos fatores críticos para extração, desenvolvimento e validação de métodos analíticos por cromatografia líquida (CLAE e CLUE) para quantificação destes compostos e também avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* utilizando modelo de quimiotaxia.

Objetivos específicos

- Obter amostras de frutos de *P. granatum* de diferentes regiões do estado e comercializadas;
- Comparar e otimizar métodos extrativos da casca de *P. granatum*;
- Isolar os componentes majoritários presentes nos extratos utilizando técnica cromatográfica, para utilização como substâncias referência;
- Ensaio de pureza: determinar cinzas totais e teor de água nas amostras;
- Validar método cromatográfico de quantificação dos compostos por CLAE;
- Desenvolvimento de método utilizando CLUE;
- Verificar atividade anti-inflamatória *in vitro* utilizando o modelo da quimiotaxia dos extratos otimizados.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. 1. Material Vegetal

As amostras de *Punica granatum* L. foram obtidas entre o período de abril de 2015 a agosto de 2016, coletadas nas diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, incluindo colaboração da Embrapa – Pelotas, com diferentes cultivares do fruto, uma amostra do estado de São Paulo e amostras comerciais (Tabela 4).

Após, os frutos foram separados das cascas, e as mesmas foram submetidas à dessecação sob temperatura ambiente em local com sombra e ventilado por um período de dez dias (Figura 5). Por fim, a trituração do material ocorreu em moinho de facas, e o pó obtido foi armazenado em frascos apropriados ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

Tabela 4. Listagem das amostras de *P. granatum* L. e seus respectivos locais de coleta e/ou obtenção.

Amostra	Tipo	Origem	Data de coleta/obtenção
1	Coleta	Alegrete/RS	4/2015
2	Coleta	Colônia Cristal – Pelotas/RS*	5/2015
3	Coleta	Cascata – Pelotas /RS*	5/2015
4	Coleta	Capão do Leão/RS*	5/2015
5	Coleta	Morro Redondo/RS*	5/2015
6	Coleta	Morro Redondo/RS*	5/2015
7	Coleta	Antônio Prado/RS	11/2015
8	Coleta	Alegrete/RS	1/2016
9	Coleta	São Jerônimo/RS	3/2016
10	Coleta	Campinas/SP	5/2016
11	Comercial	Quimer®/SP	7/2016
12	Comercial	Florien®/SP	7/2016
13	Comercial	Chá e Cia®/RS	8/2016

*Amostras colaboração Embrapa – Pelotas.



Figura 5. Cascas do fruto de romã em processo de secagem.

IV. 2. Perda por dessecação

Seguindo normativa da Farmacopéia Brasileira (2010), foi realizada a técnica para determinação da perda por dessecação na qual, foram pesados cerca de 3,0g de cada amostra de casca do fruto de romã em pesa-filtro, previamente dessecado e tarado. Os pesa-filtros contendo as amostras foram levados à estufa a 105 ± 5 °C por três horas. Posteriormente, foram resfriados em dessecador. Os resultados foram expressos utilizando-se a média de três determinações para cada amostra.

Cálculo para determinação do percentual de perda de água:

$$PA(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_a} \times 100$$

Onde:

PA = perda de água.

Pa = peso da amostra (g).

Pi = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g).

Pf = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

IV. 3. Determinação de cinzas totais

O ensaio foi realizado, em triplicata, seguindo *Determinação de Cinzas Totais* da FB 5° ed. (2010).

Foram pesados, exatamente, entre 1,0 e 3,0 g da amostra pulverizada (180 µm), em cadinho de porcelana previamente tarado (2 h a 600 °C). A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C) foi utilizado. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca ao ar, através da equação abaixo.

Cálculo para determinação de Cinzas Totais:

$$CT (\%) = \frac{Pf - Pcv}{Pi} \times 100$$

Onde,

Pf = massa, em g, do cadinho + amostra após a incineração.

Pcv = massa, em g, do cadinho vazio antes da incineração.

Pi = massa, em g, da amostra.

IV. 4. Otimização do método extrativo

Para a otimização da extração de compostos fenólicos na casca de *P. granatum* L., utilizou-se a amostra coletada em Alegrete no ano de 2015 e inicialmente testes preliminares foram realizados para a definição do método extrativo. Testaram-se quatro técnicas, a citar: maceração; refluxo; banho de ultrassom e turbólise. Foram estabelecidos o uso de parâmetros idênticos em cada método testado, que foram definidos como: relação massa vegetal solvente extrator na proporção de 1:50 (g/mL) e mistura de metanol e água como solvente (80:20, v/v). Outros parâmetros como tempo e temperatura,

foram estabelecidos de acordo com as características de cada técnica extrativa. Para maceração, ultrassom e turbólise não foi utilizado o parâmetro temperatura. Na maceração, utilizou-se o tempo de três dias de extração, para a técnica de ultrassom trinta minutos e turbólise dez minutos. Para a extração por refluxo, empregou-se temperatura de 90 °C e tempo de quinze minutos.

Os extratos foram submetidos à análise por CLAE, conforme especificações demonstradas no item IV. 7.2, e a avaliação da resposta foi considerada como o somatório das áreas dos picos referentes às punicalaginas.

IV. 5. Desenho fatorial

Após a seleção do método extrativo, por refluxo, utilizou-se planejamento fatorial para a seleção de fatores significativos ao processo extrativo com auxílio de software estatístico Minitab[®]. Foram selecionados cinco fatores em um desenho experimental do tipo meio fatorial 2⁴. Os fatores selecionados foram: temperatura, granulometria, tempo, relação material vegetal/solvente extrator (m/v) e proporção hidrometanólica do solvente extrator (v/v), que foram analisados em 2 níveis diferentes, conforme especificado na Tabela 5. O desenho experimental gerou 16 experimentos, que foram conduzidos em unicata (Tabela 6). Após cada procedimento, os extratos foram avaliados por CLAE (conforme item IV. 7.2), e a avaliação da resposta foi considerada como o somatório das áreas dos picos referentes às punicalaginas.

Tabela 5. Descrição dos níveis e fatores avaliados no planejamento meio fatorial 2⁴.

Fator	Nome	Nível baixo	Nível Alto
A	Temperatura (°C)	70	90
B	M / V	0,5	1
C	Solvente (v/v)	60	90
D	Granulometria (µm)	355	500
E	Tempo (min)	15	30

Tabela 6. Desenho experimental do tipo meio fatorial 2^4 avaliando cinco fatores: (A) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); (B) relação massa vegetal:volume (g/mL); (C) % solvente; (D) Granulometria (μm) e (E) Tempo (min).

Ordem	Fatores				
	A	B	C	D	E
1	70	0,5	60	355	30
2	90	0,5	60	355	15
3	70	1,0	60	355	15
4	90	1,0	60	355	30
5	70	0,5	90	355	15
6	90	0,5	90	355	30
7	70	1,0	90	355	30
8	90	1,0	90	355	15
9	70	0,5	60	500	15
10	90	0,5	60	500	30
11	70	1,0	60	500	30
12	90	1,0	60	500	15
13	70	0,5	90	500	30
14	90	0,5	90	500	15
15	70	1,0	90	500	15
16	90	1,0	90	500	30

IV. 6. Otimização por desenho experimental de Box-Behnken

Para a otimização da extração, utilizando o desenho experimental de Box-Behnken, os efeitos de três variáveis independentes: temperatura (A) [60–80 $^{\circ}\text{C}$], relação material vegetal/solvente extrator (B) [1:75, 1:125 e 1:150; m/v] e proporção hidrometanólica do solvente extrator (C) [75, 85 e 95%;v/v], sobre a resposta foram investigados. Os experimentos foram estabelecidos em um desenho experimental com três fatores em três níveis (-1 0 e +1). Os fatores foram testados sob as condições demonstradas na Tabela 8, e os extratos

foram analisados por CLAE (item IV. 7.2). A resposta considerada foi à soma das áreas dos picos referentes às punicalaginas.

Tabela 7. Descrição dos três fatores avaliados na otimização da extração com desenho fatorial – Box-Behnken e seus respectivos valores de teste.

Fator	Nome	Unidade	Valor menor utilizado (-1)	Valor central utilizado (0)	Valor maior utilizado (+1)
1	Temperatura	°C	60	70	80
2	MV/solvente		1:75	1:125	1:150
3	Solvente	%	75	85	95

*MV = material vegetal.

Tabela 8. Desenho Box-Behnken avaliando três fatores: (A) Temperatura (°C); (B) relação massa vegetal:volume (g/mL); (C) % solvente.

Ordem	Fatores		
	A	B	C
1	60	0,750	85
2	80	0,750	85
3	60	1,500	85
4	80	1,500	85
5	60	1,125	75
6	80	1,125	75
7	60	1,125	95
8	80	1,125	95
9	70	0,750	75
10	70	1,500	75
11	70	0,750	95
12	70	1,500	95
13	70	1,125	85
14	70	1,125	85
15	70	1,125	85

IV. 7. Análise das amostras

IV. 7.1 Extração

Após a otimização do método extrativo, os extratos das cascas de *P. granatum* L. foram analisadas por CLAE (o método de análise está especificado no item IV. 7.2). Para tanto, pesou-se 187,5 mg das amostras (granulometria 355 μ m) em balão de fundo redondo de 100 mL e adicionou-se 25 mL de solução hidrometanólica (95%; v/v). O balão foi acoplado em sistema de refluxo com banho de água, e a extração ocorreu por 15 minutos. Após, o balão foi removido do sistema de refluxo e arrefecido, para posterior filtração com auxílio de funil e algodão para um novo balão de fundo redondo. Em seguida, o solvente extrator foi evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 45 °C até remoção total do solvente. O resíduo no balão foi dissolvido em metanol e avolumado para balão volumétrico de 10 mL. Após homogeneização da amostra, coletou-se alíquota de 0,5 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL, completando o volume com água ultra pura.

Para análise cromatográfica, uma alíquota dos extratos foi filtrada em filtro de PVDF e seringa (0,45 μ m de porosidade), e acondicionada em vial para análise por CLAE.

IV. 7.2. Desenvolvimento do método por CLAE

As análises foram desenvolvidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos em aparelho da marca Waters (e2695). Para as mesmas, utilizou-se coluna Kromasil® C₁₈ – 5 μ m x 4,6 mm x 150 mm, guarnecida de pré-coluna Phenomenex® C₁₈ (4 x 3,0 mm). O sistema de fase móvel utilizado foi gradiente linear, utilizando-se as misturas de água e ácido trifluoroacético (99,9: 0,01 v/v) como fase A; e acetonitrila e ácido trifluoroacético (99,2: 0,08 v/v) como fase B; com fluxo de 0,7 mL/min. O

comprimento de onda utilizado na análise foi de 256 nm. Os parâmetros utilizados na composição da fase móvel *versus* o tempo de análise estão descritos na Tabela 9. Todos os solventes utilizados para composição da fase móvel foram previamente filtrados através de membrana (HPLV 047 / Millipore) e desareados por 25 minutos em banho de ultrassom.

Tabela 9. Descrição do sistema gradiente com porcentagens da fase móvel utilizada para análise por CLAE.

TEMPO (MIN)	A%	B%
0	100	0
20	75	25
25	50	50
30	25	75

IV. 7.3. Isolamento das Punicalaginas

O extrato da amostra denominada Alegrete 15, obtido conforme descrito no item IV.7.1, foi fracionado em coluna semipreparativa composta por módulo de compressão radial Waters PrepLC e cartucho Waters PrepPak C₁₈ (25 x 100 mm), em aparelho Perkin Elmer S200. A fase móvel foi constituída por mistura de água e ácido trifluoroacético (0,08%, v/v) como fase A; acetonitrila e ácido trifluoroacético (0,01%, v/v), como fase B (Tabela 10). Utilizou-se modo gradiente linear, com fluxo de 5 mL/min e detector ajustado em comprimento de onda de 256 nm.

Tabela 10. Descrição do sistema gradiente com porcentagens da fase móvel utilizada para isolamento das punicalaginas por CLAE.

TEMPO (MIN)	A%	B%
0	95	5
10	75	25
15	50	50
20	25	75

IV. 8. Validação do método por CLAE-UV para quantificação de punicalaginas totais

O método para identificação e quantificação de taninos totais, punicalaginas, através de CLAE, foi validado segundo padrões de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Os parâmetros analíticos avaliados foram determinados segundo códigos oficiais como a Farmacopeia Americana (USP, 2015), International Conference on Harmonization (ICH, 2005), e a resolução da Agência de Vigilância Sanitária RE - nº 899 (ANVISA, 2003). Foram preparadas as amostras para análise conforme método extrativo otimizado e validado, utilizando como padrão interno a fração de punicalaginas obtidas a partir do extrato bruto. Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA).

IV. 8.1. Linearidade

A faixa de linearidade foi determinada a partir de curvas padrão composta por sete níveis de concentrações diferentes, conforme descrito na tabela 11. Utilizou-se como padrão o marcador punicalagina, isolado da casca do fruto de *P. granatum*, e as curvas foram obtidas em três dias consecutivos, sendo que foram realizadas três injeções (10 µL cada) para cada concentração, a partir de soluções distintas. Para cada curva, foram determinados a inclinação (a), a intersecção (b) e o coeficiente de correlação (r) (ICH, 2005; ANVISA, 2010; USP, 2015).

Tabela 11. Concentração utilizada em cada ponto da curva de linearidade.

Pontos da curva	Concentração (mg/mL)
1	0,538
2	0,615
3	0,692
4	0,769
5	0,846
6	0,923
7	1

IV. 8.2. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi estimado a partir das curvas padrão através da fórmula: $LD = DP\alpha \times 3 / IC$, onde:

- $DP\alpha$ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y (b) de, no mínimo, três curvas de calibração.
- IC é a inclinação (a) da curva de calibração (ANVISA, 2003; ICH, 2005; USP, 2015).

IV. 8.3. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi estimado a partir das curvas de calibração através da fórmula: $LD = DP\alpha \times 10 / IC$, onde:

- $DP\alpha$ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y (b) de, no mínimo, três curvas de calibração.
- IC é a inclinação (a) da curva de calibração (ANVISA, 2003; ICH, 2005; USP, 2015).

IV. 8.4. Repetibilidade e Precisão Intermediária

Através da repetibilidade, foram determinadas as médias das áreas dos picos dos taninos punicalagina A e punicalagina B de seis injeções consecutivas dos extratos brutos de *P. granatum* dentro de um mesmo dia (repetibilidade ou precisão intradia) e em três dias consecutivos (precisão intermediária ou interdia) e foram calculados os desvios padrão relativos (DPR) e coeficiente de variação (CV%), conforme preconizado pela ANVISA (2010).

IV. 8.5. Exatidão

Para a avaliação da exatidão da metodologia utilizou-se a adição e recuperação de quantidades conhecidas do isolado - padrão interno, na amostra. O ensaio foi realizado em triplicata, onde se adicionou concentrações equivalentes a 80, 100 e 120% (baixa, média e alta) da concentração teórica analisada (0,509 mg/mL).

IV. 8.6. Robustez

Para robustez do método, foram analisadas variações no fluxo (0,7 mL/min) para $\pm 0,05$ mL/min, mudança na marca da coluna com mesmas especificações e alteração do comprimento de onda (256 nm) para leitura (Tabela 12). Os procedimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 12. Parâmetros alterados e utilizados na etapa para verificar a robustez do método analítico.

	Nominal	Varição
Fluxo (mL/min)	0,7	0,75 – 0,65
Coluna (marca)	Kromasil®	NST®
λ (nm)	256	252 – 260

IV. 9. Desenvolvimento de método analítico – CLUE

O método em CLUE foi desenvolvido a partir da metodologia desenvolvida por CLAE e o extrato utilizado para o desenvolvimento foi o mesmo descrito no item IV. 7.1. As análises foram desenvolvidas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência da marca Waters, modelo Acquity, acoplada a detector de arranjo de diodos. Para as mesmas, utilizou-se coluna Waters Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 µm), guarnecida de pré-coluna Waters Acquity BEH C18 (5 x 2,1 mm x 1,7 µm). O sistema de fase móvel utilizado foi gradiente linear, utilizando-se as misturas de água e ácido trifluoroacético (99,9: 0,01 v/v) como fase A; e acetonitrila e ácido trifluoroacético (99,2: 0,08 v/v) como fase B; com fluxo de 0,15 mL/min. O comprimento de onda utilizado na análise foi de 256 nm. Os parâmetros utilizados na composição da fase móvel *versus* o tempo de análise estão descritos na Tabela 13. Todos os solventes utilizados para composição da fase móvel foram previamente filtrados através de membrana e desareados por 25 minutos em banho de ultrassom.

