



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LILIANE BEZERRA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DE EXTRATOS
E FRAÇÕES OBTIDOS DE ESPÉCIES VEGETAIS FRENTE A CEPAS
MULTIDROGA-RESISTENTES PARA VEICULAÇÃO EM SISTEMAS DISPERSOS**

RECIFE

2019

LILIANE BEZERRA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DE EXTRATOS
E FRAÇÕES OBTIDOS DE ESPÉCIES VEGETAIS FRENTE A CEPAS
MULTIDROGA-RESISTENTES PARA VEICULAÇÃO EM SISTEMAS DISPERSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares.

RECIFE

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- L732a Lima, Liliane Bezerra de.
Avaliação da atividade antimicrobiana e sinérgica de extratos e frações obtidos de espécies vegetais frente a cepas multidroga-resistentes para veiculação em sistemas dispersos / Liliane Bezerra de Lima. – 2019.
285 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.
- Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. *Cinnamomum zeylanicum*. 2. *Eugenia uniflora*. 3. *Punica granatum*. 4. Sinergismo farmacológico. 5. Emulsões. I. Soares, Luiz Alberto Lira. (Orientador). II. Título.
- 615.1 CDD (20. ed.) UFPE (CCS 2019-294)

LILIANE BEZERRA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DE EXTRATOS
E FRAÇÕES OBTIDOS DE ESPÉCIES VEGETAIS FRENTE A CEPAS
MULTIDROGA-RESISTENTES PARA VEICULAÇÃO EM SISTEMAS DISPERSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 31/10/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)

Prof.^a Dr.^a. Karina Perrelli Randau (Examinadora Externa)

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga (Examinador Externo)

Prof.^a. Dr.^a. Rejane Pereira Neves (Examinadora Externa)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, inteligência suprema. Causa primária de todas as coisas. Obrigada pelas pessoas que colocou no meu caminho, pela possibilidade de realizar este trabalho edificante e por me dar forças, não deixando desistir em fracassos e nem estagnar em sucessos

Aos meus queridos pais *Geraldo Ferreira de Lima Santos e Luci Felipe Bezerra de Lima*, por todo amor e dedicação, os quais vendendo verduras, carregando água mineral e datilografando documentos fizeram imenso esforço para que eu pudesse estudar e chegar até aqui. Por terem acreditado em mim em todos os momentos em que o mundo parecia dizer não. À minha irmã *Luciana Bezerra de Lima*, por ser meu porto seguro. Agradeço ainda o imenso auxílio de todos na coleta dos materiais vegetais

A todos consanguíneos, base desta minha existência, sobretudo aos tios *David e Gercina Soares*, fundamentais para minha orientação ao curso; e *Gilberto e Nilvaneide Bezerra*, pelo carinho e colaboração na coleta do material vegetal

Ao meu marido *Marcos Nunes Pereira Filho* pelo amor, paciência e incentivo nas horas fáceis e difíceis desses anos. Pela compreensão de ausências físicas e mentais, sobretudo pela abnegação durante o meu período na Alemanha. Extensivo à sua família, especialmente *Ana Luisa, Marcos e Cecília Nunes*, pela ajuda e compreensão; *Tia Fátima (in memoriam)* e *Thereza e Humberto Nunes*, pelos conselhos e oportunidades

Ao meu orientador *Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares*, que fortuitamente me acolheu em adoção tardia. Concedeu-me oportunidades e estrutura para desenvolvimento pessoal e profissional, integrando-me ao Núcleo de Desenvolvimento Analítico-Tecnológico de Fitoterápicos (NUDATEF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e incentivando minha ida para a Alemanha. A ele, por tudo, minha eterna gratidão. Extensivo à sua esposa, Sr.^a Roseli, por toda receptividade, simpatia, cuidado e “camarões”

À supervisora do NUDATEF *Dr.^a Magda Rhayanny Assunção Ferreira*, gratidão pelo seu devotamento singular, auxílio na elaboração de metas e na interpretação de resultados, bem como na resolução de assuntos burocráticos em benefício do grupo. Obrigada pela confiança, apoio durante meu estágio à docência em Farmacognosia e orientação no prosclênio, no Brasil e na Alemanha

À equipe do NUDATEF: *Alisson Macário, Amanda Samson, Camylla Tenório, Elayne Cristina, Eloiza Marcelle, Ewelyn Cintya, Franciele Florencio, Isabelle Ferraz, Janaina Machado, Joyce Cristina, Kassia Teixeira, Laysa Karla, Lorena Mendonça, Lucas Almeida, Patricia Andrade, Rhayanne Moraes, Sarah Luanne e Wliana Alves* pela imensa colaboração com todo o trabalho experimental, confraternizações e momentos de descontração – cada um contribuindo ao seu modo. *Sarah e Rhayanne*, agradeço o estágio à docência compartilhado, a preocupação e a compreensão da minha ausência em suas defesas de Mestrado, no momento de finalização desta Tese

Ao Prof. Dr. *Thiago Napoelão*, Dr.^a *Maiara Moura* e Dr.^a *Thamara Procópio* – Departamento de Bioquímica da UFPE, pelo fornecimento de microrganismos

Acknowledgments to Prof. Dr. *Rolf Daniels*, my German supervisor at Eberhard Karls Universität Tübingen. I am so grateful for his receptiveness and caring. Thanks for the shared knowledge and for including me into the *Pharmaceutical Technology Research Group*. There, I could meet great personalities, such as *Anja Bork, Anja Hoffmann, Ann-Kathrin Widmann, Bougoslava, Dominique Lunter, Elena, Francis Kamau, Ilka Kemmer, Ingrid, Jana Huissel, Janosch Klinger, Johannes Schmid, Kashif Ghaffar, Katharina Beck, Klaus Weyhing, Manuel Bunk, Martina, Marc Schönherr, Markus Schmidberger, Melanie Sigg, Nadine Löw, Richard Krombholz, Sabrina Hermann, Ulrike Söpfer* and *Yali Liu*, who were always kind and helpful. Special thanks to my Portuguese friend *Sofia Schön* and to my Chinese friends *Ziwei Zhang “Carrie”* and *Tianyuan Fan*, for inspiring conversations, superb experiences and genuine friendship

Acknowledgments to *Zimmermann* family – *Ernest, Margret* and *Frank*, who adopted me during my Metzingen times. Thank you for the house care, protection, guidance, lovely cakes, amusement and souvenirs. Thanks for the valuable efforts so that I could learn some German – “*Vielen Dank*”

Aos doutorandos brasileiros na Alemanha: *Emanuelle Moraes, Irene Beteille, João Victor Dutra, Paulo Cavalcanti* e *Victor Padilha*, pela ajuda na adaptação, incentivo, confiança, compartilhamento de informações e boas lembranças; especialmente ao amigo farmacêutico *João*, por permanecer doando conhecimento, paciência e sugestões

Ao grande amigo brasileiro *Wilson Rossi Jr*, presente inesperado nos tempos alemães, o qual me ajudou (e ainda ajuda) no aprendizado do Inglês. Preciosos incentivos pessoais e profissionais! *“Miracles start to happen when you give as much energy to your dreams as you do to your fears”* - I'll never forget it

Aos servidores do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Militar de Área do Recife (HMAR), pelo fornecimento de isolados clínicos e doação de insumos importantes para este trabalho. Aos integrantes do HMAR: *Adilson Nunes, Almir Silva, Álvaro Pereira, André Henrique, Ana Flávia Pessanha, Breno Albuquerque, Cidélia Alves, Danilo Valadares, Dayvid Batista, Edson Soares, Edson Souza, Elaine Lima, D. Elda, Emanuelle Pires, Felipe Souza, Fernanda Lara, D. Graça, Gualberto Fernandes, Hellen Aguiar, Járison Rocha, Juliana Costa, Luciana Gomes, Luciana Macedo, Paula Guanabara, Rafaella Barreto, Robson Silva, Romildo Moreira, Salvino Filho, Simone Casseiro, Virgínia Aguiar e Wendell Lins*, sempre incentivadores e com vibrações positivas. Orgulho também dos tantos ex-estagiários que escolheram a Farmácia e a Pós-graduação como ofício, exercendo-os com competência e afinco. Para não cometer faltas, não citarei nomes... Apenas recebam meu abraço!

Ao *Dr. Esteban Vidal* por ter disponibilizado as instalações do Laboratório de Bioprocessos (LABIO) do CETENE – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste. Aos membros do LABIO: *Aldenise Oliveira, Aline Andrade, Arianne Duarte, Bianca Galucio, Carine Lagrange, Fernanda Vaz, Flávia Silva, Isaac Martins, Joselma Silva, Letícia Daiana, Ludhimilla Lima, Luiz Heytor, Marcio Ootani, Mayara Oliveira, Naiara Reis, Natalia Kitaoka, Nataly Amorim, Nattany de Paula, Raquel Souza, Tayane de Cássia e Yllana Marinho*, pela recepção fraterna, confiança, estímulo, auxílio ímpar, empatia e orações. Também aos integrantes do CETENE: *Ana Maria, Arthur, Carolina Malafaia, Dayanne Almeida, Flávia Coutinho, Gian Duarte, Joana Cristina, Júlia Campos, Katarynna Santos, Kelvin Augusto, Priscilla Sales, Ramon Tenório, Raiana Apolinário, Tulio Diego e Zoraia Silva* pela fraternidade, descontração, imensa ajuda e pensamentos positivos

Aos alunos que frequentaram o Departamento de Antibióticos: *Amanda Mesquita, Anastássia Mariáh, Cecília Falcão, Hanna Lopes, Iane Lara, Iranildo Cruz, Laís Nerys, Matheus Carvalho, Michele Oliveira, Samyla Kelly, Suellen Feitosa, Vanessa Lima e Vinícius Jackes*; pela amizade construída, troca de experiências, apoio e convivência salutar

Aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UFPE, especialmente à *Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite* e à *Prof.^a Dr.^a Beate Saegesser Santos* por terem proporcionado o meu início na carreira acadêmica e científica, respectivamente; e aos secretários *Nerilin Trajano* e *Rilvan Pereira*, sempre solícitos

Aos doutorandos do PPGCF-UFPE: *Izak Araújo, Jamilka Silva, Lourenço Neto* e *Ticianara Aragão* pela presença e convívio, mesmo em meio à correria

Ao doutorando do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da UFPE *Jabson Herber*, pela total disponibilidade, paciência, ideias e possibilidades, ampliando minhas perspectivas profissionais e pessoais. Uma parceria e amizade genuína, com fundamental importância na etapa final deste trabalho

Igor Arruda “Massafera”, obrigada por ser tão prestativo e cuidadoso. Não tenho dúvidas que serás um excelente farmacêutico!

Aos amigos do ensino fundamental *Celice Alves, Francisco Pedrosa, José Olímpio, Reginaldo Cavalcanti* e *Vanessa Basílio*; e aos companheiros *Andrea Gomes, Danilo Pontes, Eduardo Maciel, Egline Barros* e *Renata Ramos* dos tempos de UNINASSAU, por toda camaradagem, bondade, confiança e incentivo

Aos amigos do CELEC – Centro Espírita Luz, Esperança e Caridade: *Antonio Gomes, Cacildo Silva, Evandro Carvalho, Elisabeth, José Edilson, José Paulo, Liana Menard, Maria de Jesus, Margareth Valdevino, Michaelson Farias, Nizete paz, Robinson Damásio, Sandra Franco, Telma Coelho* e *Zuleide Silva*, pela recepção, amparo e significado existencial

À *Ada Neusa Conceição, Terezinha Moraes, Zuleide* e *Pedro Lemes*, pela prestimosidade na coleta de materiais vegetais

Às pessoas e circunstâncias do ciclo 2015-2017 que contribuíram para o meu esforço de perdão, de resiliência e de fé em Deus, proporcionando-me a vivência transformadora no Brasil e na Alemanha durante o ciclo 2018-2019

Ao sustento de *Carmen Jussara* até o “primeiro fim”, de *Rosa Maria Silva* por todo trajeto e de *Reuel Tertuliano* até “este fim”

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Once you have tasted flight, you will forever walk the Earth with your eyes turned skyward, for there you have been, and there you will always long to return” (DA VINCI, 1489, apud HARDING, 2012, p. 8)

“Nós escutamos o barulho do carvalho que cai, mas não escutamos o barulho da floresta que cresce (...) O mais importante é aquilo que não se ouve; é preciso prestar atenção às sementes de consciência que estão brotando” (LELOUP, 2002 apud HENRIQUES JR, 2017, p. 23)

RESUMO

Compostos fenólicos possuem ação multifarmacofórica e *Cinnamomum zeylanicum* (canela, CV), *Eugenia uniflora* (pitangueira, EU) e *Punica granatum* (romãzeira, PG) são espécies ricas nestas moléculas e com uso popular antimicrobiano. Poucos estudos relatam sinergia de seus polifenóis com antimicrobianos frente a microrganismos multidroga-resistentes (MDR), que promovem infecções de elevada mortalidade. O objetivo deste trabalho foi obter derivados das folhas destas espécies para caracterização de polifenóis, avaliação do potencial antioxidante/antimicrobiano contra MDR e veiculação em sistemas dispersos. Os materiais vegetais foram coletados (7°59'45.9" S 34°54'33.3" W) e extraídos por turbólise (acetona:água 7:3), obtendo-se o extrato bruto (EB). A partir deste, frações aquosas, hexânicas e acetato de etila (FAEs) foram obtidas por partição. Espectrofotometria ultravioleta/visível e cromatografia em camada delgada/líquida de alta eficiência foram empregadas na quantificação de flavonoides e taninos, evidenciando-se incremento de rutina, quercetina e catequina (CV), ácido elágico/gálico (EU e PG) e ácido clorogênico e miricitrina (EU) nas FAEs. Testes antioxidantes (DPPH e ABTS) e antibacterianos (concentração inibitória mínima (CIM)/bactericida mínima e sinergismo, n=22) apontaram desempenho superior *in vitro* para as FAEs, com CIM entre 7,81-125 µg/mL (Gram-positivos) e ampliação do espectro para Gram-negativos quando em associações. FAEs/ciprofloxacina contra *Klebsiella pneumoniae* KPC (FICI 0,124) e *Pseudomonas aeruginosa* colistina-resistente (FICI 0,031) foram relevantes. Para a viabilidade em emulsões, EBs/FAEs foram submetidos a secagem por aspersão utilizando dióxido de silício coloidal (Aerosil®). Testes de eficiência de incorporação demonstraram emprego de Aerosil® a 15% como ideal, em 5% (CV e EU) e 15% (PG) de incorporação para EBs. As FAEs foram incorporadas com sucesso a 10% (CV e PG; 15% de Aerosil®) e 5% (EU; 10% de Aerosil®). A influência do tempo e potência foi avaliada, estabelecendo-se 15 min/13 600 rpm (ultraturrax) e 15 min/40% (sonda ultrassônica). A formulação foi composta por triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (10%) e pelo EB/FAE em água ultrapurificada (85%), sendo testada para diferentes estabilizantes (5%): monooleato de sorbitano 80/monolaurato de sorbitano etoxilado 20, hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico. Emulsões Pickering contendo EBs obtidas por sonda ultrassônica demonstraram estabilidade intrínseca e acelerada (180 dias, 25 °C). A incorporação das FAEs associadas aos antimicrobianos e a investigação de suas atividades biológicas são necessárias para posterior emprego farmacêutico e captação industrial.

Palavras-chave: *Cinnamomum zeylanicum*. *Eugenia uniflora*. *Punica granatum*. Sinergismo Farmacológico. Emulsões.

ABSTRACT

Phenolic compounds have multipharmacophoric action and *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon, CV), *Eugenia uniflora* (pitangueira, EU), and *Punica granatum* (pomegranate, PG) are plant species rich in these molecules and with antimicrobial use in the folk medicine. Few studies report synergy of their polyphenols with antimicrobials against multidrug-resistant (MDR) microorganisms, which promote high mortality infections. This work aimed to obtain derivatives of the leaves of these species for characterization of polyphenols, evaluation of antioxidant/antimicrobial potential against MDR and for incorporation in dispersed systems. Plant materials were collected (7°59'45.9" S 34°54'33.3" W) and extracted by turbolysis (acetone: water, 7:3) to give crude extract (CE). From this, aqueous, hexane and ethyl acetate (EAFs) fractions were obtained by partition. Ultraviolet/visible spectrophotometry and high performance thin/liquid chromatography were employed to quantify flavonoids and tannins, showing an increase in rutin, quercetin and catechin (CV), ellagic/gallic acid (EU and PG), and chlorogenic acid and myricitrin (EU) in the EAFs. Antioxidant (DPPH and ABTS) and antibacterial tests (minimal inhibitory concentration (MIC)/minimal bactericidal concentration and synergism, n=22) showed superior *in vitro* performance for EAFs, with MICs ranging from 7.81-125 µg/mL (Gram-positive) and spectrum enlargement for Gram-negative when in combinations. EAFs/ciprofloxacin against *Klebsiella pneumoniae* KPC (FICI 0.124) and colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (FICI 0.031) were relevant. For emulsion viability, CEs/EAFs were spray-dried using colloidal silicon dioxide (Aerosil®). Incorporation efficiency tests demonstrated the use of 15% Aerosil® as ideal in 5% (CV and EU) and 15% (PG) incorporation for CEs. EAFs were successfully incorporated at 10% (CV and PG; 15% Aerosil®) and 5% (EU; 10% Aerosil®). The influence of time and power was evaluated, establishing 15 min/13 600 rpm (ultraturrax) and 15 min/40% (ultrasound). The formulation was composed of capric/caprylic acid triglycerides (10%) and CE/EAF in ultra-purified water (85%) and tested for different stabilizers (5%): sorbitan monooleate 80/ethoxylated sorbitan monolaurate 20, hydroxypropyl methylcellulose, and polyvinyl alcohol. Pickering emulsions containing CEs obtained by ultrasound demonstrated accelerated and intrinsic stability (180 days, 25 °C). The incorporation of antimicrobial-associated EAFs and the investigation of their biological activities are necessary for further pharmaceutical use and industrial uptake.

Keywords: *Cinnamomum zeylanicum*. *Eugenia uniflora*. *Punica granatum*. Drug Synergism. Emulsions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais classes e subclasses dos compostos fenólicos segundo Waterman e Mole.....	31
Figura 2 -	Classificação de polifenóis baseada no número de anéis fenólicos e em elementos estruturais, com principais grupos e alguns representantes.....	33
Figura 3 -	Estrutura química básica dos flavonoides	34
Figura 4 -	Produtos de degradação colônica da quercetina.....	41
Figura 5 -	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.....	54
Figura 6 -	<i>Eugenia uniflora</i> Linn	64
Figura 7 -	<i>Punica granatum</i> Linn	72
Figura 8 -	Principais métodos analíticos qualitativos e quantitativos aplicáveis aos compostos fenólicos	109
Figura 9 -	Fluxograma de preparo dos extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	114
Figura 10 -	Fluxograma de eluição das amostras de extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> para análise por CLAE-DAD	116
Figura 11 -	Perfis de CCD-AE obtidos para extratos brutos/frações das folhas de <i>C. verum</i> (A), <i>E. uniflora</i> (B) e <i>P. granatum</i> (C).....	124
Figura 12 -	Estruturas químicas dos compostos fenólicos quantificados por CLAE-DAD nas folhas de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	126
Figura 13 -	Perfis cromatográficos em CLAE-DAD dos extratos brutos/frações das folhas de <i>C. verum</i> (A), <i>E. uniflora</i> (B) e <i>P. granatum</i> (C).....	127
Figura 14 -	Principais mecanismos de resistência bacteriana	147
Figura 15 -	Esquema geral da reação para o ensaio DPPH*	153
Figura 16 -	Esquema geral da reação para o ensaio ABTS* ⁺	154
Figura 17 -	Representação do ensaio de determinação da CIM dos extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	157
Figura 18 -	Representação do ensaio de avaliação da interferência das frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> na resistência aos antimicrobianos convencionais	159

Figura 19 - Representação do ensaio <i>Checkerboard</i> para avaliação do sinergismo entre as frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> e antimicrobianos convencionais	160
Figura 20 - Percentual de remoção do radical DPPH [•] pelos extratos brutos/frações das folhas de <i>C. verum</i> (A), <i>E. uniflora</i> (B) e <i>P. granatum</i> (C)	161
Figura 21 - Diagrama de possibilidades nanotecnológicas para veiculação de compostos fenólicos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	192
Figura 22 - Tipos de emulsões de acordo com a orientação espacial das fases	213
Figura 23 - Representação de estabilização de uma micela em uma emulsão Pickering	216
Figura 24 - Fluxograma de preparação dos sistemas emulsionados para avaliação dos diferentes agentes tensoativos	222
Figura 25 - Perfil de solubilização dos extratos brutos/frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA nos componentes da formulação	229
Figura 26 - Diagramas de fases pseudoternários obtidos por ultraturrax e sonda ultrassônica.....	231
Figura 27 - Superfície-resposta para o d ₅₀ (μm) e para o potencial Zeta (mV) nas variáveis tempo (min) versus rotação (rpm) de emulsões contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> SPA (15% de Aerosil [®]), incorporados a 5% (p/v)	238
Figura 28 - Superfície-resposta para o d ₅₀ (μm) e para o potencial Zeta (mV) nas variáveis tempo (min) versus rotação (rpm) de emulsões contendo extratos brutos de <i>E. uniflora</i> SPA (15% de Aerosil [®]), incorporados a 5% (p/v)..	239
Figura 29 - Superfície-resposta para o d ₅₀ (μm) e para o potencial Zeta (mV) nas variáveis tempo (min) versus rotação (rpm) de emulsões contendo extratos brutos de <i>P. granatum</i> SPA (15% de Aerosil [®]), incorporados a 15% (p/v).....	240
Figura 30 - Índice de cremagem dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 4 °C	251
Figura 31 - Índice de cremagem dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C	252

Figura 32 - Índice de cremagem dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 40 °C	253
Figura 33 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA (ultraturrax, dia 01, armazenamento a 25 °C).....	254
Figura 34 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA (ultraturrax, dia 90, armazenamento a 25 °C).....	255
Figura 35 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA (sonda ultrassônica dia 01, armazenamento a 25 °C).....	256
Figura 36 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA (sonda ultrassônica, dia 90, armazenamento a 25 °C).....	257
Figura 37 - Tamanho médio de gotículas (µm) dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C	258
Figura 38 - Potencial Zeta (mV) dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C	260
Figura 39 - pH dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C	261

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação de compostos fenólicos proposta por Harbone e Simmonds.....	30
Quadro 2 - Principais constituintes fenólicos e voláteis presentes nas partes aéreas de <i>Cinnamomum verum</i>	57
Quadro 3 - Sintaxe de busca de artigos para prospecção de sistemas de liberação contendo bioativos de <i>Cinnamomum verum</i>	58
Quadro 4 - Principais constituintes fenólicos e voláteis presentes nas folhas de <i>Eugenia uniflora</i>	68
Quadro 5 - Sintaxe de busca de artigos para prospecção de sistemas de liberação contendo bioativos de <i>Eugenia uniflora</i>	70
Quadro 6 - Principais constituintes fenólicos presentes nas folhas de <i>Punica granatum</i>	76
Quadro 7 - Sintaxe de busca de artigos para prospecção de sistemas de liberação contendo bioativos de <i>Punica granatum</i>	80
Quadro 8 - Comparação entre diferentes técnicas utilizadas para extração de compostos fenólicos	108
Quadro 9 - Classes de antimicrobianos atualmente disponíveis, contendo principais representantes, formas de apresentação e mecanismo de ação	139
Quadro 10 - CI ₅₀ dos extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> para remoção do radical DPPH*	163
Quadro 11 - Patentes relacionadas nas plataformas DWPI e INPI para ativos de <i>Cinnamomum verum</i>	195
Quadro 12 - Patentes relacionadas nas plataformas DWPI e INPI para ativos de <i>Eugenia uniflora</i>	201
Quadro 13 - Patentes relacionadas nas plataformas DWPI e INPI para ativos de <i>Punica granatum</i>	205
Quadro 14 - Principais tipos e características de sistemas emulsionados.....	214
Quadro 15 - Delineamento experimental para avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo extrato bruto/fração acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	219
Quadro 16 - Delineamento experimental para avaliação do método de dispersão das formulações contendo extrato bruto/fração acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	220

Quadro 17 - Otimização experimental para avaliação da eficiência do método de dispersão das formulações contendo extrato bruto/fração acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	221
Quadro 18 - Métodos e condições de dispersão selecionados para incorporação de extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA em sistemas estabilizados por tensoativos, hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico	223
Quadro 19 - Respostas experimentais de avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	233
Quadro 20 - Respostas experimentais de avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	234
Quadro 21 - Influência das variáveis tempo e potência nos sistemas emulsionados contendo extratos brutos SPA com 15% de Aerosil® para <i>C. verum</i> (5% p/v), <i>E. uniflora</i> (5% p/v) e <i>P. granatum</i> (15%, p/v), homogeneizados por ultraturrax e sonda ultrassônica.....	236
Quadro 22 - Influência das variáveis tempo e potência nos sistemas emulsionados contendo frações acetato de etila SPA com 15% de Aerosil® para <i>C. verum</i> (10% p/v) e <i>P. granatum</i> (10%, p/v) e com 10% de Aerosil® para <i>E. uniflora</i> (5% p/v), homogeneizados por ultraturrax e sonda ultrassônica.....	237

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Prospecção de publicações contendo sistemas de liberação/atividades biológicas de bioativos de <i>Cinnamomum verum</i>	60
Tabela 2 -	Prospecção de publicações contendo sistemas de liberação/atividades biológicas de bioativos de <i>Eugenia uniflora</i>	71
Tabela 3 -	Prospecção de publicações contendo sistemas de liberação/atividades biológicas de bioativos de <i>Punica granatum</i>	81
Tabela 4 -	Rendimentos obtidos para extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> produzidos por turbo-extração utilizando sistema acetona:água (7:3 v/v)	120
Tabela 5 -	Teor de flavonoides totais e de compostos fenólicos dos extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	122
Tabela 6 -	Origem e fenótipo de resistência dos microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana	156
Tabela 7 -	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox dos extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> para remoção do radical ABTS ^{•+}	165
Tabela 8 -	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima para extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> e para fármacos convencionais frente a bactérias Gram-positivas	167
Tabela 9 -	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima para extratos brutos/frações de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> e para fármacos convencionais frente a bactérias Gram-negativas	168
Tabela 10 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antibióticos convencionais frente a cepas multidroga-resistentes, na ausência e presença de concentrações subinibitórias (1/8 da CIM) das frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	171
Tabela 11 -	Teste <i>Checkerboard</i> de associação das frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> com agentes antimicrobianos, frente a cepas multidroga-resistentes	174
Tabela 12 -	Composição final da emulsão.....	219

Tabela 13 - Teores de incorporação dos extratos brutos/frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> e de Aerosil® 130 utilizados para avaliação do método de dispersão	220
Tabela 14 - Rendimentos dos extratos brutos/frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	228
Tabela 15 - Estabilidade intrínseca de sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA	243
Tabela 16 - Estudo de ciclo gelo/degelo dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA.....	246
Tabela 17 - Avaliação macroscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento em temperatura de 4°C	248
Tabela 18 - Avaliação macroscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento em temperatura de 25°C	249
Tabela 19 - Avaliação macroscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento em temperatura de 40°C	250
Tabela 20 - Viscosidade (cSt) dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i> SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C	262

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
a.C.	Antes de Cristo
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água em óleo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
B-CPAP	<i>Nthy-ori 3-1 Cell Line</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
BR	Brasil
BT-474	<i>Invasive ductal carcinoma humam cells</i> (câncer de mama)
CA 19.9	Antígeno carboidrato 19-9 (câncer colorretal)
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCD-AE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CCL28	Quimiocina epitelial mucosa-associada, membro 28
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CFM	Concentração fungicida mínima
CI₅₀	Concentração Inibitória mediana
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COX	Cicloxygenase

CV	<i>Cinnamomum verum</i>
d₁₀	Diâmetro médio de 10% das gotículas
d₅₀	Diâmetro médio de 50% das gotículas
d₉₀	Diâmetro médio de 90% das gotículas
DAD	Detector de arranjo de diodos
DAF	Detector de arranjo de fotodiodos
d.C.	Depois de Cristo
DL₅₀	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DWPI	<i>Derwent World Patents Index</i>
EB	Extrato bruto
EB-AH	Extrato bruto após hidrólise
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EHL	Equilíbrio Hidrofílico–Lipofílico
EP	Emulsão Pickering
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
EU	<i>Eugenia uniflora</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAE	Fração 20cetate de etila
FAE-AH	Fração acetato de etila após hidrólise
FAq	Fração aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FH	Fração hexânica
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HPV	Papilomavírus humano
HSD	Hidroxiesteroide desidrogenase
HSV	Vírus do herpes simples

IC	Índice de cremagem
IL	Interleucina
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Intelectual
INRA	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
IPD	Índice de polidispersão
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LJ	Ágar Lowenstein-Jensen
LOX	Lipoxigenase
LPH	Lactase-florizina hidrolase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCF-10F	<i>Non-tumorigenic epithelial cell line from mammary gland type 10</i>
MCF-12F	<i>Non-tumorigenic epithelial cell line from mammary gland type 12</i>
MDA-MB-231	<i>Basal type and triple negative cells for chemotherapy model (mama)</i>
MDR	Multidroga-resistente
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MH	ágar Mueller Hinton
MHR	Hospital Militar de Área do Recife
miR-155	Microácido ribonucleico codificado pelo gene 155
miR-27a	Microácido ribonucleico oncogênico em câncer de mama
MMP-7	Metaloproteinase de matriz-7
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (neurotoxina)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
MS	Mato Grosso do Sul
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-sensível
miRNA	Microácido ribonucleico
NF-Kb	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
O/A	Óleo em água
Omps	<i>Outer-membrane proteins</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico

PBPs	Proteínas de ligação à Penicilina
PE	Pernambuco
PEG	Polietilenoglicol
PG	<i>Punica granatum</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA-PEG	ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico) – polietilenoglicol
PVA	Álcool polivinílico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
qsp	quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
Rf	Fator de Retenção
RNA	Ácido ribonucleico
SEA	Enterotoxina estafilocócica A
SHIP-1	inositol 5 'polifosfatase 1
siRNA	RNA silenciador
SPA	Seco por aspersão
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
tR	Tempo de Retenção
UDP	Uridina 5'-difosfato
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFPEA	Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UVA	Radiação ultravioleta tipo A
UVB	Radiação ultravioleta tipo B
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
VRE	Enterococos Resistentes à Vancomicina
WBSSH	<i>White-Bate-Smith-Swain-Haslam</i> , (classificação de compostos fenólicos)
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	29
3.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	30
3.1.1	Classificação química.....	30
3.1.2	Importância fisiológica e distribuição vegetal	34
3.1.3	Atividades farmacológicas.....	36
3.1.4	Limitações biofarmacêuticas.....	40
3.1.5	Prospecção industrial.....	42
3.2	CONCLUSÃO	43
3.3	REFERÊNCIAS.....	44
4	<i>CINNAMOMUM VERUM, EUGENIA UNIFLORA E PUNICA GRANATUM:</i>	
	ESPÉCIES RICAS EM COMPOSTOS FENÓLICOS.....	53
4.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	54
4.1.1	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.....	54
4.1.1.1	Aspectos botânicos e históricos.....	54
4.1.1.2	Uso tradicional	55
4.1.1.3	Composição química	56
4.1.1.4	Atividades biológicas.....	58
4.1.2	<i>Eugenia uniflora</i> Linn.....	64
4.1.2.1	Aspectos botânicos e históricos.....	64
4.1.2.2	Uso tradicional	65
4.1.2.3	Composição química	67
4.1.2.4	Atividades biológicas.....	69
4.1.3	<i>Punica granatum</i> Linn.....	72
4.1.3.1	Aspectos botânicos e históricos.....	72
4.1.3.2	Uso tradicional	73
4.1.3.3	Composição química	75
4.1.3.4	Atividades biológicas.....	77
4.2	CONCLUSÃO	90
4.3	REFERÊNCIAS.....	91

5	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE <i>CINNAMOMUM VERUM</i>, <i>EUGENIA UNIFLORA</i> E <i>PUNICA GRANATUM</i>.....	106
5.1	REFERENCIAL TEÓRICO	107
5.1.1	Métodos de extração de compostos fenólicos.....	107
5.1.2	Métodos analíticos para identificação de compostos fenólicos.....	109
5.1.2.1	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	110
5.1.2.2	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE)	111
5.1.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	112
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	113
5.2.1	Material vegetal.....	113
5.2.2	Preparo dos extratos brutos e frações enriquecidas	113
5.2.3	Caracterização dos extratos brutos/frações por CCD-AE	115
5.2.4	Caracterização dos extratos brutos/frações por CLAE.....	115
5.2.5	Quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria UV/Vis.....	117
5.2.5.1	Diluição direta.....	117
5.2.5.2	Hidrólise ácida	118
5.2.6	Análise estatística	118
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
5.3.1	Produção dos extratos brutos e frações.....	119
5.3.2	Quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria UV/Vis e caracterização de extratos brutos/frações por CCD-AE	121
5.3.3	Caracterização de extratos brutos/frações por CLAE.....	126
5.4	CONCLUSÃO	129
5.5	REFERÊNCIAS.....	130
6	EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE <i>CINNAMOMUM VERUM</i>, <i>EUGENIA UNIFLORA</i> E <i>PUNICA GRANATUM</i> COMO ANTIOXIDANTES E MODIFICADORES DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	135
6.1	REFERENCIAL TEÓRICO	136
6.1.1	Resistência microbiana: Aspectos gerais e impactos	136
6.1.2	Antimicrobianos disponíveis: Histórico e principais representantes	137
6.1.3	Mecanismos de resistência bacteriana.....	147
6.1.4	Compostos fenólicos como alternativa antimicrobiana sinérgica.....	150

6.1.5	<i>Cinnamomum verum</i>, <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Punica granatum</i> como reservatórios de metabólitos antimicrobianos	151
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	152
6.2.1	Atividade antioxidante.....	152
6.2.1.1	Radical DPPH [•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	152
6.2.1.2	Radical ABTS ^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)).....	153
6.2.2	Atividade antimicrobiana.....	155
6.2.2.1	Microorganismos e condições de cultivo	155
6.2.2.2	Determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima	155
6.2.2.3	Determinação da atividade sinérgica das frações acetato de etila.....	158
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
6.3.1	Atividade antioxidante.....	161
6.3.2	Atividade antimicrobiana.....	166
6.3.2.1	Determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima	166
6.3.2.2	Determinação da atividade sinérgica das frações acetato de etila.....	171
6.4	CONCLUSÃO	177
6.5	REFERÊNCIAS.....	178
7	DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO COMPREENDENDO ATIVOS DE <i>CINNAMOMUM VERUM</i>, <i>EUGENIA UNIFLORA</i> E <i>PUNICA GRANATUM</i>	190
7.1	REFERENCIAL TEÓRICO	191
7.1.1	Sistemas de liberação para compostos fenólicos.....	191
7.1.2	<i>Status quo</i> de formas farmacêuticas e sistemas de liberação contendo ativos de <i>Cinnamomum verum</i>, <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Punica granatum</i>	193
7.1.2.1	<i>Cinnamomum verum</i>	193
7.1.2.2	<i>Eugenia uniflora</i>	199
7.1.2.3	<i>Punica granatum</i>	202
7.1.3	Secagem por aspersão para produção de insumos farmacêuticos ativos de <i>C. verum</i>, <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	211
7.1.4	Emulsões como sistemas de liberação para compostos fenólicos derivados de <i>C. verum</i>, <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>.....	212
7.1.4.1	Emulsões Pickering.....	216
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	217
7.2.1	Obtenção de extratos brutos e frações secos por aspersão	217
7.2.2	Obtenção e caracterização dos sistemas dispersos emulsionados.....	218

7.2.2.1	Construção de diagramas pseudoternários	218
7.2.2.2	Método de obtenção e avaliação preliminar do desempenho das formulações.....	219
7.2.2.3	Avaliação da eficiência do método de dispersão	220
7.2.2.4	Avaliação de desempenho de agentes tensoativos	221
7.2.2.4.1.	<i>Caracterização das emulsões</i>	224
7.2.2.4.2.	<i>Estudos de estabilidade</i>	226
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	227
7.3.1	Extratos brutos e frações obtidos por <i>spray drying</i>	227
7.3.2	Obtenção e caracterização das emulsões	229
7.3.2.1	Avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo extrato bruto/frações acetato de etila de <i>C. verum</i> , <i>E. uniflora</i> e <i>P. granatum</i>	232
7.3.2.2	Avaliação do método de dispersão.....	235
7.3.2.3	Avaliação do desempenho dos agentes tensoativos	241
7.3.2.3.1.	<i>Caracterização e estabilidade das emulsões</i>	241
7.4	CONCLUSÃO	265
7.5	REFERÊNCIAS.....	266
8	CONCLUSÃO	275
	REFERÊNCIAS	276
	APÊNDICE A – PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO BR1020190160870	278
	APÊNDICE B – ARTIGO 1	279
	APÊNDICE C – ARTIGO 2	281
	ANEXO A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	283
	ANEXO B – CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN)	284
	ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE (CAMPUS RECIFE)	285

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, cerca de dois milhões de pacientes são infectados por microrganismos multidroga resistentes (MDR) nos Estados Unidos, sendo gastos aproximadamente 16 bilhões de dólares em tratamento. Essas infecções são recorrentes, com elevada taxa de mortalidade/morbidade e relacionadas a pelo menos 23 mil óbitos/ano. Microrganismos MDR representam um desafio para a ciência, pois o desenvolvimento de antimicrobianos efetivos demanda longo tempo e, por vezes, elevado custo (SEPTIMUS, 2018; USA, 2013).

Novos agentes antimicrobianos são indefectíveis, particularmente no tratamento de infecções crônicas. Neste sentido, a utilização de compostos com atividade multifarmacofórica, sobretudo antioxidante e anti-inflamatória; bem como combinações sinérgicas aumentaram consideravelmente na literatura científica (artigos) e tecnológica (patentes). Tal abordagem reflete a atual mudança de estratégia para arremeter a multirresistência (MARTELLI; GIACOMINI, 2018).

Os produtos naturais se diferenciam das moléculas sintéticas sob o aspecto da diversidade estrutural, a qual é superior àquela derivada dos processos de síntese, e isso proporciona um grande leque de possibilidades para o desenvolvimento de novos agentes com propriedades terapêuticas diversificadas (KOH et al., 2013). Estima-se que as plantas possam biossintetizar pelo menos um milhão de compostos além dos metabólitos primários, estando a expressão destas moléculas diretamente envolvida em mecanismos de adequação do produtor a seu meio, apresentando diversas atividades biológicas (MCCREATH; DELGODA, 2017).

Em 2013, cem metabólitos secundários isolados ou derivados de produtos naturais foram avaliados em ensaios clínicos, estando 31 deles em Fase III ou registrados (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014). Esses números indicam o importante contributo dos produtos naturais na terapia moderna e representam a crescente procura pelo mercado de fitoterápicos. Os principais grupos de metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana incluem polifenóis, alcaloides, flavonoides, terpenoides, lecitinas, taninos e saponinas (KON; RAI, 2016).

Compostos fenólicos tem sido descritos como ativos antimicrobianos não-tóxicos e de eficácia significativa frente a cocos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* (ALEXANDRE et al., 2019; PAGLIARULO et al., 2016) e *Enterococcus* spp. (BEHERA et al., 2017; DAHMER et al., 2019), fungos do gênero *Candida* spp. (PINNA et al., 2019; SARDI

et al., 2017) e bactérias Gram-negativas (GARCIA et al., 2019; UBEROS et al., 2015) com fenótipo MDR (BENAMEUR et al., 2019; DEY; RAY; HAZRA, 2015).

Considerando aplicação frente a microrganismos MDR, algumas espécies vegetais produtoras de compostos fenólicos têm sido estudadas, inserindo-se *Cinnamomum verum* Blume (Lauraceae), *Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae) e *Punica granatum* Linn (Lythraceae). O extrato metanólico do caule de *C. verum* apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1,51 mg/mL frente a Gram-positivos e Gram-negativos MDR (KOH et al., 2013), bem como CIM e Concentração Bactericida Mínima (CBM), respectivamente, de 0,4 mg/mL e 1,6 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae* e de 3,1 mg/mL e 6,2 mg/mL para *Escherichia coli*, ambas produtoras de β -lactamase de espectro estendido (RATH; PADHY, 2014).

O extrato metanólico do caule de *P. granatum* apresentou atividade antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Chromobacterium violaceum* (KOH; THAM, 2011), bem como aumentou a atividade de cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, tetraciclina e oxacilina contra *S. aureus* (UPADHYAY et al., 2014). Extratos hidroalcoólicos de partes aéreas de *E. uniflora* foram ativos contra *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, com CIM de 31,25 μ g/mL (LAGO et al., 2011). Extratos hidroalcoólicos das sementes e das folhas de *Eugenia* spp. foram ativos contra *Candida albicans* (CIM de 15,62 μ g/mL e 31,25 μ g/mL, respectivamente) e reduzindo a viabilidade do biofilme em 54-55% (SARDI et al., 2017). A CIM para o óleo essencial de *E. uniflora* foi 256 μ g/mL para *S. aureus* e 1,0 mg/mL para *E. coli* multirresistentes; apresentando sinergismo com amicacina (PEREIRA et al., 2017).

Torna-se, portanto, plausível a utilização de extratos e/ou frações enriquecidas dessas espécies em formulações, considerando as atividades biológicas supracitadas. No que pese a veiculação destes ativos, as emulsões destacam-se por sua importância para a indústria farmacêutica. O desenvolvimento de emulsões é uma estratégia para obtenção de produtos que contenham ativos vegetais, devido a possibilidade de compartimentalização em uma das fases, podendo associar-se diversos componentes à formulação, incluindo fármacos hidrofóbicos (LU; KELLY; MIAO, 2016; SANTANA et al., 2019; ZORZI et al., 2015). Para tanto, pesquisas necessitam ser ampliadas frente ao desenvolvimento de sistemas farmacêuticos que permitam a veiculação de derivados de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* para atuação sinérgica junto a antibióticos disponíveis, no combate à resistência antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biológico e tecnológico de extratos brutos e frações das folhas de canela (*Cinnamomum verum*), pitangueira (*Eugenia uniflora*) e romãzeira (*Punica granatum*), visando o desenvolvimento de sistemas dispersos emulsionados contendo bioativos para aplicação frente a microrganismos multidroga-resistentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação botânica de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum*;
- Coletar as matérias-primas vegetais, constituídas pelas folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*;
- Preparar os extratos brutos e as frações a partir das matérias-primas vegetais;
- Caracterizar e quantificar, por métodos espectrofotométricos e cromatográficos, os extratos brutos/frações, com determinação do teor de taninos e flavonoides;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos/frações frente aos radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+};
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos extratos/frações e de fármacos convencionais, frente a cepas-padrão e multidroga-resistentes;
- Determinar o potencial modulador das frações ativas na resistência aos fármacos, com cálculo de Índice de Concentração Inibitória Fracionada;
- Avaliar a viabilidade tecnológica da veiculação do extrato(s) bruto(s)/fração(ões) secos por aspersão em sistemas dispersos emulsionados, realizando estudo de estabilidade preliminar e acelerada das formulações obtidas.

3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Produtos naturais são uma ampla variedade de compostos oriundos de diferentes fontes, incluindo bactérias, fungos, organismos marinhos e plantas. O termo pode ser usado para descrever misturas complexas e compostos isolados. Estas substâncias têm sido utilizadas milenarmente no tratamento de doenças humanas, sendo crescente o interesse terapêutico no âmbito acadêmico e industrial (FU et al., 2019; GWIAZDON; BIESAGA, 2017; KELLOGG et al., 2019).

Uma das principais vantagens da utilização de produtos naturais na pesquisa de novos fármacos, em relação aos compostos sintéticos, é a alta probabilidade de atividade biológica. Metabólitos secundários são sintetizados e otimizados através da evolução para interações biológicas específicas entre o produtor e o ambiente. Neste sentido, a diversidade química destas substâncias torna-se inigualável (BODEKER; GRAZ, 2019; HO; TRAN; CHAI, 2018).

Há estimativa de 500.000 espécies de plantas terrestres, sendo maior parte distribuída em regiões tropicais (CORLETT, 2016). Estima-se que foi realizada a investigação terapêutica de apenas 10% destas e, considerando que cada espécie vegetal pode conter de 500 a 800 diferentes metabólitos secundários, o potencial para a descoberta de moléculas terapêuticas torna-se considerável (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; GWIAZDON; BIESAGA, 2017).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo atualmente identificadas aproximadamente 10.000 moléculas. São essenciais para crescimento, reprodução e defesa das plantas contra fatores estressantes internos e externos (KALLSCHEUER et al., 2019; ZAYNAB et al., 2018), representando um vasto grupo de moléculas com potencial exploratório no segmento farmacêutico. Nesse contexto, serão abordadas as classificações químicas, importância fisiológica e farmacológica, limitações biofarmacêuticas e prospecção industrial destes compostos.

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Classificação química

Estruturalmente, os compostos fenólicos compreendem um ou mais anéis aromáticos contendo grupos hidroxila em uma ampla variedade de estruturas químicas, variando desde moléculas simples até compostos altamente polimerizados. O número e as características das estruturas de fenol fundamentam as propriedades físicas, químicas e biológicas únicas dos membros desta classe (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2018; QUIDEAU et al., 2011).

Harborne e Simmonds (1964) primeiramente separaram essas substâncias em grupos baseados no número de carbonos de cada molécula, propondo uma classificação (Quadro 1). Entretanto, este sistema incluía várias categorias de substâncias e dificultava a hierarquização para compostos específicos (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2018).

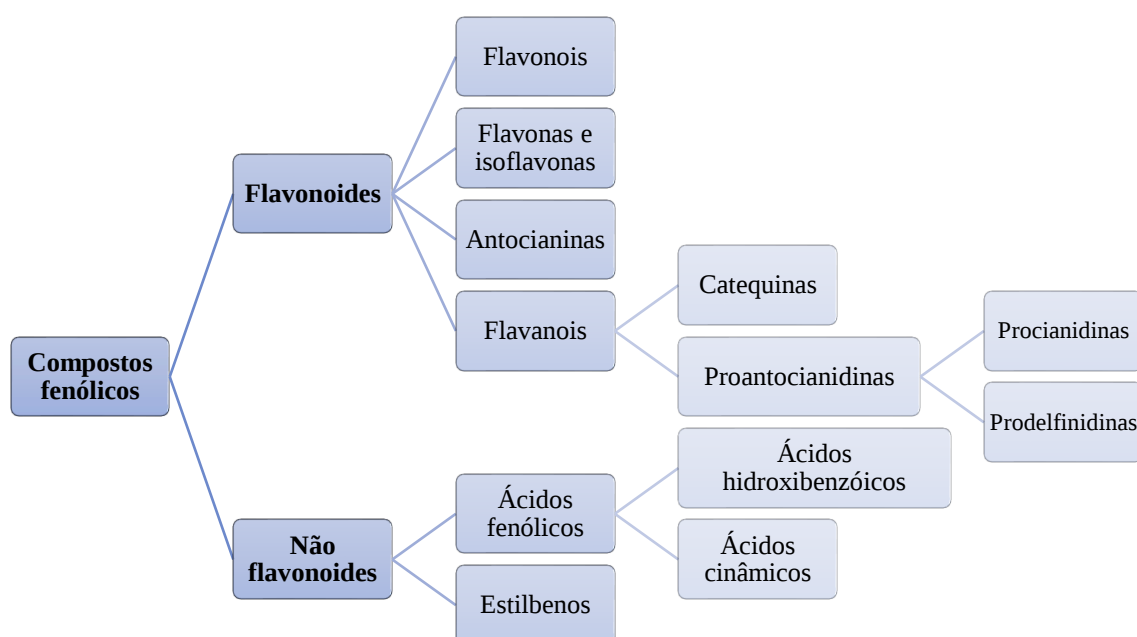
Quadro 1 - Classificação de compostos fenólicos proposta por Harborne e Simmonds

ESTRUTURA	CLASSE
C ₆	fenóis simples
C ₆ -C ₁	ácidos fenólicos e compostos relatados
C ₆ -C ₂	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	ácidos cinâmicos, aldeídos cinâmicos, álcoois cinâmicos
C ₆ -C ₃	cumarinas, isocumarinas e cromonas
C ₁₅	chalconas, auronas, dihidrochalconas
C ₁₅	flavanas
C ₁₅	flavonas
C ₁₅	flavanonas
C ₁₅	flavanonois
C ₁₅	antocianidinas
C ₁₅	antocianinas
C ₃₀	biflavonoides
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	benzofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	quinonas
C ₁₈	betacianinas
Lignanas, neolignanas	dímeros ou oligômeros
Ligninas	polímeros
Taninos	oligômeros ou polímeros
Flobafenos	polímeros

Fonte: Harborne; Simmonds (1964).

Trinta anos depois, Waterman e Mole (1994) classificaram os compostos fenólicos em fenóis simples (com único anel aromático) e em esqueletos mais complexos, baseados nos esqueletos C_6-C_3 , $C_6-C_3-2C_6$, $C_6-C_3-C_6$, quinonas, benzofenonas (e substâncias relacionadas), alcaloides e terpenos. Desta maneira, foram então considerados compostos multifuncionais, com diversas combinações e sendo divididos principalmente em compostos flavonoides ou não flavonoides (Figura 1) (BARUAH, 2011; JIMENEZ-GARCIA et al., 2013; LIU et al., 2015).

Figura 1 - Principais classes e subclasses dos compostos fenólicos segundo Waterman e Mole



Fonte: Adaptado de Gwiazdon; Biesaga (2017).

O grupo de compostos flavonoides compreendia flavonois, flavanois, isoflavonas, flavonas, flavanonas, flavanonas, proantocianidinas e antocianinas (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013). Em contrapartida, os compostos não flavonoides incluíam tocoferóis, ácidos fenólicos (ácido benzóico, ácido cinâmico e seus derivados), taninos hidrolisáveis, estilbenos, cumarinas e lignanas (BARUAH, 2011; GWIAZDON; BIESAGA, 2017). Todavia, essa classificação utilizava termos coletivos para vários subgrupos de compostos, os quais possuíam distintas taxonomias biológicas (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2018).

Nesse sentido, a classificação de White-Bate-Smith-Swain-Haslam (WBSSH) ganhou notoriedade. Proposta por Haslam e Cai (1994), teve como base pesquisas de Edgar Charles Bate-Smith, Anthony Swain e Theodore White que descreviam características comuns aos compostos vegetais usados no curtimento – os chamados “taninos” (HEMINGWAY, 1998; QUIDEAU et al., 2011).

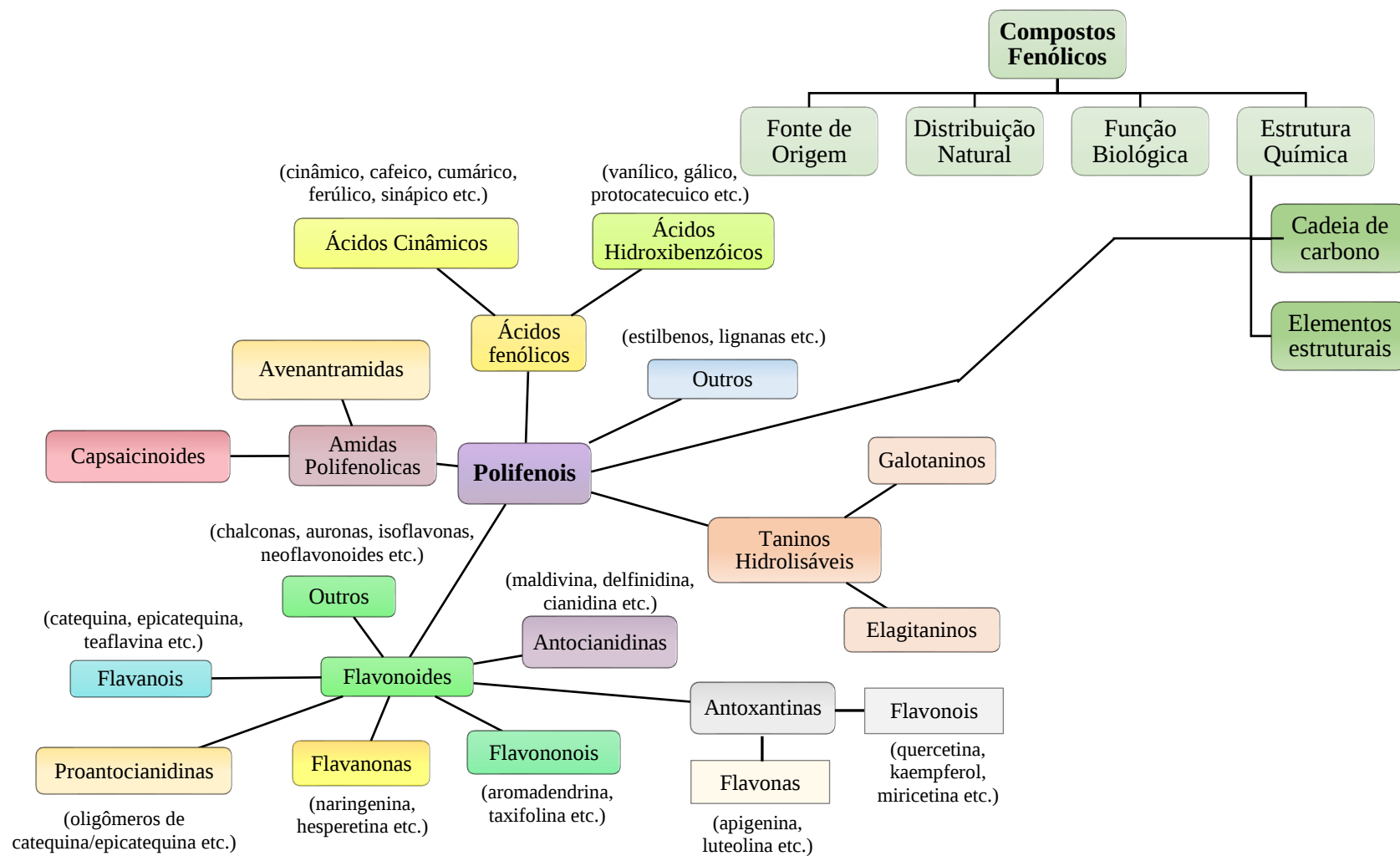
A WBSSH descreve “polifenóis” como compostos moderadamente hidrossolúveis, com peso molecular de 500 a 4000 Da, contendo de 12 a 16 hidroxilas fenólicas e 5 a 7 anéis aromáticos a cada 1000 Da de massa molecular relativa (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2018). De acordo com a WBSSH, a atividade antioxidante não é listada entre os fatores que tornam um composto fenólico num polifenol “verdadeiro” (QUIDEAU et al., 2011), propriedade esta atribuída aos “polifenóis” pelas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (ASSEFA; KEUM; SAINI, 2018; SHAVANDI et al., 2018).

Um desafio classificatório reside no fato de numerosos fenóis simples apresentarem atividade antioxidante, ainda que o termo “polifenóis” seja preferido em comunicações comerciais (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2018). A classificação WBSSH apresentava outras limitações; por exemplo, substâncias polifenólicas eram divididas em poli-hidroxi aromáticos com múltiplas unidades fenólicas ou compostos aromáticos poli-hidroxilados (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2018).

A necessidade de esclarecer a definição de “polifenóis” à luz da extensa pesquisa e do uso cada vez mais ambíguo do termo levou Stéphane Quideau a oferecer uma definição diferenciada (QUIDEAU, 2006). Nela, o termo "polifenol" deve ser usado para compostos derivados exclusivamente da via do shiquimato/fenilpropanóide/policetídeo, apresentando mais de uma unidade fenólica e desprovidos de funções nitrogenadas (QUIDEAU et al., 2011). O termo “fenóis poliméricos” atualmente tem sido preferido ao invés de “polifenóis”, porque as ligninas seriam excluídas de acordo com esta definição estrita de “polifenóis” (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2018).

Diante da relevância farmacêutica e industrial dos compostos fenólicos, os sistemas de classificação dessas substâncias tendem a mudar continuamente. A classificação mais comum é baseada nas estruturas químicas das agliconas (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2018). De maneira abrangente, os polifenóis podem ser classificados quanto sua origem, distribuição natural, função biológica e estrutura química (Figura 2).

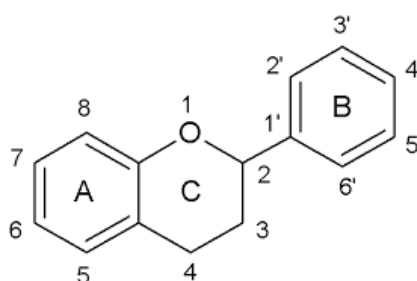
Figura 2 - Classificação de polifenóis baseada no número de anéis fenólicos e em elementos estruturais, com principais grupos e alguns representantes



Fonte: Adaptado de Bunte, Hensel e Beikler (2019).

Quantitativamente, estima-se que exista entre 100.000 e 200.000 metabólitos secundários, com direcionamento de cerca de 20% do carbono fixado pela fotossíntese para a via dos fenilpropanoides, o que massivamente contribui para a formação do grupo mais abundante de compostos fenólicos: os flavonoides (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2018; GWIAZDON; BIESAGA, 2017; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Os flavonoides, por sua vez, estão divididos em sete subgrupos; os quais compartilham uma estrutura comum (Figura 3), que consiste em dois aromáticos anéis (A e B) e três átomos de carbono que ligam o anel A e B, criando um heterociclo oxigenado chamado anel C (BUNTE; HENSEL; BEIKLER, 2019).

Figura 3 - Estrutura química básica dos flavonoides



Fonte: Próprio autor.

Através das rotas biossintéticas para a síntese dos flavonoides, entre as fases de condensação e polimerização formam-se os taninos condensados (proantocianidinas). Os taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico ou do ácido elágico (RAUF et al., 2019). Além da diversidade química, os polifenóis podem estar associados a vários carboidratos (existindo como glicosídeos com diferentes unidades de açúcar e açúcares acilados em diferentes posições dos esqueletos de polifenóis) e ácidos orgânicos ou entre si (SINGLA et al., 2019).

3.1.2 Importância fisiológica e distribuição vegetal

A composição dos compostos fenólicos é qualitativamente e quantitativamente variável. Enquanto alguns compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, outros estão restritos a famílias ou espécies específicas (por exemplo, a presença de isoflavonas em leguminosas). Ademais, significativas variações intraespécies também podem ocorrer, particularmente devidas a fatores genéticos, condições ambientais e estágios de crescimento ou maturação (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2018; QUIDEAU et al., 2011).

Os polifenóis desempenham papéis importantes, servindo como mensageiros na interação planta-ambiente. São capazes de regular o transporte do fitohormônio auxina, criando gradiente em células vegetais e, assim, causando a formação de vários fenótipos. Flavonoides, em particular, atuam na defesa contra o estresse abiótico, absorvendo luz solar em comprimentos de onda correspondentes às faixas de radiação ultravioleta longa (UV-A) e média (UV-B), bem como inibindo espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pela luz solar (GITELSON et al., 2017). Dessa forma, os flavonoides localizam-se nos núcleos de células mesófilas e cloroplastos, onde ocorre a produção primária de ERO (TEPLOVA et al., 2018; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2018).

Os pigmentos que colorem a maioria das flores, frutos e sementes são os flavonoides, que têm a maior gama de cores, de amarelo pálido a azul. As antocianinas ocorrem em todos os tecidos vegetais em cores que vão de laranja/vermelho a violeta/azul. A cor específica apresentada também depende do pH, co-pigmentos e complexação com íons metálicos. Nesse sentido, atuam como atrativos para insetos, pássaros e mamíferos para polinização e dispersão de sementes. Além disso, contribuem para características sensoriais de folhas, flores e frutos, como sabor e adstringência (GWIAZDON; BIESAGA, 2017; SANTOS et al., 2017).

Flavonoides atuam ainda como fitoalexinas, produzidas em maiores quantidades imediatamente após infecção por microrganismos. O teor de glicosídeos flavonoidicos pode aumentar em até 50% nas fases iniciais da infecção, participando na resposta imune específica vegetal (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012; ZAYNAB et al., 2018). O acúmulo de flavonoides em núcleos celulares também promove função reguladora transcricional. Desse modo, protege o DNA frente à radiação UV e à degradação oxidativa, bem como controla a transcrição de genes necessários para o crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo genes que codificam proteínas transportadoras de auxina (TEPLOVA et al., 2018).

No que tange à distribuição, flavonas estão presentes em frutas cítricas (HOSTETLER; RALSTON; SCHWARTZ, 2017), isoflavonoides (isoflavonas, isoflavanonas e isoflavonois) são geralmente encontrados em leguminosas (POPA; RUSU, 2017) e favan-3-ols (sobretudo catequinas) são abundantes em chás (ex: *Camellia sinensis*) e no chocolate (feito das sementes de *Theobroma cacao*) (KUHNLE, 2018). Plantas aromáticas também são fontes significativas de flavonoides (COSTA et al., 2015; PICCOLELLA et al., 2018; PROESTOS; VARZAKAS, 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Antocianidinas promovem coloração azul, vermelha e violeta em flores, frutos e folhas, especialmente em hortaliças; com aumento do teor conforme a maturação (GU et al., 2019).

Dada a crescente procura, bancos de dados foram criados para divulgar informações acerca do teor de polifenóis em alimentos. O “Phenol-Explorer” versão 1.5.7, desenvolvido em 2009 pelo *Institut National de la Recherche Agronomique* “INRA” em parceria com o grupo *Wishart Research*, contém mais de 35.000 teores de 500 polifenóis presentes em mais de 400 alimentos. Esses dados derivam de coleção sistemática de mais de 60.000 valores em mais de 1.300 publicações científicas (GALANAKIS, 2018). Outra fonte importante também é disponibilizada pelo *United States Department of Agriculture* (USDA), um “Banco de Dados para o Conteúdo Flavonoídico de Alimentos Seleccionados” para 506 itens alimentícios (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2013), atualizado em 2018 (HAYTOWITZ; WU; BHAGWAT, 2018).

3.1.3 Atividades farmacológicas

A indústria vinícola exerceu notável contributo para a popularização da importância dos compostos fenólicos para a saúde humana. Numerosos estudos epidemiológicos demonstram a associação entre bebidas ricas em (poli) fenóis e seus efeitos profiláticos e terapêuticos. O interesse remonta desde estudos sobre o chamado "paradoxo" de menor incidência de doenças cardíacas coronárias na França e na Itália, como consequência do consumo regular de vinho, apesar de alta ingestão de gordura (CORDER et al., 2006; GWIAZDON; BIESAGA, 2017; QUIDEAU et al., 2011; RENAUD; DE LORGERIL, 1992).

Grande impulso científico foi promovido com a descoberta dos efeitos quimiopreventivos do resveratrol, um estilbeno encontrado principalmente nas sementes, nas películas e no vinho de uvas pretas (JANG et al., 1997). Após este feito, mais de 9.000 publicações sobre o resveratrol ocorreram nos últimos anos, contribuindo para o aumento da busca por outros compostos (HUANG et al., 2019b; TOMÉ-CARNEIRO et al., 2013).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos é a mais reconhecida, por mecanismos de eliminação direta de radicais livres, quelação de íons metálicos envolvidos na formação desses radicais, e inibição de enzimas envolvidas na produção e regeneração de antioxidantes ligados à membrana, como o α -tocoferol (MARRANZANO et al., 2019). Outros efeitos farmacológicos secundários têm sido atribuídos aos polifenóis, sob o ponto de vista de redox, como por exemplo a ação anti-inflamatória.

A cicloxigenase (COX), na sua isoforma tipo 2, e a lipoxigenase (LOX) são enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (AA), ácido graxo importante no desenvolvimento de processos inflamatórios. A inibição destas enzimas reduz a produção de AA, diminuindo a produção de prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico (ON). Há evidências de que os polifenóis podem inibir esses sistemas enzimáticos, reduzindo o nível de radicais livres nas células (CORRÊA; ROGERO, 2019; KHAN et al., 2019).

Estudos usando métodos *in silico* avaliaram o modo de ligação de flavonoides à COX-2, demonstrando que compostos que possuem ligação dupla em 2,3 atuam como inibidores seletivos da COX-2. Estas observações foram encontradas para as classes de flavonóis, flavonas e flavanonas ou isoflavonas (D'MELLO et al., 2011). Flavonoides como silbinina, galangina, hesperitina, naringenina e daidzeína tem sítios de ligação comparáveis ao celecoxib (MADESWARAN et al., 2012). Em relação à LOX, os flavonoides aromadadrina, eriodictiol, fisetina, homoeriodictiol, pachipodol, ramnetina, robinetina, tangeritina, teaflavina e azelastina possuem configurações estruturais inibitórias, podendo levar ao desenvolvimento de fármacos potentes para o tratamento da inflamação (MADESWARAN et al., 2011; NILE et al., 2018; RIBEIRO et al., 2014).