Tabela 13. Descrição do sistema gradiente com as porcentagens da fase móvel utilizada para análise por CLUE.

TEMPO (min)	A%	B%
0	100	0
6,67	75	25
8,33	50	50
10	25	75

IV. 10. Determinação da atividade antiquimiotóxica *in vitro*

Para a avaliação da atividade antiquimiotóxica *in vitro* empregou-se a técnica de Boyden modificada por Suyenaga e colaboradores (2011). Basicamente, o ensaio consiste em duas câmaras construídas em acrílico transparente, contendo poços de 0,5 mL de capacidade cada, dispostas uma sobre a outra. O compartimento inferior é preenchido com uma solução contendo o fator quimiotático (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - LPS) diluído em plasma, enquanto que o compartimento superior contém a suspensão de neutrófilos. Os compartimentos são separados por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 µm de diâmetro, através dos quais avalia-se a migração leucocitária no gradiente de concentração do fator quimiotático que se estabelecerá entre os dois compartimentos. Para esse ensaio, as amostras extrato bruto (coleta Alegrete/15), fração contendo punicalagina isolada e padrão de ácido gálico foram avaliadas nas concentrações de 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/mL. Como controle negativo empregou-se a solução de neutrófilos sem adição de agente antiquimiotático, enquanto que indometacina nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL foram utilizados como controle positivo.

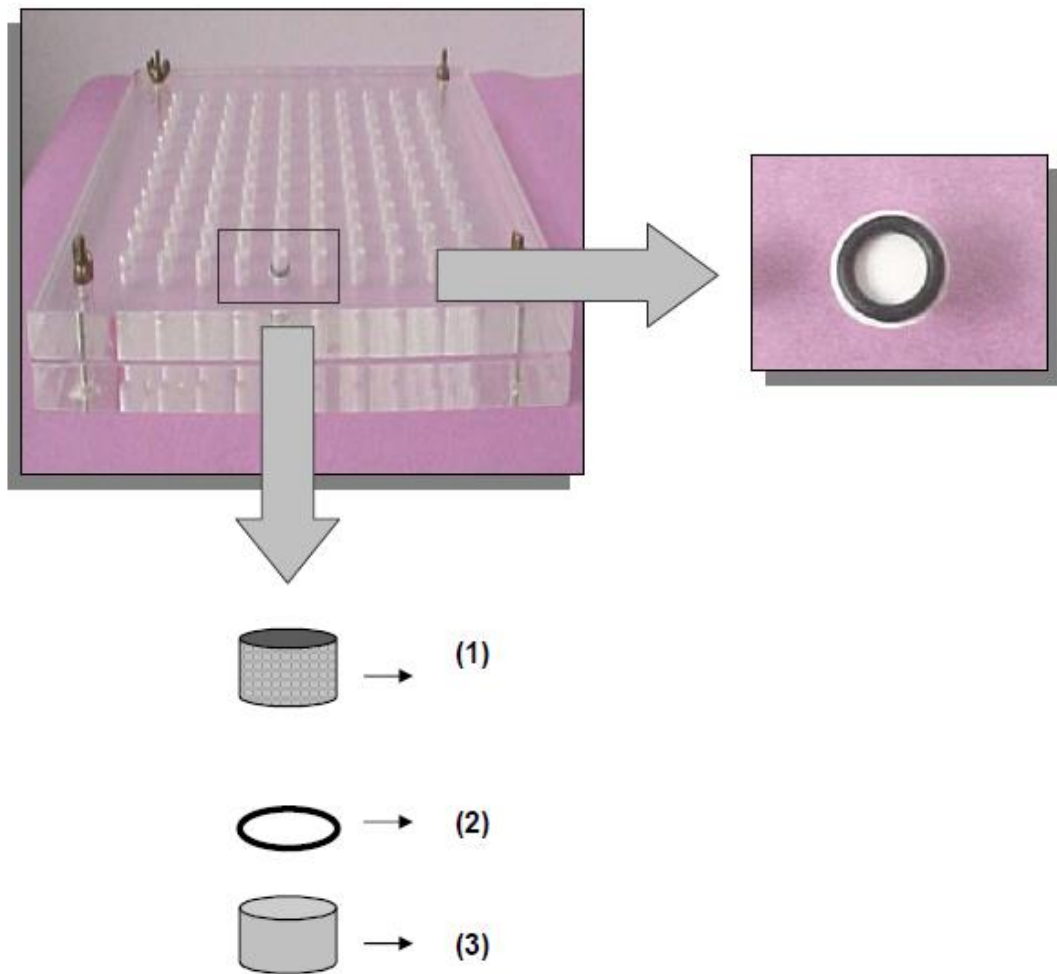


Figura 6. Montagem da câmara de Boyden; (1) compartimento superior: suspensão de neutrófilos + amostra; (2) filtro de nitrato de celulose; (3) compartimento inferior: plasma + fator quimiotático.

IV. 10.1. Obtenção do fator quimiotático

O material quimiotático utilizado nos experimentos foi obtido incubando-se plasma homólogo, por 30 minutos a 37° C, com solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), na concentração de 65 µg/mL. A interação do plasma com antígenos bacterianos ativa as via clássica e alternativa do sistema complemento, com consequente formação de fatores quimiotáticos para leucócitos. Após a incubação, o plasma foi diluído (V/V)

com solução de Hanks a 4%, para a obtenção das concentrações desejadas do material (20%).

IV. 10.2. Suspensões de neutrófilos

Para obtenção dos neutrófilos, foi administrada na cavidade peritoneal de um rato, uma solução de 10 mL de glicogênio a 1% em salina. Após um período de quatro horas, o animal foi sacrificado e recebeu uma injeção intraperitoneal de 60 mL de solução de Hank's, contendo 1UI/mL de heparina. O líquido da cavidade peritoneal foi recolhido e centrifugado, as células foram lavadas com tampão de Hank's e diluídas até contagem de $1,5 \times 10^6$ células em câmara de Neubauer. Os neutrófilos foram tratados com o extrato, a fração de punicalaginas isoladas, ácido gálico e indometacina, dissolvidos em solução salina balanceada de Hank's (HBSS pH 7,4), nas concentrações previamente estabelecidas e mantidos em banho-maria à 37 °C por 30 min. Posteriormente, essa suspensão de neutrófilos foi adicionada ao compartimento superior da câmara, sendo esta incubada a 37 °C durante 1 hora em atmosfera úmida.

IV. 10.3. Determinação da atividade migratória de leucócitos

Após o período de incubação na câmara, os filtros, triplicata de amostra, foram removidos, fixados, corados, diafanizados por 12 horas em xilol e montados entre lâmina e lamínula. A leitura dos mesmos foi realizada sob microscopia óptica, utilizando-se ampliação de 40 vezes (Microscópio Nikon, modelo Alphaphot-2 YS2 - Nikon), de forma a mensurar a distância da migração leucocitária, em micrômetros, entre o plano superior do filtro em relação ao plano inferior que contivesse duas células, em dez campos microscópicos. A análise estatística foi realizada empregando ANOVA seguido de Tukey.

V. RESULTADOS

As coletas da espécie em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul e uma amostra de São Paulo, como também em épocas do ano distintas, tiveram por intuito comparar e avaliar o perfil químico dos compostos presentes na casca da romã. Sabe-se que fatores como clima, solo e microambiente de cada local podem afetar a produção e constituição química das plantas. Dessa forma, utilizando-se condições cromatográficas otimizadas, descritas neste trabalho, constatou-se a grande semelhança no perfil cromatográfico de todas as amostras coletadas, incluindo amostra coletada no estado de São Paulo. Apresentando mesmo perfil, porém concentrações ligeiramente diferentes do composto majoritário, anômeros de punicalagina.

Ensaio de Pureza

Determinação de Água

Insumos farmacêuticos e matérias-primas de origem vegetal apresentam complexidade na composição química que está relacionada à variações ligadas às condições de cultivo, coleta e armazenamento. Assim, é de grande importância critérios de qualidade como a determinação de água, tendo em vista que a contaminação microbiológica e ação enzimática estão relacionadas diretamente com teores de umidade, alterando e contaminando a matéria prima e reduzindo eficácia do produto final.

O ensaio de perda por dessecação demonstrou que as cascas coletadas de *P. granatum*, após procedimento de secagem, apresentaram valores médios de material volátil de 9,73%, enquanto as três amostras comerciais apresentam valores médios de 10,3% conforme Tabela 14. Estes valores podem ser indicativos de que as condições de secagem e armazenamento foram adequadas para as amostras coletadas segundo a Farmacopeia Britânica (BRITISH, 2011). Os coeficientes de variação entre cada amostra como também entre as amostras foram satisfatório, menores que 5 %.

Tabela 14. Resultados da determinação de água para as amostras coletadas e amostras comerciais.

Água (%)						
Amostras	Replicatas			Média (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
	1	2	3			
1	10,236	9,872	9,720	9,943	0,2655	2,670
2	9,170	9,574	9,592	9,446	0,2385	2,525
3	9,946	9,934	10,053	9,978	0,0656	0,657
4	9,5673	9,6742	9,5749	9,605	0,0597	0,621
5	9,722	9,620	9,900	9,747	0,1417	1,454
6	9,917	9,929	9,995	9,947	0,0418	0,420
7	9,463	9,514	8,972	9,316	0,2994	3,214
8	9,707	9,787	9,703	9,732	0,0470	0,483
9	9,5914	9,6631	9,7528	9,669	0,0809	0,837
10	9,926	9,967	9,990	9,961	0,0322	0,323
11	10,080	9,994	10,102	10,059	0,0570	0,567
12	10,077	10,068	10,370	10,172	0,1720	1,691
13	10,6357	10,9879	11,0784	10,901	0,2338	2,145

Determinação de Cinzas Totais

Os testes para determinação de cinzas totais indicaram a quantidade de resíduo inorgânico que permanece após a incineração da matéria orgânica da amostra. Este ensaio é o ponto de partida para análise de minerais específicos, processo de determinação que apresenta grande valor em alimentos tanto para fins nutricionais como também para segurança, além de causar interferência durante a produção e limpeza de equipamentos na indústria.

As amostras da espécie foram analisadas em triplicata conforme especificações da Farmacopeia Brasileira 5° ed. (2010). Os resultados foram

obtidos calculando-se a porcentagem de resíduo em relação ao material vegetal seco e estão apresentados na Tabela 15. Os resultados mostram que o valor médio referente ao teor de cinzas das amostras de casca de romã é de 2,96% o que representa um valor adequado.

Tabela 15. Resultados da determinação de cinzas totais para as amostras coletadas e amostras comerciais.

Cinzas Totais (%)						
Amostras	Triplícatas			Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
	1	2	3			
1	3,13	3,17	3,15	3,15	0,0193	0,613
2	2,73	2,70	2,71	2,72	0,01438	0,5294
3	3,19	3,24	3,23	3,22	0,0212	0,659
4	3,26	3,21	3,22	3,23	0,0276	0,854
5	3,16	3,21	3,22	3,20	0,0325	1,018
6	3,16	3,15	3,19	3,17	0,0172	0,542
7	2,31	2,33	2,32	2,32	0,0110	0,472
8	2,73	2,68	2,73	2,71	0,0241	0,888
9	3,55	3,56	3,52	3,54	0,0238	0,673
10	3,18	3,17	3,21	3,19	0,0234	0,735
11	2,84	2,85	2,83	2,84	0,0127	0,448
12	2,31	2,33	2,32	2,32	0,0110	0,472
13	2,85	2,86	2,88	2,87	0,0150	0,523

Otimização extração

A verificação inicial com o objetivo de avaliar o perfil fitoquímico da casca do fruto de romã, utilizando amostra Alegrete 15 por diferentes métodos extrativos mostrou, conforme Figura 7, que os extratos apresentam um mesmo perfil químico, mesmo obtidos por técnicas bastante distintas.

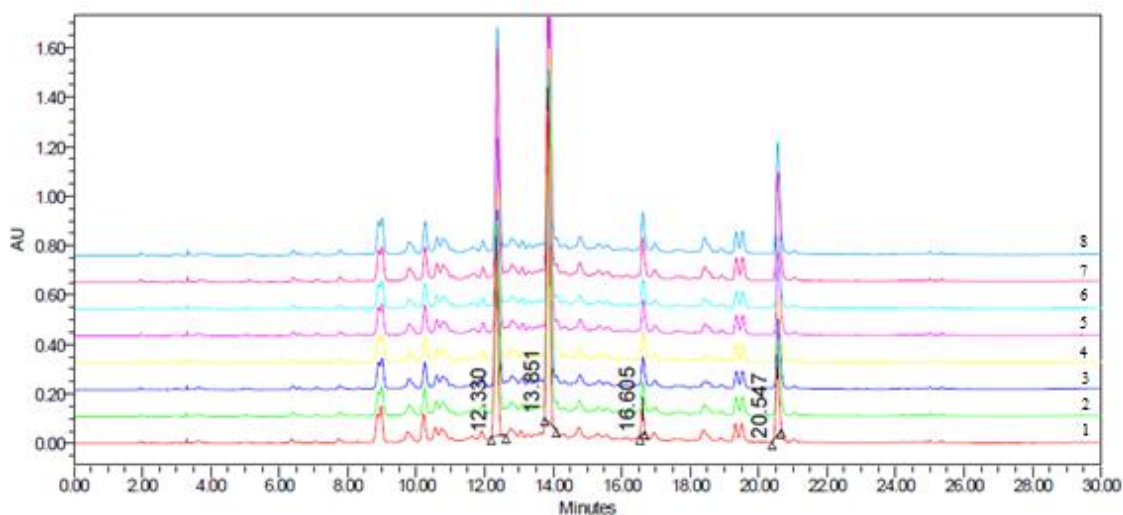


Figura 7. Sobreposição de cromatograma submetidos a mesmas condições de análise, avaliando extratos de casca do fruto de romã em dois tamanhos de partícula diferentes e obtidos por diferentes técnicas extrativas. (1) maceração - 500 μ m; (2) maceração - 300 μ m; (3) ultrassom - 500 μ m; (4) ultrassom - 300 μ m; (5) ultraturrax - 500 μ m; (6) ultraturrax - 300 μ m; (7) refluxo - 500 μ m; (8) refluxo - 300 μ m.

Levando-se em consideração o somatório das áreas dos picos dos compostos majoritários dos extratos analisados e obtidos de diferentes técnicas de extração, selecionou-se como melhor forma extrativa a técnica de refluxo, a qual apresentou maiores concentrações de punicalaginas, apesar de um menor rendimento do extrato bruto total, conforme Tabela 16. Isso indica que a técnica extrativa por refluxo seja mais seletiva, apresentando maior rendimento dos compostos de interesse, sendo ainda uma técnica rápida para obtenção dos extratos.

Tabela 16. Descrição dos valores de rendimento (%) encontrados nas diferentes técnicas extrativas para casca do fruto de *P. granatum* e somatório da área dos picos de punicalaginas obtidos por CLAE.

Extração	Rendimento (%)	Extração	Somatório área
Maceração	51,17	Maceração	16304560
Ultrassom	55,67	Ultrassom	15412580
Ultraturrax	53,35	Ultraturrax	14980517
Refluxo	50,49	Refluxo	19204385

Após a definição do método a ser utilizado, iniciou-se o processo de otimização desta extração, com auxílio do programa estatístico Minitab[®]. Primeiramente utilizou-se o planejamento meio fatorial 2⁴ para refino e seleção de fatores com maior influência sobre o processo extrativo. Avaliaram-se cinco parâmetros de maior relevância: temperatura; massa/volume; concentração do solvente; granulometria e tempo, descritos com seus respectivos resultados na Tabela 17.

Tabela 17. Delineamento experimental meio fatorial 2^4 e somatório das áreas dos compostos fenólicos analisados e extraídos por refluxo.