Outras modulações enzimáticas também tem sido descritas, tais como da ON sintase, atuante no tônus vascular e angiogênese, na secreção de insulina, no peristaltismo e no desenvolvimento neural (OAK et al., 2018; SANTOLINI, 2019) e quimioprevenção por modulação da tirosina e serina-treonina quinases, envolvidas na proliferação de células T, ativação de células B e produção de citocinas por monócitos ativados (CABAN et al., 2019; DAS; RAMANI; SURAJU, 2016). Polifenóis podem ainda regular a expressão do fator nuclear alfa B e o remodelamento da cromatina, através de enzimas epigenéticas como histonas acetiltransferases, DNA metiltransferases ou histonas desacetilases, contribuindo para efeitos antitumorais (HUANG et al., 2019a).

Chalconas, estilbenos, flavanonas, flavononóis, flavonóis e isoflavonas têm sido relacionados como moduladores da gênese de esteroides, atuando frente a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD), 17 β -HSD e aromatase. Experimentos de triagem indicaram maior afinidade por flavonas do que suas respectivas chalconas. As flavononas possuem afinidade de ligação consistente a todas as três enzimas utilizadas e são melhores moduladores da esteroidogênese de cânceres hormônio-dependentes (BALDOVSKÁ et al., 2019; COUTURE et al., 2019; HATTI et al., 2009; KANG et al., 2016; NIELSEN; MCNULTY, 2019).

Em relação à xantina oxidase (XO), enzima envolvida em hiperuricemia, gota e cálculos renais, alguns flavonoides como buteína, fisetina, diosmetina, tricetinina, genisteína, tricina, vitexicarpo, herbacetina, biochanina, rhamnetina, apigenina, luteolina, isorannetina, robinetina, peonidina e okanina exercem atividade inibitória. A presença de um anel benzopirano no núcleo básico flavonoídico contribui para o incremento da atividade inibidora da XO (MASUOKA; KUBO, 2018; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016; RANJANA et al., 2019; UMAMAHESWARI et al., 2011).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave no sistema nervoso central e sua inibição leva a um aumento dos níveis de acetilcolina neural, que é uma das terapias para o alívio sintomático da demência leve a moderada. Portanto, a inibição das colinesterases é um dos focos do desenvolvimento de medicamentos para combater a Doença de Alzheimer. Um número expressivo de flavonoides tem sido relatado por sua atividade anticolinesterásica. Os estudos inibitórios *in vitro* realizados com quercetina, rutina, kaempferol 3-O- β -d-galactosideo mostraram que a quercetina possui capacidade de inibição dependente da concentração de AChE e butirilcolinesterase (BChE), outra enzima associada ao Alzheimer (LIU et al., 2016; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Embora alguns mecanismos antiagregante plaquetários tenham sido relatados, tais como a inibição da fosfolipase A2, fosfodiesterases e diversas proteínas quinases (KUMAR et al., 2017), o mecanismo que parece ser comum para a maioria dos flavonoides parece ser a inibição da agregação plaquetária através da via do AA (FAGGIO et al., 2017; KARLÍČKOVÁ et al., 2016). Os flavonoides são capazes de reduzir também a agregação induzida por diferentes estimuladores, evitando a agregação provocada por múltiplos agonistas de receptores acoplados à proteína G, ADP ou trombina; bem como atuando pela via do colágeno, que é reconhecida por desempenhar papel central na fase 1 da agregação patofisiológica das plaquetas. A flavona apigenina e a isoflavona genisteína, por exemplo, apresentam maior capacidade de ligação ao tromboxano A2 (FAGGIO et al., 2017). Flavonoides como rutina, quercetina, diosmina e hesperidina têm sido amplamente utilizados para tratamento da insuficiência venosa crônica, promovendo a homeostase endotelial (LICHOTA; GWOZDZINSKI; GWOZDZINSKI, 2019).

Polifenois da dieta podem melhorar a resistência à insulina relacionada com a obesidade, atenuando as respostas inflamatórias e o estresse oxidativo. O consumo de flavonoides pode prevenir a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica via receptores de estrogênio acoplados à proteína G da superfície celular, aumentando a expressão de genes relacionados e suas vias, que são responsáveis pela sensibilidade à insulina. A epicatequina, por exemplo,

regula negativamente a expressão da quimiocina CCL19 no tecido adiposo e, desse modo, melhora a obesidade induzida pela dieta e a resistência à insulina (ENGIN et al., 2018; SANO et al., 2017).

Estudos apontam flavonóis, antocianidinas, proantocianidinas, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavan-3-óis para o tratamento da desregulação metabólica. Estudos observacionais realizados por Hügel e colaboradores (2016) associaram a dieta rica nestes compostos à diminuição do risco de hipertensão e doenças cardiovasculares. O efeito da ingestão regular de tirosol, alquilfenóis, lignanas e estilbenos em 550 pacientes idosos brasileiros hipertensos também foi estudado, demonstrando redução da pressão arterial sobretudo por ácidos fenólicos (MIRANDA et al., 2016).

Polifenois têm sido utilizados no tratamento de desordens cutâneas. A quercetina demonstrou atividade anti-psoriática, com redução significativa da espessura epidérmica e da migração de leucócitos (SINGH; TRIPATHY, 2014). Outros estudos também demonstraram a utilização de capsaicinoides para psoríase (DZIAŁO et al., 2016) e de curcumina para feridas e queimaduras (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019). Em ensaios clínicos, polifenois de *Ginkgo biloba* têm sido utilizados para o tratamento de vitiligo (SZCZURKO et al., 2011), avenantramidas para dermatite atópica (SILVERBERG, 2017) e epigallocatequina-3-galato para acne e rosácea (DURSUN; DAYE; DURMAZ, 2019).

A atividade antiviral de compostos fenólicos tem sido comprovada. Kaempferol, luteolina e quercetina mostraram-se eficazes contra o vírus do herpes simples (HSV-1 e HSV-2) (ÜRMÉNYI et al., 2016). Flavan-3-óis mostraram-se mais eficientes no bloqueio seletivo do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1, HIV-2), onde baicalina, gardenina dimetilada A e robinetina bloquearam a transcriptase reversa e a proteinase HIV-1 (DANIYAL et al., 2016; TRIVEDI et al., 2019). Baicalina, curcumina, genisteína, miricetina e resveratrol também foram eficazes contra infecções virais causadas pelo papilomavírus humano (HPV) e pelo Zika vírus (JACOB; THOMAS, 2019; OO et al., 2019; TEPLOVA et al., 2018).

Compostos fenólicos têm atraído interesse de pesquisadores por sua pronunciada atividade antimicrobiana. Dentre estes destacam-se flavan-3-óis, flavonóis e taninos, por apresentarem amplo espectro e atividade superiores, em comparação com outros polifenois. A maioria destes compostos também é capaz de suprimir um número expressivo de fatores de virulência bacterianos, tais como formação de biofilme, adesão e produção de toxinas. Ademais, estes compostos demonstram sinergismo com antibióticos, o que é relevante, considerando o aumento da resistência microbiana (DAGLIA, 2012; LIMA et al., 2019; XIE et al., 2014).

3.1.4 Limitações biofarmacêuticas

Instabilidades físico-químicas e a baixa biodisponibilidade oral dos compostos fenólicos limitam seus potenciais usos para a saúde, considerando as atividades biológicas relevantes destas moléculas (LU; KELLY; MIAO, 2016). De fato, apenas uma pequena proporção de polifenóis quando administrados por via oral são absorvidos, devido ao tempo de retenção gástrica insuficiente e às degradações enzimáticas pré-sistêmicas sequenciais (HU; WU; LIU, 2017).

Polifenóis são muito instáveis em soluções neutras e alcalinas, caracterizando perda de teores ativos nas fases digestivas salivares e intestinal, fenômeno este principalmente devido à epimerização e à auto-oxidação. Ademais, possuem reduzida lipofilia (FARIDI ESFANJANI; ASSADPOUR; JAFARI, 2018; PULIGUNDLA et al., 2017). Apenas 5% a 10% da quantidade de polifenóis ingerida é absorvida no intestino delgado. Desse montante, 90% –95% entram na circulação como compostos conjugados produzidos por uma combinação de metilação, conjugação de sulfato, conjugação de glucuronídeo e, no caso de alguns ácidos fenólicos, também por conjugação de glicina (BARROS; MARÓSTICA JUNIOR, 2019).

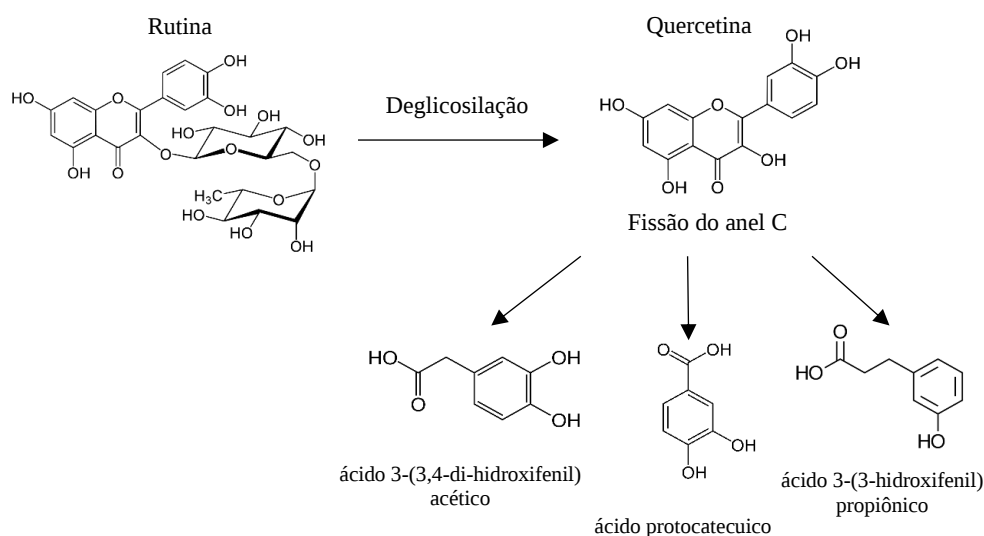
A absorção dos compostos fenólicos e seus correspondentes glicosídeos está relacionada à clivagem e liberação das suas agliconas, em parte como resultado da atividade das enzimas digestivas e do metabolismo microbiano (MARÍN FERNÁNDEZ et al., 2015). O metabolismo de compostos como catequinas, flavanois e flavonas ocorre no intestino delgado. A enzima lactase-florizina hidrolase (LPH), localizada nas células epiteliais do intestino delgado, tem especificidade para flavonoides-*O*- β -glicosilados, permitindo liberação da aglicona nas células por difusão passiva. Adicionalmente, a β -glicosidase citosólica existente nas células epiteliais, alternativamente hidrolisa alguns glicosídeos fenólicos depois de transportados através do epitélio (TENG; CHEN, 2019).

Antes do transporte passivo para o sistema porta-hepático e a circulação sistêmica, as agliconas são metabolizadas através de sulfatação, glicuronidação ou metilação e passam por metabolismo de fase II através das respectivas ações das sulfotransferases, uridina 5'-difosfato (UDP)-glicuronil transferase e catecol-*O*-metiltransferases (MARGALEF et al., 2017). Caso contrário, alguns metabólitos retornam ao lúmen do intestino delgado, envolvendo transporte ativo mediado por proteínas transmembrana da família da adenosina trifosfato (ATP) – as ATPases, incluindo proteína de resistência a múltiplos fármacos e glicoproteína P (HU; WU; LIU, 2017).

Os demais polifenóis não modificados (~90%–95%), que são resistentes à ação da LPH/ β -glicosidase citosólica, e as formas conjugadas presentes na bile atravessam o trato intestinal, acumulando-se no intestino grosso onde sofrem ação enzimática da microbiota, resultando na produção de metabólitos com diferentes efeitos farmacológicos (BARROS; MARÓSTICA JUNIOR, 2019). Flavonóis, por exemplo, são extensivamente degradados pela microbiota colônica, gerando compostos fenólicos mais simples (menos ativos) derivados do metabolismo dos anéis A e B, após a quebra do flavonoide no anel C, como apresentado na Figura 4 para a quercetina (MARÍN FERNÁNDEZ et al., 2015).

Metabólitos de polifenóis podem seguir duas vias de excreção: via biliar ou via urinária. Os metabólitos grandes e extensivamente conjugados são mais propensos a serem eliminados na bile, enquanto pequenos conjugados, como os monossulfatos, são preferencialmente excretados na urina (BARROS; MARÓSTICA JUNIOR, 2019).

Figura 4 - Produtos de degradação colônica da quercetina



Fonte: Adaptado de Marín Fernández e colaboradores (2015).

Considerando a associação da biodisponibilidade de polifenóis com enzimas de fase II e transportadores de efluxo, prever e melhorar a biodisponibilidade destas moléculas torna-se difícil. Neste sentido, é desafiador o uso de polifenóis por via oral em humanos, pois faz-se necessário o incremento da biodisponibilidade para níveis consistentes (geralmente acima de 50%) (HU; WU; LIU, 2017). Ademais, diferenças interindividuais na composição da microbiota intestinal podem levar a variações na biodisponibilidade e eficácia dos polifenóis e seus metabólitos (BARROS; MARÓSTICA JUNIOR, 2019).

Sob a perspectiva de veiculação oral, além da limitada biodisponibilidade, muitos polifenóis apresentam sabor desagradável, predominantemente amargo. Neste sentido, necessitam de mascaramento antes da incorporação em formulações orais. Portanto, a administração de compostos fenólicos requer a formulação de um produto final capaz de manter a integridade estrutural da molécula até sua administração, mascarar o seu sabor, aumentar a biodisponibilidade e atingir precisamente o alvo fisiológico (FARIDI ESFANJANI; ASSADPOUR; JAFARI, 2018; MUNIN; EDWARDS-LEVY, 2011). A incorporação em nanocarreadores, a veiculação em sistemas coloidais e a utilização de vias de administração locais representam alternativas para estas limitações (LU; KELLY; MIAO, 2016; NAGULA; WAIRKAR, 2019; PIMENTEL-MORAL et al., 2018).

3.1.5 Prospecção industrial

Devido aos diversos efeitos terapêuticos mencionados, os polifenóis estão entre os produtos naturais mais intensamente estudados. No entanto, torna-se um desafio elucidar os mecanismos polifarmacológicos destes compostos. Em análise *bicluster* de perfis de expressão gênica; Li, Xiong e Zhang, (2014) identificaram 148 alvos para 20 polifenóis, incluindo catequina, quercetina, resveratrol e genisteína.

Diversas estratégias surgiram na tentativa de comercializar compostos fenólicos. Os produtos que contêm polifenóis estão sendo promovidos como alimentos funcionais, que são “alimentos que têm um efeito potencialmente positivo sobre a saúde além da nutrição básica” (GWIAZDON; BIESAGA, 2017). O mercado global de polifenóis, que inclui aplicações em alimentos e bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos, foi estimado em mais de 700 milhões de dólares em 2015 e está previsto para atingir 1,1 bilhão de dólares em 2022 (CORY et al., 2018).

Um evento singular foi marcado pela aprovação de uma pomada pela *Food and Drug Administration* (FDA), a Polyphenon E®, contendo 15% de sinecatequinas para o tratamento de verrugas genitais (TATTI et al., 2010). Posteriormente em 2012, a crofelemer (Mytesi®), uma proantocianidina oligomérica utilizada para o tratamento oral de diarreia associada ao uso de antirretrovirais, também foi aprovada (HU; WU; LIU, 2017).

Atualmente existem 13 produtos derivados de flavonoides aprovados e registrados mundialmente. Dentre os fármacos, destacam-se o Urispas[®] (flavoxato, antagonista muscarínico das vias urinárias para uso oral); Analpram[®] (diosmina em pomada, para tratamento de hemorroidas) e Elas Gel[®] (troxerrutina associada a extrato de folhas de *Ginkgo biloba*, como anestésico tópico) (DRUGBANK, 2019).

No Brasil, há 12 medicamentos comercializados a base de flavonoides, aprovados e com registro válido na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento de insuficiência venosa crônica. São eles: Troxvenot[®], Varicoss[®], Venalot[®] (associação de cumarina + troxerrutina) e Conduvaz[®], Daflon[®], Dievari[®], Diohesp[®], Diosmin[®], Flebosmin[®], Perivasc[®], Variflux[®], Velunid[®] (associação de diosmina + hesperidina) (ANVISA, 2019). Isso demonstra o emprego de compostos fenólicos pela indústria, a despeito de suas limitações.

3.2 CONCLUSÃO

Dentre os produtos naturais, os compostos fenólicos representam uma ampla classe de metabólitos secundários presentes no reino vegetal. Estruturalmente variam desde moléculas simples até compostos altamente polimerizados, usualmente classificados de acordo com o núcleo fenólico e estruturas químicas associadas. Os polifenóis representam a classe mais abrangente, sendo o grupo dos flavonoides o mais diversificado.

Diversas atividades farmacológicas têm sido atribuídas a esses compostos, sobretudo relacionadas a prevenção e tratamento de processos oxidativos e infecciosos, modulações enzimáticas e interações proteicas, muitas vezes com mecanismos multifarmacofóricos. Dada esta importância terapêutica, crescente interesse científico tem sido demonstrado nas últimas décadas, no que tange à busca por espécies vegetais produtoras destes bioativos, à comprovação e elucidação de potenciais atividades biológicas e à veiculação em formas farmacêuticas. Neste último aspecto, limitações físico-químicas têm sido relatadas, porém os benefícios dos polifenóis à saúde humana são evidentes, e incansáveis esforços para tornar esses compostos em produtos comercializáveis são constantemente realizados no segmento acadêmico e industrial.

3.3 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007–1021, 2012.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 2, p. 73–90, 2012.
- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. **Food Research International**, v. 115, p. 167–176, 1 jan. 2019.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- ASSEFA, A. D.; KEUM, Y. S.; SAINI, R. K. A comprehensive study of polyphenols contents and antioxidant potential of 39 widely used spices and food condiments. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 3, p. 1548–1555, 2018.
- BALDOVSKÁ, S. et al. Polyphenol-rich pomegranate extract as a potential modulator of steroidogenesis in human ovarian cells. **Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences**, v. 8, n. 6, 2019.
- BARROS, H. D. DE F. Q.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **Phenolic Compound Bioavailability Using *In vitro* and *In vivo* Models**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- BARUAH, J. B. **Chemistry of Phenolic Compounds: State of the Art**. [s.l.: s.n.].
- BEHERA, S. et al. Evaluation of antibacterial activity of three selected fruit juices on clinical endodontic bacterial strains. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 9, n. 5, p. 217, nov. 2017.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Overview of polyphenols and their properties. **Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications**, p. 3–44, 2018.
- BENAMEUR, Q. et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla(ESBL) producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. **Natural Product Research**, v. 33, n. 18, p. 2647–2654, 2019.
- BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. USDA Database for the flavonoid content of selected foods prepared by. **U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory**, v. 3.1, p. 155 p., 2013.
- BODEKER, G.; GRAZ, B. Traditional Medicine. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**, p. 194–199, 1 jan. 2019.
- BUNTE, K.; HENSEL, A.; BEIKLER, T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease : A systematic review of *in vivo* , *ex vivo* and *in vitro* studies. **Fitoterapia**, v. 132, n. October 2018, p. 30–39, 2019.

- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in *Clinical Trials*. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.
- CABAN, M. et al. Overview of polyphenols and polyphenol-rich extracts as modulators of IGF-1, IGF-1R, and IGFBP expression in cancer diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 389–407, 1 jan. 2019.
- CORDER, R. et al. Oenology: red wine procyanidins and vascular health. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 566, nov. 2006.
- CORLETT, R. T. Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. **Plant Diversity**, v. 38, n. 1, p. 10–16, 1 fev. 2016.
- CORRÊA, T. A.; ROGERO, M. M. Polyphenols regulating microRNAs and inflammation biomarkers in obesity. **Nutrition**, v. 59, p. 150–157, 1 mar. 2019.
- CORY, H. et al. The role of polyphenols in human health and food systems: A Mini-Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, p. 87, 21 set. 2018.
- COSTA, D. C. et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 336–354, 2015.
- COUTURE, R. et al. Luteolin modulates gene expression related to steroidogenesis, apoptosis, and stress response in rat LC540 tumor Leydig cells. **Cell biology and toxicology**, p. 1–19, 2019.
- D'MELLO, P. et al. Modeling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 3, n. 4, p. 33–40, 2011.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.
- DAHMER, J. et al. Antibacterial activity of *Discaria americana* Gillies ex Hook (Rhamnaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 111635, jul. 2019.
- DANIYAL, M. et al. Comprehensive review on treatment of HIV. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 4, p. 1331–1338, 2016.
- DAS, J.; RAMANI, R.; SURAJU, M. O. Polyphenol compounds and PKC signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 10, p. 2107–2121, 1 out. 2016.
- DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1474–1480, 2015.
- DRUGBANK. **DrugBank**. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- DURSUN, R.; DAYE, M.; DURMAZ, K. Acne and rosacea: What's new for treatment? **Dermatologic Therapy**, p. e13020, 2019.

DZIAŁO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

ENGİN, A. B. et al. Do flavanols-rich natural products relieve obesity-related insulin resistance? **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 157–167, 1 fev. 2018.

FAGGIO, C. et al. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, n. April, p. 91–101, 2017.

FAHIMIRAD, S.; AJALLOUEIAN, F. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p. 307–328, 20 jul. 2019.

FARIDI ESFANJANI, A.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 56–66, 1 jun. 2018.

FU, Y. et al. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 189–200, 2019.

GALANAKIS, C. M. **Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2018.

GARCIA, J. A. A. et al. Phytochemical profile and biological activities of ‘Ora-pro-nobis’ leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.

GITELSON, A. et al. In situ optical properties of foliar flavonoids: Implication for non-destructive estimation of flavonoid content. **Journal of Plant Physiology**, v. 218, n. August, p. 258–264, 2017.

GU, K.-D. et al. How do anthocyanins paint our horticultural products? **Scientia Horticulturae**, v. 249, p. 257–262, 30 abr. 2019.

GWIAZDON, M.; BIESAGA, M. Phenolic compounds: Types, effects and research. **Analytical Chemistry and Microchemistry**, p. 105–107, 2017.

HARBORNE, J. B.; SIMMONDS, N. W. **Biochemistry of Phenolic Compounds**. London: Academic Press, 1964.

HASLAM, E.; CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. **Natural Product Reports**, v. 11, n. 0, p. 41, 1 jan. 1994.

HATTI, K. S. et al. Abyssinones and related flavonoids as potential steroidogenesis modulators. **Bioinformation**, v. 3, n. 9, p. 399–402, 4 maio 2009.

HAYTOWITZ, D. B.; WU, X.; BHAGWAT, S. USDA Database for the flavonoid content of selected foods. **U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory**, v. 3.3, p. 173 p., 2018.

HEMINGWAY, R. W. Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action by Edwin Haslam (University of Sheffield). Cambridge University Press, New York, NY. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 11, p. 1454–1455, 1 nov. 1998.

HO, T. T.; TRAN, Q. T.; CHAI, C. L. The polypharmacology of natural products. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1361–1368, 20 jun. 2018.

HOSTETLER, G. L.; RALSTON, R. A.; SCHWARTZ, S. J. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 423–435, 2017.

HU, M.; WU, B.; LIU, Z. Bioavailability of polyphenols and flavonoids in the era of precision medicine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 2861–2863, 2017.

HUANG, D. et al. An overview of epigenetic agents and natural nutrition products targeting DNA methyltransferase, histone deacetylases and microRNAs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 574–594, 1 jan. 2019a.

HUANG, X. TAO et al. Resveratrol: Review on its discovery, anti-leukemia effects and pharmacokinetics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 306, p. 29–38, 2019b.

HÜGEL, H. M. et al. Polyphenol protection and treatment of hypertension. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 220–231, 15 fev. 2016.

JACOB, A.; THOMAS, J. Therapeutic potential of dietary flavonoids against viral-borne infections: A review. **Drug Invention Today**, v. 11, n. 2, 2019.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218–220, 1997.

JIMENEZ-GARCIA, S. N. et al. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1195–1207, 2013.

KALLSCHEUER, N. et al. Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 7–17, 1 abr. 2019.

KANG, J.-T. et al. Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 3, p. 352, 2016.

KARLÍČKOVÁ, J. et al. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway. **Planta Medica**, v. 82, n. 01/02, p. 76–83, 2016.

KELLOGG, J. J. et al. Selection and characterization of botanical natural products for research studies: a NaPDI center recommended approach. **Natural Product Reports**, 2019.

KHAN, H. et al. Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, 2019.

KOH, C.-L. et al. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 6217–6228, 2013.

KOH, K. H.; THAM, F.-Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 2, p. 144–148, 2011.

KON, K.; RAI, M. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**. [s.l.] Academic press, 2016.

KUHNLE, G. G. C. Nutrition epidemiology of flavan-3-ols: The known unknowns. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 61, p. 2–11, 2018.

KUMAR, R. et al. Exploring the Binding Mechanism of Flavonoid Quercetin to Phospholipase A2: Fluorescence Spectroscopy and Computational Approach. **Eur Exp Biol**, v. 7, n. 5, p. 33, 2017.

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827–9837, 2011.

LI, B.; XIONG, M.; ZHANG, H.-Y. Elucidating polypharmacological mechanisms of polyphenols by gene module profile analysis. **International Journal of Molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 11245–54, 25 jun. 2014.

LICHOTA, A.; GWOZDZINSKI, L.; GWOZDZINSKI, K. Therapeutic potential of natural compounds in inflammation and chronic venous insufficiency. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 68–91, 15 ago. 2019.

LIMA, M. C. et al. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 259–270, 1 maio 2019.

LIU, W. et al. Development of a neuroprotective potential algorithm for medicinal plants. **Neurochemistry International**, v. 100, p. 164–177, nov. 2016.

LIU, Y. et al. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. **Food Chemistry**, v. 186, p. 46–53, 1 nov. 2015.

LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 1–9, 1 jan. 2016.

MADESWARAN, A. et al. *In silico* docking studies of lipoxygenase inhibitory activity of commercially available flavonoids. **Journal of Computational Methods in Molecular Design**, v. 1, p. 65–72, 2011.

MADESWARAN, A. et al. *In silico* docking studies of cyclooxygenase inhibitory activity of commercially available flavonoids. **Asian Journal of Pharmacy and Life Science**, v. 2, n. 2, p. 174–181, 2012.

MARGALEF, M. et al. Flavanol plasma bioavailability is affected by metabolic syndrome in rats. **Food chemistry**, v. 231, p. 287–294, 2017.

MARÍN FERNÁNDEZ, L. et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MARRANZANO, M. et al. Polyphenols: Plant sources and food industry applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 35, p. 4125–4130, 24 jan. 2019.

MASUOKA, N.; KUBO, I. Characterization of the xanthine oxidase inhibitory activity of alk(en)yl phenols and related compounds. **Phytochemistry**, v. 155, p. 100–106, 1 nov. 2018.

MCCREATH, S. B.; DELGODA, R. **Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies**. [s.l.] Academic Press, 2017.

MIRANDA, A. M. et al. Association between polyphenol intake and hypertension in adults and older adults: A population-based study in Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0165791, 2016.

MUNIN, A.; EDWARDS-LEVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 793–829, nov. 2011.

NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. **Recent Advances In Topical Delivery of Flavonoids: A Review**. [S.L.] Elsevier B.V, 2019. V. 296

NIELSEN, A. J.; MCNULTY, J. Polyphenolic natural products and natural product-inspired steroidal mimics as aromatase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 4, p. 1274–1293, 2019.

NILE, S. H. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 1, p. e22002, 2018.

OAK, M.-H. et al. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 161–170, 1 jul. 2018.

OO, A. et al. Baicalein and baicalin as Zika virus inhibitors. **Archives of Virology**, v. 164, n. 2, p. 585–593, 2019.

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, p. 824–831, jan. 2016.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016.

PEREIRA, N. L. F. et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 512–518, 2017.

PICCOLELLA, S. et al. Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly) phenol seasonality? A case study from Mediterranean area. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 785–799, 2018.

PICCOLELLA, S. et al. Nutraceutical Polyphenols: new analytical challenges and opportunities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 15 jul. 2019.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 260, p. 85–94, 1 out. 2018.

PINNA, R. et al. Antimicrobial effect of *Thymus capitatus* and *Citrus limon* var. pompia as raw extracts and nanovesicles. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, 2019.

POPA, D.-S.; RUSU, M. E. Isoflavones: Vegetable sources, biological activity, and analytical methods for their assessment. **Superfood and Functional Food-The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine**, 2017.

PROESTOS, C.; VARZAKAS, T. Aromatic plants: Antioxidant capacity and polyphenol characterisation. **Foods**, v. 6, n. 4, p. 28, 2017.

PULIGUNDLA, P. et al. Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of green tea polyphenols. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 139–151, 1 jul. 2017.

QUIDEAU, S. Why bother with polyphenols. **Polyphénols Actualités**, v. 24, p. 10–14, 2006.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

RANJANA et al. Standardization and xanthine oxidase inhibitory potential of *Zanthoxylum armatum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 230, p. 1–8, 10 fev. 2019.

RATH, S.; PADHY, R. N. Monitoring *in vitro* antibacterial efficacy of 26 Indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 3, p. 133–141, 1 set. 2014.

RAUF, A. et al. Proanthocyanidins : A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, n. May, 2019.

RENAUD, S. DE; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523–1526, 1992.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 154–169, 1 abr. 2017.

RIBEIRO, D. et al. Inhibition of LOX by flavonoids: a structure–activity relationship study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 137–145, 24 jan. 2014.

SANO, T. et al. Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD**, v. 27, n. 3, p. 249–259, 1 mar. 2017.

SANTANA, E. A. et al. Simultaneous extraction and obtention of a novel nano-dispersion from *Mikania glomerata* Spreng: Monitoring coumarin content and increasing the biological and industrial potential of a classical cultivated herb. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 49–56, 2019.

SANTOLINI, J. What does" NO-Synthase" stand for? **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 24, p. 133–171, 2019.

SANTOS, E. L. et al. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. **Intech**, v. 6, p. 482 p., 2017.

SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 1 abr. 2017.

- SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial Resistance: an antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach. **The Medical clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819–829, set. 2018.
- SHAVANDI, A. et al. Polyphenol uses in biomaterials engineering. **Biomaterials**, v. 167, p. 91–106, 2018.
- SILVERBERG, N. B. Selected active naturals for atopic dermatitis: Atopic Dermatitis Part 1. **Clinics in Dermatology**, v. 35, n. 4, p. 383–386, 2017.
- SINGH, K. K.; TRIPATHY, S. Natural treatment alternative for psoriasis: A review on herbal resources. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 11, p. 114–121, 2014.
- SINGLA, R. K. et al. Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. **Journal of AOAC International**, v. 102, p. 1–4, 2019.
- SZCZURKO, O. et al. Ginkgo biloba for the treatment of vitilgo vulgaris: an open label pilot clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 21, 15 dez. 2011.
- TATTI, S. et al. Polyphenon E[®] : a new treatment for external anogenital warts. **British Journal of Dermatology**, v. 162, n. 1, p. 176–184, 1 jan. 2010.
- TENG, H.; CHEN, L. Polyphenols and bioavailability : an update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2019.
- TEPLOVA, V. V. et al. Natural polyphenols: Biological activity, pharmacological potential, means of metabolic engineering (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 221–237, 1 maio 2018.
- TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. Resveratrol and *Clinical Trials*: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 34, p. 6064–93, 2013.
- TRIVEDI, J. et al. Plant-derived molecules in managing HIV infection. In: **New Look to Phytomedicine**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 273–298.
- TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Classification of phenolic compounds in plants. **Polyphenols in Plants**, p. 263–284, 2018.
- UBEROS, J. et al. Phenolic acid content and antiadherence activity in the urine of patients treated with cranberry syrup (*Vaccinium macrocarpon*) vs. trimethoprim for recurrent urinary tract infection. **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. A, p. 608–616, 2015.
- UMAMAHESWARI, M. et al. Discovery of potential xanthine oxidase inhibitors using in *silico* docking studies. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 5, p. 240–247, 2011.
- UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. **Biomed Research International**, v. 2014, 2014.
- ÜRMÉNYI, F. G. G. et al. Anti-HSV-1 and HSV-2 flavonoids and a new kaempferol triglycoside from the medicinal plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 12, p. 1707–1714, 2016.

USA. **Antibiotic Resistance Threats in the United States** Atlanta, GeorgiaCenters for Disease Control and Prevention (CDC, , 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Families of phenolic compounds and means of classification. **Phenolic Compound Biochemistry**, p. 1–34, 2006.

WATERMAN, P.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. 1994.

XIE, Y. et al. Antibacterial activities of flavonoids: Structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132–149, 2014.

ZAYNAB, M. et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198–202, 1 nov. 2018.

ZORZI, G. K. et al. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 426–436, 2015.

4 *CINNAMOMUM VERUM*, *EUGENIA UNIFLORA* E *PUNICA GRANATUM*: ESPÉCIES RICAS EM COMPOSTOS FENÓLICOS

Regiões de climas tropicais e subtropicais representam reservatório de singulares espécies vegetais, como resultado dos diversos biomas existentes. A resposta adaptativa às excessivas condições de umidade, luz solar e chuvas, bem como a relação fauna-flora silvestre proporcionam estímulo ímpar para produção de metabólitos secundários. Nesta perspectiva, diversificadas ações biológicas podem ser observadas, ampliando possibilidades para a pesquisa de moléculas bioativas (CHAVEERACH; SUDMOON; TANEE, 2017).