EXP.	A	B	C	D	E	SOMA ÁREAS
1	-1	-1	-1	-1	1	12091738
2	1	-1	-1	-1	-1	18181980
3	-1	1	-1	-1	-1	23617756
4	1	1	-1	-1	1	12908376
5	-1	-1	1	-1	-1	19339797
6	1	-1	1	-1	1	20401718
7	-1	1	1	-1	1	26525984
8	1	1	1	-1	-1	13335824
9	-1	-1	-1	1	-1	13505641
10	1	-1	-1	1	1	13238676
11	-1	1	-1	1	1	19236943
12	1	1	-1	1	-1	19170824
13	-1	-1	1	1	1	22889942
14	1	-1	1	1	-1	12346844
15	-1	1	1	1	-1	24908346
16	1	1	1	1	1	12974960

A = temperatura (-1=70; 1=90°C); B = m/v (-1=0,5; 1=1,0 g/mL); C = Etanol (-1=60; 1=90%); D = Granulometria (-1=355; 1=500 μ m); E = Tempo (-1=15; 1=30 min).

Cada ordem especificada conforme a condição descrita na Tabela 17 foi realizada em duplicata, cada um destes extratos foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as áreas dos picos dos compostos majoritários e de interesse foram utilizadas como resposta (Soma das Áreas). Estes dados obtidos foram processados estatisticamente e geraram-se gráficos resposta como resultado, indicando os fatores que expressam maior influência na extração.

Analisando os resultados obtidos no desenho experimental e expresso no Gráfico 1, podemos dizer que os fatores temperatura, granulometria e tempo apresentam melhores resultados no menor nível (influenciam de forma inversamente proporcional), enquanto a proporção de metanol e razão m/v apresentam melhores respostas nos níveis mais altos (influenciam de forma proporcional). Ainda, pode-se perceber que os fatores temperatura, proporção de solvente e razão m/v, foram os que mais influenciaram na resposta.

Pela análise dos efeitos gerados, é possível perceber que os cinco fatores testados não afetaram a resposta de forma estatisticamente significativa (Gráfico 2). O fator A (temperatura), e a interação AB (temperatura*relação massa: solvente) aparecem como fatores de maior influência nos resultados.

Gráfico 1. Efeitos principais de cada fator testado no meio fatorial com base no somatório de áreas referentes à punicalaginas.

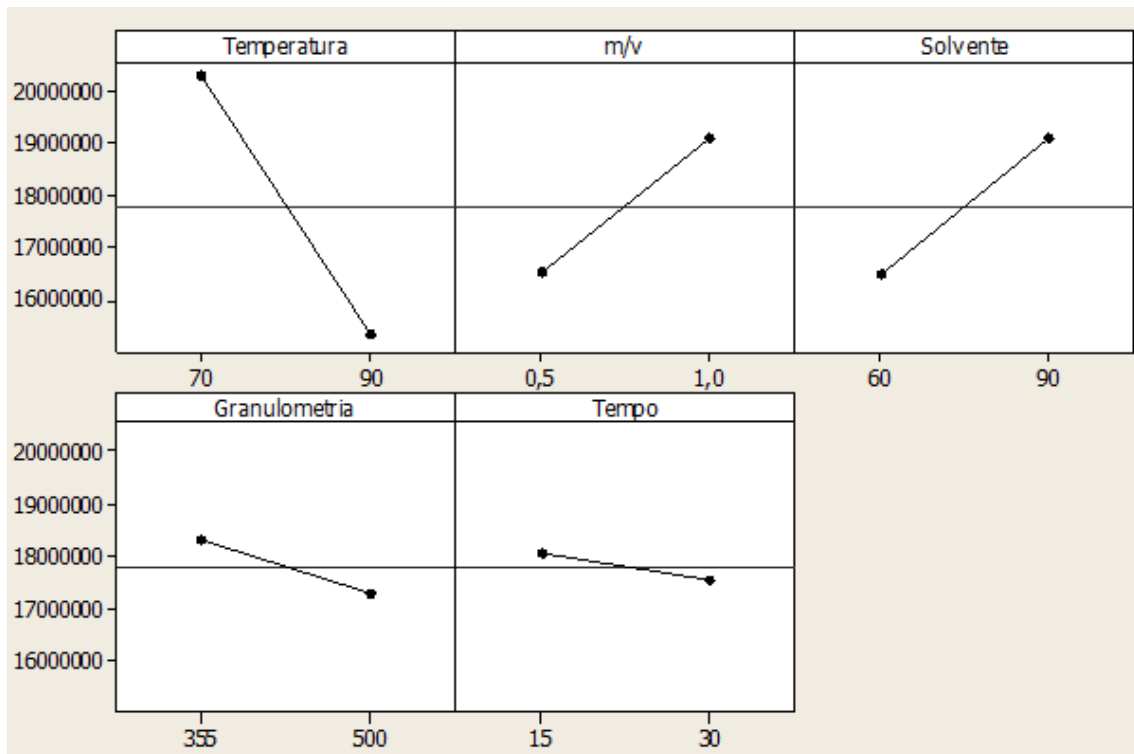
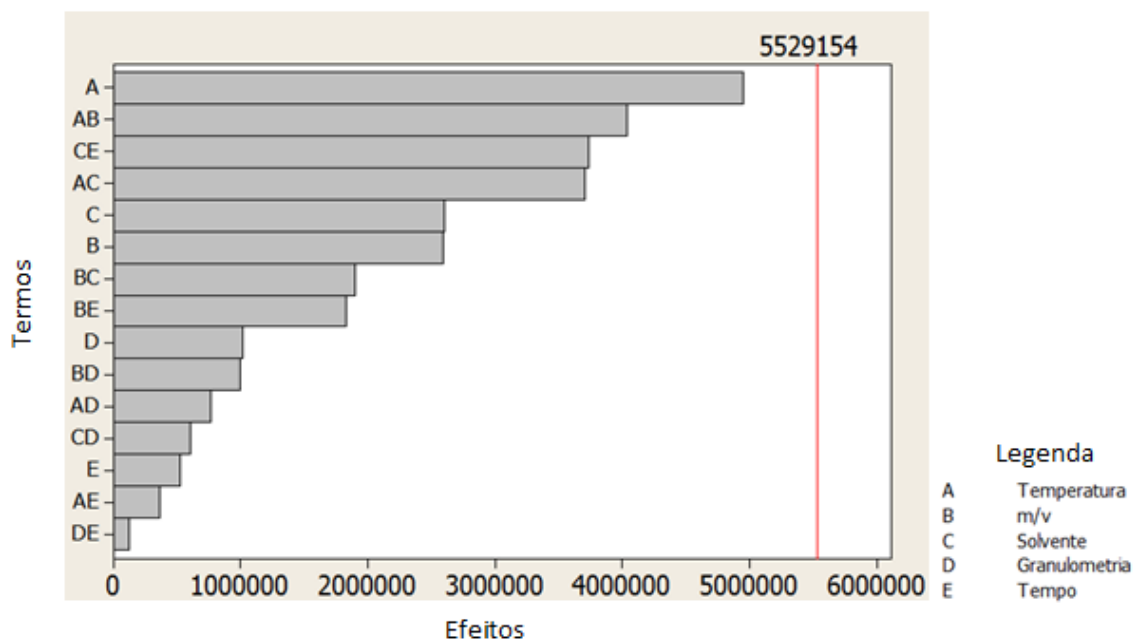


Gráfico 2. Resultados evidenciando os efeitos de cada fator sobre a extração, expressos em gráfico de Pareto ($\alpha = 0,1$).



Após o refinamento preliminar da técnica de extração, o desenho experimental obtido pela metodologia de superfície de resposta Box-Behnken, gerou quinze experimentos independentes. Os fatores utilizados agora, temperatura, proporção de solvente e razão m/v, foram os que tiveram maior influência anteriormente. A granulometria e o tempo que não apresentaram diferença significativa entre o maior e menor nível na análise preliminar optou-se por utilizar valores de 355µm para granulometria e o nível mais baixo de tempo, quinze minutos.

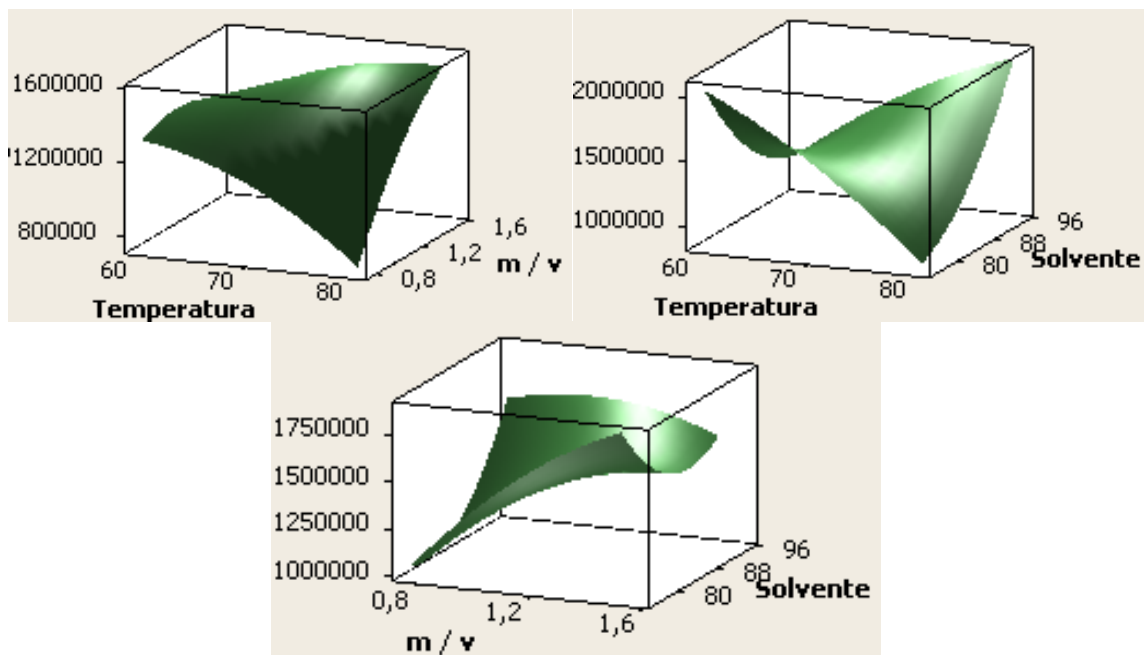
Tabela 18. Delineamento experimental de superfície de resposta Box-Behnken e somatório das áreas dos compostos fenólicos analisados. Temperatura expressa em °C; a relação massa/volume de material vegetal/solvente representada em relação a proporção (0,75 = 1:75, 1,125 = 1:125, 1,5 = 1:150); solvente metanol representado em porcentagem.

EXP.	Temperatura	m / v	Solvente	Soma Áreas
1	60	0,750	85	1489193
2	80	0,750	85	663650
3	60	1,500	85	1329899
4	80	1,500	85	1392176
5	60	1,125	75	1890705
6	80	1,125	75	994154
7	60	1,125	95	1009899
8	80	1,125	95	2203178
9	70	0,750	75	1019906
10	70	1,500	75	1932390
11	70	0,750	95	1568393
12	70	1,500	95	1576163
13	70	1,125	85	1550215
14	70	1,125	85	1548195
15	70	1,125	85	1642609

Os efeitos dos fatores e suas interações podem ser observados no Gráfico 3, de Superfície de Resposta, onde apresenta os resultados obtidos com base nos valores da soma das áreas em relação às punicalaginas de cada experimento e gerados pelo software utilizado.

As áreas mais escuras do gráfico representam as maiores respostas obtidas. Assim, é possível observar que as interações solvente*temperatura e solvente*massa/volume foram as mais significantes. Já a interação de massa/volume*temperatura apresenta uma área ampla com maiores respostas, com áreas menos escuras e assim menos significantes.

Gráfico 3. Diagrama de superfície de resposta para a interação entre temperatura, porcentagem de solvente e razão massa/solvente.

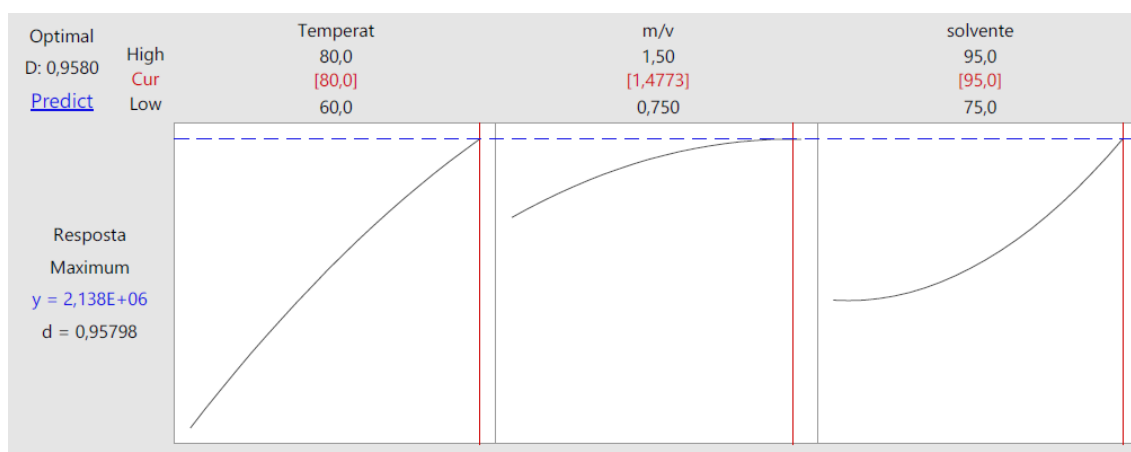


Também se podem observar estes resultados nos gráficos de superfície de resposta, representação em três dimensões dos resultados, pelas inclinações produzidas a partir dos resultados obtidos da soma das áreas das punicalaginas.

A análise dos gráficos mostram os valores intermediários de cada fator, sendo a temperatura em torno do ponto mais alto (80 °C), assim como a relação m/v e concentração de solvente nos pontos mais altos, em torno de 1,4 – 1,6 e 93 – 96% respectivamente.

A partir do software foi possível obter os parâmetros ótimos para a extração de punicalaginas em cascas do fruto de *Punica granatum* L. As condições ótimas podem ser visualizadas no Gráfico 4.

Gráfico 4. Resposta otimizada para extração a partir do Box-Behnken para a determinação do teor de punicalaginas totais em *P. granatum*, via Minitab 17.



A partir da análise dos resultados, observou-se que os parâmetros temperatura e concentração do solvente (metanol), tiveram influência estatisticamente significativa ($p < 0,5$) nas respostas avaliadas. A razão variável da massa vegetal e solvente não demonstrou influência estatisticamente significativa ($p < 0,5$).

Tabela 19. Valores de superfície de resposta encontrados na otimização da extração de *P. granatum* por Box-Behnken avaliando o somatório das áreas de punicalaginas obtidos por CLAE de três fatores, temperatura; massa:solvente e porcentagem de metanol.

Termos	Coefficiente	Coefficiente SE	T	P
Constante	1413673	155519	9,090	0,000
Temperatura	-58317	95235	-0,612	0,567
m/v	186186	95235	1,955	0,108
Solvente	65060	95235	0,683	0,525
Temperatura*temperatura	-97336	140183	-0,694	0,518
m/v*m/v	-97607	140183	-0,696	0,517
Solvente*solvente	208147	140183	1,485	0,198
Temperatura*m/v	221955	134683	1,648	0,160
Temperatura*solvente	522458	134683	3,879	0,012
m/v*solvente	-226179	134683	1,679	0,154

A otimização da extração de compostos fenólicos da casca de frutos de *P. granatum*, utilizando o desenho experimental Box-Behnken, indicou que os parâmetros ótimos de extração são utilizando a técnica extrativa por refluxo a uma temperatura de 80 °C, a relação massa vegetal e solvente na proporção de 1:147 p/v e concentração de metanol a 95%.

Tabela 20. Valores de desvio padrão e coeficiente e variação a partir das áreas médias do somatório de punicalaginas utilizando metodologia definida como ótima através dos resultados anteriores da otimização da extração via Box-Behnken.

VALIDAÇÃO - Box Behnken						
Somatório das áreas de Punicalagina A e B						
Extrato	Área 1	Área 2	Área 3	Áreas médias	Desvio padrão	CV (%)
1	438438	441748	444037	441408	2814,97	0,6377
2	460915	466673	466195	464594	3195,35	0,6878
3	468300	472984	475558	472281	3679,76	0,7791
4	469446	475961	472858	472755	3258,72	0,6893
5	440524	445977	447506	444669	3670,18	0,8254

A capacidade preditiva do modelo matemático gerado foi avaliada através da análise de cinco extrações, cada uma em triplicata, avaliadas sob as condições ótimas de extração, 80 °C para a temperatura de aquecimento, tempo de 15 minutos, relação MV/solvente 1:147 p/v, 95% de concentração do solvente extrator e granulometria 355µm.

Os valores encontrados encontram-se dentro dos limites e valores preditos pelo software, apresentando CV médio igual a 0,72%, assim a validação do desenho Box–Bhenken foi considerada satisfatória.

Validação do método analítico

Para escolher o método analítico por CLAE/UV e suas melhores situações cromatográficas, preliminarmente foram realizados e testados vários ensaios, estes baseados em métodos descritos na literatura para compostos fenólicos.

Os testes realizados avaliaram diferentes parâmetros, entre eles: concentração das amostras, composição e fluxo da fase móvel, comprimento de onda (λ) considerando a intensidade dos picos e a estabilidade da linha de base, temperatura de análise e colunas cromatográficas, juntamente observadas à resolução dos picos e o tempo total de análise.

Apesar de serem encontradas na literatura técnicas cromatográficas para análise de amostras de extrato da casca de romã, a metodologia proposta por CLAE/UV se mostrou mais eficaz. A coluna de separação juntamente com a composição da fase móvel e os demais parâmetros do método apresentaram melhor resolução/separação cromatográfica e utilizou 30 minutos de tempo de análise (Figura 8). Os tempos de retenção (TR) obtidos para os isômeros, punicalagina α e β , foram iguais a 13 e 14,6 min, respectivamente.

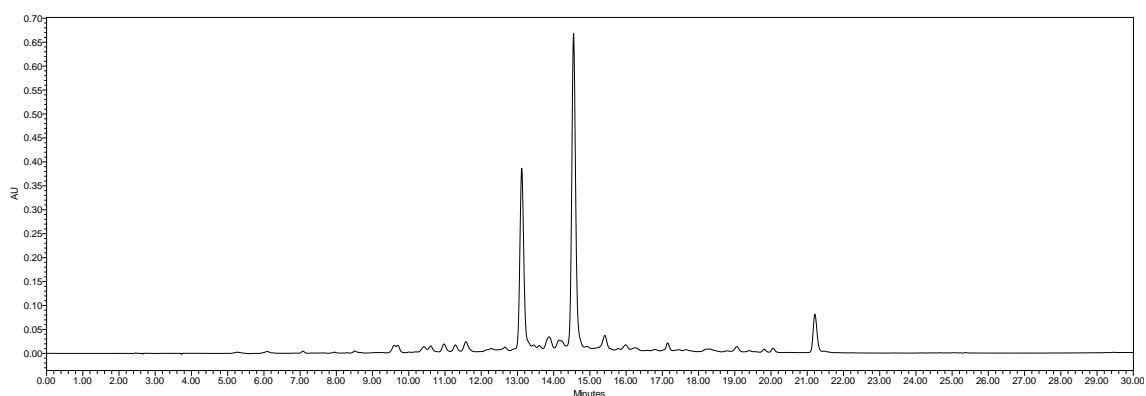


Figura 8. Cromatograma de análise do extrato alcoólico bruto de casca de *P. granatum* (Alegrete/15) utilizando CLAE/DAD. Fase móvel: água:TFA 0,01% e acetonitrila:TFA 0,08%, fluxo 0,7mL/min, coluna Kromasil® C₁₈ (5 μ m x 4.6mm x 150mm), guarnecida com pré coluna, detecção em 256nm e volume de injeção de 10 μ L.

Especificidade/Seletividade: foram injetadas soluções contendo o padrão interno obtido e também a solução amostra (extrato bruto) que foram comparados através dos espectros de ultravioleta, referentes à banda do marcador químico e estão demonstrados na Figura 9, a qual mostra que ambas as amostras analisadas apresentam o mesmo espectro de UV.

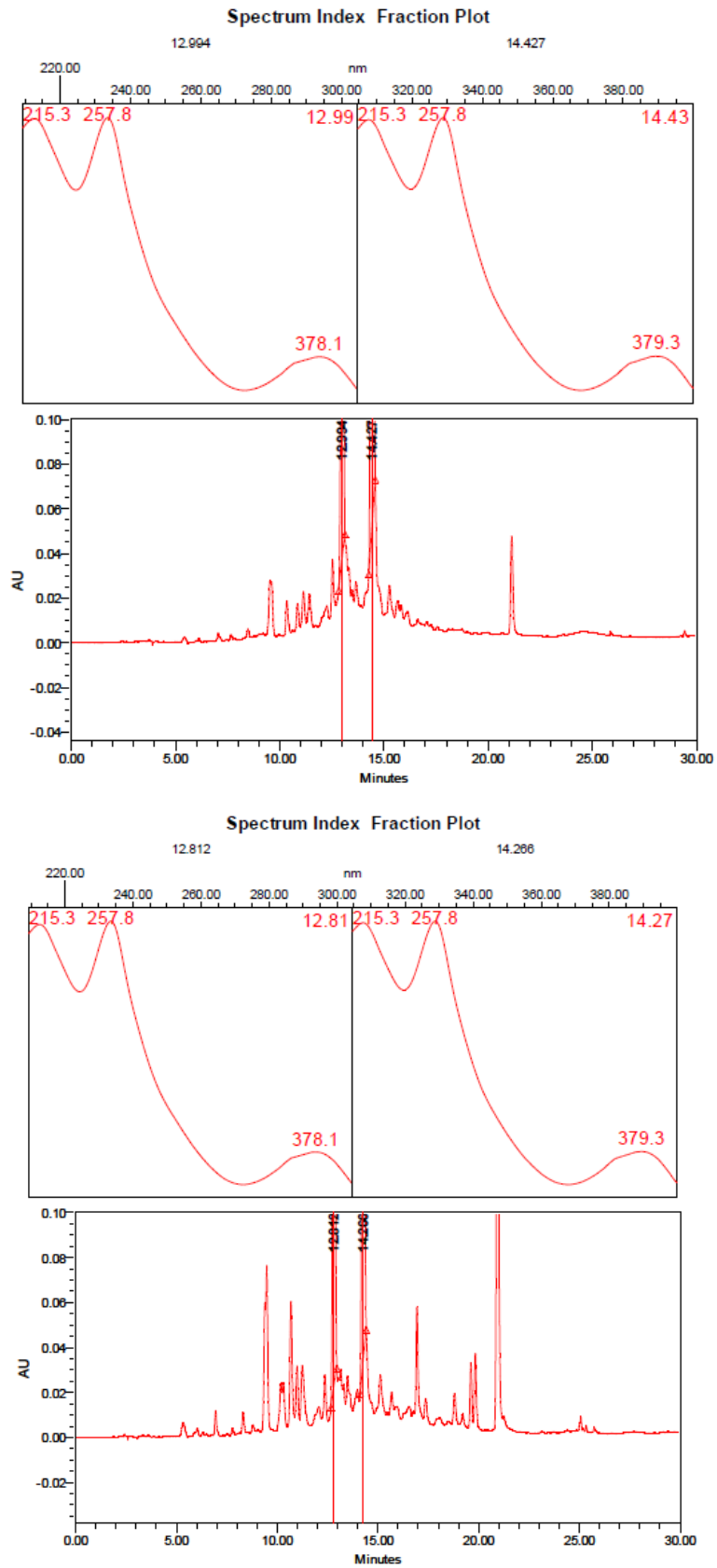


Figura 9. Espectros de UV e cromatogramas dos anômeros punicalagina α e β , adquiridos por CLAE-DAD a partir da fração de punicalaginas, utilizado como padrão interno e extrato bruto da casca do fruto de *P. granatum*, respectivamente.

A curva de calibração do método foi construída a partir de sete pontos na faixa de 0,538-1 mg/mL, em três dias distintos. Para avaliar a linearidade da faixa testada foi utilizada a regressão linear significativa pelo método dos mínimos quadrados ordinários (ANOVA). Obteve-se um R^2 na ordem de 0,99 em todas as equações, estando de acordo com as especificações e observando-se um aumento proporcional da razão das áreas em relação à concentração dos analitos. Na Tabela 21 estão apresentadas as áreas médias dos picos referentes às punicalaginas para cada concentração injetada no CLAE. O gráfico da linearidade média, a equação da reta e o coeficiente de regressão estão ilustrados no Gráfico 5.

Tabela 21. Média das áreas obtidas dos dias 1, 2 e 3 da linearidade por CLAE.

Linearidade Média			
Concentração (mg/mL)	Áreas médias	Desvio padrão	CV (%)
0,538	5773518	199903,14	3,462
0,615	6746760	204527,90	3,031
0,692	7836089	94791,90	1,210
0,769	8692423	231717,82	2,666
0,846	9396537	199786,80	2,126
0,923	10284539	50501,09	0,491
1,000	11008621	224016,01	2,035

Gráfico 5. Curva padrão média de punicalagina, equação da reta e coeficiente de regressão, obtido nos dias 1,2 e 3 da linearidade obtida por CLAE.

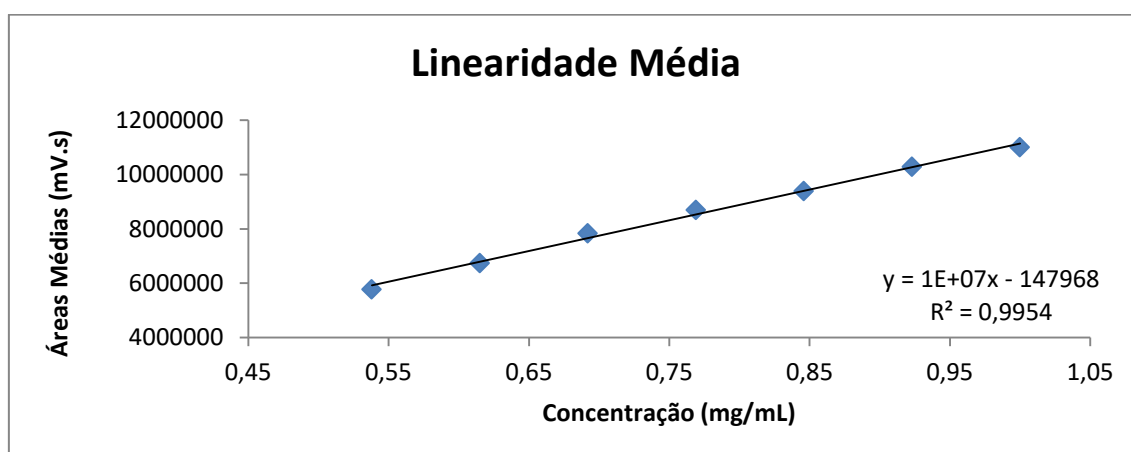


Tabela 22. Análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos pela linearidade da curva padrão de punicalagina – CLAE.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2,5491E+14	1	2,54906E+14	143,8876142	4,85701E-08	4,747225347
Dentro dos grupos	2,1259E+13	12	1,77156E+12			
Total	2,7616E+14	13				

Os resultados da curva padrão obtidos por CLAE e utilizando ANOVA, apresentam regressão linear significativa entre as diferentes concentrações ($p < 0,05$) e também não apresenta desvio de linearidade ($F > F_{crítico}$). O R^2 ($r = 0,9954$) está de acordo com as especificações, indicando ainda correlação entre as áreas absolutas e a concentração das punicalaginas, com intervalo de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$).

Os valores obtidos para a determinação dos Limites de Detecção (LD), considerado como a menor concentração da substância capaz de ser detectada nas condições experimentais e Limites de Quantificação (LQ), menor concentração da substância capaz de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, por método de CLAE para a substância de referência de acordo com os parâmetros obtidos com a equação média da reta, foram calculados a partir da média dos coeficientes de regressão linear e do desvio padrão médios dos interceptos. Os resultados podem ser observados na tabela abaixo, indicando que o método apresenta boa sensibilidade com baixos valores de LD e LQ.

Tabela 23. Valores obtidos para a determinação de LD e LQ para as punicalaginas do extrato bruto de romã.

Limite de Quantificação	0,238 mg/mL
Limite Detecção	0,078 mg/mL

Na tabela 24 estão representados os resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária, que verifica a variação da metodologia em diferentes dias de análise. Os teores médios de punicalaginas variaram de $8,6916 \pm 0,04$

a $9,5261 \pm 0,04$ g/%, os desvios padrão relativos (DPR%) e os coeficientes de correlação (CV%) nas extrações realizadas no mesmo dia e em três dias consecutivos foram adequados (<5%), desta forma, demonstra que o método apresenta apropriada precisão.

Tabela 24. Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação do teor de punicalaginas totais de *P. granatum* por CLAE.

Dia	n	Área média ± DP	Teor de punicalaginas (g%)	Média (g%) ± DP	DP (%)	CV (%)
1	1	7335842 ± 16335	9,308	9,1836 ± 0,15	1,49	1,65
	2	7126972 ± 24945	9,014			
	3	7279435 ± 23961	9,227			
2	1	6858678 ± 50473	8,689	8,691 ± 0,04	0,43	0,47
	2	6843430 ± 15324	8,651			
	3	6901304 ± 8268	8,734			
3	1	7536915 ± 61537	9,553	9,526 ± 0,04	0,50	0,46
	2	7510027 ± 40632	9,550			
	3	7462589 ± 35224	9,474			
Média (inter-dias) (mg/g) ± DP				9,133	0,41	4,592

Cada ponto corresponde à média de três determinações; DP: desvio padrão; Concentração (g%): g de punicalagina por 100g de amostra; DPR: desvio padrão relativo (%); n: replicatas.

A repetibilidade do método, avalia a precisão do método analítico e as variáveis deste método dentro de um mesmo dia, verificada por 6 extrações realizadas no mesmo dia, está representada na tabela 25. O teor médio de punicalaginas foi de 9,425. O DPR observado para a sextuplicata foi de 0,10 % e o CV% = 1,127, o que demonstra que o método apresenta adequada precisão-repetibilidade.

Tabela 25. Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de punicalaginas totais de *P. granatum* por CLAE.

Extrações	Massa (g)	Áreas médias	Teor de punicalaginas (g%)
1	0,1690	7506109	9,5146
2	0,1696	7497292	9,5338
3	0,1693	7442347	9,4489
4	0,1691	7391370	9,3742
5	0,1688	7302974	9,2424
6	0,1692	7436246	9,4361

Média ± DP: 9,4250 ± 0,10 g%; CV (%): 1,12

A proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor teórico é chamada de exatidão de um método analítico. A exatidão do método por CLAE/UV foi avaliada, sendo realizada pelo teste de recuperação para as punicalaginas. Pelos resultados adquiridos ficou evidenciado que o método desenvolvido mostrou-se exato, conforme está demonstrado na Tabela 26, levando-se em consideração os DPR obtidos e as condições experimentais avaliadas.

Tabela 26. Resultados do ensaio de exatidão (recuperação) para o método de quantificação de punicalaginas em amostra de *P. granatum* por CLAE.

Amostra*	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração média encontrada (µg/mL)**	Recuperação média (%)	Média (%)	DP (%)	CV (%)
Controle	-	27,07	-			
80%*	23,82	51,3	101,8			
100%*	29,78	57,2	101,1			
120%*	35,73	63,8	102,8			
Média				101,9	0,900	0,883

*porcentagem de adição do padrão na amostra.

**cada valor refere-se à média de três amostras analisadas em relação às punicalaginas.

Os resultados da etapa de exatidão foram satisfatórios, uma vez que a legislação preconiza percentual de recuperação entre 95 – 105 % em relação às concentrações de SQR adicionadas à solução amostra. Os teores recuperados dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente comprovam a exatidão do método desenvolvido.

A robustez avalia a capacidade que o método apresenta em se manter estável através de pequenas variações realizadas nos fatores que potencialmente afetariam as condições analíticas do método. Esta foi avaliada alterando-se os parâmetros de fluxo, coluna analítica de mesmas especificações, porém marcas diferentes e comprimento de onda, conforme descrito na metodologia. Os resultados (Tabela 27) demonstraram que não houve influência sobre a determinação quantitativa de punicalaginas após as variações no método descritas. O teor médio encontrado foi de 9,209 e o DPR (%) resultante de 0,12%. Desta forma, conclui-se que o método desenvolvido resiste a pequenas variações sem prejuízo à confiabilidade analítica.