O Brasil detém grande parcela da biodiversidade mundial, compreendendo mais de 45.000 espécies de vegetais superiores, o que representa 20-22% do total existente no planeta. O conhecimento etnofarmacológico constitui importante ferramenta para a pesquisa de ativos vegetais, uma vez que o uso popular frequentemente norteia as ações farmacológicas de um determinado composto (DUTRA et al., 2016; LEONTI et al., 2017). Tendo em vista o uso popular descrito, algumas plantas medicinais encontradas no Brasil têm sido identificadas como ricas em compostos fenólicos (ARAÚJO et al., 2019; DONADO-PESTANA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Dentre estas espécies relatadas, inserem-se *Cinnamomum verum* J.Presl. (Lauraceae), *Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae) e *Punica granatum* Linn (Lythraceae), popularmente conhecidas como “canela”, “pitangueira” e “romanzeira”, respectivamente. São plantas dotadas de atividades farmacológicas consagradas pela medicina popular, algumas delas correlacionadas cientificamente com a presença de polifenóis (RAMALINGUM; MAHOMOODALLY, 2015; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Frente ao exposto, serão abordados aspectos gerais, composição química, atividades biológicas e sistemas de liberação contendo ativos relacionados às espécies vegetais supracitadas.

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

4.1.1 *Cinnamomum verum* J. Presl.

4.1.1.1 Aspectos botânicos e históricos

Cinnamomum verum J. Presl. (sinonímia *Cinnamomum zeylanicum* Blume) é uma espécie pertencente à família Lauraceae, nativa do Sri Lanka e Ásia tropical. Nominada mundialmente como “cinnamon”, no Brasil é conhecida “canela”, “canela-do-Ceilão” ou “canela-verdadeira”. Na Ásia é conhecida como “Pati-Hunda”, “Naga-dalchini”, “Seerang-esing”, “Sami-jong” e “Tejpat-manbi” entre os diferentes grupos étnicos. Seu nome é derivado da palavra grega “kinnámōmon”, a qual significa “madeira doce” (SMIDERLE; DAS GRAÇAS SOUZA, 2016; THOMAS; KURUVILLA, 2012).

A canela (Figura 5) é uma árvore perenifólia de 7-10 m de altura, porém, quando cultivada, limita-se a 3 m. Possui folhas verde-escuras, ovóides-oblongas com 7 a 18 cm de comprimento. As flores são pequenas, de cor branco-amarelada e dispostas em panículas, com odor distinto. Os frutos tem cor púrpura, com 1 cm de comprimento contendo uma única semente. A floração ocorre em janeiro e os frutos amadurecem de maio a agosto. Desenvolve-se melhor em baixa altitude, com clima tropical quente e úmido (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011; THOMAS; KURUVILLA, 2012).

Figura 5 - *Cinnamomum verum* J. Presl.



Fonte: Köhler (2003).

Os portugueses interessaram-se pela canela no Sri Lanka (Ceilão) durante o início do século XVI; importando-a posteriormente para a Europa durante os séculos XVI e XVII. Durante o século XVIII, a Companhia das Índias Ocidentais tornou-se a principal exportadora de canela para a Europa. Os holandeses cultivavam canela em Java, e com a perspectiva de arruinar o comércio holandês, o príncipe regente de Portugal solicitou ao governador de Goa o envio de sementes da canela, para cultivo pelos jesuítas no Brasil. A espécie foi bem adaptada, devido ao clima tropical (DEAN, 1991; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

A casca do caule da canela é uma das especiarias mais utilizadas mundialmente para fins alimentícios, devido a seu aroma delicado e sabor adocicado e picante. Tem sido usada como tempero há milhares de anos, comumente obtido por secagem da casca, a qual é comercializada na forma de paus ou pós. Informações sobre a composição nutricional de *C. verum* podem ser encontradas na base de dados alimentares USDA (MURPHY, 2012). De maneira geral, quase todas as partes de *C. verum*, incluindo a casca do caule, folhas, flores, frutos e raízes, são aproveitadas para uso culinário ou medicinal (MANOSI et al., 2013).

4.1.1.2 Uso tradicional

A canela é mencionada no Antigo Testamento (Êxodo 30:23; Cantares de Salomão 4:14; Provérbios 7:17) e no Novo Testamento (Apocalipse 18:13) da Bíblia. Era utilizada no Egito por volta de 3.000 a.C. para o embalsamamento de múmias, por suas propriedades aromatizantes. Os romanos usavam a canela para fins medicinais no tratamento de doenças do trato digestivo e respiratório e em funerais, a fim de afastar o odor dos cadáveres (BALIJEPALLI et al., 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

C. verum constitui a primeira planta aromática usada no tratamento de bronquite crônica. Na medicina ayurvédica, a casca do caule da canela tem sido utilizada para fim adstringente, antiemético, antidiarreico, carminativo, antibacteriano e antiespasmódico. Pode ser usada ainda no tratamento da impotência, frigidez, inflamação ocular, vaginose, neuralgia, reumatismo, para curar feridas e dores de dente (HUSAIN et al., 2018; KAWATRA; RAJAGOPALAN, 2015; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Seu consumo tradicional está relacionado a outros benefícios, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, inibição da proliferação de células tumorais, controle glicêmico no diabetes, prevenção de doenças neurodegenerativas, diminuição dos níveis de colesterol total e triglicerídeos e controle de hipertensão (DOS SANTOS et al., 2019; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

A resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10/2010 (BRASIL, 2010a), já revogada pela RDC 26/2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014a), incluía *C. verum* como espécie passível de ser tratada como droga vegetal sujeita à notificação, apresentando as seguintes informações:

Nomenclatura botânica: *Cinnamomum verum*

Nomenclatura popular: Canela, Canela-do-Ceilão

Alegações: Falta de apetite, perturbações digestivas com cólicas leves, flatulência (gases) e sensação de plenitude gástrica

Parte utilizada: Cascas

Forma de utilização: Decocção: 0,5-2 g (1-4 colher de café) em 150 mL (xícara de chá)

Posologia: Utilizar 1 xícara chá de 2 a 6 vezes ao dia

Via: Oral

Observações: Não utilizar na gravidez. Podem ocorrer reações alérgicas de pele e mucosas

Dentre diversas espécies de interesse medicinal e para produção de fitoterápicos, *C. verum* consta na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). Entretanto, esta espécie não consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009) e na Instrução Normativa número 02, de 13 de maio de 2014, a qual publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado” (BRASIL, 2014b).

4.1.1.3 Composição química

Plantas aromáticas são ricas em óleos essenciais, sendo o cinamaldeído (56-78%) o principal composto extraído da casca do caule de *C. verum*, enquanto nas folhas, é predominantemente encontrado o eugenol (60-77%). As raízes apresentam cânfora como componente majoritário (56.2%), e frutos e flores são fonte de acetato de trans-cinamila. Mais de 80 compostos voláteis foram identificados em diferentes partes da canela (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011).

Em relação aos compostos fenólicos, rutina, quercetina, ácido protocatecúico, ácido cinâmico e epicatequina podem ser encontrados em *C. verum* (KLEJDUS; KOVÁČIK, 2016; VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2014). O Quadro 2 lista os principais constituintes fenólicos e voláteis encontrados nas partes aéreas de *C. verum*.

Quadro 2 - Principais constituintes fenólicos e voláteis presentes nas partes aéreas de *Cinnamomum verum*

COMPOSTOS FENÓLICOS	COMPOSTOS VOLÁTEIS
3,4-dihidroxibenzaldeído	2-metoxi-benzilbenzoato
ácido cafeico	acetileugenol
ácido cinâmico	benzaldeído
ácido clorogênico	camfeno
ácido ferúlico	cinamaldeído
ácido gálico	cinamil acetato
ácido <i>p</i> -cumárico	cumarina
ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	eugenol
ácido protocatecúico	limoneno
ácido rosmarínico	linalol
ácido salicílico	óxido de cariofileno
ácido siríngico	<i>p</i> -cimeno
ácido vanílico	α -felandreno
catequina	α -humuleno
cinamtanino B-1	α -pineno
epicatequina	α -terpineno
isoramnetina	α -terpineol
kaempferol	α -terpinoleno
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	β -cariofileno
quercetina	β -felandreno
rutina	β -pineno
urolignosideo	
vanilina	

Fonte: Adaptado de Jayaprakasha e Rao (2011) e Ribeiro-Santos e colaboradores (2017).

Os compostos voláteis estão presentes em todas as partes de *C. verum* e podem ser classificados em monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropenos. O cinamaldeído pode sofrer decomposição induzida pelo calor a temperaturas razoavelmente baixas (inferiores a 60 °C) e produzir benzaldeído. Em relação ao eugenol, seu teor diminui gradualmente com o desenvolvimento das folhas e o incremento de trans-cinamaldeído é observado em folhas de ramos com 2 anos de idade (NENOV et al., 2011; SHAHVERDI et al., 2007).

A catequina foi relatada como principal composto fenólico das cascas do caule, seguido por galato de epigallocatequina e ácido ferúlico, em extração utilizando acetona 75% (LV et al., 2012). Combinações de (epi) catequina, (epi) catequinagalato, (epi) galocatequina e (epi) afzelequina também foram identificadas em extratos metanólicos das cascas do caule de *C. verum* (MATEOS-MARTÍN et al., 2012).

4.1.1.4 Atividades biológicas

As atividades biológicas mais bem documentadas para *C. verum* estão relacionadas à prevenção e ao tratamento do diabetes e hiperlipidemias (ALLEN et al., 2013; ANDERSON et al., 2016; DUGOUA et al., 2007; HAMIDPOUR et al., 2015) e de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (HABTEMARIAM; HABTEMARIAM, 2019; HO; CHANG; CHANG, 2013; MODI et al., 2015; MOMTAZ et al., 2018).

A canela, em seus mais diversos farmacógenos, apresenta também comprovadas atividades antitumoral (CHEN et al., 2016), inseticida, repelente, antiparasitária, espermatogênica, osteoclastogênica, analgésica, inibidora de aromatase e antimutagênica (BALIJEPALLI et al., 2017; HAMIDPOUR et al., 2015), anti-inflamatória (HAN; PARKER, 2017), antioxidante (ASSEFA; KEUM; SAINI, 2018), antimicrobiana (ALHADI et al., 2018; VASCONCELOS; CRODA; SIMIONATTO, 2018) e, mais recentemente, no tratamento de artrite reumatoide e osteoartrite (MIRAGHAJANI; GHIASVAND, 2019).

Tendo em vista a versatilidade das aplicações terapêuticas de *C. verum*, foi realizada uma prospecção biotecnológica através de levantamento bibliográfico de artigos na plataforma *Web of Science*, no mês de maio de 2019, em busca de atualizações sobre farmacógenos, compostos bioativos, atividades farmacológicas prevalentes e sistemas de liberação existentes para esta espécie vegetal. A busca foi realizada sem delimitação de intervalo de tempo e utilizando critérios descritos no Quadro 3.

Quadro 3 - Sintaxe de busca de artigos para prospecção de sistemas de liberação contendo bioativos de *Cinnamomum verum*

Busca	Sintaxe de Busca	Nº de artigos
1	TS = ("Drug Delivery" OR "controlled release" OR "modified release" OR "delayed release" OR "retard release" OR carrier OR transdermal OR topical OR nano* OR micro* OR complex* OR matrix OR polymer* OR "inclusion complex" OR cosmetic*)	8.789.401
2	TS = ("in vivo" OR "ex vivo" OR "pre-clinical" OR "clinical")	3.080.221
3	TS = ("Cinnamomum")	2.043
Combinação de busca 1, 2 e 3		64

Fonte: Próprio autor.

Das 64 publicações encontradas, a leitura dos resumos permitiu a exclusão de artigos utilizando os seguintes critérios: estudos relacionados ao uso veterinário, uso botânico, uso dietético, uso cosmético (sem finalidades farmacológicas), nutracêuticos, ativos isolados, ativos previamente quantificados, ativos provenientes de resíduo industrial, estudos *in silico*,

duplicados e revisões de literatura. Dezenove artigos foram selecionados e estão apresentados detalhadamente na Tabela 1.

O farmacógeno prevalente nestas publicações foi a casca do caule (94,7%, 18 trabalhos) e apenas um estudo relacionou as folhas (MISHRA et al., 2008). Considerando bioativos, 13 artigos (68,4%) utilizaram óleos essenciais e seis (31,6%) extratos brutos (ARIF et al., 2015; KHAN et al., 2013; MOUSAVI; KAZEMI, 2015; NENOV et al., 2011; RANASINGHE et al., 2017; TOMAR; SHRIVASTAVA, 2015).

A atividade farmacológica mais citada foi a antimicrobiana (57,9%), em 11 trabalhos, dentre os quais foi demonstrada a atividade *in vitro* frente a fungos (NASIR; TAFESS; ABATE, 2015; NENOV et al., 2011; TOMAR; SHRIVASTAVA, 2015), prevalecendo dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (LIMA et al., 1992; MOUSAVI; KAZEMI, 2015; NARDONI et al., 2015).

Atividade antimicrobiana também foi relatada para bactérias Gram-positivas (MISHRA et al., 2008; MONIKA et al., 2014; NAVEED et al., 2013; TOMAR; SHRIVASTAVA, 2015) e Gram-negativas (BARBOSA et al., 2015; MISHRA et al., 2008; NAVEED et al., 2013; TOMAR; SHRIVASTAVA, 2015), incluindo multidroga-resistentes como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) (BARBOSA et al., 2015; YANG et al., 2019). Os óleos essenciais da casca do caule apresentaram sinergismo frente a *Clostridium difficile* clindamicina-resistente, com Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) de 0,312 (SHAHVERDI et al., 2007). A atividade antimicrobiana *in vivo* em modelo murino de sepse induzida por *K. pneumoniae* também foi demonstrada (EL-SHOUNY et al., 2017).

Estudos toxicológicos para *C. verum* foram relacionados, como testes de fragilidade osmótica (BARROS et al., 2016) e de toxicidade aguda, sub-crônica (KHAN et al., 2013), crônica (ARIF et al., 2015) e reprodutiva (DOMARACKY et al., 2007), onde este último demonstrou efeitos deletérios da administração dos óleos essenciais durante o período de pré-implantação. Atividades antioxidante (NENOV et al., 2011) e anti-inflamatória (HAN; PARKER, 2017) também foram relatadas.

Apenas um trabalho foi relacionado a formas farmacêuticas contendo ativos de *C. verum* (RANASINGHE et al., 2017). Neste, um estudo farmacocinético foi conduzido para cápsulas contendo extrato bruto da casca do caule, em 30 indivíduos saudáveis por um período de 3 meses (via oral), demonstrando ausência de efeitos colaterais e/ou tóxicos.

Tabela 1 - Prospecção de publicações contendo sistemas de liberação/atividades biológicas de bioativos de *Cinnamomum verum*

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
1	Arif et al. (2015)	Extrato bruto da casca	NR	Parâmetros bioquímicos, análise histológica	Toxicidade crônica em coelhos	NR	NR	NR	NR	Toxicidade não observada
2	Barbosa et al. (2015)	Óleos essenciais da casca	NR	Diluição em ágar e curva de morte	NR	NR	<i>S. aureus</i> (MRSA e MSSA), <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i>	0,25 mg/mL para todas as bactérias testadas	NR	Pronunciada atividade antimicrobiana
3	Barros et al. (2016)	Óleos essenciais da casca	NR	Teste de fragilidade osmótica em hemácias	NR	NR	NR	NR	NR	Aumentou a curva de fragilidade osmótica e induziu alterações nas hemácias
4	Domaracky et al. (2007)	Óleos essenciais da casca	NR	NR	Toxicidade reprodutiva (pré-implantação) em ratos	NR	NR	NR	NR	Reduziu o número e a distribuição de embriões
5	El-Shouny et al. (2017)	Óleos essenciais da casca	NR	Teste Kirby-Bauer, MET e exame histológico	Sepse induzida em modelo murino	NR	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	NR	NR	Eficácia <i>in vivo</i> para infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i>

(Continuação Tabela 1)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
6	Han; Parker (2017)	Óleo essencial da casca	NR	Modelo de inflamação crônica com fibroblastos dérmicos humanos	NR	NR	NR	NR	NR	Efeto anti-proliferativo e inibidor da produção de biomarcadores inflamatórios e moléculas de remodelação
7	Khan et al. (2013)	Extrato bruto da casca	NR	Parâmetros hematológicos	Toxicidade aguda (camundongos) e subcrônica (coelhos)	NR	NR	NR	NR	DL ₅₀ superior a 1.600 mg/kg. Sem toxicidade aguda e subcrônica
8	Lima et al. (1992)	Óleos essenciais da casca	NR	Teste Kirby-Bauer	NR	NR	16 cepas de dermatófitos, dentre elas: <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	NR	NR	Inibição de 81% das cepas de dermatófitos estudadas
9	Mishra et al. (2008)	Óleos essenciais das folhas	NR	Teste Kirby-Bauer	NR	NR	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>S. aureus</i> e <i>S. pneumoniae</i>	Variação de 1,25-2,5 µL/disco	NR	Atividade pronunciada, quando comparada à <i>C. camphora</i> e <i>C. tamala</i> .
10	Monika et al. (2014)	Óleos essenciais da casca	NR	Método de microdiluição em caldo e Teste Kirby-Bauer	NR	NR	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,125 mg/mL (CIM) e 1,0 mg/mL (CFM)	NR	Atividade para cepas de <i>S. agalactiae</i> obtidas de gestantes de 37 semanas

(Continuação Tabela 1)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
11	Mousavi; Kazemi (2015)	Extrato metanólico da casca	NR	Macrodiluição em caldo e contagem de UFC	Atividade anti-dermatófito <i>in vivo</i> frente porcos-da-índia	NR	<i>M. gypseum</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>M. canis</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	CIM de 0,058-3,73 mg/mL e CFM de 0,058-7,46 mg/mL	NR	Inibiu o crescimento de todos os dermatófitos testados, em 9 dias
12	Nardoni et al. (2015)	Óleos essenciais da casca	NR	Microdiluição em caldo e contagem de UFC	NR	NR	<i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. erinacei</i> , <i>T. terrestre</i> e <i>M. gypseum</i>	4,5 mg/mL (CIM) e 5 mg/mL (CFM) para <i>M. canis</i>	NR	Efetivo apenas para <i>Microsporium canis</i>
13	Nasir; Tafess; Abate (2015)	Óleos essenciais da casca	NR	Método de microdiluição em caldo e Teste Kirby-Bauer	NR	NR	<i>Tricophyton</i> spp., <i>Microsporium</i> spp., <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> , <i>R. rubra</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Shigella</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	0,08 µL/mL (CIM) e 0.31 µL/mL (CBM) para fungos e 0,63 µL/mL (CIM) para 1,25 µL/mL (CBM) para bactérias	NR	Ativo contra os microrganismos testados
14	Naveed et al. (2013)	Óleos essenciais das cascas	NR	Microdiluição em caldo	NR	NR	<i>S. typhi</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> A, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>B. licheniformis</i>	2,9 mg/mL contra <i>S. typhi</i> e <i>P. fluorescens</i>	NR	Atividade para <i>Salmonella</i> spp. e <i>P. fluorescens</i>
15	Nenov et al. (2011)	Extrato das cascas do caule, em tetrafluoreta-no	NR	Microdiluição em caldo e atividade antioxidante para remoção do radical DPPH*	NR	NR	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. abony</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>	80% de inibição, exceto <i>P. aeruginosa</i>	NR	80% dos inibição das cepas testadas

(Continuação Tabela 1)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
16	Ranasinghe et al. (2017)	Extrato aquoso da casca do caule	Cápsulas	NR	NR	Ensaio de fase I (n=30) por 3 meses. Doses mensais 85 mg, 250 mg e 500 mg	NR	NR	NR	Sem efeitos colaterais e/ou tóxicos. Efeitos hipolipidêmico e hipotensor observados
17	Shahverdi et al. (2007)	Óleo essencial e trans-cinamaldeído derivado	NR	Teste Kirby-Bauer, Associação modulatória em placas de ágar-sangue e ensaio <i>Checkerboard</i>	NR	NR	<i>C. difficile</i> toxicogênica clindamicina-resistente	≥ 800 µg/disco. CIM 4µg/mL (clindamicina) e 80µg/mL, (trans-cinamaldeído)	trans-cinamaldeído + clindamicina = FICI 0,312 (sinergia)	20 µg/mL de trans-cinamaldeído reduziu em 16 vezes a CIM da clindamicina (4,0 para 0,25µg/mL)
18	Tomar; Shrivastava, (2015)	Extrato etanólico da casca do caule	NR	Teste Kirby-Bauer e microdiluição em caldo	NR	NR	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i> (8 mg/mL); <i>C. albicans</i> (6 mg/mL)	NR	Ativo apenas para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>
19	Yang et al., (2019)	Óleo essencial da casca	NR	Extração, digestão, separação de peptídeos, identificação e quantificação de proteínas. Análise qRT-PCR	NR	NR	<i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase	NR	NR	Induziu estresse oxidativo por abundância de radical glicila, catalase, peroxidase e proteína de reparo de DNA incompatível

CIM: Concentração Inibitória Mínima; DPPH: (2,2- difenil-1-picril-hidrazil); MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; MRSA: *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente; MSSA: *Staphylococcus aureus* metilicina-sensível; NR: não realizado; qRT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*; UFC: Unidades Formadoras de Colônias.

Fonte: Próprio autor.

4.1.2 *Eugenia uniflora* Linn

4.1.2.1 Aspectos botânicos e históricos

A primeira citação desta espécie vegetal remonta a 1893, pelo *Index Kewensis do Kew Royal Botanic Gardens* (Londres, Reino Unido); recebendo a denominação de *Stenocalyx pitanga* Berg. A denominação atual *Eugenia uniflora* Linn passou a ser adotada e constar no mesmo índice somente em 1985, embora a nova denominação tenha sido citada em 1965, no índice botânico Angely (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

Eugenia uniflora Linn (Figura 6) é um arbusto dicotiledôneo nativo do Brasil e pertencente à família Myrtaceae. Conhecida popularmente como “pitangueira”, tem seu fruto conhecido como “pitanga”, derivada da palavra “pi’tãg” que significa “vermelho profundo” em Tupi. Internacionalmente é conhecida como “cereja brasileira”, “ibitanga”, “cereja pitanga”, “pitangatuba”, “ginja”, “nangapiry”, “cereja cayena”, “cereja do Suriname”, “cerejeira kanak”, “cerejeira de Maré”, “cerejeira de Cayenne” e “boobo” (FRANZON et al., 2018; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

Figura 6 - *Eugenia uniflora* Linn



Fonte: PFAF (2019).

Apresenta-se como arbusto semidecíduo, que atinge de 4 a 10 m de altura. Possui copa estreita, tronco liso de cor parda-clara e ramos finos e secos. Tem folhas simples e opostas, cartáceas, medindo de 3-7 cm × 1,5-3 cm. As folhas jovens apresentam cor vermelha ou roxa e, em maturidade, tornam-se verde-escura com aspecto brilhante e aroma *sui generis*. As flores são brancas, hermafroditas, melíferas e abundantes em pólen; localizando-se individualmente ou em grupos de 2 a 3 nas axilas das folhas (FIUZA et al., 2008; PFAF, 2019; SILVA, 2006).

O fruto prende-se por meio de um pedúnculo de 2-3 cm; possuindo forma de baga, com 1,5 a 3 cm de diâmetro e oito sulcos longitudinais. Quando maduro, a cor varia de alaranjada, vermelho ou roxa, sendo a polpa macia e agridoce, contendo de 1 a 2 sementes, ocasionalmente 3 ou 4. O período de floração de *E. uniflora* é entre setembro e outubro, e o fruto amadurece entre outubro e novembro. No entanto, espécimes podem apresentar um segundo ciclo de floração entre fevereiro e março, com amadurecimento dos frutos entre abril e início de maio (FRANZON et al., 2018; PFAF, 2019; SILVA, 2006).

E. uniflora é encontrada nos mais diversos biomas brasileiros, como Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. A espécie pode ser encontrada em quase todo o Brasil, como também na Argentina e no Uruguai (LORENZI et al., 2006). Devido às similaridades climáticas, esta espécie foi introduzida com sucesso em várias partes do continente asiático, em especial no subcontinente indiano. Em Goa, território de posse da coroa portuguesa, *E. uniflora* foi transplantada para a Índia ainda no século XVI (BRACHT; CONCEIÇÃO; SANTOS, 2011). Atualmente, tem sido cultivada em várias partes do mundo, como América Central, Antilhas, Flórida, Califórnia, Havaí, China Meridional, Sri Lanka, África setentrional e Sul da França (PFAF, 2019).

4.1.2.2 Uso tradicional

E. uniflora foi introduzida na medicina empírica pelos índios Guaranis no século XV (BRAATZ, 2010). Seu uso popular remonta nos países da América do Sul, sobretudo no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (FRANZON et al., 2018). Na Ilha da Madeira as folhas de *E. uniflora* são utilizadas no tratamento de bronquites, gripes e problemas intestinais, na Nigéria como um febrífugo e em Maurício é usada como emenagogo (FIUZA et al., 2008; SANTOS et al., 2018).

No Brasil, folhas de *E. uniflora* sob a forma de infusões têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional com finalidade antirreumática (OWEN; JOHNS, 1999); diurética, antipirética (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002) e em distúrbios do trato digestivo, tais como diarreia, gastrite, náuseas, vômitos, gases, azia e má digestão (BRANDELLI et al., 2009).

Efeitos hipotensor, homeostático; analgésico, anti-inflamatório, antialérgico, cicatrizante, antioxidante, adstringente, antidepressivo, antifúngico, antibacteriano, antiparasitário, expectorante (GIRALDI; HANAZAKI, 2010) e hipolipidêmico (PIZZIOLO et al., 2011) também foram relatados. Outras condições específicas, tais como astenia, erisipela, hemorroidas, dor de dente e doenças hepáticas têm sido tratadas com infusões das folhas de *E. uniflora* (GIRALDI; HANAZAKI, 2010; SANTOS et al., 2018).

A resolução RDC 10/2010 (BRASIL, 2010a), já revogada pela RDC 26/2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014a), incluía a *Eugenia uniflora* como espécie passível de ser tratada como droga vegetal sujeita à notificação, apresentando as seguintes informações:

Nomenclatura botânica: *Eugenia uniflora*

Nomenclatura popular: Pitangueira

Alegações: Diarreia não infecciosa

Parte utilizada: Folhas

Forma de utilização: Infusão: 3 g (1 colher de sopa) em 150 mL (xícara de chá)

Posologia: Utilizar 1 cálice (30 mL) após a evacuação em no máximo 10 vezes ao dia

Via: Oral

Dentre diversas espécies de interesse medicinal e para produção de fitoterápicos, *E. uniflora* consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009) e na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). Entretanto, esta espécie ainda não consta na Instrução Normativa número 02, de 13 de maio de 2014 a qual publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado” (BRASIL, 2014b).

4.1.2.3 Composição química

A composição química dos frutos, porção comestível, é altamente variável a fatores como clima, condição do solo e manejo. Sua composição (média de 77% de polpa e 23% de sementes) é rica em cálcio, fósforo, magnésio, potássio, vitamina C, carotenoides, antocianinas, e flavonoides (FRANZON et al., 2018). O teor de vitamina C descrito na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos é de 24,9 mg/100 g de polpa de fruta fresca (BRASIL, 2011). Quercetina (5,80 mg/100 g) e miricetina (3,36 mg/100 g de polpa) são os flavonoides majoritários da pitanga (HAYTOWITZ; WU; BHAGWAT, 2018).

Nas folhas os óleos essenciais majoritários são selina-1,3,5(11)-trien-8-ona e óxido selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, com teores de 48,52% e 17,33% respectivamente (AURICCHIO; BACCHI, 2003). Posteriormente, curzereno, citronelol, geraniol, cineol foram relatados (FIUZA et al., 2008). O Quadro 4 sintetiza os principais óleos essenciais referenciados nos trabalhos de Alves; Freires; de Castro (2010); Melo e colaboradores (2007); Oliveira e colaboradores (2009); Martinez-Correa e colaboradores (2011); Prestes e colaboradores (2011) e Victoria e colaboradores (2013).

Foram identificados diversos constituintes fenólicos nas folhas de *E. uniflora* dentre estes quercetina, miricetina (compostos majoritários), ácido gálico e elágico. Açúcares isolados como arabinose, ramnose, galactose e glicose, ou associados a flavonoides como miricetina-ramnosídeo, quercetina-ramnosídeo, miricetina-hexosil-galato, quercetina-hexosil-galato e quercetina-ramnosil-galato também foram descritos (ARAÚJO et al., 2019; BEZERRA et al., 2018; RATTMANN et al., 2012; RODRIGUES; SANDINI; PEREZ, 2010). O Quadro 3 também apresenta os principais compostos fenólicos referenciados para as folhas desta espécie, com base nos trabalhos supracitados.

Outros estudos confirmaram a presença de esteroides, taninos, antraquinonas, fenóis simples, hiperosídeos (AURICCHIO; BACCHI, 2003; DENARDIN et al., 2014) e alcaloides como pentaidroxindolizidina nas folhas da pitangueira (AURICCHIO; BACCHI, 2003; SANTOS et al., 2018; SOBEH et al., 2019; SOBRAL DE SOUZA et al., 2017).

A Farmacopeia Brasileira (5ª Edição) caracteriza como droga vegetal as folhas secas de *E. uniflora* que contenham no mínimo, 5,0% de taninos, 1,0% de flavonoides totais, expressos em quercetina e 0,8% de óleos voláteis. O óleo volátil deve ser constituído de, no mínimo, 27,0% de curzerenos (*cis* e *trans*) (BRASIL, 2010b).

Quadro 4 - Principais constituintes fenólicos e voláteis presentes nas folhas de *Eugenia uniflora*

COMPOSTOS FENÓLICOS	COMPOSTOS VOLÁTEIS
2,3-hexahidroxidifenoil-D-glicose	(E)-nerolidol acetato
2-O-D- galoil glicose	(E,E)-germacrona
3-O-D-galoil glicose	1,10-di-epi-cubenol
ácido elágico	10-epi- β -eudesmol
ácido gálico	1-epi-cubenol
ácido gálico 3-O- (6'-O-acetil- β D-glicosídeo)	allo-aromadendreno
ácido gentísico 5-O-[6"-O- β -D-galoil glicosídeo	anodieno
ácido gentísico 5-O- β -D-glicosídeo	aromadendreno
ácido quínico	atractilona
ácido valoneico dilactona	biciclogermacreno
catequina	cariofileno
delfinidina-3-hexosídeo	cineol
cianidina-3-hexosídeo	citronelol
eugeniflorina D1	copaeno
eugeniflorina D2	citronol
epicatequina	cubenol
metilgalato	curzereno
miricetina -3-O-[6"-O- β -D-acetil galactosídeo	furanoelemeno
miricetina-3-O -(2"-O-acetil- α -L-ramnosídeo)	furanodieno
miricetina-3-O -ramnosídeo	furanodiona
miricetina-3-O-[3"-O- acetil ramnosídeo	geraniol
miricetina-3-O- β -D-galactosídeo	germacreno A
miricetina-3-O- β -D-glicosídeo	germacreno B
miricitrina	germacreno D
pirogalol	globulol
procianidina	guaiol
quercetina-3,5-dimetil éster	ledol
quercitrina	linalol
	oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona
	selina-1,3,7(11)-trien-8-ona
	spatulanol
	viridiflorol
	α -bisabolol
	α -cadinol
	α -copaeno
	α -humuleno
	β -chamigreno
	β -elemeno
	β -elemenona
	β -eudesmol
	β -selineno
	γ -elemeno
	γ -eudesmol
	δ -cadineno
	δ -elemeno
	τ -cadinol
	τ -muurolol

Fonte: Próprio autor.

4.1.2.4 Atividades biológicas

Extratos, frações enriquecidas, óleos essenciais e compostos isolados de *E. uniflora* apresentam comprovadas atividades farmacológicas. Dentre estas, destaca-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais (BARBOSA et al., 2015; LAGO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018; VICTORIA et al., 2012), de extratos brutos (BERNARDO et al., 2015; BIASI-GARBIN et al., 2016; BOBADILLA et al., 2018; BRAGA et al., 2007; SILVA-ROCHA et al., 2015; SOUZA et al., 2018) e frações semipurificadas das folhas (FERREIRA et al., 2013). Ademais, outros estudos citam extratos brutos das folhas da pitangueira com agentes modificadores de resistência microbiana (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; COUTINHO et al., 2010) e em modelos murinos de sepse (RATTMANN et al., 2012).