Tabela 27. Resultados obtidos nos parâmetros avaliados na etapa de robustez.

Parâmetros	Teor de punicalaginas (g%)	
Fluxo (mL/min)	0,65	9,271
	0,7	9,277
	0,75	9,183
Coluna (marca)	Kromasil®	9,277
	NST®	8,908
λ (nm)	252	9,229
	256	9,277
	260	9,251

A transferência do método analítico desenvolvido por CLUE/DAD, baseado na metodologia por CLAE, incluiu uma adaptação no volume de injeção e do fluxo de fase móvel, mantendo-se o mesmo sistema gradiente de fase móvel utilizado. Neste método, nota-se a interferência do comprimento da coluna e também a maior pressão imposta pelo sistema em relação ao tempo de retenção da análise, onde os anômeros das punicalaginas aparecem com tempos de retenção em torno de 5,55 e 6,35 minutos. Além disso, o tempo total de análise foi otimizado em dez minutos, tempo suficiente para separação dos compostos com boa resolução dos sinais.

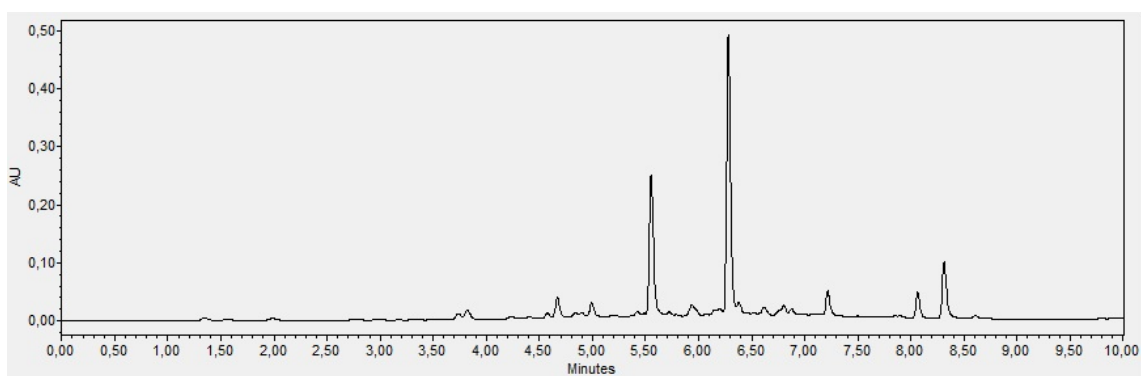


Figura 10. Cromatograma de análise do extrato alcoólico bruto da casca (Alegrete/15) de *P. granatum* utilizando CLUE/DAD. Fase móvel: água:TFA 0,01% e acetonitrila:TFA 0,08%, fluxo 0,15mL/min, coluna Waters Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 μ m), guarnecida com pré coluna e detecção em 256nm.

Determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

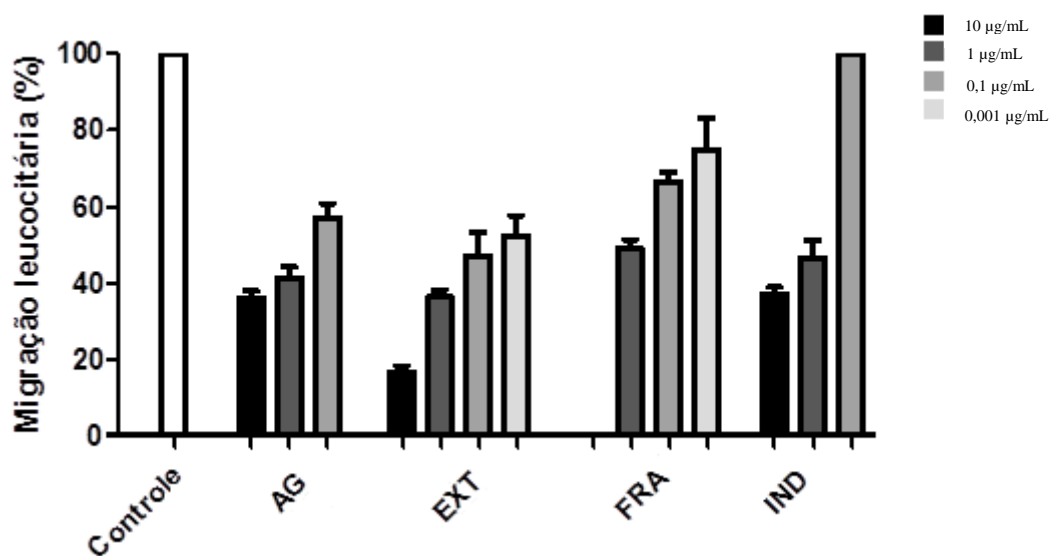
O processo de quimiotaxia, caracterizado pela migração e acúmulo de células inflamatórias ao local da injúria, é uma das primeiras e principais etapas numa reação inflamatória (MEDZHITOV, 2008; MCDONALD *et al.*, 2010). Dessa forma, a capacidade do extrato bruto e também da fração de punicalaginas obtidos da casca do fruto de *P. granatum* em inibir a migração leucocitária foi determinada pelo ensaio de anti-quimiotaxia, através do método da câmara de Boyden. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 28 e expressos em percentual de migração leucocitária em relação ao controle negativo. Indometacina, utilizada como controle positivo, inibiu 62,9% da migração na maior concentração testada (10 µg/mL). Leucócitos polimorfonucleares tratados com 0,1, 1 e 10 µg/mL do padrão de ácido gálico, apresentaram redução na migração de 43, 58,5 e 63,8%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo. Tanto o extrato bruto quanto a fração demonstraram resultados positivos e significativos perante a inibição da migração leucocitária. O extrato bruto mostrou percentuais de inibição de 82, 63,6, 52,6 e 42,8%, respectivos às concentrações 10, 1, 0,1 e 0,001 µg/mL. Já a fração contendo os anômeros de punicalagina apresentou inibição total da migração na concentração de 10 µg/mL, e nas concentrações mais baixas inibições de 50,9, 33,3 e 26,2% respectivamente. Na comparação entre os efeitos apresentados pelas amostras testadas, em todas as concentrações, podemos observar que o extrato bruto apresenta maiores efeitos que o padrão de ácido gálico, com maior porcentagem de inibição da migração dos leucócitos. Entre o extrato bruto e fração em iguais concentrações, podemos observar que a fração punicalaginas apresenta melhores respostas de inibição apenas na concentração mais elevada (10 µg/mL), já nas concentrações mais baixas, o extrato bruto aparece com maior potencial anti-inflamatório *in vitro*. Ainda, o padrão de ácido gálico não apresenta diferença significativa em relação à indometacina. Já o extrato e a fração na concentração mais alta, 10 µg/mL, reduziram significativamente ($p < 0,05$) a migração leucocitária em direção ao quimioatrativo LPS, em relação às mesmas concentrações testadas para indometacina, indicando potencial atividade inibitória. Estes resultados

podem ser observados com maior clareza no gráfico 6 e corroboram com estudos realizados por Mo e colaboradores (2013) onde testaram a atividade anti-inflamatória dos extratos de *P. granatum* L.

Tabela 28. Resultados do teste da câmara de Boyden para padrão de ácido gálico, extrato bruto da casca de *P. granatum* e fração punicalagina em diferentes concentrações.

Amostra	Migração (μm)	% de inibição
Controle	47,4	0
P. ác. Gálico 10 $\mu\text{g/mL}$	17,1	63,8
P. ác. Gálico 1 $\mu\text{g/mL}$	19,7	58,5
P. ác. Gálico 0,1 $\mu\text{g/mL}$	27,0	43,0
Extrato bruto 10 $\mu\text{g/mL}$	8,5	82,0
Extrato bruto 1 $\mu\text{g/mL}$	17,3	63,6
Extrato bruto 0,1 $\mu\text{g/mL}$	22,4	52,6
Extrato bruto 0,001 $\mu\text{g/mL}$	27,1	42,8
Fração 10 $\mu\text{g/mL}$	0,0	100
Fração 1 $\mu\text{g/mL}$	23,3	50,9
Fração 0,1 $\mu\text{g/mL}$	31,6	33,3
Fração 0,001 $\mu\text{g/mL}$	35,0	26,2
Indometacina 10 $\mu\text{g/mL}$		62,9
Indometacina 1 $\mu\text{g/mL}$		
Indometacina 0,1 $\mu\text{g/mL}$		

Gráfico 6. Resposta da atividade anti-inflamatória *in vitro* das amostras (AG): padrão ácido gálico; (EXT): extrato bruto; (FRA): fração punicalagina e (IND): indometacina em diferentes concentrações, perante a migração leucocitária.



VI. DISCUSSÃO GERAL

A espécie *Punica granatum* L., foi selecionada como tema central do trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação, após revisão bibliográfica que indicou a existência do potencial uso terapêutico bem como a necessidade de aprofundamento em estudos químicos e farmacológicos para a casca do fruto. Desta forma, o presente trabalho agregou conhecimentos à utilização da espécie e forneceu, assim, mais subsídios científicos para as políticas públicas de saúde e também para a indústria de fitoterápicos.

A revisão apresentada evidencia a distribuição global do gênero como também suas atividades biológicas (Tabela 1), porém com menor enfoque do farmacógeno estudado, a casca do fruto, bem como a falta de padronização por compêndios oficiais como as farmacopeias, inclusive a Farmacopeia Brasileira.

A casca do fruto da romã é parte normalmente desprezada e sem valor, podendo ser utilizada pela indústria com o intuito de agregar valor aos produtos ou ainda, desenvolver produtos a partir deste substrato que apresenta como principais constituintes os compostos fenólicos (Tabela 2), com amplo potencial terapêutico e farmacológico.

Em vista da utilização caseira da população e o crescente interesse da indústria, é importante avaliar a uniformidade das amostras, e para tanto se buscou investigar a homogeneidade do perfil químico em diferentes pontos de coleta de amostras. Fatores como solo, clima e diferentes exposições que a planta recebe são determinantes para a constituição química da mesma. Os diferentes pontos de coleta de variadas regiões do estado do Rio Grande do Sul mostrou que as cascas dos frutos de romã oriundos de diferentes regiões e climas, apresentam mesmo perfil químico, variando ligeiramente nas concentrações dos isômeros punicalagina α e β , principal constituinte químico presente no extrato e quantificadas como somatório. Isso corrobora resultados descritos por Fischer e colaboradores (2011) que encontraram o mesmo perfil químico em extratos de romã, assim como as punicalaginas como constituintes majoritários.

Este resultado, no qual as cascas não apresentam variabilidade química qualitativa, pode sugerir, tanto para a indústria, como para o uso medicinal popular, garantia de homogeneidade para utilização e produção. Complementando esse resultado, os ensaios físicos – químicos de pureza, como a determinação de cinzas totais, por exemplo, apesar de serem inespecíficos, são de relevante importância como informação complementar para o controle de qualidade detectar adulterações inorgânicas. Para as cascas do fruto de *P. granatum*, o teor médio de cinzas totais (média \pm dp) foi de $3,04 \pm 0,019\%$ e, apesar de não haver dados em farmacopeias para a espécie, este valor é considerado adequado quando comparados ao limite de 10% estabelecido para este tipo de material vegetal (casca) pela Farmacopeia Brasileira (2010). O mesmo acontece no ensaio de perda por dessecação que apresentou teor médio de $9,73 \pm 0,13\%$, valor este abaixo do limite de 10% estabelecido como adequado à conservação da droga vegetal.

Havendo uma necessidade contínua de atualização de dados analíticos sobre plantas medicinais que sejam consistentes, se torna interessante a busca e otimização de métodos analíticos e sua validação, para a obtenção de resultados rápidos, confiáveis, de baixo custo e mais seguros. Visando melhorar a eficiência da extração dos princípios ativos contidos nas cascas do fruto de romã, foi proposto o método por refluxo, sendo simples, barato e também rápido (quinze minutos), desta forma, de fácil inserção na rotina da indústria. Além disso, o método proposto apresenta maiores rendimentos no teor de compostos fenólicos, quando comparado a outros métodos extrativos avaliados, como maceração, ultrassom e ultraturrax. Os resultados encontrados, com teores elevados de punicalaginas (9,13% de média) estão de acordo com trabalhos já descritos na literatura (AMYRGIALAKI, E. *et al*, 2014; KAZEMI, M. *et al*, 2016).

Técnicas analíticas de controle de qualidade contribuem para a padronização e também para verificar as variações no conteúdo de princípios ativos de matérias-primas vegetais. Com os produtos fitoterápicos em constante ascensão no mercado brasileiro, é necessária a busca pela qualidade desses produtos e controles de qualidade mais rigorosos. A determinação química qualitativa e quantitativa do composto majoritário, os anômeros punicalagina α e β , foi realizada por CLAE.

As punicalaginas tratam-se de compostos anoméricos e se interconvertem. Os anômeros alfa e beta possuem um monossacarídeo ciclizado e, o carbono anomérico torna-se um centro quiral com duas conformações possíveis sendo o alfa com a substituição no carbono anomérico oposto ao anel do açúcar.

Para comprovar sua interconversão estes foram extraídos isoladamente por CLAE. A injeção dos dois picos isolados mostrou, adicionalmente, a presença dos dois picos no cromatograma. Assim sendo, estes foram quantificados como somatório dos dois picos.

Vários fatores podem ser utilizados na análise por CLAE para se obter a melhor separação, entre eles a coluna cromatográfica, o fluxo e a composição da fase móvel e o tipo de detector. Neste trabalho a separação ocorreu de forma satisfatória com uma coluna de 15 cm e fase reversa com tamanho de partícula de 5 µm. O fluxo proposto seguiu gradiente linear, buscando a melhor separação dos compostos fenólicos. Toda a análise foi realizada com detector de arranjo de fotodiodos, e leitura de análise em comprimento de onda de 256nm, faixa onde ocorre a absorção máxima e característica dos compostos fenólicos (GULLON, 2016).

Após o desenvolvimento do método para a quantificação das punicalaginas, o mesmo então foi validado. Processo fundamental para a confiabilidade dos resultados e necessário para o registro de qualquer apresentação farmacêutica, a validação do método analítico foi realizada seguindo as normas estabelecidas pelo ICH (2005) e pela RDC n. 899 (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos nos testes de linearidade, precisão, repetibilidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e robustez foram satisfatórios, estando dentro dos limites padronizados para matrizes complexas e ainda, todas as análises, apresentaram valores de coeficiente de variação menores que 5%, indicando confiabilidade do método.

A análise desenvolvida por metodologia de CLUE mostrou-se satisfatória. Esta técnica mais moderna permitiu a análise em tempos menores com conseqüente economia de solvente. Assim, a transferência de métodos analíticos de CLAE para CLUE tem se tornado uma tendência importante na indústria farmacêutica. Este método quando comparado ao CLAE, apresenta

redução de vinte minutos no tempo de análise, e uma redução de 14 vezes em relação ao consumo total dos solventes, em mL.

A avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato bruto da casca do fruto de *P. granatum* e também da fração contendo punicalaginas, foi realizada utilizando a técnica de Boyden (1962) modificada por Suyenaga e colaboradores (2010). Nesta técnica pode-se avaliar a quimiotaxia, etapa importante do processo inflamatório. Os resultados evidenciaram um efeito inibitório da migração de leucócitos importante, tanto para o extrato bruto como para a fração nas concentrações mais elevadas, quando comparados ao controle positivo, indometacina, anti-inflamatório não esteroidal.

Dentre os mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório da romã, estudos realizados demonstraram que a mesma é capaz de inibir a ativação de vias inflamatórias incluindo o NF- κ B³. Princípios ativos isolados da romã, proantocianidinas e as antocianidinas, apresentam potencial atividade inibitória frente à cicloxigenase e a produção de óxido nítrico (HOU *et al.*, 2003). O ácido punico, as punicalaginas e os polifenóis podem inibir a biossíntese de prostaglandinas. Assim como os elagitaninos, apresentam potencial atividade na redução da sinalização celular inflamatória em modelos laboratoriais de células de câncer de cólon (LANSKY *et al.*, 2007). Lansky e colaboradores ainda apresentam resultados onde os componentes do suco de romã podem agir de forma sinérgica na supressão da expressão das citocinas inflamatórias.