Extratos brutos e óleos essenciais das folhas também estão relacionados à atividade anti-inflamatória (SCHAPOVAL et al., 1994), antidiarreica (ALMEIDA et al., 1995); hipotensora (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002) e hepatoprotetora (VICTORIA et al., 2013). A ação antioxidante de extratos brutos (CUNHA et al., 2016; GARMUS et al., 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011) e antiparasitária de óleos essenciais, extratos brutos e frações enriquecidas (BRAGA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2012, 2013; SOBRAL DE SOUZA et al., 2017) também foram relatadas. Outras atividades relevantes, tais como inibições enzimáticas da XO e COX-2 (LEE et al., 2000; MORAIS et al., 2013; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; SILVA-ROCHA et al., 2015), analgésica, antipirética e hipoglicemiante (AMORIM et al., 2009; SOBEH et al., 2019) também são descritas.

Poucos estudos toxicológicos foram descritos para esta espécie vegetal. Destes, em testes pré-clínicos utilizando modelos agudos, extratos hidroalcoólicos das folhas foram administrados por via oral em camundongos (AURICCHIO et al., 2007; LORA, 2007; SCHAPOVAL et al., 1994), e a DL₅₀ encontrada foi de 1.924,41 mg/kg, apresentada no trabalho de Lora (2007), demonstrando alterações hepáticas e comportamentais significativas.

Considerando o potencial terapêutico de *E. uniflora*, uma prospecção biotecnológica foi realizada através de levantamento bibliográfico na plataforma *Web of Science* no mês de maio de 2019, em busca de atual cenário de farmacógenos, bioativos, atividades farmacológicas prevalentes e sistemas de liberação existentes. A busca foi realizada sem delimitação de intervalo de tempo e utilizando critérios descritos no Quadro 5.

Quadro 5 - Sintaxe de busca de artigos para prospecção de sistemas de liberação contendo bioativos de *Eugenia uniflora*

Busca	Sintaxe de Busca	Nº de artigos
1	TS = ("Drug Delivery" OR "controlled release" OR "modified release" OR "delayed release" OR "retard release" OR carrier OR transdermal OR topical OR nano* OR micro* OR complex* OR matrix OR polymer* OR "inclusion complex" OR cosmetic*)	8.789.401
2	TS = ("in vivo" OR "ex vivo" OR "pre-clinical" OR "clinical")	3.080.221
3	TS = (" <i>Eugenia uniflora</i> ")	283
Combinação de busca 1, 2 e 3		3

Fonte: Próprio autor.

Nas três publicações encontradas foram aplicados critérios de exclusão: uso veterinário, uso botânico, uso dietético, ativos isolados, ativos previamente quantificados, ativos provenientes de resíduo industrial, uso cosmético (sem finalidades farmacológicas), nutracêuticos, estudos *in silico*, duplicados e revisões de literatura. Duas publicações foram relacionadas e são descritas detalhadamente na Tabela 2.

Os artigos relacionados, em sua totalidade, concentraram-se na atividade antimicrobiana das folhas de *E. uniflora* (BARBOSA et al., 2015; BIASI-GARBIN et al., 2016), utilizando óleos essenciais e extratos obtidos por diferentes solventes, respectivamente. O espectro antimicrobiano incluiu bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* meticilina-sensível (MSSA)) (BARBOSA et al., 2015) e fungos dermatófitos (BIASI-GARBIN et al., 2016).

Diferenças no líquido extrator influenciaram significativamente na atividade antifúngica, onde a utilização de extrato hidroacetônico (1:1) proporcionou redução da concentração inibitória mínima (CIM) para 31,3 µg/mL contra *Trichophyton mentagrophytes* (BIASI-GARBIN et al., 2016), em comparação à CIM alcançada para os extratos hidroalcoólico e aquoso. Ensaio de atividade antimicrobiana sinérgica, testes pré-clínicos, clínicos e sistemas de liberação de fármacos não foram desenvolvidos pelos autores.

Tabela 2 - Prospecção de publicações contendo sistemas de liberação/atividades biológicas de bioativos de *Eugenia uniflora*

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
1	Barbosa et al. (2015)	Óleos essenciais das folhas	NR	Diluição em ágar e curva de morte	NR	NR	<i>S. aureus</i> (MRSA e MSSA), <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i>	50,8 mg/mL para MSSA e 92,4 mg/mL para <i>Salmonella</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i>	NR	Melhor atividade para MSSA
2	Biasi-Garbin et al. (2016)	Extrato aquoso (EA), etanólico (EE) e acetônico (EAc) das folhas	NR	Microdiluição em caldo	NR	NR	<i>T. rubrum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i> 125 µg/mL (EA e EE), 62,5 µg/mL (EAc); <i>T. mentagrophytes</i> 125 µg/mL (EA e EE), 31,3 µg/mL (EAc)	NR	Melhor atividade de EAc para <i>T. mentagrophytes</i>

CIM: Concentração Inibitória Mínima; MRSA: *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente; MSSA: *Staphylococcus aureus* metilicina-sensível; NR: não realizado.

Fonte: Próprio autor.

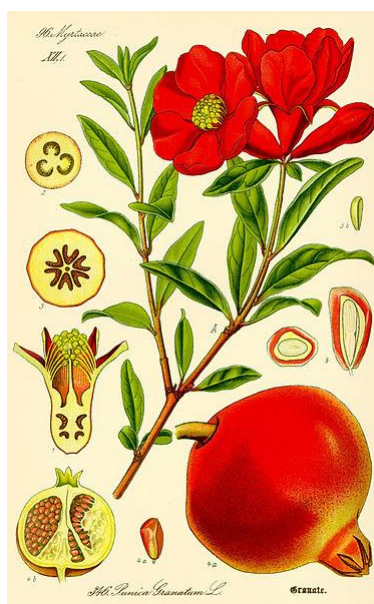
4.1.3 *Punica granatum* Linn

4.1.3.1 Aspectos botânicos e históricos

Planta nativa das regiões da Pérsia e Cáucaso, *Punica granatum* Linn (Punicaceae) tem o fruto conhecido internacionalmente como “pomegranate”, palavra derivada do Latim Medieval “pōmum” que significa maçã e “grānātum” que significa “sementes” (STOVER; MERCURE, 2007). A espécie é cultivada no Oriente Médio, Sul da Ásia e região do Mediterrâneo, prosperando também na Califórnia e no Arizona (DOIJODE, 2012). No Brasil, o fruto é conhecido como “romã” e o arbusto como “romãzeira”. É tolerante às diferentes condições de solo, água e clima, o que faz seu cultivo ser relativamente simples e mundialmente difundido (SUZUKI, 2016).

P. granatum (Figura 7) é um arbusto que atinge de 5-10 metros de altura. Dicotiledôneo e decíduo, tem o caule coberto por casca amarronzada que depois torna-se cinza. Os ramos são rígidos, angulares e frequentemente espinhosos. Possui folhas brilhantes, coriáceas, estreitas e lanceoladas. As flores possuem cor vermelho alaranjada variegada, com formato afunilado e medindo cerca de 3 cm de diâmetro, com 5 a 8 pétalas torcidas e cálice tubular vermelho, carnudo, que persiste no fruto. Podem ser ainda solitárias ou agrupadas, em pares e trios nas extremidades dos ramos, florescendo no verão e sendo autopolinizadas ou polinizadas por insetos e pássaros (MAURYA et al., 2018; STOVER; MERCURE, 2007).

Figura 7 - *Punica granatum* Linn



Fonte: Thomé (2008).

O fruto é uma baga, ligeiramente redonda, medindo 2,5-5 cm × 5-12 cm. Coroada na base pelo cálice proeminente, a romã possui casca dura (pericarpo e mesocarpo) de cor amarela, com parede interna variando de rosa a vermelho profundo. O interior do fruto, parte comestível, é separado por membranas distribuídas em câmaras, contendo arilos preenchidos com polpa succulenta de sabor doce ou ácida, com cor vermelha, rosa ou esbranquiçada. Cada arilo é preenchido com uma semente angular, macia ou dura. O número de sementes varia, mas não mais de 1.300 por fruto. Em temperaturas quentes, os frutos amadurecem normalmente de 5 a 7 meses após a floração (STOVER; MERCURE, 2007).

Punica granatum tem sido cultivada pelos Sumérios desde 5.000 a.C., porém a evidência do seu cultivo na Ásia remonta a 3.300-3.400 a.C. Estima-se que os fenícios espalharam este arbusto por toda a região do Mediterrâneo, sendo cultivado em Cartago (900 a.C.), na península Ibérica, na Grécia e na Itália (400 a.C.) (CHANDRA et al., 2010). Em muitas culturas, a romã está associada à fertilidade, à abundância, tendo sido consagrada pelos gregos a Afrodite, a deusa do amor (ZOHARY; HOPF; WEISS, 2012).

A espécie também é mencionada na Bíblia (Êxodo 28:33; Êxodo 39:25-24; Números 13:23; Números 20:5; 1 Reis 7:18, 20 e 42; Reis 25:17; Crônicas 4:13; Cantares de Salomão 4:13; Cantares de Salomão 8:2; Jeremias 52:22-23). Segundo os textos bíblicos, Moisés trouxe romãs de Canaan como prova de que a terra prometida era fértil. Segundo o Corão, a romã é um exemplo das coisas boas criadas por Alá e é um dos frutos do Paraíso. Entre os hindus é dedicada a Bhoomidevi, deusa da Terra. Para os judeus a romã é o símbolo da retidão, porque para eles o fruto teria 613 sementes, que correspondem aos 613 mandamentos da Torá (CHANDRA et al., 2010; MAURYA et al., 2018).

4.1.3.2 Uso tradicional

De acordo com o papiro de Eber (aproximadamente 1.550 a.C.), os antigos egípcios usavam extratos de raiz de *P. granatum*, ricos em taninos, para o tratamento de teníase. Hipócrates (400 a.C.) mencionou o uso de extratos de romã para tratar várias doenças, na forma de emplastos para inflamação de pele e olhos, e como bebida auxiliar na digestão. Dioscórides (40-90 d.C.) sugeria o suco da romã para a cura de úlceras, dores auriculares e nasais (ANAZARBUS, 2005; CHANDRA et al., 2010).

No sistema Ayurveda quase todas as partes (frutas, flores, sementes, folhas e cascas) são usadas para fins medicinais. Outros usos relacionam extratos de romã para contracepção, picadas de cobras, diabetes e hanseníase. Extratos das cascas, folhas e frutos imaturos são usados para diarreia, reumatismo e hemorragias, enquanto os botões secos e esmagados são transformados em chá como remédio para bronquite (STOVER; MERCURE, 2007).

Na medicina Unani, a decocção das cascas na proporção de 1:5 é recomendada no controle do diabetes e como antiparasitária. No México, os extratos das flores são usados como um gargarejo para aliviar a inflamação da boca e da garganta (ARUN; SINGH, 2012; RAMALINGUM; MAHOMOODALLY, 2015). No Brasil, a decocção, infusão ou lambedor das cascas do fruto, folhas ou sementes são utilizados popularmente para o tratamento de gastrite, sinusite, dores de garganta, rouquidão e tosse (BANDEIRA et al., 2018; LEITE et al., 2015; RIBEIRO et al., 2013).

A resolução RDC 10/2010 (BRASIL, 2010a), já revogada pela RDC 26/2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014a) incluía *Punica granatum* como espécie passível de ser tratada como droga vegetal sujeita à notificação, apresentando as seguintes informações:

Nomenclatura botânica: *Punica granatum*

Nomenclatura popular: Romã

Alegações: Inflamações e infecções da mucosa da boca, faringe como anti-inflamatório e anti-séptico

Parte utilizada: Pericarpo (casca do fruto)

Forma de utilização: Infusão: 3 g (1 colher de sopa) para 150 mL (xícara de chá) de água

Posologia: Decocção: 6 g (2 colheres de sopa) em 150 mL (xícara de chá) Aplicar no local afetado, em bochechos e gargarejos, 3 vezes ao dia. Não engolir a preparação após o bochecho e gargarejo

Via: Tópica

Observações: Se ingerido, pode provocar zumbido, distúrbios visuais, espasmos na panturrilha e tremores

Dentre diversas espécies de interesse medicinal e para produção de fitoterápicos, *P. granatum* consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009). Entretanto, a romãzeira ainda não possui especificações como droga vegetal na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), bem como não consta na Instrução Normativa número 02, de 13 de maio de 2014 a qual publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado” (BRASIL, 2014b).

4.1.3.3 Composição química

O valor nutricional da romã crua, porção comestível, por 100 g é: água (77,93 g), proteína (1,67 g), carboidrato (18,70 g), lipídeos totais (1,17 g), fibra (4 g), cálcio (10 mg), ferro (0,3 mg), magnésio (12 mg) e fósforo (36 mg). O suco fornece cerca de 16% do consumo diário de vitamina C por 100 mL e é fonte de vitamina B5 (ácido pantotênico), ácido elágico, ácido gálico; ácido cafeico; catequina, epigallocatequina galato, quercetina, rutina, elagitaninos, antocianinas, coenzima Q10, ácido α -lipóico e potássio (ARUN; SINGH, 2012; RAMALINGUM; MAHOMOODALLY, 2015).

As folhas de *P. granatum* apresentam como principais compostos punicalina, pedunculagina, punicalagina (isômeros α e β), flavonas glicosiladas, incluindo luteolina e apigenina, ácido galágico e ácido elágico. As flores são compostas majoritariamente por triterpenoides como ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido maslínico e ácido asiático. Antocianinas glicosadas como pelargonidina 3, 5- diglicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo também estão presentes nas flores (ARUN; SINGH, 2012; KHWAIRAKPAM et al., 2018).

O pericarpo e as cascas da romã apresentam punicalaginas, ácido gálico, catequina, epigallocatequina galato, quercetina, rutina e outros flavonóis, flavonas, flavononas, antocianidinas. antocianinas, punicalina, punicafolina e flavonas glicosiladas, incluindo luteolina e apigenina. As sementes contêm ácido punícico (95%), ácido esteárico, ácido palmítico, fitoesteróis e ácidos graxos conjugados, tais como ácido linoleico e ácido α -linolênico. As raízes e cascas do caule apresentam elagitaninos, incluindo punicalina e punicalagina e alcaloides piperidínicos (ARUN; SINGH, 2012; BRIGHENTI et al., 2017; CERDA et al., 2004; FELLAH et al., 2018; SAFIAGHDAM et al., 2018).

O Quadro 6 apresenta os principais compostos fenólicos descritos nas folhas de *P. granatum* (AL-MUAMMAR; KHAN, 2012; BEKIR et al., 2013; FELLAH et al., 2018; KHWAIRAKPAM et al., 2018; LANSKY; NEWMAN, 2007; NAWWAR; HUSSEIN; MERFORT, 1994). Há escassez de trabalhos que descrevem compostos voláteis para as folhas.

Quadro 6 - Principais constituintes fenólicos presentes nas folhas de *Punica granatum*

COMPOSTOS FENÓLICOS
1,2,3-tri- <i>O</i> -galloil- β - C1-glicose
5-pentadecilresorcinol
ácido cumárico
ácido clorogênico
ácido elágico
ácido ferúlico
ácido galágico
ácido gálico
ácido <i>p</i> -cumaroil málico
apigenina
apigenina-4'- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo
apigenina-7- <i>O</i> -glicosídeo
catequina
cianidina
cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo
cianidina-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo
cianidina 3- <i>O</i> -6''- <i>p</i> -cumaroil-glicosídeo
corilagina
epicatequina
epigalocatequina-3-galato
galocatequina
kaempferol
kaempferol-3- <i>O</i> -ramnoglicosídeo
luteolina-3'- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo
luteolina-3'- <i>O</i> -xilopiranosídeo
luteolina-4'- <i>O</i> -glicopiranosídeo
luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo
malvidina 3- <i>O</i> -arabinosídeo
matairesinol
<i>n</i> -(2,5-dihidroxifenil) piridium cloreto
narigenina
punicafolina
punicalagina
punicalina
quercetina
resveratrol
rutina
sesamina
sulfato de 10-monopotássio brevifolina ácido carboxílico
tirosol

Fonte: Próprio autor.

4.1.3.4 Atividades biológicas

Considerando a atividade hipoglicemiante, modelos murinos comprovaram a redução da glicose plasmática pelo extrato etanólico do pericarpo (PEREIRA, 1997), pelo extrato hidroetanólico das flores (JAFRI et al., 2000) e pelo extrato metanólico das sementes (DAS et al., 2001). Estudos demonstraram a cicatrização de lesões por ação de ativos de *P. granatum*, através da indução de migração fibroblástica, formação de colágeno e angiogênese (HAYOUNI et al., 2011; HUAN et al., 2013; NEMA et al., 2013). A romã e sua casca apresentam efeito inibitório na produção de citocinas pró-inflamatórias, atuando na via de sinalização da proteinoquinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 e no fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B). A ativação de MAPK-p38 e NF- κ B está associada ao aumento da expressão gênica de mediadores inflamatórios, como ON e COX-2 (HOUSTON et al., 2017; KIM et al., 2017; ZAID et al., 2007).

Em relação a efeitos antioxidantes, o extrato de romã rico em punicalaginas foi efetivo na proteção de danos induzidos por exposição a raios UVA e UVB em células fibroblásticas humanas, reduzindo a ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B e aumentando o reparo do DNA (LISBETH et al., 2008). O extrato etanólico das folhas apresentou efeito anti-inflamatório por inibição da atividade da 5-LOX; anti-colinesterásico por inibir AChE e BChE; e citotóxico contra células de adenocarcinoma mamário tipo MCF-7 (BEKIR et al., 2013). Efeitos anti-inflamatórios e analgésicos foram alcançados por extratos de romã ricos em ácido elágico, através da inibição da infiltração leucocitária e da modulação das citocinas pró-inflamatórias IL- β e TNF- α (MO et al., 2013). A casca de romã também demonstrou prevenção em modelos murinos de hematotoxicidade, aberrações cromossômicas, genotoxicidade (ELWEJ et al., 2016) e osteoartrite (LEE et al., 2018).

Atividades neuroprotetoras foram relatadas para *P. granatum*. Extratos de suco de romã apresentaram efeito protetor em neurônios humanos, de maneira dose-dependente atenuando os efeitos deletérios induzidos pela neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropirina) (BRAIDY et al., 2013). Em modelos *in vivo* e *in silico* para Doença de Alzheimer e Parkinson, foram relatados incremento na resposta de memória, aprendizagem e hiperalgesia respectivamente (DOLATSHAHI et al., 2015; LIU et al., 2016; YUAN et al., 2016).

Extratos metanólicos da casca da romã demonstraram efeito nefroprotetor em modelo murino de insuficiência renal crônica (EL-HABIBI, 2013). Outros achados concluíram que o extrato hidroalcoólico das flores (SADEGHI et al., 2015) e o extrato metanólico das folhas desta espécie vegetal (MESTRY et al., 2018) possuem papel protetor e atenuador de nefropatia induzida pela gentamicina.

Diversos trabalhos relatam atividade antitumoral de *P. granatum*, por diferentes mecanismos de ação (LANSKY; NEWMAN, 2007). A citotoxicidade de polifenóis da romã foi comprovada em modelo murinos, frente a células de câncer de mama (BANERJEE et al., 2012) e câncer de cólon (AHMED et al., 2017). Outros tipos de tumores têm sido positivamente combatidos por extratos de *P. granatum*, tais como bexiga, colo de útero, fígado, pâncreas, pulmão, ovário, próstata, pele, leucemia e mieloma múltiplo. Extratos da romãzeira, ricos em ácido elágico, punicalaginas e ácido punílico, suprimem a proliferação de células tumorais e induzem apoptose através da modulação de vários fatores de transcrição, vias de sinalização e expressão de vários genes em ambos cenários *in vitro* e *in vivo* (KHWAIRAKPAM et al., 2018; MASTROGIOVANNI et al., 2019).

Compostos fenólicos presentes em *P. granatum* inibiram a ação estrogênica do 17- β -estradiol, através da ligação competitiva aos receptores de estrogênio (KIM et al., 2002). Efeito protetor agonista de estrogênio do suco da romã e do extrato das sementes também foi demonstrado em camundongos ovariectomizados (MORI-OKAMOTO et al., 2004). Desse modo, o agonismo estrogênico pode ampliar o potencial terapêutico antitumoral de *P. granatum*, pela inibição da atividade androgênica, especialmente no câncer de próstata (LANSKY; NEWMAN, 2007).

O extrato metanólico da casca da romã inibiu a peroxidação lipídica *in vitro* (SINGH; CHIDAMBARA MURTHY; JAYAPRAKASHA, 2002). Fuhrman e Aviram (2001) citam que diferentes grupos de flavonoides e taninos presentes no suco de romã inibem a oxidação de LDL, *in vitro* e *in vivo*, reduzindo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em ratos. O suco de romã também preservou a paraoxonase plasmática, relacionada com a prevenção de doenças cardiovasculares e auxílio ao sistema imunológico inato (FUHRMAN; AVIRAM, 2002; NGUYEN; SOK, 2003; OZER et al., 2005). Aviram e colaboradores (2004) em ensaios clínicos com pacientes com estenose de artérias carótidas, citam a diminuição em 30% da espessura da placa ateromatosa, aumento da atividade da paraoxanase plasmática, diminuição do LDL e redução da pressão sistólica, após o consumo diário do suco de romã por três anos.

Com ação antiparasitária em murinos, as cascas da romã foram ativas frente a *Cryptosporidium parvum*, demonstrando restauração das vilosidades intestinais, desaparecimento de sintomas agudos e morte do parasita (AL-MATHAL; ALSALEM, 2013). Atividade anti-plasmodial foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*, frente a *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium chabaudi*, utilizando frações enriquecidas em taninos, elagitaninos e ácidos fenólicos provenientes da casca do fruto (DELL'AGLI et al., 2010; MUBARAKI et al., 2016; REDDY et al., 2007). Estudos em camundongos também demonstraram a eficácia do extrato de casca de romã contra *Giardia lamblia* (AL-MEGRIN, 2017).

Taninos presentes no pericarpo de *P. granatum* apresentaram atividade contra o vírus do herpes genital (HSV-2), inibindo a replicação e demonstrando ação virucida (ZHANG et al., 1995). O extrato etanólico da casca demonstrou atividade *in vitro* e *in silico* também para o HSV-2 (ARUNKUMAR; RAJARAJAN, 2018), bem como atividade frente ao HSV-3, em estudos *in silico* (ANGAMUTHU et al., 2019). Ação anti HIV-1 e HIV-2 foram demonstradas *in vitro* no suco da romã (NEURATH et al., 2004, 2005). Extratos hidroalcoólicos, bem como punicalaginas isoladas do extrato de romã, demonstraram ação virucida e inibidora de replicação do RNA do vírus influenza (CABALLERO et al., 2001; HAIDARI et al., 2009; PEÑA; MARTÍNEZ, 2001).

No que tange ao potencial antimicrobiano, Perez e Anesini (1994) demonstraram que extrato do pericarpo de *P. granatum* possui atividade frente *Salmonella typhi*, com fenótipo de resistência. O extrato etanólico da casca da romã foi eficaz contra *Escherichia coli* O157: H7, enterohemorrágica (VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2004), o extrato metanólico foi ativo frente *S. aureus* produtor de enterotoxina estafilocócica tipo A (SEA) (BRAGA et al., 2005) e o extrato aquoso pressurizado demonstrou atividade contra *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, bacilos comumente associados à intoxicação alimentar e meningite, respectivamente (ALEXANDRE et al., 2019).

P. granatum tem sido relacionada ainda à prevenção, controle e erradicação de biofilmes de bactérias e fungos da microbiota oral (ROCHELLE et al., 2016; VAHID DASTJERDI et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2003, 2006), bem como atividade frente a multidroga-resistentes, como *Staphylococcus aureus* MRSA, *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Pseudomonas aeruginosa* MDR e *Mycobacterium tuberculosis* (DEY; RAY; HAZRA, 2015; ENDO et al., 2018; PALLAVALI et al., 2019; SILVA et al., 2019).

P. granatum, consumida milenarmente por diferentes culturas, não possui efeitos adversos relatados nas antigas escrituras. Os compostos bioativos da romã, nas concentrações utilizadas pela medicina popular, não demonstraram efeitos tóxicos (JURENKA, 2008; PRAKASH; PRAKASH, 2011; VIDAL et al., 2003) e nem adversos na função renal, hepática e hematológica após estudos pré-clínicos com ratos e camundongos (CERDA et al., 2004; PATEL et al., 2008; VILADOMIU et al., 2013).

Considerando as diversas aplicações terapêuticas apresentadas por esta espécie, considerada uma “uma farmácia *per si*” pela medicina Ayurvédica (MESTRY et al., 2018), foi realizada prospecção biotecnológica de artigos na plataforma *Web of Science* no mês de maio de 2019. Tendo em vista a busca de atualizações sobre farmacógenos, compostos bioativos, atividades farmacológicas prevalentes e sistemas de liberação existentes para a romãzeira; este levantamento foi realizado sem delimitação de intervalo de tempo e utilizando critérios descritos no Quadro 7.

Quadro 7 - Sintaxe de busca de artigos para prospecção de sistemas de liberação contendo bioativos de *Punica granatum*

Busca	Sintaxe de Busca	Nº de artigos
1	TS = ("Drug Delivery" OR "controlled release" OR "modified release" OR "delayed release" OR "retard release" OR carrier OR transdermal OR topical OR nano* OR micro* OR complex* OR matrix OR polymer* OR "inclusion complex" OR cosmetic*)	8.789.401
2	TS = ("in vivo" OR "ex vivo" OR "pre-clinical" OR "clinical")	3.080.221
3	TS = (" <i>Punica granatum</i> ")	399
Combinação de busca 1, 2 e 3		65

Fonte: Próprio autor.

Das 65 publicações relacionadas, a leitura dos resumos permitiu a exclusão de trabalhos utilizando os seguintes critérios: estudos relacionados ao uso veterinário, uso botânico, uso dietético, ativos isolados, ativos previamente quantificados, ativos provenientes de resíduo industrial, uso cosmético (sem finalidades farmacológicas), nutracêuticos, estudos *in silico*, duplicados e revisões de literatura. Vinte e quatro trabalhos foram selecionados e estão apresentados detalhadamente na Tabela 3.

Tabela 3 - Prospecção de publicações contendo sistemas de liberação/atividades biológicas de bioativos de *Punica granatum*

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
1	Ahmed et al. (2017)	Extrato metanólico da casca da romã	NR	Dosagem de TGF- β e Bcl2 plasmáticos, EGF, CEA, CA 19.9, MMP-7 e imunohistoquímica	Câncer colorretal induzido, em um modelo murino	NR	NR	NR	NR	Promove a apoptose, atenua a inflamação e suprime a proliferação de células tumorais
2	Al-Obaidi; Muhsin; Ibrahim (2017)	Extrato metanólico da casca da romã	Colutório	Teste Kirby-Bauer	NR	NR	<i>S. mutants</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. gaseous</i> , <i>E. faecalis</i>	NR	NR	Efetivo para Gram-positivos, em concentrações acima de 50%
3	Amal et al. (2015)	Extrato aquoso do pericarpo	Membrana de quitosana-colágeno-amido	Teste Kirby-Bauer	cicatrização de feridas em porcos-da-Índia	NR	<i>P. aeruginosa</i>	NR	NR	Ação antimicrobiana e de recuperação epitelial com ausência de cicatriz
4	Banerjee et al. (2012)	Extrato metanólico da romã	NR	Contagem de células BT474, MCF-10F e 12F, MDA-MB-231; qRT-PCR (mRNA, miRNA, miR-155, miR-27a e siRNA); Western blotting (SHIP-1 e luciferase)	Estudo xenográfico murino	NR	NR	NR	NR	Efeitos anti-inflamatórios e antitumorais em câncer de mama, por via miRNA-155 e miRNA-27a

(Continuação Tabela 3)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
5	Barathikannan et al. (2016)	Extratos, hexânico, acetato de etila e metanólico da casca da romã	NR	Ensaio DPPH*, FRAP e peroxidação lipídica; teste Kirby-Bauer, microdiluição; teste hipoglicêmico e dosagem de α -glicosidase em <i>C. elegans</i>	NR	NR	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. diastaticus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. smegmati</i> , <i>C. lunata</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>A. niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>A. flavus</i> , <i>T. mentagrophyte</i>	125 µg/mL (para todos os fungos testados). CIM não realizada para bactérias	NR	O extrato de acetato de etila teve maior conteúdo fenólico, melhor inibição de α -glicosidase, atividade hipoglicêmica e antifúngica
6	Dassprakash et al. (2012)	Extrato aquoso da folha	NR	Ensaio antioxidantes para DPPH*, FRAP e peroxidação lipídica	Genotoxicidade murina induzida por ciclofosfamida	NR	NR	NR	NR	Efeitos antioxidante e antígeno tóxico
7	Dey; Ray; Hazra (2015)	Extrato metanólico e aquoso da casca da romã e sumo dos arilos	NR	Proporções em LJ, Teste Kirby-Bauer, microdiluição em caldo	NR	NR	<i>M. tuberculosis</i> , <i>K. pneumoniae</i> ESBL e KPC	64 µg/mL para <i>M. tuberculosis</i> e 128 µg/mL para <i>K. pneumoniae</i> ESBL	NR	Extratos metanólico e aquoso apresentaram atividade antimicrobiana
8	Elwej et al. (2016)	Extrato etanólico da casca da romã	NR	Ensaio DPPH*	Genotoxicidade murina induzida por BaCl ₂	NR	NR	NR	NR	Diminuição da hematotoxicidade e genotoxicidade por ação antioxidante

(Continuação Tabela 3)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
9	Endo et al. (2010)	Extrato etanólico da casca da romã	NR	Microdiluição, Teste Kirby-Bauer, <i>Checkerboard</i> ; curva de morte; tubo germinativo; inibição de aderência, análise microscópica da parede celular e citotoxicidade	NR	NR	<i>C. albicans</i> , <i>C. Parapsilosis</i>	3,9 µg/mL para <i>C. albicans</i> e 1,9 µg/mL para <i>C. parapsilosis</i>	FICI de 0,25	Interação sinérgica com fluconazol, reduzindo em duas vezes a CIM
10	Ferrazzano et al. (2017)	Extrato etanólico da casca da romã e sumo dos arilos	NR	Macrodiluição em caldo	NR	NR	<i>S. mutans</i> , <i>R. dentocariosa</i>	10 µg/mL (etanólico) 25 µg/mL e 20 µg/mL (sumo)	NR	O extrato etanólico foi mais eficaz para inibir bactérias cariogênicas
11	Hajimahmoodi et al. (2011)	Extrato metanólico da casca da romã	NR	Teste Kirby-Bauer	NR	NR	<i>H. pylori</i>	NR	NR	Significativa atividade anti <i>H. pylori in vitro</i>
12	Houston et al. (2017)	Extrato aquoso da casca da romã	NR	<i>Western blotting</i> de lisado de pele para COX-2, coloração imuno-histoquímica <i>ex vivo</i> para COX-2, perfis de profundidade	NR	NR	NR	NR	NR	Efeito anti-inflamatório <i>ex vivo</i> por redução da expressão de COX-2. Boa penetração cutânea em modelo porcino

(Continuação Tabela 3)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
13	Kumagai et al. (2015)	Extrato etanólico da romã	NR	Dosagem de glicose, de produtos finais de glicação avançada e níveis de peroxidação lipídica	Efeito anti-glicação <i>in vivo</i> , modelo murino para diabetes tipo 2	NR	NR	NR	NR	Suprimiu a formação de produtos finais de glicação avançada, como glicalbumina e hemoglobina glicada
14	Lei et al. (2003)	Extrato etanólico das folhas	NR	Quantificação de ácido elágico plasmático por HPLC	Estudo farmacocinético em ratos machos	NR	NR	NR	NR	Má absorção oral e rápida eliminação, sendo parte absorvida pelo estômago
15	Li et al. (2016)	Extrato etanólico da casca da romã	NR	Cultura de células B-CPAP, TPC-1 e Nthy-ori 3-1; potencial de membrana mitocondrial; EROs, teste de câmara de Boyden e <i>Western blot</i>	Estimulação de carcinoma tipo B-CPAP, com estudo xenográfico murino	NR	NR	NR	NR	Suprimiu a proliferação e induziu a apoptose em células de câncer tireoideano
16	Mo et al. (2013)	Extrato metanólico da casca da romã	Gel de polietileno-glicol 4000, incorporado a 5%, 2,5% e 1% (m/m)	Atividade da mieloperoxidase tecidual	Modelos murinos de edema de orelha e de pata, poliartrite crônica, hiperalgesia mecânica e teste de formalina	NR	NR	NR	NR	Efeitos anti-inflamatórios e analgésicos tópicos por inibição da migração leucocitária e modulação de citocinas

(Continuação Tabela 3)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
17	Nóbrega et al. (2015)	Extrato hidro-alcoólico da casca da romã	Colutório	Análise microbiológica da saliva por contagem de UFC/mL	NR	Teste randomizado duplo-cego por 14 dias. Determinação do índice de sangramento à sondagem e índice de placa	Pesquisa para <i>Streptococcus</i> spp.	NR	NR	Não reduziu o biofilme dentário e a inflamação gengival. No entanto, teve efeito inibitório na contagem de estreptococos orais
18	Oliveira et al. (2013)	Extrato da casca da romã em Poprileno-glicol	NR	Microdiluição em caldo; citotoxicidade em macrófagos murinos, dosagem de IL-1 β e TNF- α	NR	NR	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i>	25 mg/mL (<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>); 12,5 mg/mL (<i>S. mutans</i>) e 50 mg/mL (<i>Candida</i> spp.)	NR	Mais efetivo para Gram-positivos, diminuição de TNF- α e ineficaz para reduzir IL-1 β
19	Pagliarulo et al. (2016)	Extrato etanólico da casca da romã e sumo dos arilos	NR	Ensaio DPPH*, teste Kirby-Bauer, microdiluição e curva de morte	NR	NR	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	40 μ g/ μ L <i>E. coli</i> e 65 μ g/ μ L <i>S. aureus</i> (sumo); 30 μ g/ μ L <i>E. coli</i> e 20 μ g/ μ L <i>S. aureus</i> (etanólico)	NR	Atividade antimicrobiana efetiva, e potencializada após processo extrativo

(Continuação Tabela 3)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
20	Prakash et al. (2017)	Extrato hidro-alcoólico da casca da romã	Gel de carboximetil-celulose 10% (m/m)	Dosagem de IL-1 β , IL-8 e CCL28	NR	Teste randomizado duplo-cego por 14 dias (n=32). Determinação do índice gengival, de sangramento à sondagem, de profundidade de sondagem e de placa	NR	NR	NR	Redução dos marcadores inflamatórios e complemento à terapia mecânica para o tratamento da gengivite
21	Sanchez-Lamar et al. (2008)	Extrato hidro-alcoólico de todas as partes da romã	NR	Testes de Ames, com <i>S. cerevisiae</i> , ensaios citogenéticos com células de ovário murino, ensaio de trocas de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas	Ensaio murinos de micronúcleo de medula óssea e de anomalia do formato de espermatozoide	NR	NR	NR	NR	Toxicidade ao DNA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
22	Spilmont et al. (2015)	Extrato hidro-alcoólico de cascas da romã	NR	Proliferação de células osteoblásticas murinas MC3T3-E1 ⁺ , fosfatase alcalina, atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato e taxa de mineralização	Análise de densidade mineral óssea, micro-arquitetura óssea e matrizes Taqman em murinos pós-ovariectomia	NR	NR	NR	NR	Eficaz na prevenção da perda óssea associada à ovariectomia em camundongos

(Continuação Tabela 3)

Nº	Autor	Ativos	Forma Farmacêutica	Testes <i>in vitro</i>	Testes pré-clínicos	Testes clínicos	Microrganismo testado	CIM	Sinergismo	Conclusões
23	Vahid Dastjerdi et al. (2014)	Extrato aquoso das flores	NR	Microdiluição e macrodiluição em caldo, análise microscópica da parede celular	NR	NR	<i>S.sanguinis</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. mutans</i> e <i>E. faecalis</i>	<i>S. sanguinis</i> (6,25 mg/mL) e <i>S. sobrinus</i> (25 mg/mL)	NR	Efeito antibacteriano e preventivo na formação de biofilme em fios ortodônticos
24	Vasconcelos et al. (2003)	Extrato aquoso das cascas da romã	Gel carbopol 940	Auxanograma e formação de tubo germinativo	NR	Estudo duplo-cego (n = 60) em pacientes com candidose oral. Aplicação 3 vezes ao dia por 15 dias	<i>Candida</i> spp.	NR	NR	Ação antifúngica tópica para candidose associada à estomatite protética

BaCl₂: cloreto de bário; Bcl2: *B-cell lymphoma 2*; B-CPAP: *Nthy-ori 3-1 Cell Line*; CA 19.9: antígeno carboidrato 19-9 (câncer colorretal); CCL28: quimiocina epitelial mucosa-associada, membro 28; CEA: antígeno carcinoembrionário; CIM: Concentração Inibitória Mínima; DNA: ácido desoxirribonucleico; DPPH*: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; EGF: *epidermal growth fator*; FICI: *Fractional Inhibitory Concentration Index*; FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*; HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*; IL: interleucina; LJ: Ágar Lowenstein-Jensen; miRNA: micro ácido ribonucleico; MMP-7: metaloproteinase de matriz-7; NR: não realizado; qRT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*; SHIP-1: Inositol 5 'polifosfatase 1; siRNA: RNA silenciador; TGF: *Transforming Growth Fator*; TNF: Fator de Necrose Tumoral; UFC: Unidades Formadoras de Colônias.

Fonte: Próprio autor

O farmacógeno prevalente nos trabalhos relacionados foi a casca do fruto (66,67%, 16 trabalhos), seguido do pericarpo e/ou fruto inteiro (16,67%) (AMAL et al., 2015; BANERJEE et al., 2012; KUMAGAI et al., 2015; SANCHEZ-LAMAR et al., 2008) e do sumo dos arilos (DEY; RAY; HAZRA, 2015; FERRAZZANO et al., 2017; PAGLIARULO et al., 2016). Apenas dois estudos utilizaram folhas (DASSPRAKASH et al., 2012; LEI et al., 2003) e um as flores (VAHID DASTJERDI et al., 2014) de *P. granatum*. Apenas extratos brutos foram relatados nas publicações.

A atividade farmacológica mais citada foi a antimicrobiana (50%) em 12 trabalhos, dentre os quais foram prevalentes testes *in vitro* frente a patógenos da cavidade oral, tais como *Streptococcus mutans* e *Rothia dentocariosa* (AL-OBAIDI; MUHSIN; IBRAHIM, 2017; BARATHIKANNAN et al., 2016; FERRAZZANO et al., 2017; NÓBREGA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; VAHID DASTJERDI et al., 2014). Microrganismos do gênero *Candida* spp. (ENDO et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2003), bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (AMAL et al., 2015; PAGLIARULO et al., 2016), *Helicobacter pylori* (HAJIMAHMOODI et al., 2011), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/KPC e *Mycobacterium tuberculosis* (DEY; RAY; HAZRA, 2015) também foram inibidos. O trabalho de Endo e colaboradores (2010) cita sinergismo antifúngico apresentado pela punicalagina derivada do extrato bruto de *P. granatum*, quando associada ao fluconazol, frente a cepas de *Candida* spp.

Os demais trabalhos demonstraram, através de testes *in vitro* e pré-clínicos, os potenciais anti-inflamatório (20,83%) (BANERJEE et al., 2012; HOUSTON et al., 2017; MO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; PRAKASH et al., 2017), antioxidante (16,67%) (BARATHIKANNAN et al., 2016; DASSPRAKASH et al., 2012; ELWEJ et al., 2016; PAGLIARULO et al., 2016), antitumoral (12,5%) frente a cânceres colorretais, de mama e de tireoide, respectivamente (AHMED et al., 2017; BANERJEE et al., 2012; LI et al., 2016), hipoglicemiante (8,33%) (BARATHIKANNAN et al., 2016; KUMAGAI et al., 2015), cicatrizante (4,17%) (AMAL et al., 2015), analgésico (4,17%) (MO et al., 2013) e osteoprotetor (4,17%) (SPILMONT et al., 2015), além de estudo farmacocinético em modelo murino (LEI et al., 2003).

No que tange à genotoxicidade, apenas o trabalho de Sanchez-Lamar e colaboradores (2008) demonstrou efeitos deletérios ao DNA de células reprodutivas. Entretanto, os outros autores levantados consideraram os ativos de *P. granatum* como redutores e/ou preventivos de genotoxicidade (DASSPRAKASH et al., 2012; ELWEJ et al., 2016).

Considerando sistemas de liberação de ativos de *P. granatum*, seis trabalhos (25%) apresentaram sistemas para via tópica, sendo um gel a base de carbopol 940 (VASCONCELOS et al., 2003) e dois colutórios (AL-OBAIDI; MUHSIN; IBRAHIM, 2017; NÓBREGA et al., 2015) contendo extratos brutos da casca da romã e destinados a ação antimicrobiana bucal. Mo e colaboradores (2013) desenvolveram um gel contendo extrato bruto incorporado a 5%, 2,5% e 1% (m/m) em polietilenoglicol (PEG) 4000, para efeito anti-inflamatório e analgésico local. Com proposta cicatrizante, Amal e colaboradores (2015) elaboraram uma membrana de quitosana-colágeno-amido contendo extrato bruto da casca da romã e; como anti-inflamatório para a mucosa oral, Prakash e colaboradores (2017) incorporaram 10% de extrato bruto das cascas de romã em carboximetilcelulose.

Em estágios clínicos de desenvolvimento relacionados à busca estão três dos seis sistemas de liberação supracitados, sendo todos destinados ao tratamento de doenças odontológicas. Com objetivo antimicrobiano, o gel desenvolvido por Vasconcelos e colaboradores (2003) tem por finalidade o tratamento da candidose oral associada à estomatite protética; e o colutório de Nóbrega e colaboradores (2015) foi eficaz na redução de estreptococos orais. Prakash e colaboradores (2017) apresentaram o gel de carboximetilcelulose contendo extrato bruto de *P. granatum* como alternativa anti-inflamatória complementar à terapia mecânica de tratamento de gengivite.

4.2 CONCLUSÃO

Cinnamomum verum, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* são espécies vegetais ricas em compostos fenólicos e de cultivo facilitado em solo brasileiro, por serem pertencentes a biomas tropicais e subtropicais, sendo a pitangueira espécie nativa do Brasil. Agregam valor econômico, devido à importância para as indústrias alimentícias (como especiarias e frutos comestíveis), cosméticas (como aromatizantes) e farmacêuticas (dada a versatilidade de bioativos e usos medicinais documentados).

Em relação ao potencial terapêutico, estas espécies vegetais constam em compêndios oficiais e são de interesse ao Sistema Único de Saúde, devido a ampla utilização pela medicina popular brasileira. As cascas de *C. verum*, as folhas de *E. uniflora* e as cascas dos frutos de *P. granatum* são os farmacógenos mais descritos na literatura, sendo os dois primeiros ricos em óleos voláteis e compostos fenólicos e a romã rica em compostos fenólicos. Entretanto as folhas destas espécies apresentam-se como ricas em compostos fenólicos, o que configura versatilidade de utilização.

A atividade antimicrobiana foi a mais bem reportada dentre os trabalhos levantados, abrangendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras, dermatófitos e micobactérias. Contudo, poucos trabalhos apresentam atividades dos compostos fenólicos presentes nas folhas destas espécies frente a microrganismos multidroga-resistentes, bem como estudos sinérgicos com antimicrobianos convencionais. No que tange ao desenvolvimento farmacotécnico, apenas um trabalho citou cápsulas contendo extratos brutos das cascas do caule de *C. verum* em estudo farmacodinâmico; nenhuma forma farmacêutica foi descrita para *E. uniflora* e seis publicações citaram sistemas tópicos de liberação de ativos de *P. granatum*, sendo três trabalhos referentes a atividade antimicrobiana e três a ensaios clínicos. Diante do exposto, evidencia-se a perspectiva de veiculação de compostos fenólicos presentes nas folhas destas espécies; sobretudo, como terapia para infecções cutâneo-mucosas.

4.3 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007–1021, 2012.
- AHMED, H. H. et al. *Punica granatum* suppresses colon cancer through downregulation of Wnt/ β -catenin in rat model. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 5, p. 627–635, 2017.
- AL-MATHAL, E. M.; ALSALEM, A. A. Pomegranate (*Punica granatum*) peel is effective in a murine model of experimental *Cryptosporidium parvum* ultrastructural studies of the ileum. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 4, p. 482–494, 1 ago. 2013.
- 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, 1 jan. 2017.
- AL-MUAMMAR, M. N.; KHAN, F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 595–604, jun. 2012.
- AL-OBAIDI, D. M.; MUHSIN, S. A.; IBRAHIM, A. A. *In vivo* antimicrobial inhibition of *Punica granatum* extracts as mouthwash. **Russian Open Medical Journal**, v. 6, n. 4, 2017.
- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. **Food Research International**, v. 115, p. 167–176, 1 jan. 2019.
- ALHADI, E. A. et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Pistacia lentiscus*, *Phyllanthus andersonii* and *Cinnamomum verum* crude extracts and fractions. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 16, p. 186–193, 2018.
- ALLEN, R. W. et al. Cinnamon use in type 2 diabetes: An updated systematic review and meta-analysis. **Annals of Family Medicine**, v. 11, n. 5, p. 452–459, 2013.
- ALMEIDA, C. E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 428–433, dez. 1995.
- ALVES, L. A.; FREIRES, I. DE A.; DE CASTRO, R. D. Efeito antibacteriano de óleos essenciais sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 57–62, 2010.
- AMAL, B. et al. Preparation and characterisation of *Punica granatum* pericarp aqueous extract loaded chitosan-collagen-starch membrane: role in wound healing process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 5, 2015.
- AMORIM, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L.(Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.
- ANAZARBUS, P. D. **De Materia Medica** (L. Y. Beck, translator), New York, USA Olms-Weidmann Publisher, 2005.

- ANDERSON, R. A. et al. Cinnamon extract lowers glucose, insulin and cholesterol in people with elevated serum glucose. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 4, p. 332–336, 1 out. 2016.
- ANGAMUTHU, D. et al. Antiviral study on *Punica granatum* L., *Momordica charantia* L., *Andrographis paniculata* Nees, and *Melia azedarach* L., to Human Herpes Virus-3. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 28, p. 98–108, 1 jun. 2019.
- ARAÚJO, F. F. et al. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57–72, 1 jul. 2019.
- ARIF, M. et al. Evaluation of toxicity of *Mucuna pruriens*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myristica fragrans* and their combination on renal, hepatic and cardiac parameters. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 146–150, 2015.
- ARUN, N.; SINGH, D. P. *Punica granatum*: a Review on Pharmacological and Therapeutic Properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 5, p. 1240–1245, 2012.
- ARUNKUMAR, J.; RAJARAJAN, S. Study on antiviral activities, drug-likeness and molecular docking of bioactive compounds of *Punica granatum* L. to Herpes simplex virus - 2 (HSV-2). **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 301–309, 1 maio 2018.
- ASSEFA, A. D.; KEUM, Y. S.; SAINI, R. K. A comprehensive study of polyphenols contents and antioxidant potential of 39 widely used spices and food condiments. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 3, p. 1548–1555, 2018.
- AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76, 2007.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L.(pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.
- AVIRAM, M. et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 423–433, 2004.
- BALIJEPALE, M. K. et al. *Cinnamomum* genus: a review on its biological activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2017.
- BANDEIRA, A. et al. Ethnoknowledge: Use of medicinal plants in communities. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 23, n. 5, p. 1–12, 2018.
- BANERJEE, N. et al. Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells *in vitro* and *vivo*: Potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 1, p. 21–34, 2012.
- BARATHIKANNAN, K. et al. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its *in vitro* and *in vivo* biological properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, jul. 2016.

BARBOSA, L. N. et al. *In vitro* antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 3, p. 289–298, mar. 2015.

BARROS, F. J. et al. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n. 4, p. 505–512, 2016.

BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 470–475, 2013.

BERNARDO, T. H. L. et al. Antimicrobial analysis of an antiseptic made from ethanol crude extracts of *P. granatum* and *E. uniflora* in wistar rats against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

BEZERRA, I. C. F. et al. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 92–101, 2018.

BIASI-GARBIN, R. P. et al. Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

BOBADILLA, F. J. et al. Antibacterial activity and toxicity of the ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. leaves on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences**, v. 8, n. 2, 2018.

BRAATZ, S. M. **Avaliação do efeito citoprotetor do extrato bruto das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pintanga) e de compostos bioativos isolados em células secretoras de insulina.** Ponta Grossa, PR. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2010. Disponível em: <<https://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/951>>. Acesso em: 30 de julho de 2019.

BRACHT, F.; CONCEIÇÃO, G. C. DA; SANTOS, C. F. M. DOS. A América conquista o mundo: uma história da disseminação das especiarias americanas a partir das viagens marítima do século XVI. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 1, 2011.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396–402, 2007.

BRAGA, L. C. et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1–2, p. 335–339, 2005.

BRAIDY, N. et al. Neuroprotective effects of a variety of pomegranate juice extracts against MPTP-induced cytotoxicity and oxidative stress in human primary neurons. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

BRANDELLI, C. L. C. et al. Indigenous traditional medicine: *in vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. **Parasitology Research**, v. 104, n. 6, p. 1345–1349, 2009.

BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2009. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2019

BRASIL. **RDC Nº 10, de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências**. Brasília, DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010a.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**. Brasília, DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010b.

BRASIL. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO 4a Edição Ampliada e Revisada**. Campinas, SP, 2011. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2019

BRASIL. **RDC Nº 26, DE 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Brasília, DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2014a.

BRASIL. **Instrução Normativa número 02, de 13 de Maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”**. Brasília, DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2014b.

BRIGHENTI, V. et al. Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1480, p. 20–31, 2017.

CABALLERO, O. et al. Actividad inhibitory de extractos del fruto de *Punica granatum* sobre cepas del virus de la gripe. **Revista Cubana de Química**, v. 13, p. 106, 2001.

CERDA, B. et al. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 4, p. 205–220, 2004.

CHANDRA, R. et al. Origin, history and domestication of pomegranate. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 4, n. December 2010, p. 1–6, 2010.

CHAVEERACH, A.; SUDMOON, R.; TANEE, T. Interdisciplinary researches for potential developments of drugs and natural products. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 378–384, 2017.

CHEN, T.-W. et al. Discovery of a novel anti-cancer agent targeting both topoisomerase I & II as well as telomerase activities in human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo*: *Cinnamomum verum* component cuminaldehyde. **Current Cancer Drug Targets**, v. 16, n. 9, p. 796–806, 2016.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57–63, 2002.

COUTINHO, H. D. M. et al. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 1024–1026, 2010.

CUNHA, F. A. B. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 2016.

DAS, A. K. et al. Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 628–629, 2001.

DASSPRAKASH, M. V. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1523–1530, 2012.

DEAN, W. A botânica e a política imperial: A introdução e a domesticação de plantas no Brasil. **Revista Estudos Históricos**, v. 4, n. 8, p. 216–228, 1991.

DELL'AGLI, M. et al. Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum*) antagonize *in vitro* the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 208, 2010.

DENARDIN, C. C. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 32, n. 1, p. 16–23, jan. 2014.

DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1474–1480, 2015.

DOIJODE, S. D. **Seed Storage of Horticultural Crops**. [s.l.] CRC Press, 2012.

DOLATSHAHI, M. et al. Ellagic acid improves hyperalgesia and cognitive deficiency in 6-hydroxidopamine induced rat model of Parkinson's disease. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 38, 2015.

DOMARACKY, M. et al. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos *in vivo*. **Physiological Research**, v. 56, n. 1, p. 97–104, 2007.

DONADO-PESTANA, C. M. et al. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 42–49, 2018.

DOS SANTOS, S. L. F. et al. Uso de plantas medicinais por idosos de uma instituição filantrópica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 4, n. 2, p. 71–75, 2019.

DUGOUA, J.-J. et al. From type 2 diabetes to antioxidant activity: a systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. This article is one of a selection of papers published in this special issue (part 1 of 2) on the Safety and Efficacy of Natural. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 837–847, 2007.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 1 out. 2016.

EL-HABIBI, E. M. Renoprotective effects of *Punica granatum* (pomegranate) against adenine-induced chronic renal failure in male rats. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, p. 2059–2069, 2013.

EL-SHOUNY, W. et al. Antimicrobial activity of different essential oils against *Aspergillus flavus* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from respiratory tract. **Egyptian Journal of Botany**, v. 0, n. 0, p. 161–172, 2017.

ELWEJ, A. et al. Protective effects of pomegranate peel against hematotoxicity, chromosomal aberrations, and genotoxicity induced by barium chloride in adult rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 964–974, jun. 2016.

ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534–540, 2010.

ENDO, E. H. et al. Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 48–54, 1 dez. 2018.

FELLAH, B. et al. Phenolic profiling and antioxidant capacity in flowers, leaves and peels of Tunisian cultivars of *Punica granatum* L. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 9, p. 3606–3615, 2018.

FERRAZZANO, G. F. et al. *In vitro* antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

FERREIRA, M. R. A. et al. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008–3013, 2013.

FIUZA, T. S. et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, 2008.

FRANZON, R. C. et al. Pitanga—*Eugenia uniflora* L. **Exotic Fruits**, p. 333–338, 1 jan. 2018.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 12, n. 1, p. 41–48, 2001.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, n. 1, p. 321–324, 2002.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, 1 fev. 2014.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395–406, 2010.

HABTEMARIAM, S.; HABTEMARIAM, S. The chemical and pharmacological basis of cinnamon (*Cinnamomum* species) as potential therapy for type-2 diabetes and associated diseases. **Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases**, p. 505–550, 1 jan. 2019.

HAIDARI, M. et al. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1127–1136, 2009.

HAJIMAHMOODI, M. et al. *In vitro* antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 11, p. 1059–1066, 2011.

HAMIDPOUR, R. et al. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaracidal, and repellent activities. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 2, p. 66–70, 1 abr. 2015.

HAN, X.; PARKER, T. L. Antiinflammatory activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil in a human skin disease model. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 1034–1038, jul. 2017.

HAYOUNI, E. A. et al. Phytomedicine hydroalcoholic extract based-oointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 11, p. 976–984, 2011.

HAYTOWITZ, D. B.; WU, X.; BHAGWAT, S. USDA Database for the flavonoid content of selected foods. **U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory**, v. 3.3, p. 173 p., 2018.

HO, S.-C.; CHANG, K.-S.; CHANG, P.-W. Inhibition of neuroinflammation by cinnamon and its main components. **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2275–2282, 15 jun. 2013.

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, mar. 2017.

HUAN, Y. A. N. et al. Effect of pomegranate peel polyphenol gel on cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic rats. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 9, p. 1700–1706, 2013.

HUSAIN, I. et al. Phytochemical characterization and biological activity evaluation of ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 110–116, jun. 2018.

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, n. 3, p. 309–314, 2000.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M. Chemistry, Biogenesis, and Biological Activities of *Cinnamomum zeylanicum*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 547–562, jul. 2011.

JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 2, 2008.

KAWATRA, P.; RAJAGOPALAN, R. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. **Pharmacognosy Research**, v. 7, n. 5, p. 1, jun. 2015.

KHAN, R. A. et al. Acute and sub chronic toxicity of *Mucuna pruriens*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myristica fragrans* and their effects on hematological parameters. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 8, p. 641–647, 2013.

KHWAIRAKPAM, A. D. et al. Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 53–64, jul. 2018.

KIM, H. et al. Pomegranate polyphenolics reduce inflammation and ulceration in intestinal colitis—involvement of the miR-145/p70S6K1/HIF1 α axis *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 43, p. 107–115, 2017.

KIM, N. D. et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 71, n. 3, p. 203–217, 2002.

KLEJDUS, B.; KOVÁČIK, J. Quantification of phenols in cinnamon: A special focus on “total phenols” and phenolic acids including DESI-Orbitrap MS detection. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 774–780, 1 maio 2016.

KÖHLER, F. E. **Köhler’s Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte**. [s.l.] BLSmedia, 2003.

KUMAGAI, Y. et al. Anti-glycation effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extract and its components *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7760–7764, 2015.

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827–9837, 2011.

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

LEE, C.-J. et al. Inhibitory effects of punicalagin from *Punica granatum* against type II collagenase-induced osteoarthritis. **Journal of Functional Foods**, v. 41, p. 216–222, 1 fev. 2018.

LEE, M.-H. et al. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v. 154, n. 2, p. 131–136, 2000.

- LEI, F. et al. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical And Life Sciences**, v. 796, n. 1, p. 189–194, out. 2003.
- LEITE, I. A. et al. A etnobotânica de plantas medicinais no município de São José de Espinharas, Paraíba-Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, 2015.
- LEONTI, M. et al. Reverse ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 417–431, 23 fev. 2017.
- LI, Y. et al. *Punica granatum* (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and anti-metastasis activity in thyroid cancer. **RSC Advances**, v. 6, n. 87, p. 84523–84535, 2016.
- LIMA, E. D. et al. *In-vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. **Revista de Microbiologia**, v. 23, n. 4, p. 235–238, 1992.
- LISBETH, A. et al. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8434–8441, 2008.
- LIU, W. et al. Development of a neuroprotective potential algorithm for medicinal plants. **Neurochemistry International**, v. 100, p. 164–177, nov. 2016.
- LORA, J. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**. Criciúma, SC. Dissertação. Mestrado em Ciências Ambientais. Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), 2007. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=116211>. Acesso em 17 jul. 2019.
- LORENZI, H. et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, v. 640, 2006.
- LV, J. et al. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1442–1450, 1 jun. 2012.
- MANOSI, D. et al. Ethnobotany, phytochemical and pharmacological aspects of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, p. 58–63, 2013.
- MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006, 1 jan. 2011.
- MASTROGIOVANNI, F. et al. Anti-inflammatory effects of pomegranate peel extracts on *in vitro* human intestinal Caco-2 Cells and *ex vivo* porcine colonic tissue explants. **Nutrients**, v. 11, n. 3, mar. 2019.
- MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 3, p. 1327–1336, 20 jan. 2012.
- MAURYA, A. et al. Pomegranate (*Punica granatum*) - Review Article. **Indian Journal of Drugs**, v. 6, n. 2, p. 128–132, 2018.

- MELO, R. M. et al. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L.(Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 179–183, 2007.
- MESTRY, S. N. et al. *Punica granatum* improves renal function in gentamicin-induced nephropathy in rats via attenuation of oxidative stress. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, 17 mar. 2018.
- MIRAGHAJANI, M.; GHIASVAND, R. Cinnamon and arthritic care. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**, p. 253–260, 1 jan. 2019.
- MISHRA, A. K. et al. Antimicrobial activity of essential oils from the leaves of *Cinnamomum* spp. **National Academy Science Letters-India**, v. 31, n. 11–12, p. 341–345, 2008.
- 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, n. 3, p. 901–908, jul. 2013.
- MODI, K. K. et al. Cinnamon and its metabolite sodium benzoate attenuate the activation of p21rac and protect memory and learning in an animal model of Alzheimer's disease. **PloSOne**, v. 10, n. 6, p. e0130398, 23 jun. 2015.
- MOMTAZ, S. et al. Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 241–258, 1 abr. 2018.
- MONIKA, S. et al. Inhibitory activity of Cinnamon bark oil on group B *Streptococci* (GBS). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 5, p. 981–991, 2014.
- MORAIS, S. M. et al. Correlation between the anti-radical, anti-acetylcholinesterase activities and phenolic content of some extracts of live herbal pharmacies in the Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 575–582, 2013.
- MORI-OKAMOTO, J. et al. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 93–101, 2004.
- MOUSAVI, S. A. A.; KAZEMI, A. *In vitro* and *in vivo* antidermatophytic activities of some Iranian medicinal plants. **Medical Micology**, v. 53, n. 8, p. 852–859, nov. 2015.
- MUBARAKI, M. A. et al. Beneficial effect of *Punica granatum* peel extract on murine malaria-induced spleen injury. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 221, 2016.
- MURPHY, S. P. **Food Composition Data**. Disponível em:
<<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/144936?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=microgreens&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>>>. Acesso em: 19 jul. 2019.
- NARDONI, S. et al. *In vitro* activity of twenty commercially available, plant-derived essential oils against selected dermatophyte species. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 8, p. 1473–8, ago. 2015.

- NASIR, M.; TAFESS, K.; ABATE, D. Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, jul. 2015.
- NAVEED, R. et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.
- NAWWAR, M. A. M.; HUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I. Leaf phenolic of *Punica granatum*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1175–1177, 1994.
- NEMA, N. et al. *In vivo* topical wound healing activity of *Punica granatum* peel extracts on rats. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 1, n. 2, p. 195–200, 2013.
- NENOV, N. et al. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liquefied gases. 6. Barks from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Nees). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 1, p. 67–75, 2011.
- NEURATH, A. R. et al. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. **BMC Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 41, 2004.
- NEURATH, A. R. et al. *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and *Candidate* topical microbicide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1056, n. 1, p. 311–327, 2005.
- NGUYEN, S. D.; SOK, D.-E. Oxidative inactivation of paraoxonase1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. **Free Radical Research**, v. 37, n. 12, p. 1319–1330, 2003.
- NÓBREGA, R. DE M. et al. A randomized, controlled clinical trial on the clinical and microbiological efficacy of *Punica granatum* Linn mouthwash. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 15, n. 1, p. 301–308, 2015.
- OLIVEIRA, C. et al. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L.(Pitanga). **Brazilian Dental Science**, v. 12, n. 2, 2009.
- OLIVEIRA, J. R. et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.
- OWEN, P. L.; JOHNS, T. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 149–160, 1999.
- OZER, E. A. et al. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 29–37, 2005.
- 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, p. 824–831, jan. 2016.
- PALLAVALI, R. R. et al. Data of antibacterial activity of plant leaves crude extract on bacterial isolates of wound infections. **Data in Brief**, v. 24, p. 103896, 1 jun. 2019.

PATEL, C. et al. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2728–2735, 2008.

PEÑA, B. R.; MARTÍNEZ, M. T. Inhibición de la hemaaglutinación de cepas de influenza A por un extracto liofilizado de granada BLBU. **Revista Cubana de Química**, v. 13, p. 395, 2001.

PEREIRA, N. A. Plants as hypoglycemic agents. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 49, n. 5/6, p. 354–358, 1997.

PEREIRA, N. L. F. et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 512–518, 2017.

PEREZ, C.; ANESINI, C. *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 1, p. 41–46, 1994.

PFAF. **Edible Shrubs**. [s.l.] Plants For a Future (PFAF), 2019.

PIZZIOLO, V. R. et al. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p.98-109, 2011.

PRAKASH, C. V. S.; PRAKASH, I. Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel-A review. **International Journal of Research in Chemistry and Environment**, v. 1, p. 1–18, 2011.

PRAKASH, J. et al. Effect of *Punica granatum* extract gel on gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β , interleukin-8 and CCL28 levels: Randomised controlled clinical trial. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 11, p. ZC12–ZC17, nov. 2017.

PRESTES, L. et al. Evaluation of the bactericidal action of essential oils from guava, Surinam cherry and strawberry guava. **Revista Cubana De Plantas Medicinales**. v. 16, n. 4, p.324-330, 2011.

RAMALINGUM, N.; MAHOMOODALLY, M. F. The Therapeutic Potential of Medicinal Foods. **Advances in Pharmacological Sciences**, n. April 2014, 2015.

RANASINGHE, P. et al. Evaluation of pharmacodynamic properties and safety of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) in healthy adults: A phase I clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, 2017.

RATTMANN, Y. D. et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2012, p. 623940, 20 dez. 2012.

REDDY, M. K. et al. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. **Planta medica**, v. 53, n. 05, p. 461–467, 2007.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 154–169, 1 abr. 2017.

RIBEIRO, D. A. et al. Botanical medical knowledge of native species of the Caatinga and spontaneous plants in the Agreste region of the state of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2013.

ROCHELLE, S. L. DE A. et al. The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 150–160, 2016.

RODRIGUES, K. A. DA F. et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

RODRIGUES, N. M.; SANDINI, T. M.; PEREZ, E. Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR. **Biosaúde**, v. 12, n. 1/2, p. 1–13, 2010.

SADEGHI, F. et al. Protective effect of pomegranate flower extract against gentamicin-induced renal toxicity in male rats. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 2, p. 45, 2015.

SAFIAGHDAM, H. et al. Medicinal plants for gingivitis: A review of *Clinical Trials*. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 10, p. 978–991, 2018.

SANCHEZ-LAMAR, A. et al. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 416–422, 2008.

SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018.

SANTOS, K. K. A. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 130–132, maio 2012.

SANTOS, K. K. A. et al. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 47–50, 2013.

SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 137–142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183–186, 1 nov. 1987.

SHAHVERDI, A. R. et al. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. S55–S58, 2007.

SILVA-ROCHA, W. P. et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2015.

SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 3 jun. 2019.

SILVA, S. DE M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p.159, abr. 2006.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 81–86, 2002.

SMIDERLE, O. J.; DAS GRAÇAS SOUZA, A. Produção e qualidade de mudas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 2, p. 104–110, 2016.

SOBEH, M. et al. Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 111939, 2019.

SOBRAL DE SOUZA, C. E. et al. LC–MS characterization, anti-kinetoplastide and cytotoxic activities of natural products from *Eugenia jambolana* Lam. and *Eugenia uniflora*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 9, p. 836–841, 1 set. 2017.