Outros trabalhos, como realizado por Pinheiro e colaboradores (2015), Garreto e colaboradores (2012), utilizaram modelos experimentais de inflamação respiratória, mostrando que os constituintes químicos de *P. granatum* são capazes de desempenhar atividade anti-inflamatória, verificando que o extrato afetou a quimiotaxia de neutrófilos e o extravasamento plasmático e, ainda, uma redução do número de células do lavado brônquico foi demonstrada, corroborando com os resultados encontrados neste estudo com concentrações mais baixas. Assim nossos resultados devem ser complementados para maior entendimento dos mecanismos de ação dos extratos padronizados obtidos.

VII. CONCLUSÃO

Considerando os resultados experimentais obtidos, conclui-se que:

- As amostras de diferentes origens de coletas analisadas não apresentaram variabilidade química qualitativa.
- A otimização da extração realizada por software estatístico, apesar de não apresentar significância estatística, mostrou um aumento importante das áreas dos picos de punicalaginas nos cromatogramas.
- O método de extração proposto apresenta vantagens, utilizando solventes de baixo custo, além de ser simples e rápido.
- O método validado por CLAE mostrou-se eficiente e confiável, podendo ser utilizado em laboratórios de controle de qualidade para análise de rotina e quantificação de punicalaginas.
- O desenvolvimento da metodologia por CLUE mostra-se adequado, reduzindo tempo de análise bem como o consumo de solvente.
- Análise antiquimiotóxica mostrou que, tanto o extrato bruto, como a fração contendo anômeros punicalagina α e β apresentam potencial anti-inflamatório nas concentrações testadas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.113-123, 2001.

ALMEIDA, R. B.; SCHEFFER, T. P. Estudo sobre a utilização de recursos vegetais com potencial terapêutico. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, Florianópolis, v. 5, n. 1, p. 59-71, 2012.

AL-MEGRIN W.A., *In-vivo* study of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract efficacy against *Giardia lamblia* in infected experimental mice, *Asian Pacific. Journal of Tropical Biomedicine* , v 7. , n 1. , p 59-63. , 2016

AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO M.N.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; REIS, A.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 16, p.696-720, 2006.

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.

AQIL, F. *et al.* Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**. v. 49, p. 345-353, 2012.

ASLAM, M.N.; LANSKY, E.P.; VARANI, J. Pomegranate as a cosmeceutical source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. **Journal Ethnopharmacology**. v. 103, n. 3, p. 311-318, 2006.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.119-128, 1993.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BASTOS, J.C.S.; CUNHA, L.C.; OSTROSKY, E.A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) em solução de proteína plasmática para aplicação em estudos de microdiálise cutânea. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 34, 191-198, 2013.

BOROCHOV-NEORI, H.; JUDEINSTEIN, S.; TRIPLER, E.; HARARI, M.; GREENBERG, A.; SHOMER, I.; HOLLAND, D. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 3, p. 189-195, 2009.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Experimental Medicine**. v. 115, p. 453-466, 1962.

BRAGA, L.C. et al. Pomegranate Extract Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth and Subsequent Enterotoxin Production. **Journal of Ethnopharmacology**. v.96, n. 12, p.335-339, 2005.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ed. Volume 1, p. 545, Brasília 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ed. Volume 2, p. 899, Brasília 2010.

CAUSON R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*. v. 689, p.175-180, 1997

CERDA, B. et al. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p.3493-3501, 2003.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de; SILVA, N. P. da; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

ÇAM, M., IÇYER, N.C. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. **Journal of Food Science and Technology**. v. 52, p.1489-1497, 2015.

DAS, A.K. et al. Studies on the hypoglycemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.15, n.7, p.628-9, 2001.

DAS, A.K. et al. Studies on antidiarrhoeal activity of Punica granatum seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.205-8, 1999.

DE, M.; KRISHNA, A.; BANERJEE, A.B. Antimicrobial screening of some Indian spices. **Phytotherapy Research**, v.13, n.7, p.616-8, 1999.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar**. São Paulo. p. 9-86, 1996.

FARMACOPEIA BRITÂNICA. London: Her Majesty's Stationery Office: **Pharmacopoeia Comission British**, 2011.

FERRAZ, S.L.; KEDMA, T.; SILVA, C.P.; GREGORIO, A.; BATISTA, G.; AZEVEDO, J.; GALDINO, N.M.R. Ministrando palestras e oficinas de plantas medicinais na comunidade do Curado, 18 a 22 de outubro 2010.

FISCHER U.A.; JAKSCH A.V.; CARLE R.; KAMMERER D.R. Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica*

granatum L.) fruits and juices. **European Food Research Technology**, v.237, n. 2 ,p. 209-221, 2013.

FISCHER, U.A; CARLE, R.; KAMMERER D.R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**. v. 127, p. 807-821, 2011.

GILANI A.H.; RAHMAN A.U; Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p.43–49, 2005.

GONÇALVES, A. E. de S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONÇALVES, N.M.T., *et al.*, A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia no município de Volta Redonda – RJ. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 92, p. 346-351, 2011.

GONG, J.R. *et al*, Molecular organization of alkoxy-substituted oligo(phenylene-ethynylene)s studied by STM. **Langmuir**, v.19,n. 25, p.10128-10131, 2003.

GUEVARA, J.M.; CHUMPITAZ, J.; VALENCIA, E. The in vitro action of plants on *Vibrio cholerae*. **Revista de Gastroenterologia del Peru**, v.4, n.1, p.27-31, 1994.

GULLON, B., M. E. PINTADO, J. A. PÉREZ-ÁLVAREZ, M. VIUDA-MARTOS. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction: **Food Control**, v. 59, p. 94-98, 2016.

HASONA, N.A.S.A. *et al.* Ameliorative properties of Iranian *Trigonella foenum-graecum* L. seeds and *Punica granatum* L. peel extracts in streptozotocin-induced experimental diabetic guinea pigs. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 3, p. 234-239, 2016.

HORA, J.J. *et al.* Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. **Journal of Medicinal Food**. v.6, n.3, p.157-61, 2003.

HOU, D. X. *et al.* Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. **International Journal of Oncology**. v. 23, p.705–712, 2003.

HOUSTON, D.M.J. *et al.* Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 112, p. 30-37, 2016.

HUKKERI, V.I; KALYANI G.A; HATPAKI B.C.V; MANVI F.V. In vitro antihelmintic activity of aqueous extract of fruit rind of Punica granatum. **Fitoterapia**, v.64, n.1, p.69-70, 1993.

ICH. International Conference of Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytcal Procedures: Text and Methodoly. Q2(R1)**. 2005.

JAFRI, M.A. *et al.* Effect of Punica granatum Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan – induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.309-314, 2000.

JAIN P.; NAFIS G. Antifungal activity and phytochemical analysis of aqueous extracts of Ricinus communis and Punica granatum. **Journal of Pharmacy Research**. v. 4, p.128-129, 2011.

JASUJA, N.D.; SAXENA, R.; CHANDRA, S.; SHARMA, R. Pharmacological characterization and beneficial uses of *Punica granatum*. **Asian Journal Plant Science**. v.11, p.251-267, 2012.

KAMALI, M. *et al.* Efficacy of the Punica granatum peels aqueous extract for symptom management in ulcerative colitis patients. A randomized, placebocontrolled, clinical trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**. v. 21, p.141-146, 2015.

KAZEMI, M. *et al.* Optimization of Pulsed Ultrasound-Assisted Technique for Extraction of Phenolics From Pomegranate Peel of Malas Variety: Punicalagin and Hydroxybenzoic Acids. **Food Chemistry**. v. 206, 156-166, 2016.

KIM, N.D. et al. E. Chemopreventive and adjuvante therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.71, n.3, p.203-17, 2002.

KHAN S.A. The role of pomegranate (*Punica granatum* L.) in colon cancer. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 22, p. 346–348, 2009.

KHAN N.; A.F.A.Q.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. P. 3475–3482, 2009.

LAMBERT W.E.; BOCXLAER J.F.; DE LEENHEER A.P. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. **Journal Chromatography Biological Biomedicine Science Appl**. v. 689, n.1, p. 45-53, 1997.

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, p.177-206, 2007.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**. v.27, p.479-490, 2004.

LI, G. *et al*, Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 11, n. 4, p. 313-9, 2014.

LI, J. *et al*. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. **Food Chemistry**. v. 176, 7-11, 2015.

LI, S. et al. Prospective randomized controlled study of a Chinese herbal medicine compound Tangzu Yuyang Ointment for chronic diabetic foot ulcers: a preliminary report. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.543-550, 2011.

LI, Y.; OOI L.S.; WANG H.; BUTT P.P.; OOI V.E. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. **Phytotherapy Research Journal**. v.2, p.718-22, 2004.

LIN, L.I.; KE, Y.F.; KO, Y.C.; LIN, J.K. Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion *in vitro* and suppresses matrix metalloproteinase-9 secretion. **Oncology**. v.55, p. 349-53, 1998.

LIN R.C; DING Z.S; LI L.B; KUANG T.Y. A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plants. **Plant Molecular Biology**. v.19, p. 379-379, 2001.

LIN, D. *et al*, Exploring the Transcriptome Landscape of Pomegranate Fruit Peel for Natural Product Biosynthetic Gene and SSR Marker Discovery. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 53, p. 800-813, 2011.

MACHADO, T.B. *et al*. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.21, n.3, p.279-284, 2003.

MALIK A, *et al*. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Science – USA**. v.102, p. 14813-1418, 2005.

MALIK A.; MUKHTAR H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. **Cell Cycle**. v. 5, p. 371-373, 2006.

MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. da S. Produtos. In: LIMA, A. de A. (Coord.) **O cultivo do maracujá**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura. p. 103-108, 1999.

MCDONALD, K.G. *et al*. Dendritic cells produce CXCL13 and participate in the development of murine small intestine lymphoid tissues. **American Journal of Pathology**. v. 176,p. 2367-2377, 2010.

MEDJAKOVIC, S.; JUNGBAUER, A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. **Food & Function**. v. 4, p.19-39, 2013.

MEDZHITOV, R., Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428–435, 2008.

MEHTA, R.; LANSKY, E.P. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. **European Journal of Cancer Prevention**, v.13, n.4, p.345-348, 2004.

MIDDHA, SK.; 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, p. 10, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2003. In: Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

MO, J. et al. 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, p.901-908, 2013.

MOUHAJIR, F.; HUDSON, JB.; REJDALI, M.; TOWERS, GHN. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber peoples of Morocco. **Pharmaceutical Biology**, v.39, n.5, p.364-74, 2001.

MOREIRA, G.M.B. *et al*, Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, p.626-632, 2014.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 12, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, R.; FREITAS, PC.; SILVA, GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.247-56, 2000.

NAVARRO, V.; VILAREAL, ML.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p. 143-147, 1996.

NEURATH, A.R. et al. Punica granatum (pomegranate) juice provides an HIV-I entry inhibitor and candidate topical microbicide. **BMC Infectious Diseases**, v.4, n.41, p.1-12, 2004.

NIMRI, L.F.; MEQDAM, M.M.; ALKOFABI, A. Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, v.37, n.3, p.196-201, 1999.

NUNCIO-JÁUREGUI, N. et al, Pomegranate juice adulteration by addition of grape or peach juices. **Science of Food and Agriculture**. v. 94, p.646-655, 2014.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; TEWTRAKUL, S.; YUENYONGSAWAD, S. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. **Food Chemistry**. v.123, p.2, p. 400–403, 2010.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and oppotunities. **Drug Discovery Today**. v. 10, p. 495-502, 2005.

PEREIRA, N.A. Plants as hypoglycemic agents. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.354-8, 1997.

PINHEIRO, A.J.M.C.R. Investigação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória da fração acetato de etila de folhas da espécie *Punica granatum* L. São Luis, 2015. 78f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária). Faculdade de Biologia, Universidade Ceuma, Maranhão, Brasil.

PRASHANTH, D.; ASHA, M.K.; AMIT, A. Antibacterial activity of Punica granatum. **Fitoterapia**. v.72, n.2, p.171-173, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RANI, P.; KHULLAR, N. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **Phytotherapy Research**. v.18, n.8, p.670-3, 2004.

RIBANI M.; BOTTOLI C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, n.5, p.771-80, 2004.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 16, p. 311-318, 2011.

SANTIAGO, M.C.P.A. *et al.* Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 17, 2014.

SALGADO, A.D.Y. *et al.* Antiplaque and antigingivitis effects of a gel containing *Punica granatum L.* extract. A doubleblind clinical study in humans. **Journal Applied Oral Science**, v.14, n.3, p.162-6, 2006.

SCHANEBERG B.T.; CROCKETT S.; BEDIR E.; KHAN I.A. The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. **Phytochemistry**. v. 62, p. 911-918, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ed, 2003.

SILVA, J.A. *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 31, p. 41-46, 2010.

SILVA, C.G.A.; COLLINS, C.H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n 4, p. 665-676, 2011.

SUYENAGA, E.S.; KONRATH, E. L.; DRESCH, R.R.; APEL, M.A.; ZUANAZZI, J.A.; CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Médica**, n. 77, p. 698-704, 2011.

SYED, D.N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. **Seminars in Cancer Biology**. v. 17, p. 377-385, 2007.

TEHRANIFAR *et al.* Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae, Amsterdam**. v. 126, n. 2, p. 180-185, 2010.

TELES, D.G.; COSTA, M.M. Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de Tansagem (*Plantago major* L., Plantaginaceae) e Romã (*Punica granatum* L., Punicaceae) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p. 323-328, 2014.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOI, M. *et al.* Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. **Angiogenesis**. v.6, p.121-128, 2003.

TURKYILMAZ, M.; OZKAN, M. Effects of condensed tannins on anthocyanins and colour of authentic pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. **Food Chemistry**. v. 164, p. 324-331, 2014.

PAGLIARULO, C. *et al.* Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food Chemistry**. v. 190, 824-831, 2016.

PEREZ, C.; ANESINI, C. In vitro antibacterial of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.44, p.41-6, 1994.

USP. **The United State Pharmacopeia**. NF 38. 34. ed. Rockville: Estados Unidos Pharmacopeial Convention, 2015. p. 1445-1451.

VASCONCELOS, LC., SAMPAIO, MC., SAMPAIO, FC., HIGINO, JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, v.46, n.5-6, p.192-6, 2003.

VASCONCELOS K.R.F., VEIGA JUNIOR V.F., ROCHA W.C., BANDEIRA M.F.C.L. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 733-738, 2008.

VIDAL, A. *et al.* Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.89, n.2-3, p.295-300, 2003.

VILADOMIU, M. *et al.*, Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**. p.764-789, 2013.

VILAHUR, G. *et al.*, Polyphenol-enriched Diet Prevents Coronary Endothelial Dysfunction by Activating the Akt/eNOS Pathway. **Revista Española de Cardiología**. v. 68, p.216-225, 2014.

VORAVUTHUKUNCHAI, S.P. *et al.* Efficacy of crude extracts of Thai medicinal plants on antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains isolated from peptic ulcers [antimicrobial susceptibility In Gram-negative bacteria – II]. **Clinical Microbiology & Infection Supplement**. v.10, n. 3, p.334, 2004.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. *et al.* Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Ethnopharmacology**. v.94, n.1, p.49-54, 2004.

WAFI, B.A.; MOHAMED, MM.; SONDA, ALK., AMAL, BEM, HMB., NOUR EE., RADHOUANE, G. Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. **International Journal of Food Microbiol**, v. 241, p. 123-131, 2017.

WERKMAN, C.; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W.D.; SAMPAIO, F.C.; BRANDÃO, A.A.H.; RODE, S.M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L.(romã). **Revista Brasileira Planta Médica**. v. 10, p. 104-111, 2008.

ZAHIN, M. et al, Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts. **Biomed Research International**. v. 10, p.467-81, 2014.