SOUZA, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial, hypotensive and diuretic effect of *Eugenia uniflora* extracts. **Mundo da Saúde**, v. 42, n. 2, p. 269–275, 2018.

SPILMONT, M. et al. Pomegranate peel extract prevents bone loss in a preclinical model of osteoporosis and stimulates osteoblastic differentiation *in vitro*. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9265–9284, nov. 2015.

STOVER, E.; MERCURE, E. W. The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. **HortScience**, v. 42, n. 5, p. 1088–1092, 2007.

SUZUKI, E. T. **Avaliação Fenológica, Análise Econômica e Estudo da Cadeia Produtiva da Romã (*Punica granatum*)** Botucatu, SP, 2016.

THOMAS, J.; KURUVILLA, K. M. Cinnamon. **Handbook of Herbs and Spices**, p. 182–196, 1 jan. 2012.

THOMÉ, O. W. **Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885)**. 2007. ed. Gera, Germany: Gera-Untermhaus, 2008.

TOMAR, R. S.; SHRIVASTAVA, V. *In vitro* efficacy evaluation of ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) as potential antimicrobial agent against clinical isolates. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 5, p. 2201–2204, 2015.

VAHID DASTJERDI, E. et al. Effect of *Punica granatum* L. flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. **Iranian Journal of Public Health**, v. 43, n. 12, p. 1688–94, 2014.

- VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. **Food Chemistry**, v. 154, p. 299–307, 1 jul. 2014.
- VASCONCELOS, L. C. D. et al. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, v. 46, n. 5–6, p. 192–196, jun. 2003.
- VASCONCELOS, L. C. DE S. et al. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 3, p. 223–227, 2006.
- VASCONCELOS, N. G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 198–203, 2018.
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**, v. 4, p. 50–57, 2013.
- 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, 1 dez. 2003.
- VILADOMIU, M. et al. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- VORAVUTHIKUNCHAI, S. et al. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 49–54, 2004.
- YANG, S. K. et al. Disruption of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* membrane via induction of oxidative stress by cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl) essential oil. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0214326, 2019.
- YUAN, T. et al. Pomegranate's neuroprotective effects against Alzheimer's disease are mediated by urolithins, its ellagitannin-gut microbial derived metabolites. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 26–33, 20 jan. 2016.
- ZAID, M. A. et al. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 4, p. 882–888, 2007.
- ZHANG, J. et al. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus *in vitro*. **Zhongguo China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 20, n. 9, p. 556–8, 576, inside backcover, set. 1995.
- ZOHARY, D.; HOPF, M.; WEISS, E. **Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin**. [s.l.] Oxford University Press on Demand, 2012.

5 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *CINNAMOMUM VERUM*, *EUGENIA UNIFLORA* E *PUNICA GRANATUM*

Os compostos fenólicos têm recebido crescente destaque na literatura científica, devido às suas diversificadas funções biológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Polifenois estão envolvidos em mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse, tais como excesso de radiação ultravioleta, infecção por microrganismos ou ataque de herbívoros. Em testes pré-clínicos e clínicos, demonstram principalmente atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antiviral, antiparasitária, antiagregante plaquetária, citotóxica e antitumoral (CABAN et al., 2019; LIU et al., 2008a).

Cinnamomum verum, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* constituem espécies ricas em compostos fenólicos. De maneira geral, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente, sendo a síntese influenciada por condições ambientais. Nesse sentido, variações no teor total e/ou nas proporções relativas de polifenois podem ocorrer de acordo com sazonalidade, temperatura e luminosidade, disponibilidade de água, nutrientes do solo e estágio de desenvolvimento vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PICCOLELLA et al., 2018; SANTOS et al., 2011).

Abordagens gerais permitem a estimativa do conteúdo total de compostos fenólicos em matérias-primas vegetais, principalmente por métodos espectrofotométricos. Contudo, a identificação de classes fenólicas individuais requer análises mais específicas; como Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (STANEK; JASICKA-MISIAK, 2018; XU et al., 2017). Nesta perspectiva, uma visão geral sobre métodos de extração, separação, identificação e quantificação destes compostos será abordada. Técnicas analíticas espectrofotométricas e cromatográficas serão empregadas para análise do teor de compostos fenólicos nas folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*.

5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1.1 Métodos de extração de compostos fenólicos

O rastreio de compostos bioativos derivados de produtos naturais envolve o isolamento inicial dos compostos de interesse, a determinação da sua atividade farmacológica, seguida por estudos farmacocinéticos e de veiculação (FU et al., 2019). Dada a complexidade química inerente às matérias-primas vegetais e a diversidade estrutural apresentada pelos compostos fenólicos, as etapas de processamento da amostra, escolha do método extrativo, rendimento, propriedades físico-químicas do analito e escolha do método de detecção são cruciais para o desfecho satisfatório da caracterização fitoquímica (KLEJDUS; KOVÁČIK, 2016; MILEVSKAYA; PRASAD; TEMERDASHEV, 2019; SUT et al., 2019).

O procedimento extrativo é a etapa primária da identificação e/ou quantificação de compostos químicos vegetais. Métodos tradicionais podem ser usados para extrair compostos fenólicos, tais como extrações tipo sólido-líquido e sistemas de refluxo. Além destes, métodos avançados, como extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico, extração acelerada de solvente ou extração em alta pressão hidrostática também podem ser aplicados (XU et al., 2017). Os métodos extrativos usualmente aplicados a compostos fenólicos estão apresentados no Quadro 8, com descrição das principais vantagens, desvantagens, aplicabilidade e restrições.

A escolha do método que proporcione máxima eficiência depende, principalmente, da natureza do material vegetal a ser processado e da estabilidade físico-química dos compostos de interesse. As técnicas de extração para a obtenção de compostos fenólicos usualmente baseiam-se na extração sólido-líquido, com utilização de solventes orgânicos (KELLY; KELLY; O'MAHONY, 2019).

Dentre as técnicas de extração sólido-líquido aplicadas a folhas destaca-se a turbo-extração (ou turbólise), técnica que permite extração com diminuição simultânea do tamanho da partícula vegetal. Devido às elevadas forças de cisalhamento causadas pela alta rotação empregada, a redução drástica do tamanho de partícula e o consequente rompimento das células favorecem a rápida dissolução, resultando em menor tempo de extração e quase esgotamento da droga vegetal (MARTINS et al., 2017).

Quadro 8 - Comparação entre diferentes técnicas utilizadas para extração de compostos fenólicos

MÉTODO EXTRATIVO	VANTAGENS	DESVANTAGENS	APLICAÇÕES	RESTRIÇÕES
Extração sólido-líquido	Fácil execução; amplamente adaptável	Necessidade de grandes volumes de solventes; longo tempo de extração; eficiência limitada	Uso geral	-
Extração assistida por ultrassom	Fácil execução; eficiente; econômico; amplamente adaptável	Limitado para escala industrial	Uso geral	-
Extração assistida por micro-ondas	Requer menos solvente e menor tempo de extração; maior rendimento	Pode ocorrer degradação e/ou oxidação dos compostos de interesse	Compostos fenólicos termoestáveis	Compostos poli-hidroxilados; compostos termolábeis
Extração com fluido supercrítico	Previne a oxidação da amostra causada pelo ar atmosférico	Inadequado para extração de compostos fenólicos polares; alto custo	Compostos fenólicos lipossolúveis	Compostos fenólicos polares
Extração acelerada de solvente	Aumenta a segurança e a seletividade; previne a oxidação da amostra causada pelo ar atmosférico	Necessidade de elevada temperatura e pressão, o que pode degradar compostos-alvo	Compostos fenólicos termoestáveis	Compostos termolábeis
Extração em alta pressão hidrostática	Requer pequenas quantidades de solventes; menor tempo de execução	Necessidade de elevada temperatura e pressão, o que pode degradar compostos-alvo; alto custo	Uso geral	-

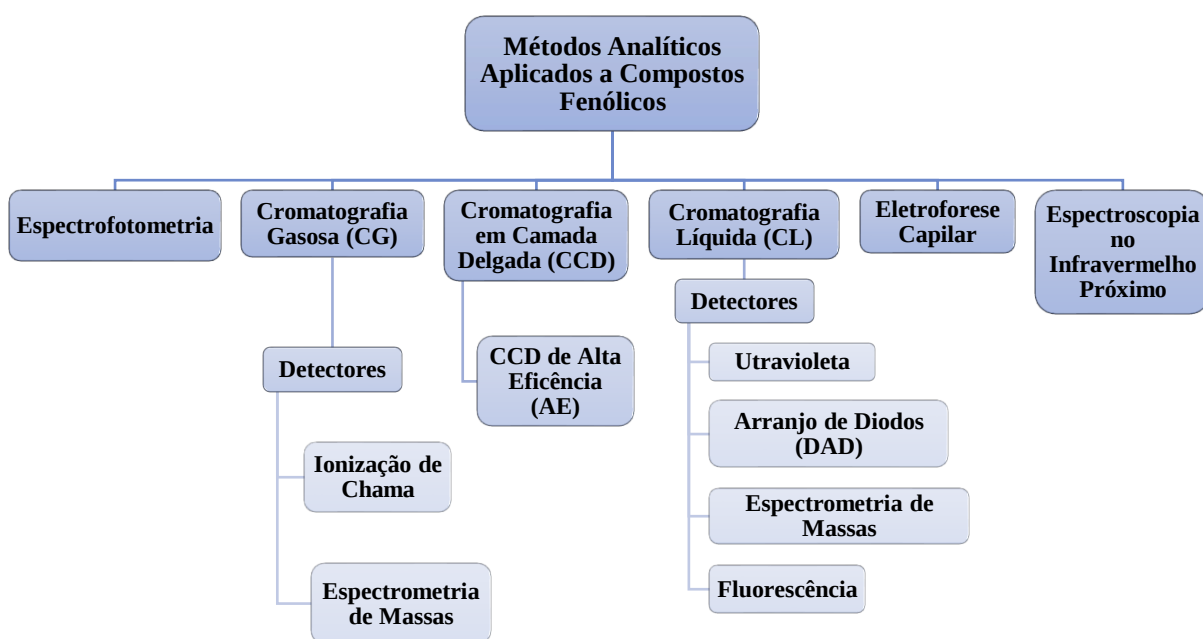
Fonte: Adaptado de Xu e colaboradores (2017).

Outras extrações sólido-líquido ou líquido-líquido a partir do extrato inicial podem ser realizadas com solventes de polaridade crescente, usualmente na sequência *n*-hexano – diclorometano – acetato de etila – metanol, com objetivo de separação preliminar baseada nas propriedades hidro/lipofílicas dos compostos biologicamente ativos (BRUSOTTI et al., 2014). Uma vez que a classe química e/ou o(s) composto(s) de interesse sejam identificados, o processo extrativo pode ser otimizado; visando menor tempo e melhora do rendimento de extração dos metabólitos secundários desejados (MANSUR et al., 2019).

5.1.2 Métodos analíticos para identificação de compostos fenólicos

Ao longo dos anos, diversos métodos foram desenvolvidos para determinar a presença de bioativos em amostras vegetais. A identificação de compostos fenólicos a partir de uma dada amostra constitui, conseqüentemente, um pré-requisito para análises mais abrangentes (LIU et al., 2008a). Uma quantificação acurada, por exemplo, depende de determinados parâmetros, tais como: a natureza química dos compostos, método de extração utilizado, tamanho da molécula, substâncias interferentes e impurezas (XU et al., 2017). Os principais métodos analíticos empregados para compostos fenólicos provenientes de matérias-primas vegetais estão esquematizados na Figura 8.

Figura 8 - Principais métodos analíticos qualitativos e quantitativos aplicáveis aos compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Xu e colaboradores (2017).

5.1.2.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

O emprego de reações colorimétricas é uma técnica comumente utilizada para detecção e quantificação de compostos fenólicos por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), devido à simplicidade, versatilidade, baixo custo operacional e confiabilidade. Reações de óxido-redução com formação de complexos são usualmente empregadas (BLAINSKI; LOPES; DE MELLO, 2013; RAMOS et al., 2017).

A despeito das vantagens apresentadas, a reduzida seletividade constitui o principal desafio da análise espectrofotométrica de matrizes complexas, tais como os extratos vegetais. A estrutura química de polifenóis permite espectros de absorção dependente do número e da posição dos substituintes, o que pode acarretar sobreposição de bandas e limitar a absorção do composto de interesse (ANOUAR et al., 2012). A absorção UV/Vis destes compostos pode ser influenciada ainda por parâmetros como pH, complexação com metais intrínsecos e interações intra e intermoleculares (FEDENKO; SHEMET; LANDI, 2017; LIU et al., 2008a).

O doseamento espectrofotométrico de fenóis totais utilizando reagente de Folin-Ciocalteu é o método mais extensivamente utilizado. Baseia-se na formação de um complexo azul (em meio alcalino) por redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas presentes na amostra, o que possibilita a quantificação da absorbância, a qual é proporcional ao conteúdo fenólico em solução (FERREIRA, 2016; FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SANTOS, 2016). O método de Folin-Ciocalteu é capaz de estimar a capacidade redutora de compostos solúveis em meio aquoso (GARMUS et al., 2014; GRANATO et al., 2016). Entretanto, outros constituintes redutores presentes na amostra, tais como açúcares, ácido ascórbico, alguns metais de transição e aminoácidos redutores (ex: triptofano e tirosina) podem reagir.

Tendo em consideração a quantificação de flavonoides, a reação de complexação após adição de cloreto de alumínio (AlCl_3) demonstra desempenhos satisfatórios na literatura. O reagente de Folin-Ciocalteu reage com todas as substâncias fenólicas presentes no material vegetal, enquanto o alumínio reage apenas com o grupo hidroxil de uma porção catecólica no anel B, tornando esta técnica específica para flavonoides. Desse modo, evita a interferência de outros compostos fenólicos, particularmente ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais (GRANATO et al., 2016; RAMOS et al., 2017).

O procedimento de reação com cloreto de alumínio permite ainda a estimativa do teor de flavonoides totais, devido à especificidade para agliconas (flavonoides livres) e componentes glicosilados, aumentando a representatividade da análise e minimizando possibilidade de desvios. Além disso, o complexo flavonoide-alumínio formado proporciona efeito batocrômico, o qual desempenha papel fundamental na especificidade método (SILVA; PEZZINI; SOARES, 2015).

5.1.2.2 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica clássica usada na análise de produtos naturais, especialmente para obtenção do perfil químico de extratos vegetais. Trata-se de um método simples, rápido e com reduzido consumo de solventes e reagentes. A CCD tem várias vantagens sobre outras técnicas cromatográficas, como a capacidade de analisar múltiplas amostras ao mesmo tempo e não requer instrumentação analítica. No entanto, sua baixa sensibilidade, baixa resolução e reprodutibilidade limitam o uso para fins qualitativos (STANEK; KAFARSKI; JASICKA-MISIAK, 2019).

A melhoria contínua via instrumentação aumentou a sensibilidade, precisão e reprodutibilidade de resultados obtidos por CCD. A técnica de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE) mantém a mesma fundamentação da CCD, porém utiliza placa cromatográfica de qualidade superior, instrumentação com aplicação de amostra automatizada e varredura densitométrica, a qual permite quantificação. As amostras são aplicadas com volume menor, fixo e de distribuição homogênea dentro da zona aplicada; e os equipamentos mais usados para CCD-AE são baseados na técnica de pulverização, a qual minimiza a difusão da amostra durante a aplicação (BERNARD-SAVARY; POOLE, 2015; STANEK; JASICKA-MISIAK, 2018).

Baseada em uma impressão digital cromatográfica, isto é, o padrão cromatográfico dos compostos químicos característicos de um determinado analito, a CCD-AE eficientemente demonstra similaridades e divergências entre amostras vegetais. Desse modo, resultados obtidos através destes cromatogramas permitem o emprego no controle de qualidade da matéria-prima analisada, como também a otimização de processos extrativos (FADEL et al., 2016; STANEK; KAFARSKI; JASICKA-MISIAK, 2019).

5.1.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Uma das técnicas mais eficientes para análise de bioativos constitui a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em combinação com vários métodos de detecção. Trata-se de uma técnica robusta, diligente e inteiramente automatizada, que permite separação química com maior capacidade de carregamento de amostras. No âmbito de produtos naturais, é utilizada principalmente para análise de moléculas não voláteis, tais como compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (BONTA, 2017; SARIKAHYA; GOREN; KIRMIZIGUL, 2019).

As condições analíticas desta instrumentação requerem uma coluna cromatográfica como fase estacionária. A maioria das separações para análise de fitoconstituintes são realizadas em colunas do tipo fase reversa, contendo octadecilsilano (C_{18}). Geralmente, água e solventes orgânicos, como metanol e acetonitrila, juntamente com pequenas concentrações de ácido acético, ácido fórmico e/ou ácido trifluoroacético são usados como fase móvel, para a separação de compostos fenólicos de amostras vegetais. Os resultados são avaliados com base no tempo de retenção dos padrões e dos compostos presentes na amostra analisada, com a quantificação feita com base na curva padrão gerada após os compostos de referência serem injetados em diferentes níveis de concentração (BONTA, 2017).

Os detectores desempenham um papel significativo na manutenção da precisão e estabilidade, reduzindo a perda durante a separação. Os detectores mais comumente usados para a separação de compostos fenólicos são detectores UV, detectores de arranjo de diodos (DAD) e detectores de arranjo de fotodiodos (DAF). Geralmente, os princípios de detecção por UV, DAD e DAF são os mesmos: aplicáveis a compostos que possuem grupamentos cromóforos. No entanto, os DAD permitem mensurar simultaneamente comprimentos de onda de absorção multicanal e possuem nível de sensibilidade de 1×10^{-5} uA, otimizando o tempo de análise e aumentando a resolução (BONTA, 2017; GANZERA; STURM, 2018).

Na interpretação dos espectros obtidos usando detecção de arranjo de diodos, é importante considerar o efeito do solvente (tanto a natureza dos constituintes da fase móvel quanto sua composição de eluição) quando comparado com os espectros de referência, uma vez que este pode ter um efeito significativo no espectro de flavonoides (VILLIERS; VENTER; PASCH, 2016).

Até o momento, a CLAE ainda é a técnica dominante para abordagens quantitativas de compostos fenólicos. A hifenização por detecção de arranjo de diodos é principalmente aplicada para flavonoides e outros polifenóis em matrizes vegetais complexas; fornecendo informações precisas sobre o espectro total através do grau de sobreposição com compostos de referência. Tal abordagem é amplamente utilizada para fins de controle de qualidade de fitoterápicos e de caracterização de perfis metabólicos em plantas medicinais (FU et al., 2019; GANZERA; STURM, 2018).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal

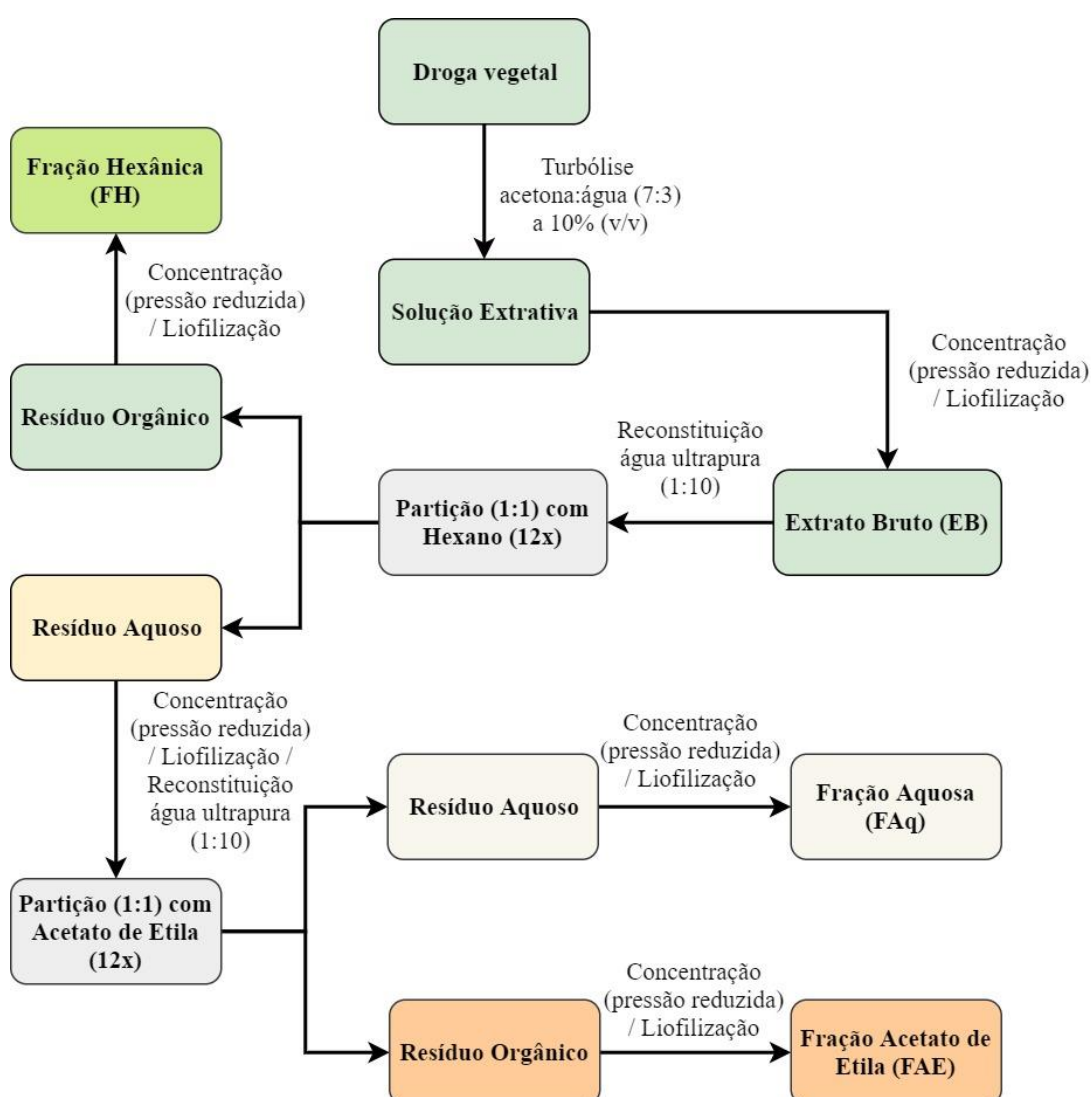
As folhas de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* foram coletadas em Recife, Pernambuco, Brasil (7°59'45.9"S34°54'33.3"W) em outubro de 2017. O material foi identificado pela Dr.^a Rita de Cássia Pereira e as exsiccatas foram depositadas no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de registro 91671, 91672 e 91673, respectivamente (Anexo A), com cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) nº AFF07B4 (Anexo B). O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante a 40 °C (Luca-82-480, Lucadema[®]) por 7 dias, e depois moído em moinho de facas tipo Wiley (TE-680, Tecnal[®]).

5.2.2 Preparo dos extratos brutos e frações enriquecidas

Cada material vegetal seco e moído foi extraído individualmente por turbólise (quatro ciclos de 30 s, intercalados com 5 min de pausa) utilizando acetona:água (7:3 v/v) na proporção de 10% (m/v) como líquido extrator. A solução extrativa foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA[®]); o resíduo foi congelado (-80 °C, 3 dias) e depois liofilizado (L101, Liotop[®]), para obtenção do extrato bruto (EB). O EB liofilizado foi reconstituído em água ultrapurificada (1:10 m/v) e particionado 12 vezes com hexano (1:1 v/v). O resíduo orgânico foi concentrado sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA[®]), congelado (-80 °C, 3 dias) e liofilizado (L101, Liotop[®]), obtendo-se a fração hexânica (FH).

A fração aquosa residual foi concentrada sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA®), congelada (-80 °C, 3 dias), liofilizada (L101, Liotop®) e reconstituída em água ultrapurificada (1:10 m/v). Após reconstituição, foi realizada uma partição 12 vezes com acetato de etila (1:1 v/v). O resíduo aquoso foi concentrado sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA®), congelado (-80 °C, 3 dias) e liofilizado (L101, Liotop®), obtendo-se a fração aquosa (FAq); enquanto que o resíduo orgânico foi concentrado sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA®), congelado (-80 °C, 3 dias) e liofilizado (L101, Liotop®), obtendo-se a fração acetato de etila (FAE) (RAMOS et al., 2017). A Figura 9 apresenta uma representação esquemática do processo.

Figura 9 - Fluxograma de preparo dos extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*



Fonte: Próprio autor.

5.2.3 Caracterização dos extratos brutos/frações por CCD-AE

Soluções de cada EB/fração foram preparadas em metanol (3 mg/mL), e posteriormente aplicadas e eluídas em sistema acetato de etila: metanol: água (50:6,75:5 v/v/v). Uma solução (1 mg/mL em metanol) composta por apigenina, kaempferol, miricitrina, rutina, quercetina e vitexina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) foi utilizada como padrão para todas as amostras. Para os EBs e frações de *P. granatum*, uma solução metanólica (1 mg/mL) de ácido elágico (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) também foi utilizada como padrão.

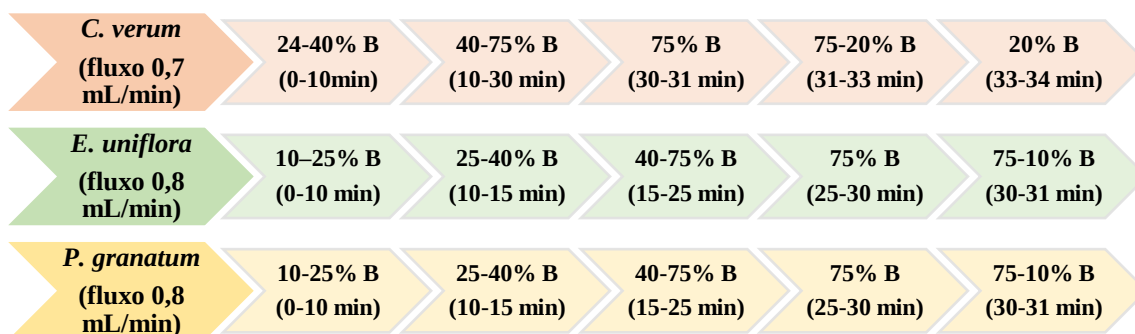
Após a otimização das condições analíticas, os experimentos foram transpostos para cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) em equipamento semi-automatizado (Linomat 5, Camag®), utilizando 30 µL de volume aplicado para cada amostra e 10 µL de volume aplicado para os padrões. As condições cromatográficas foram: placas de sílica-gel 60 F₂₅₄ de 0,10 mm de espessura (Macherey-Nagel®), bandas com 5 mm de largura e 5 mm de espaço entre as bandas e o mesmo sistema eluente. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas de vidro (10 cm × 10 cm, Camag®) após saturação por 30 min. As placas foram reveladas utilizando-se NEU + PEG (difenilboriloxietilamina 1,0% (v/v) em metanol, seguida de solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (5,0% v/v)). As imagens foram fotodocumentadas (UVP®) sob luz visível e ultravioleta a 254 e 366 nm, respectivamente (BEZERRA et al., 2018).

5.2.4 Caracterização dos extratos brutos/frações por CLAE

O ensaio foi executado em cromatógrafo de CLAE (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD-3000 (RS); Thermo Fisher Scientific®), contendo bomba binária (HPG3×00RS, Thermo Fisher Scientific®), degaseificador e amostrador automático com *loop* de 20 µL (ACC 3000, Thermo Fisher Scientific®). A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna do tipo C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm, Dionex®) protegida por pré-coluna de mesmo material (4 mm × 3,9 µm, Phenomenex®), em temperatura de 23 ± 2 °C.

Água ultra-purificada (A) e metanol grau CLAE (JTBaker®, Allentown, EUA) (B) foram utilizados como fase móvel, ambos acidificados com ácido trifluoroacético (Vetec®, Rio de Janeiro, BR) a 0,05% (v/v). Os parâmetros de fluxo e gradientes de eluição empregados estão descritos na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma de eluição das amostras de extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* para análise por CLAE-DAD



Fonte: Adaptado de Bezerra et al. (2018) e de Souza et al. (2018).

Miricitrina, rutina, quercetina, catequina, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido elágico (96% de pureza, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) foram utilizados como padrões. Comprimentos de onda de 254 nm, 270 nm, 340 nm e 350 nm foram utilizados para detecção, de acordo com a absorção máxima medida pelo detector. O software Chromeleon 6.8 (Dionex®) foi usado para aquisição e processamento de dados.

Para a análise quantitativa por CLAE, cada amostra de EB, FAq e FAE foi pesada (10 mg) em balança analítica (AUW 220, Shimadzu®) e transferida individualmente para balões volumétricos de fundo chato, com capacidade para 5 mL, aferindo-se o volume com etanol 50% (v/v) (Vetec®, Rio de Janeiro, BR). Para as frações hexânicas (FH), 20 mg foram analiticamente pesados e transferidos para balão volumétrico de fundo chato de 5 mL, aferindo-se o volume com dimetilsufóxido (DMSO) (Synth®, São Paulo, BR). Cada balão foi submetido a banho ultrassônico (SSBU 220, Solidsteel®) por 30 minutos.

As amostras de EB, FAq e FAE sonicadas (2,5 mL) foram transferidas individualmente para novo balão volumétrico de fundo chato de 5 mL, completando-se o volume com água ultrapurificada. Para as FH, 2,5 mL de cada amostra foram transferidos para novo balão volumétrico de fundo chato de 5 mL, completando-se o volume com água ultrapurificada e repetindo-se este procedimento mais uma vez.

Ao fim do processo supracitado, a concentração final para cada amostra preparada foi de 1 mg/mL. As amostras foram filtradas individualmente para *vials*, empregando-se membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com porosidade de 0,45 µm e 25 mm de diâmetro (Millipore®) (BEZERRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

5.2.5 Quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria UV/Vis

5.2.5.1 Diluição direta

Para a determinação dos teores de flavonoides nas amostras dos extratos brutos e frações, foram preparadas soluções-estoque em etanol 50% (v/v) (Vetec®, Rio de Janeiro, BR), na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas das soluções estoque dos EBs/frações semipurificadas (800 µL para *C. verum*, 400 µL para *E. uniflora* e 600 µL para *P. granatum*) foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL contendo 2 mL de cloreto de alumínio a 5% (m/v) em etanol. O volume foi aferido com etanol a 50% (v/v).

Após 15 min de reação, uma varredura (200-500 nm) foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Scientific®). Os padrões de rutina e quercetina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) foram solubilizados em etanol a 50% (v/v), resultando em soluções com concentrações variando de 0,05 a 0,10 mg/mL, respectivamente. O teor total de flavonoides (TFT) foi expresso em g% de rutina e quercetina, calculado conforme a equação (FERNANDES et al., 2012a; RAMOS et al., 2017; SILVA et al., 2009):

$$\text{TFT} = \frac{A \times FD}{m \times E_{1\text{ cm}}^{1\%}}$$

Onde: TFT – teor de flavonoides totais; A – absorbância lida; FD – fator de diluição; m – massa extrato bruto/frações (g) e $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ – absorção específica do complexo rutina (216,6) ou quercetina (500).

5.2.5.2 Hidrólise ácida

Cinquenta miligramas dos EBs/frações semipurificadas foram pesados em balança analítica (AUW 220 Shimadzu®) e distintamente transferidos para um balão de fundo redondo com capacidade para 125 mL. Neste, foram acrescentados os seguintes reagentes (Química Moderna®, São Paulo, BR): 5 mL de acetona, 0,5 mL de ácido clorídrico e 0,25 mL de uma solução aquosa de metenamina a 0,5% (m/v). O volume foi aferido com acetona.

As amostras foram mantidas sob refluxo (85 °C) durante 30 min. Posteriormente, cada volume foi filtrado em algodão hidrófilo para balão volumétrico de fundo chato (25 mL). O algodão com a droga residual foi reextraído duas vezes por 15 min. O volume final foi aferido com acetona, obtendo-se o hidrolisado do EB (EB-H), hidrolisado da FH (FH-H), hidrolisado da FAq (FAq-H) e hidrolisado da FAE (FAE-H).

Alíquotas dos hidrolisados (800 µL para *C. verum*, 400 µL para *E. uniflora* e 600 µL para *P. granatum*) foram transferidas individualmente para balões volumétricos com capacidade para 10 mL. Adicionou-se 2 mL de cloreto de alumínio a 5% (m/v) em etanol. O volume foi aferido com etanol a 50% (v/v). Após 15 min de reação, foi realizada varredura (200-500 nm) em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Scientific®). O teor de flavonoides totais (TFT) foi calculado conforme a equação descrita em 5.3.5.1, sendo expresso como g% de quercetina (RAMOS et al., 2017; SOARES et al., 2003).