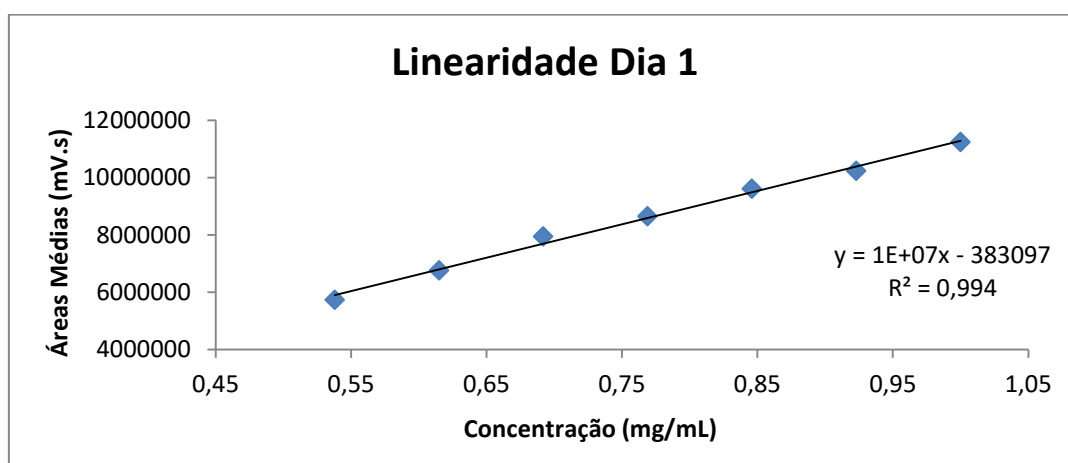
IX. ANEXOS

Procedimentos para tratamento de resíduos

Os resíduos gerados foram descartados de acordo com os procedimentos descritos no Plano de Gerenciamento de Resíduos estabelecido pela Comissão de Saúde e ambiente de Trabalho (COSAT/FAR/UFRGS).

Curvas de Linearidade Dias 1, 2 e 3 – CLAE

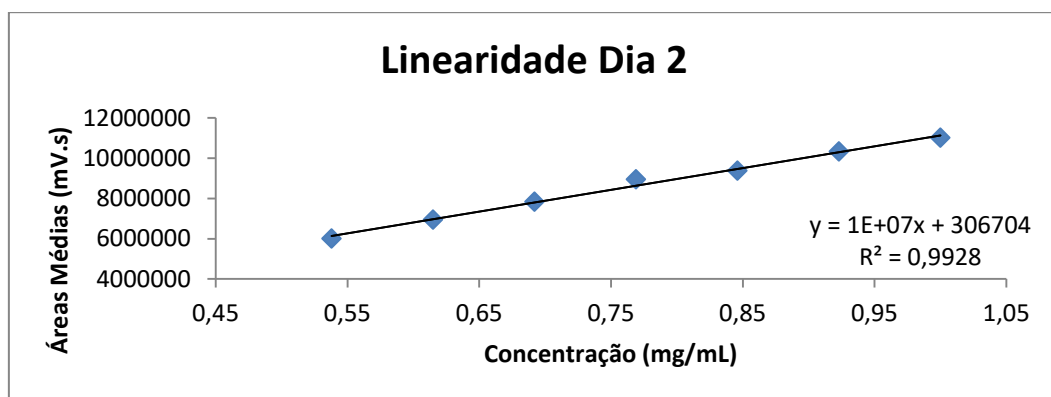
Dia 1						
Somatório das áreas de Punicalagina A e B						
Concentração (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Áreas médias	Desvio padrão	CV (%)
0,538	5712756	5733970	5713433	5720053	12057,23	0,2108
0,615	6736410	6780534	6752123	6756356	22364,45	0,3310
0,692	7939848	7959277	7902477	7933867	28868,43	0,3639
0,769	8571599	8620275	8748378	8646750,667	91314,97	1,0561
0,846	9599045	9619903	9596470	9605139,333	12850,37	0,1338
0,923	10228654	10252890	10202082	10227875	25412,95	0,2485
1	11217633	11225553	11257433	11233539,67	21067,75	0,1875



Dia 2

**Somatório das áreas de
Punicalagina A e B**

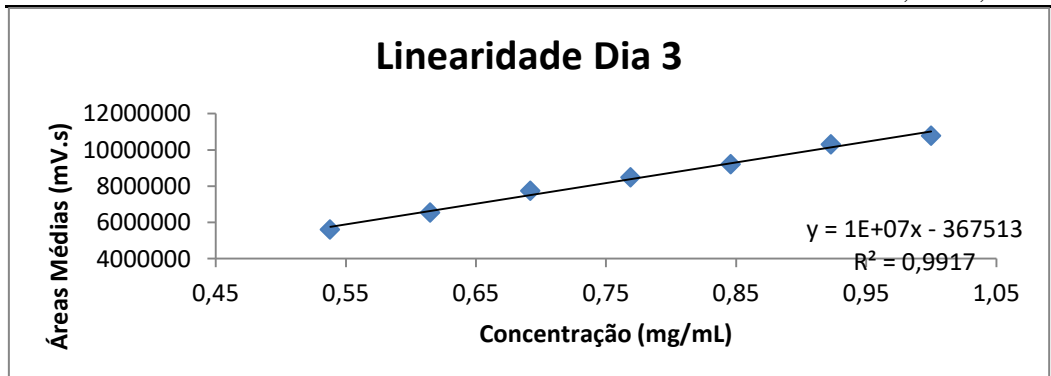
Concentração (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Áreas médias	Desvio padrão	CV (%)
0,538	5990817	6009778	5983555	5994717	13539,46	0,2259
0,615	6957673	6932444	6948846	6946321	12802,63	0,1843
0,692	7828818	7815487	7845106	7829804	14834,08	0,1895
0,769	8969687	8916072	8944970	8943576,333	26834,66	0,3000
0,846	9385382	9379729	9367539	9377550	9118,89	0,0972
0,923	10316701	10317969	10339724	10324798	12941,83	0,1253
1	11000091	11025412	10994916	11006806,33	16319,41	0,1483



Dia 3

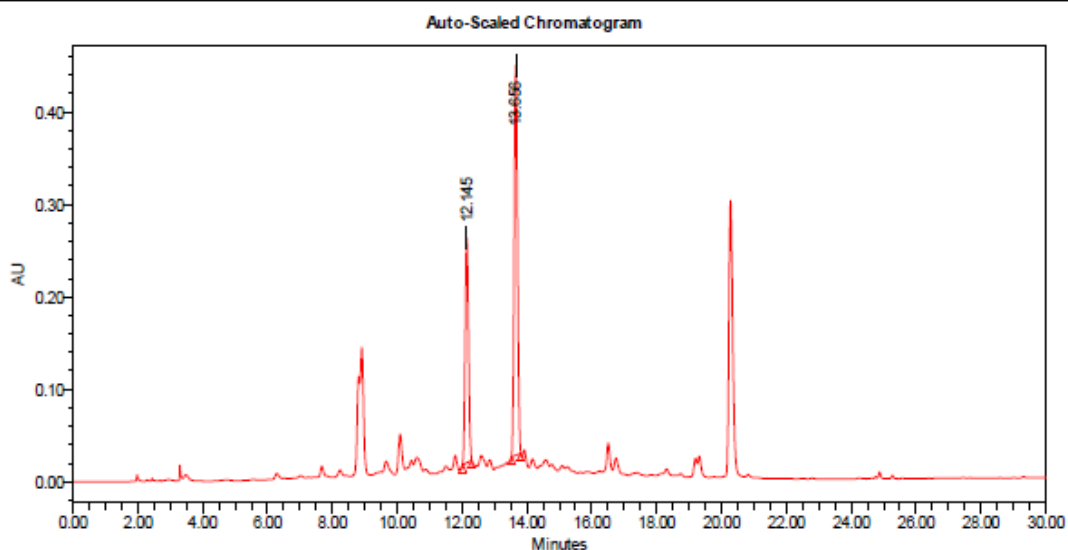
**Somatório das áreas de
Punicalagina A e B**

Concentração (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Áreas médias	Desvio padrão	CV (%)
0,538	5639323	5563597	5614428	5605783	38596,15	0,6885
0,615	6523994	6540566	6548249	6537603	12396,00	0,1896
0,692	7832640	7696892	7704256	7744596	76337,19	0,9857
0,769	8453535	8559148	8448145	8486942,667	62589,70	0,7375
0,846	9189979	9218065	9212720	9206921,333	14913,89	0,1620
0,923	10286039	10311633	10305160	10300944	13307,67	0,1292
1	10792029	10762524	10802001	10785518	20528,11	0,1903



Cromatogramas obtidos por CLAE para cada amostra, com suas respectivas áreas em relação às punicalaginas.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Alegrete 15	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	variabilidade amostras
Vial:	80	Acq. Method Set:	punica
Injection #:	1	Processing Method:	alegrete 15
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	256.0nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 256.0 nm (210-400)nm
Date Acquired:	12/12/2016 7:25:41 PM BRST		
Date Processed:	12/19/2016 12:01:38 PM BRST		



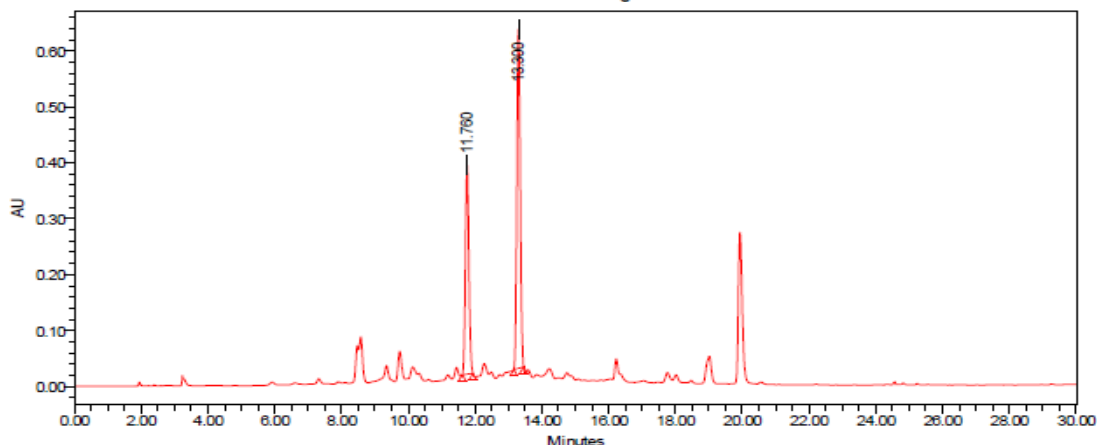
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	12.145	1727678	243153		
2	13.656	2921403	421223		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Alegrete 16	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade amostras
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: punica	Acq. Method Set: alegrete 16
Vial: 81	Processing Method: 256.0nm	Channel Name: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Injection #: 1	Proc. Chnl. Descr.:	
Injection Volume: 10.00 ul		
Run Time: 30.0 Minutes		
Date Acquired: 12/12/2016 8:47:55 PM BRST		
Date Processed: 12/19/2016 12:05:49 PM BRST		

Auto-Scaled Chromatogram



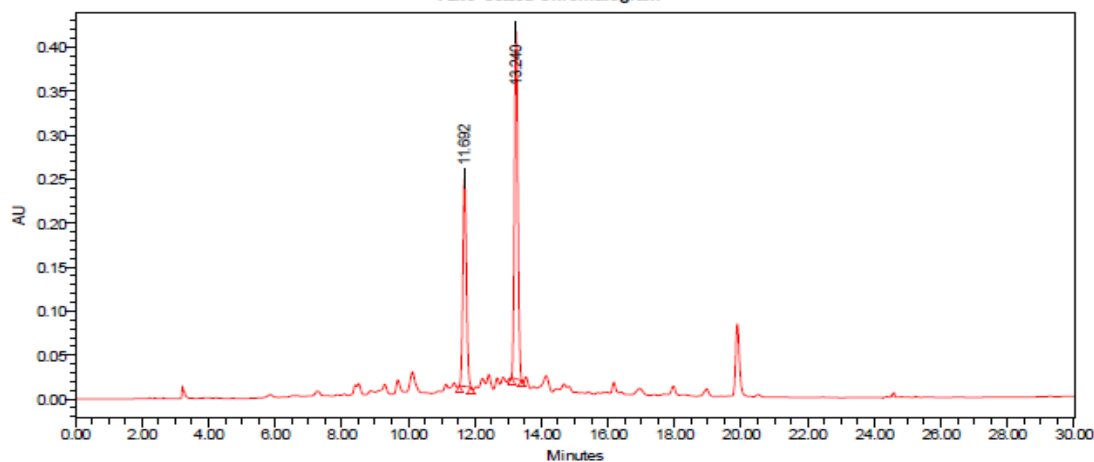
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.760	2704998	373509		
2	13.300	4223718	605724		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Ant Prado	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade amostras
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: punica	Acq. Method Set: Antonio Prado
Vial: 82	Processing Method: 256.0nm	Channel Name: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Injection #: 1	Proc. Chnl. Descr.:	
Injection Volume: 10.00 ul		
Run Time: 30.0 Minutes		
Date Acquired: 12/12/2016 10:10:05 PM BRST		
Date Processed: 12/19/2016 12:08:08 PM BRST		

Auto-Scaled Chromatogram



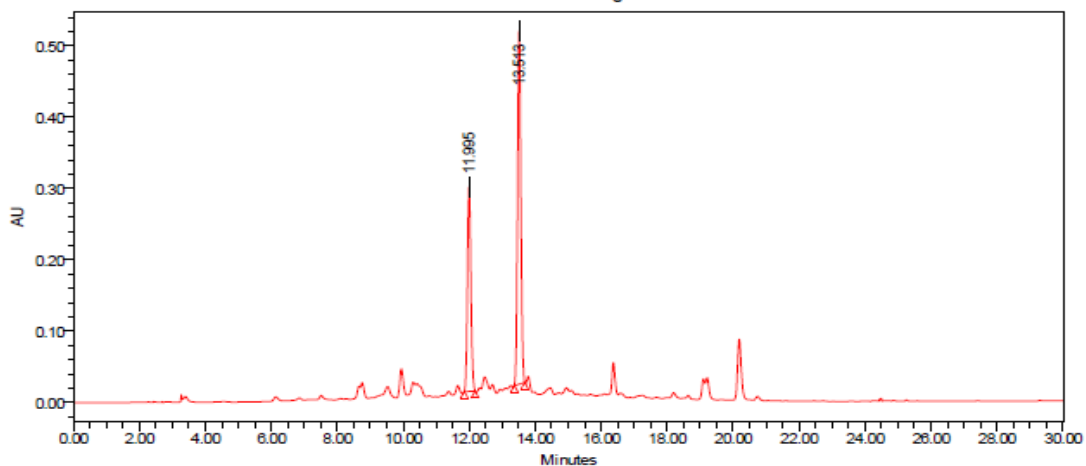
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.692	1742278	236178		
2	13.240	2758021	394708		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: capão Sample Type: Unknown Vial: 86 Injection #: 1 Injection Volume: 10.00 ul Run Time: 30.0 Minutes Date Acquired: 12/13/2016 5:02:27 PM BRST Date Processed: 12/19/2016 12:33:36 PM BRST	Acquired By: System Sample Set Name: variabilidade 2 Acq. Method Set: punica Processing Method: capão Channel Name: 256.0nm Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm
--	---

Auto-Scaled Chromatogram



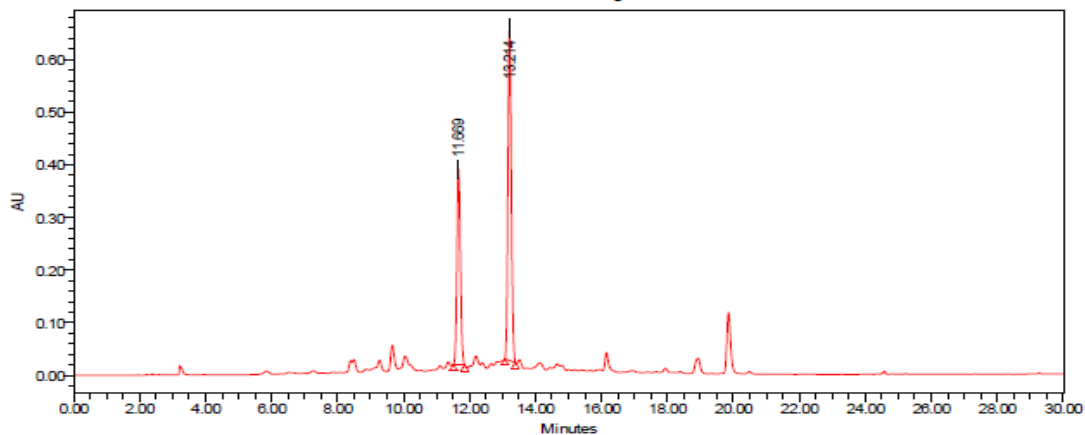
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.995	2077126	286336		
2	13.513	3439167	494832		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Cascata - Pel Sample Type: Unknown Vial: 84 Injection #: 1 Injection Volume: 10.00 ul Run Time: 30.0 Minutes Date Acquired: 12/13/2016 12:54:30 AM BRST Date Processed: 12/19/2016 12:13:39 PM BRST	Acquired By: System Sample Set Name: variabilidade amostras Acq. Method Set: punica Processing Method: cascata Channel Name: 256.0nm Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm
---	--

Auto-Scaled Chromatogram



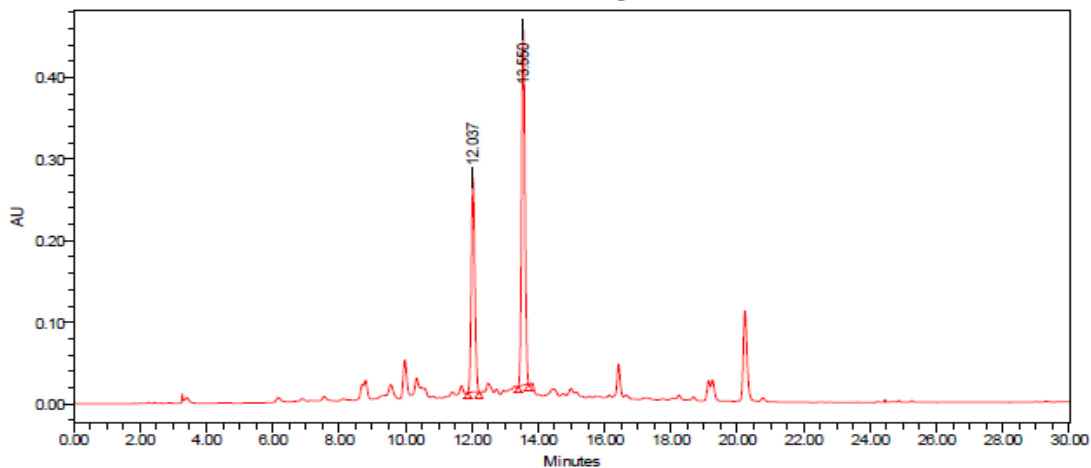
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.669	2711936	370918		
2	13.214	4461537	631126		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: cristal	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade 2
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: variabilidade 2	Acq. Method Set: punica
Vial: 87	Acq. Method Set: punica	Processing Method: cristal
Injection #: 1	Processing Method: cristal	Channel Name: 256.0nm
Injection Volume: 10.00 ul	Channel Name: 256.0nm	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Run Time: 30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm	
Date Acquired: 12/13/2016 6:24:45 PM BRST		
Date Processed: 12/19/2016 12:39:05 PM BRST		

Auto-Scaled Chromatogram



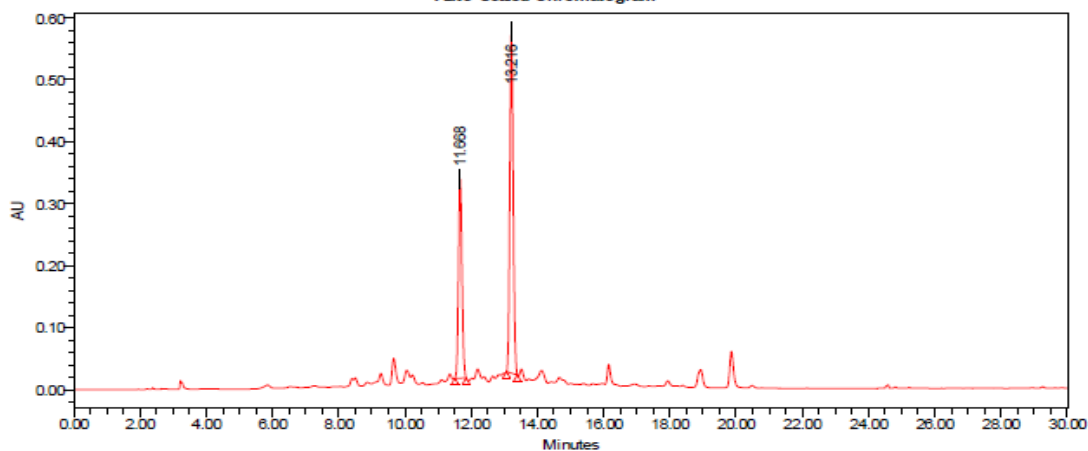
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	12.037	1909016	262462		
2	13.550	3033169	435939		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Miriam	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade amostras
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: variabilidade amostras	Acq. Method Set: punica
Vial: 85	Acq. Method Set: punica	Processing Method: miriam
Injection #: 1	Processing Method: miriam	Channel Name: 256.0nm
Injection Volume: 10.00 ul	Channel Name: 256.0nm	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Run Time: 30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm	
Date Acquired: 12/13/2016 2:57:48 AM BRST		
Date Processed: 12/19/2016 12:25:00 PM BRST		

Auto-Scaled Chromatogram



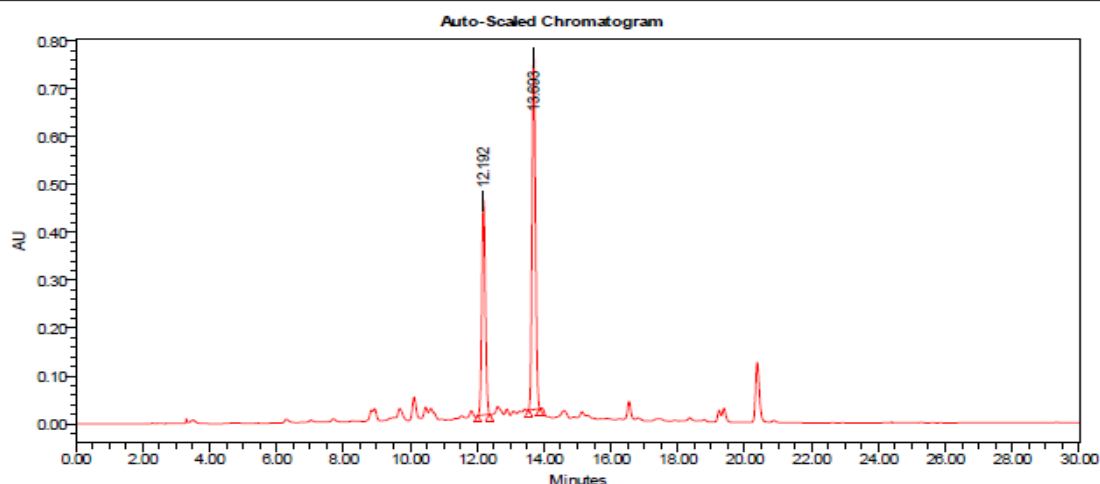
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.668	2340363	320742		
2	13.216	3905138	550587		

*Amostra Miriam = São Jerônimo/RS

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: morro redondo	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade 2
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: variabilidade 2	Acq. Method Set: punica
Vial: 88	Acq. Method Set: punica	Processing Method: morro redondo
Injection #: 1	Processing Method: morro redondo	Channel Name: 256.0nm
Injection Volume: 10.00 ul	Channel Name: 256.0nm	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Run Time: 30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm	
Date Acquired: 12/13/2016 7:46:58 PM BRST		
Date Processed: 12/19/2016 12:39:41 PM BRST		

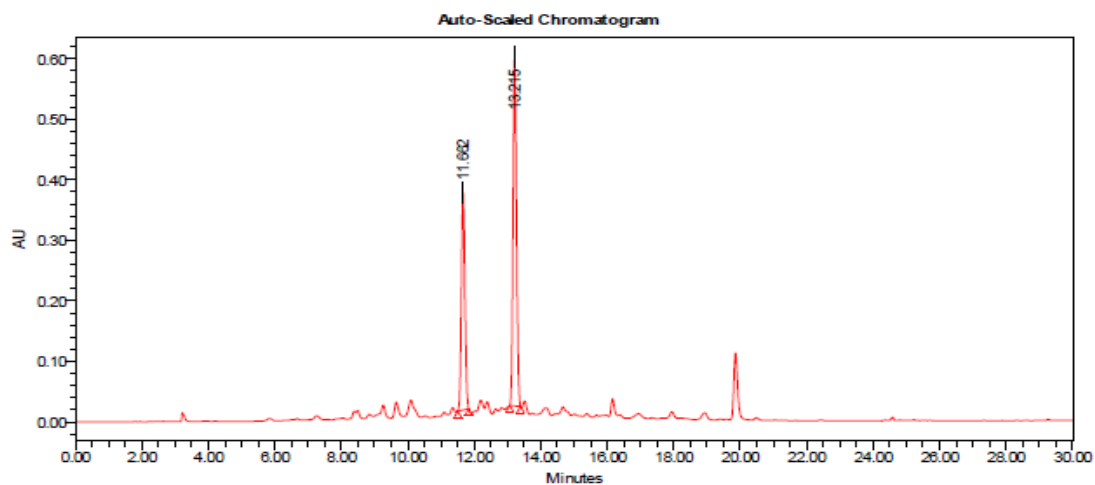


Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	12.192	3240795	447146		
2	13.693	5195466	734297		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: SP	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade amostras
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: variabilidade amostras	Acq. Method Set: punica
Vial: 83	Acq. Method Set: punica	Processing Method: SP
Injection #: 1	Processing Method: SP	Channel Name: 256.0nm
Injection Volume: 10.00 ul	Channel Name: 256.0nm	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Run Time: 30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: PDA 256.0 nm (210-400)nm	
Date Acquired: 12/12/2016 11:32:19 PM BRST		
Date Processed: 12/19/2016 12:13:05 PM BRST		



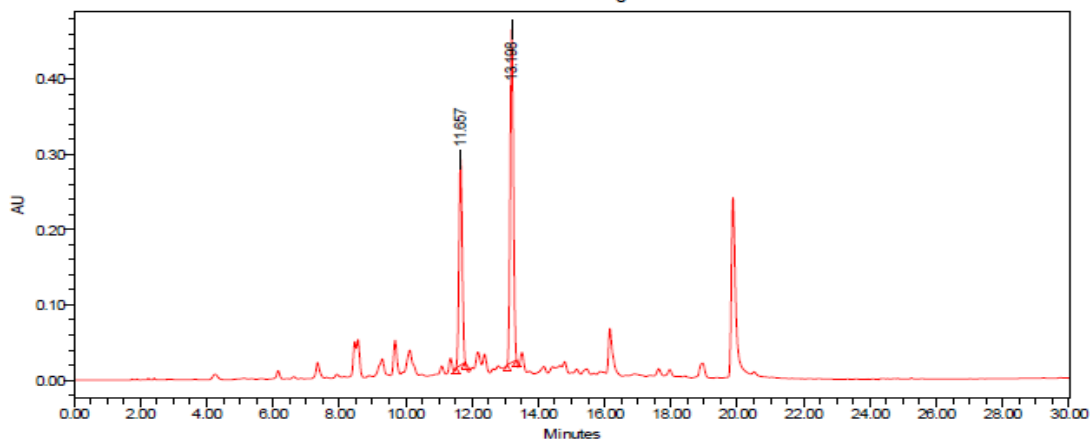
Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.662	2617148	359127		
2	13.215	4080358	577420		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Chá e Cia	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade_comerciais
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: punica	Acq. Method Set: comercial_cha e cia I
Vial: 26	Processing Method: 256.0nm	Channel Name: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Injection #: 1	Proc. Chnl. Descr.:	
Injection Volume: 10.00 ul		
Run Time: 30.0 Minutes		
Date Acquired: 21-Feb-17 21:57:40 BRT		
Date Processed: 06-Mar-17 15:57:33 BRT		

Auto-Scaled Chromatogram



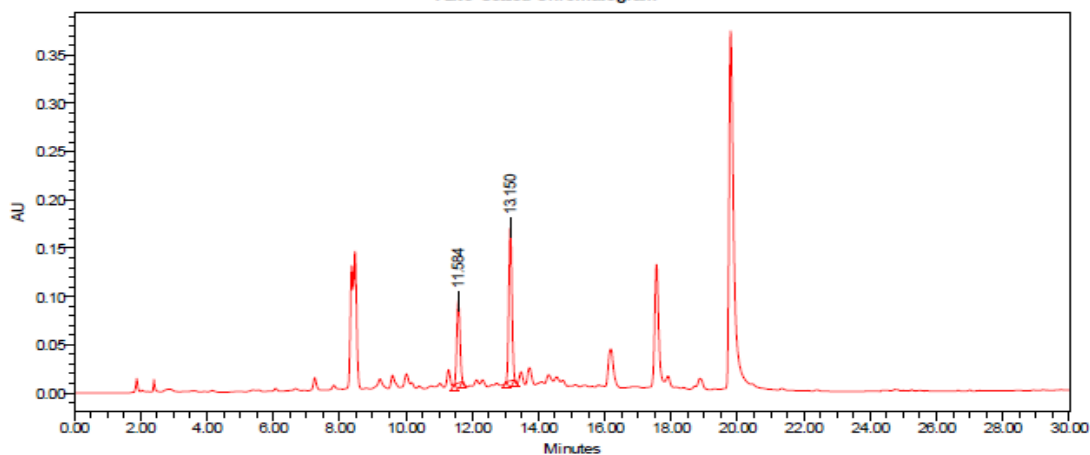
Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		11.657	1850965	272961		
2		13.198	2964763	441963		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Quimer	Acquired By: System	Sample Set Name: variabilidade_comerciais
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: punica	Acq. Method Set: comercial_quimer 1
Vial: 28	Processing Method: 256.0nm	Channel Name: PDA 256.0 nm (210-400)nm
Injection #: 1	Proc. Chnl. Descr.:	
Injection Volume: 10.00 ul		
Run Time: 30.0 Minutes		
Date Acquired: 22-Feb-17 02:14:21 BRT		
Date Processed: 06-Mar-17 15:49:38 BRT		

Auto-Scaled Chromatogram

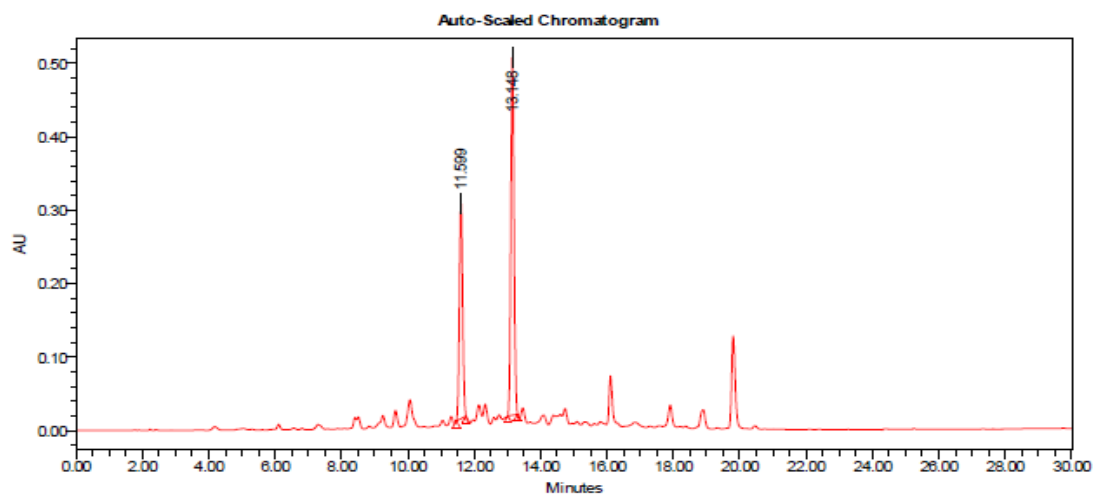


Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		11.584	500691	84936		
2		13.150	1036973	158379		

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Florien	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	variabilidade_comerciais
Vial:	27	Acq. Method Set:	punica
Injection #:	1	Processing Method:	comercial_florien I
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	256.0nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 256.0 nm (210-400)nm
Date Acquired:	22-Feb-17 00:05:58 BRT		
Date Processed:	06-Mar-17 15:52:12 BRT		



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	11.599	2003778	293896		
2	13.148	3251878	486515		