5.2.6 Análise estatística

Cada ensaio foi realizado em triplicata e como experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Os resultados foram processados usando Software Excel (Microsoft® Office 365, versão 14.0, 2016) e Statistica®. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Produção dos extratos brutos e frações

As condições extrativas influenciam diretamente na quantidade de compostos fenólicos obtidos a partir de produtos naturais. Dada a diversidade da composição e de estruturas das matrizes de origem vegetal, torna-se um desafio estabelecer metodologias que proporcionem máximo rendimento com menor tempo de extração. A otimização do processo extrativo pode ser alcançada através da modificação de parâmetros, como o tipo de solventes utilizados, seus volumes e proporção, tempo de extração, temperatura e utilização de agitação (GWIAZDON; BIESAGA, 2017).

O emprego de turbólise para obtenção de extratos brutos e frações enriquecidas a partir das folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* cultivadas em Pernambuco, Brasil, foi fundamentado na preservação de compostos termolábeis e no incremento de teores fenólicos proporcionado. Szultka e colaboradores (2013) citam como essenciais condições de extração utilizando temperatura moderadas ou baixas para a preservação de glicosídeos flavonoídicos conjugados. Ademais, Ferreira (2016) demonstrou aumento dos teores de ácido gálico e ácido elágico no extrato etanólico dos frutos de *Libidibia ferrea* utilizando turbo-extração, quando comparada à técnica de refluxo. Estudos anteriores para a espécie *P. granatum* (BATISTA et al., 2014), *C. verum* (SILVA, 2017) e *E. uniflora* (BEZERRA et al., 2018; RAMOS et al., 2017) descreveram com sucesso o uso da técnica de turbo-extração.

Compostos fenólicos são solúveis em solventes orgânicos polares, tais como etanol, metanol e acetona. Um estudo prévio demonstrou a maior eficiência de extração de catequinas de *Camellia sinensis* através de sistema acetona:água (1:1 v/v), em comparação a utilização dos solventes puros (acetona, etanol, metanol, acetonitrila e água) (PERVA-UZUNALIĆ et al., 2006). Recentemente, o emprego de sistemas acetona:água para extração de polifenóis tem crescido (BRGLEZ MOJZER et al., 2016; ZUORRO; IANNONE; LAVECCHIA, 2019), incluindo importantes resultados do nosso grupo para *E. uniflora*, utilizando a proporção 7:3 (v/v) (BEZERRA et al., 2018; RAMOS et al., 2017). Desse modo, os extratos brutos de *E. uniflora*, *P. granatum* e *C. verum* foram produzidos utilizando acetona:água (7:3 v/v) como líquido extrator.

Olatunde; Benjakul e Vongkamjan (2018) sugerem o uso de clorofórmio para a desclorofilização, devido à melhor preservação das propriedades biológicas de extratos vegetais. Entretanto, a remoção da clorofila neste estudo foi realizada pelo emprego de hexano, considerando a menor toxicidade e apolaridade proporcionada por este solvente. Através do procedimento de partição com hexano, além da desclorofilização, foram removidos nesta etapa os compostos apolares, compondo a fração hexânica.

A escolha do solvente adequado para o processo de enriquecimento de frações constitui um fator crucial. Extrações com solventes de polaridade crescente são necessárias para uma separação baseada com base nas propriedades hidro/lipofílicas dos compostos de interesse (BRUSOTTI et al., 2014). Acetato de etila tem sido empregado em diversos trabalhos para enriquecimento de flavonoides a partir de extratos brutos, demonstrando consequente incremento das atividades biológicas (AHMED; ASHIQ, 2018; SOUZA-MOREIRA et al., 2019; VAFAEI; BIN MOHAMAD; KARIMI, 2019).

No que diz respeito ao teor de flavonoides e outros compostos fenólicos, suas concentrações e diversidade desempenham papel crítico como parâmetros para estudos de qualidade e potencial biológico de espécies vegetais (RANJANA et al., 2019; TUNG MUNNITHUM et al., 2018). Considerando a possibilidade de fracionamento para o enriquecimento de compostos fenólicos, o rendimento da operação de liofilização dos extratos brutos e frações foi verificado e está sumarizado na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimentos obtidos para extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* produzidos por turbo-extração utilizando sistema acetona:água (7:3 v/v)

AMOSTRA	%Rendimento (g/g)	
<i>Cinnamomum verum</i>	EB	15,14 ± 1,25
	FAE	4,13 ± 0,32
	FH	18,47 ± 0,40
	FAq	85,73 ± 0,25
<i>Eugenia uniflora</i>	EB	21,80 ± 1,52
	FAE	13,83 ± 0,07
	FH	24,45 ± 0,08
	FAq	80,59 ± 0,51
<i>Punica granatum</i>	EB	31,15 ± 0,29
	FAE	33,21 ± 0,25
	FH	0,76 ± 0,33
	FAq	59,72 ± 0,11

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. EB: extrato bruto; FAE: fração de acetato de etila; FH: fração hexânica; FAq: fração aquosa.

Fonte: Próprio autor

O extrato bruto de *P. granatum* apresentou maior rendimento (31,15%), seguido de *E. uniflora* (21,80%) e *C. verum* (15,14%). Para as frações hexânicas, *E. uniflora* teve o maior rendimento (24,45%), seguida de *C. verum* (18,47%) e *P. granatum* (0,76%), fato este provavelmente devido à maior presença de metabólitos apolares (ex: óleos essenciais) relatados nas folhas de *C. verum* e *E. uniflora* (Seção 4). No que tange as frações acetato de etila, a espécie de maior rendimento foi *P. granatum* (33,21%), seguida de *E. uniflora* (13,83%) e *C. verum* (4,13%); o que vai de acordo com a presença de compostos mais polares (ex: taninos e flavonoides) relatados na literatura para as folhas das duas primeiras espécies (Seção 4). As frações aquosas, última etapa do processo de particionamento, apresentaram rendimentos de 85,73% para *C. verum*, 80,59% para *E. uniflora* e 59,72 % para *P. granatum*.

5.3.2 Quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria UV/Vis e caracterização de extratos brutos/frações por CCD-AE

O material vegetal foi coletado no final da estação chuvosa e início da estação seca (outubro de 2017). O aumento da proliferação de insetos e fitopatógenos durante o tempo chuvoso estimula a produção de taninos hidrolisáveis por brotos de folhas (BARBEHENN et al., 2009). Zhang e colaboradores (2010) indicam que o nível total de compostos fenólicos produzidos por *P. granatum* é mais alto em abril (237,4 mg/g) e aumenta gradualmente até o final de setembro. Outrossim, *E. uniflora* foi descrita por Santos e colaboradores (2011) com níveis elevados de fenóis ($35,43 \pm 6,24$ mg/g) e de flavonoides ($17,19 \pm 3,42$ mg/g) durante a estação seca, provavelmente como resposta à combinação entre maior incidência de luz e estresse hídrico. Assim, as folhas coletadas nesta época forneceram quantidades significativas de flavonoides e demais compostos fenólicos (Tabela 5). Há escassez de estudos sobre variações sazonais de compostos fenólicos produzidos por *C. verum*.

Tabela 5 - Teor de flavonoides totais e de compostos fenólicos dos extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*

AMOSTRAS		Teor de Flavonoides Totais (UV-Vis) - %m/m			Marcadores (CLAE) - % m/m			
		DD		HA	Taninos Hidrolisáveis	Taninos	Flavonoides	Derivados Cinâmicos
		Quercetina	Rutina	Quercetina		Condensados		
<i>C. verum</i>	EB	2,66 ± 0,005	6,14 ± 0,005	3,04 ± 0,001	-	1,11 ± 0,005 ^a	1,29 ± 0,003 ^b	-
	FAE	4,82 ± 0,001	11,13 ± 0,01	8,94 ± 0,02	-	3,53 ± 0,001 ^a	3,53 ± 0,02 ^b	-
	FH	4,66 ± 0,01	10,76 ± 0,01	6,88 ± 0,02	-	1,13 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,001 ^b	-
	FAq	1,30 ± 0,001	3,02 ± 0,01	1,15 ± 0,01	-	ND	1,05 ± 0,002 ^b	-
<i>E. uniflora</i>	EB	4,71 ± 0,004	10,88 ± 0,004	3,021 ± 0,02	0,26 ± 0,002 ^c /0,80 ± 0,01 ^d	-	0,88 ± 0,001 ^e	3,57 ± 0,002 ^f
	FAE	12,13 ± 0,01	28,00 ± 0,005	11,93 ± 0,007	0,63 ± 0,02 ^c /1,59 ± 0,01 ^d	-	4,58 ± 0,02 ^e	3,82 ± 0,01 ^f
	FH	5,11 ± 0,03	11,81 ± 0,01	4,78 ± 0,02	0,27 ± 0,001 ^c /0,19 ± 0,02 ^d	-	1,12 ± 0,001 ^e	3,52 ± 0,004 ^f
	FAq	2,63 ± 0,01	6,07 ± 0,004	1,77 ± 0,01	0,12 ± 0,002 ^c /ND	-	0,24 ± 0,003 ^e	3,54 ± 0,016 ^f
<i>P. granatum</i>	EB	4,48 ± 0,02	10,36 ± 0,006	4,50 ± 0,009	0,83 ± 0,001 ^c	-	2,79 ± 0,001 ^b	-
	FAE	7,62 ± 0,03	17,60 ± 0,003	9,36 ± 0,01	0,40 ± 0,005 ^c	-	5,02 ± 0,05 ^b	-
	FH	4,47 ± 0,02	10,33 ± 0,02	3,71 ± 0,01	0,60 ± 0,013 ^c	-	2,04 ± 0,002 ^b	-
	FAq	3,66 ± 0,01	8,46 ± 0,008	4,44 ± 0,01	0,64 ± 0,002 ^c	-	0,95 ± 0,01 ^b	-

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em g% de rutina ou quercetina. EB: extrato bruto; FAE: fração de acetato de etila; FH: fração hexânica; FAq: fração aquosa; ^a Expresso como catequina; ^b Expresso como rutina; ^c Expresso como ácido elágico; ^d Expresso como ácido gálico; ^e Expresso como Miricitrina; ^f Expresso como ácido clorogênico.

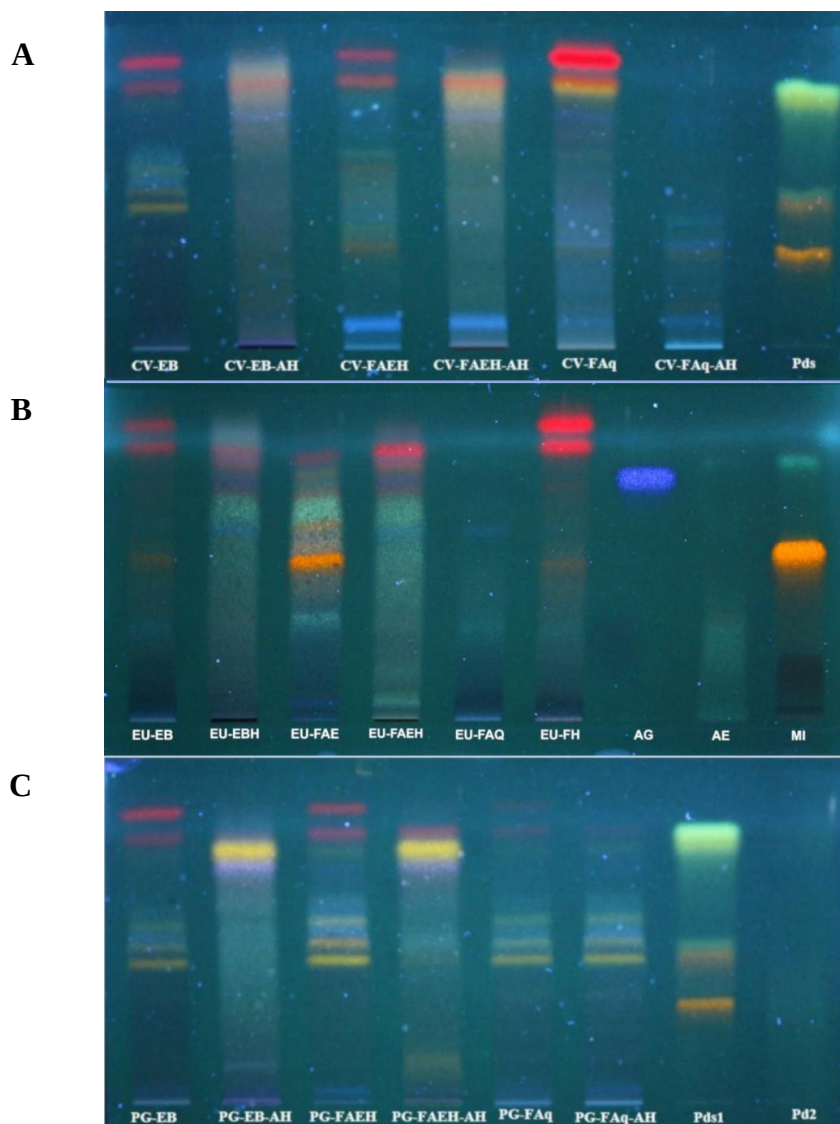
Fonte: Próprio autor.

Os teores totais de compostos fenólicos são importantes parâmetros para assegurar a qualidade e o potencial biológico de matérias-primas vegetais. A maioria dos flavonoides exibe espectros de UV/Vis com duas bandas de absorção, uma (Banda I, relativa ao anel A) variando de 240 a 280 nm e outra (Banda II, relativa ao padrão de substituição e conjugação do anel C) na região de 300 a 400 nm. O comprimento de onda de absorção é afetado pela estrutura química (isto é, grau de conjugação, número e posição dos substituintes) (ANOUAR et al., 2012). Desse modo, substituições resultam em diferentes perfis da banda II, como deslocamento batocrômico (região vermelha, devido ao aumento do número de grupamentos OH ou OCH₃) ou deslocamento hipsocrômico (região azul, por metilação e/ou glicosilação) (FERNANDES et al., 2012b; LIU et al., 2008b; PETRY; ORTEGA; SILVA, 2001; RAMOS et al., 2017).

Na Tabela 5, é possível distinguir os teores de rutina e quercetina (diluição direta) entre as espécies vegetais analisadas, onde *E. uniflora* > *P. granatum* > *C. verum*, o que corrobora com estudos anteriores para estes farmacógenos (FELLAH et al., 2018; RAMOS et al., 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Ademais, o doseamento após hidrólise ácida por espectrofotometria UV/Vis demonstrou agliconas e seus respectivos derivados O-glicosilados como principais flavonoides presentes nas folhas de *E. uniflora* e *P. granatum*; enquanto que flavonoides C-glicosilados foram prioritários nas folhas de *C. verum*. O enriquecimento proporcionado pelas frações acetato de etila incrementou os teores de flavonoides em todas as amostras analisadas, o qual pode também ser evidenciado por CCD-AE (Figura 11).

Uma característica singular da análise de compostos fenólicos por CCD-AE é a possibilidade de detecção de subgrupos, através de alterações de cor e/ou fluorescência dos compostos na região espectral UV/Vis. Flavonoides (ex: quercetina) mostram-se como bandas laranja ou amarelas; enquanto que flavonas aparecem em tom marrom. Antocianinas são detectadas como roxo-vermelho-laranja, ou raramente como bandas amarelas na região visível. Bandas azuis claras e escuras são característica dos ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico. Por outro lado, compostos fenólicos simples, como ácido gálico, não fluorescem sob luz UV, produzindo apenas bandas escuras absorventes (STANEK; JASICKA-MISIAK, 2018). A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos por CCD-AE para *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*.

Figura 11 - Perfis de CCD-AE obtidos para extratos brutos/frações das folhas de *C. verum* (A), *E. uniflora* (B) e *P. granatum* (C)



CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; EB: extrato bruto; EB-AH: extrato bruto após hidrólise; FAEH: fração de acetato de etila; FAEH-AH: fração de acetato de etila após hidrólise; FAq: fração aquosa; FH: fração hexânica; Pds: Padrão composto por apigenina, kaempferol, miricitrina, rutina, quercetina e vitexina; AG, ácido gálico; AE, ácido elágico; MI, miricitrina.

Fonte: Próprio autor.

A presença de rutina foi detectada no EB e na FAE das folhas de *C. verum* (Figura 11A, faixa de cor amarela/laranja; $R_f = 0,33$), evidenciada após adição de NEU + PEG, reagente de escolha para detecção de flavonoides (WAGNER; BLADT, 2009). Após o processo de hidrólise ácida, a rutina (quercetina 3-rutinosídeo) apresenta sua respectiva aglicona destacada no cromatograma (faixa amarela/laranja; $R_f = 0,77$). Também é possível observar a presença de outros derivados flavonoidicos (bandas de cor amarela/laranja), como catequina e isorhamnetina, descritos em trabalhos anteriores para as folhas da canela (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

O extrato aquoso das folhas de *C. verum* obtido por maceração dinâmica demonstrou teor de polifenóis totais de $2,71 \pm 0,61$ g/g, sendo o teor de flavonoides alcançado de $1,22 \mu\text{g/g}$ de equivalentes quercetina, após reação de complexação com cloreto de alumínio (PRASAD et al., 2009). Neste estudo, pode-se observar a otimização dos teores de flavonoides em *C. verum*, alcançada após turbo-extração com acetona:água (7:3 v/v), tanto para o EB ($2,66 \pm 0,005$ % m/m quercetina) como para a FAE ($4,82 \pm 0,001$ % m/m quercetina).

Considerando a análise por CCD-AE dos derivados de *E. uniflora*, observa-se a presença de ácido gálico (faixa azul profundo; $R_f = 0,72$); ácido elágico (faixa esverdeada; $R_f = 0,33$); e miricitrina (faixa amarela/laranja; $R_f = 0,50$), um 3-O- α -L-ramnopiranosídeo da miricetina. O enriquecimento deste flavonol na FAE pode ser evidenciado através da intensificação da faixa cromatográfica. Mínima quantidade de miricitrina foi detectada no EB e FH, enquanto que a FAq estava totalmente livre deste flavonol (Figura 11B). Estes dados são corroborados pelos resultados anteriores de Bezerra e colaboradores (2018), onde dados cromatográficos obtidos por CCD, CCD-AE e CLAE demonstraram bandas relacionadas à miricitrina e seus derivados, bem como taninos (ácidos gálico e elágico) em diferentes amostras de *E. uniflora*, construindo a partir destas informações uma impressão digital típica para esta espécie.

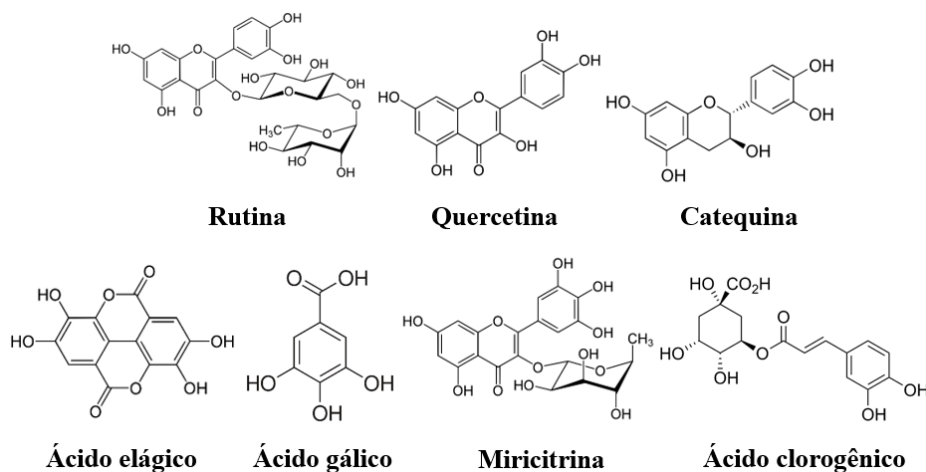
O EB e frações das folhas de *P. granatum* demonstraram por CCD-AE a presença de flavonoides (bandas cromatográficas das cores amarelo-laranja) após derivatização com NEU + PEG. Entretanto, ao contrário dos resultados apresentados pelas demais espécies vegetais, o estudo cromatográfico de *P. granatum* mostrou bandas de flavonoides nas frações aquosa (FAq) e hexânica (FH) (Figura 11C). A presença de ácido elágico (faixa de cor verde; $R_f = 0,44$) também foi evidenciada e proporcionou um efeito residual nos cromatogramas por CCD-AE. Alguns estudos relatam a ocorrência de pigmentos nas folhas de *P. granatum* (ELBATANONY et al., 2019), bem como a presença de ácido elágico e elagitaninos (como punicalaginas) (HUSSEIN et al., 1997; LI et al., 2016).

5.3.3 Caracterização de extratos brutos/frações por CLAE

A análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é geralmente realizada em fase reversa, utilizando colunas de sílica-gel quimicamente modificada ligada a grupos octilsilano (C₈) ou octadecilsilano (C₁₈). As colunas em fase reversa são preferíveis para separação de flavonoides porque constituem ácidos fracos que podem ser separados como compostos neutros e relativamente hidrofóbicos em uma matriz ácida fraca, onde tanto a eluição isocrática quanto a gradiente são aplicadas para análise de estas moléculas. As fases móveis mais utilizadas são acetonitrila e/ou metanol em combinação com água contendo tampão acetato ou formiato (LIU et al., 2008a; SZULTKA et al., 2013). Os resultados são avaliados com base no tempo de retenção (t_R) dos padrões e dos compostos presentes na amostra analisada, sendo a quantificação obtida com base na curva padrão gerada após injeção dos padrões em diferentes níveis de concentração, comparando-se os comprimento de onda máximos (λ_{max}) apresentados (BONTA, 2017).

A impressão digital cromatográfica, ou “*fingerprint*”, desempenha importante papel em termos de qualidade, segurança e eficácia da matéria prima vegetal (BANSAL et al., 2014). Desse modo, a análise por *fingerprint* é considerada a abordagem mais representativa para substâncias oriundas de matrizes vegetais complexas, e é recomendada pela OMS para a caracterização de drogas vegetais da Medicina Tradicional Chinesa (BEZERRA et al., 2018; WANG et al., 2016). Alguns representantes fenólicos foram identificados e quantificados por CLAE nas folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* (Figura 12 e Tabela 5) e as impressões digitais obtidas para cada extrato bruto/fração estão apresentadas na Figura 13.

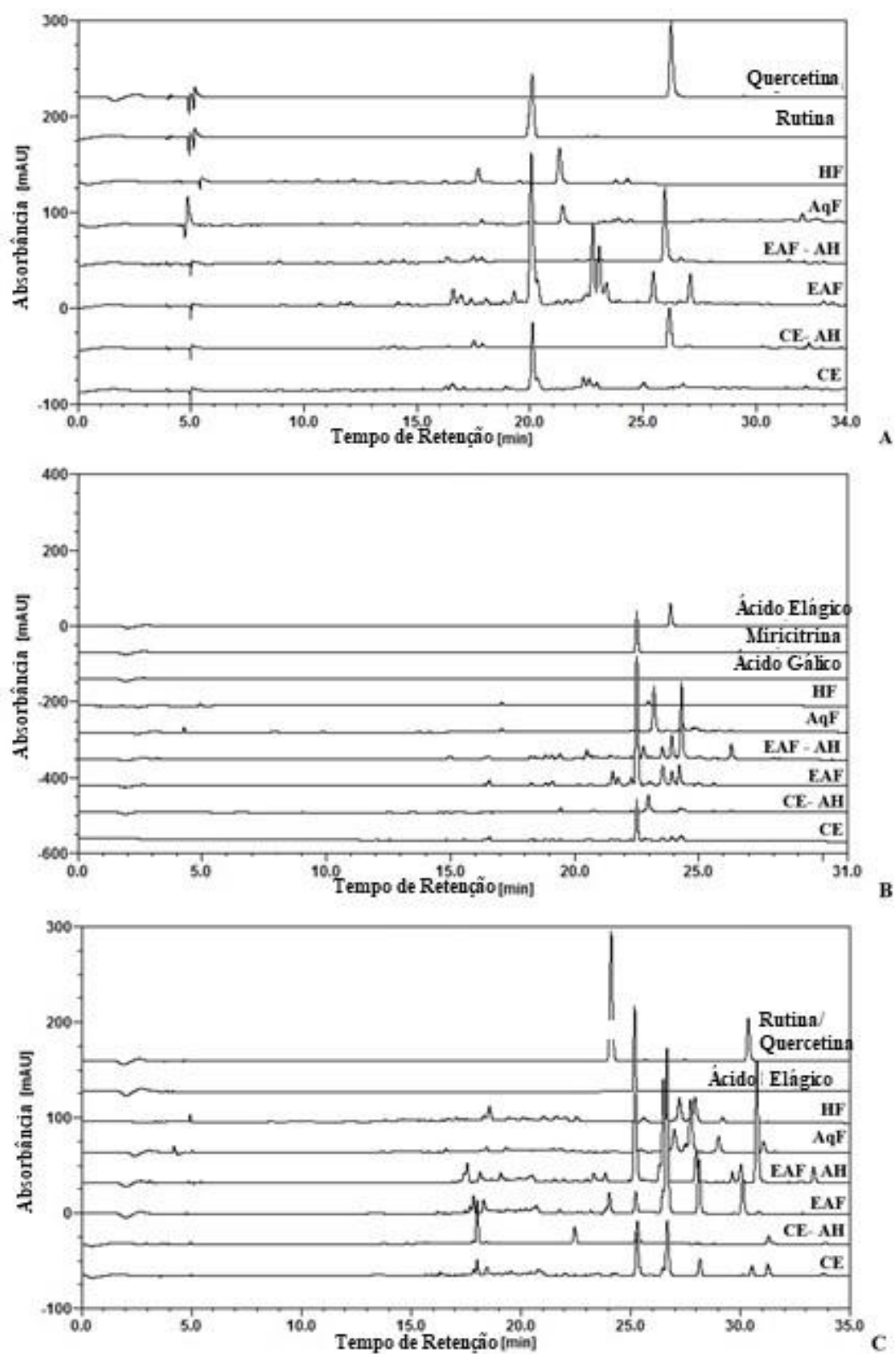
Figura 12 - Estruturas químicas dos compostos fenólicos quantificados por CLAE-DAD nas folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*.



Fonte: Adaptado de Human Metabolome Database (2019) *

*Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>. Acesso em 24 ago 2019.

Figura 13 - Perfis cromatográficos em CLAE-DAD dos extratos brutos/frações das folhas de *C. verum* (A), *E. uniflora* (B) e *P. granatum* (C)



HF: Fração Hexânica; AqF : Fração Aquosa; EAF-AH : Fração Acetato de Etila Após Hidrólise; EAF : Fração de Acetato de Etila; CE-AH : Extrato Bruto Após Hidrólise; CE : Extrato Bruto.

Fonte: Próprio autor.

O perfil fitoquímico de cromatografia líquida de *C. verum* mostrou derivados da catequina ($t_R = 5,43$ min e $\lambda_{max} = 279,1$ nm; $t_R = 10,11$ min e $\lambda_{max} = 279,2$ nm; $t_R = 10,52$ min e $\lambda_{max} = 279,3$ nm; e, $t_R = 13,32$ min e $\lambda_{max} = 278,9$ nm) (Figura 13A). A catequina é relatada como principal composto fenólico derivado das cascas do caule de *C. verum* (LV et al., 2012). A quantificação deste monômero de proantocianidina na FAE foi de 3,53% (Tabela 5), superior ao valor máximo relatado para a casca do caule da canela (2,18% equivalente-catequina) (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

O tamanho da molécula de proantocianidina é um importante fator que pode influenciar na ação farmacológica; onde a presença de alto grau de polimerização foi correlacionada *in vitro* e *in vivo* com a liberação progressiva de (epi) unidades de catequina nos sítios de ligação (MATEOS-MARTÍN et al., 2012). Taninos hidrolisáveis (ex: ácido gálico e elágico) e derivados cinâmicos (ex: ácido clorogênico) não foram detectados para *C. verum* (Tabela 5), o que vai de acordo com o descrito na literatura para as folhas (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Além disso, ambos *fingerprints* dos EB e FAE apresentam rutina ($t_R = 21,7$ min) e seu respectivo produto hidrolisado – quercetina ($t_R = 26,3$ min) (Figura 13A), notáveis também na Figura 11A.

No que se refere à análise cromatográfica dos extratos e frações das folhas de *E. uniflora*, foram identificados ácido gálico ($t_R = 8,25$ min), miricitrina ($t_R = 24,52$ min) e ácido elágico ($t_R = 24,52$ min) (Figura 13B). O processo de particionamento do EB com acetato de etila proporcionou aumento das concentrações de ácido gálico e ácido elágico nas FAE, bem como incremento da miricitrina. Além disso, outros compostos fenólicos foram relacionados à classe flavonoídica, por possuírem bandas laranja/amarelas no espectro UV/Vis (Figura 11B) e máximos de comprimento de onda correspondentes (F2: $t_R = 24,08$ min e $\lambda_{max} = 265,7$ nm/352,2 nm; F3: $t_R = 24,99$ min e $\lambda_{max} = 263,6$ nm/344,1 nm; e, F4: $t_R = 26,89$ min e $\lambda_{max} = 252,0$ nm/366,9 nm); e, derivados cinâmicos ($t_R = 16,53$ min e $\lambda_{max} = 217,8$ nm/239,7 nm/326,6 nm) (Figura 13B). Os flavonoides menos abundantes nas folhas de *E. uniflora* foram descritos como glicosídeos de quercetina e miricetina, contendo diferentes monossacarídeos, na forma de ramnosídeos, arabinosídeos e hexosil-galatos (RATTMANN et al., 2012). Ademais, derivados cinâmicos (equivalentes-ácido clorogênico) foram detectados e taninos condensados não foram evidenciados nas amostras de *E. uniflora* (Tabela 5), em concordância com a literatura que aponta derivados dos ácidos benzoico e hidroxicinâmico (DENARDIN et al., 2015).

O perfil cromatográfico dos EBs e frações enriquecidas das folhas de *P. granatum* demonstra ácido elágico ($t_R = 25,7$ min) e alguns derivados flavonoides (F1: $t_R = 28,11$ min e $\lambda_{max} = 265,0$ nm/338,1 nm; F2: $t_R = 29,44$ min e $\lambda_{max} = 270,0$ nm/341,0 nm; F3: $t_R = 1,83$ min e $\lambda_{max} = 268,0$ nm/340,0 nm) (Figura 13C), os quais puderam ser evidenciados também na Figura 11C, em banda amarelo/alaranjadas. Outros compostos foram detectados como possível derivados do ácido elágico (elagitaninos), como punicalaginas descritas na literatura (LI; TU; ZHOU, 2019). As frações enriquecidas de *P. granatum* permitiram o incremento do teor de flavonoides, os quais puderam ser determinados por CLAE e calculados em teores de rotina (Tabela 5). Taninos condensados e derivados cinâmicos não foram detectados nas amostras analisadas, mas são descritos nas flores (BEKIR et al., 2013) e nos frutos de *P. granatum* (SOUZA et al., 2018).

5.4 CONCLUSÃO

O processo extrativo de turbo-extração seguido do particionamento líquido/líquido proporcionou a obtenção um extrato bruto hidroacetônico e de três frações com diferentes teores de compostos fenólicos – fração hexânica, fração acetato de etila e fração aquosa, a partir das folhas de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum*. A caracterização por métodos espectrofotométricos (região UV/Vis) e cromatográficos (CCD-AE e CLAE) permitiram a identificação de rutina e quercetina em todas as espécies vegetais; bem como presença de catequina e derivados em *C. verum*; ácido gálico e ácido elágico em *E. uniflora* e *P. granatum* e ácido clorogênico e miricitrina, presentes apenas em *E. uniflora*.

O enriquecimento promovido pela partição em acetato de etila possibilitou o incremento dos teores de flavonoides e taninos em todas as espécies analisadas, quando comparado aos extratos brutos originais. A triagem fitoquímica e elucidação de grupos bioativos norteiam possíveis atividades biológicas, na busca de resultados terapêuticos positivos, práticos e seguros. Neste contexto, *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* configuram espécies ricas em compostos fenólicos, sobretudo flavonoides. Consequentemente, representam alternativas promissoras para utilização farmacológica, dada as múltiplas atividades biológicas dessa classe de moléculas.

5.5 REFERÊNCIAS

- AHMED, D.; ASHIQ, N. *In vitro* analysis of anti-diabetic and anti-oxidative potential of pedicles of fruit-vegetable bottle gourd. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 6, p. 2497–2501, nov. 2018.
- ANOUAR, E. H. et al. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 79–89, 2012.
- BANSAL, A. et al. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 4, p. 223–233, 2014.
- BARBEHENN, R. V et al. Hydrolyzable tannins as “quantitative defenses”: limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 4, p. 297–304, abr. 2009.
- BATISTA, A. L. A. et al. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 20, n. 1, p. 93–98, 2014.
- BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 470–475, 2013.
- BERNARD-SAVARY, P.; POOLE, C. F. Instrument platforms for thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, p. 184–202, 20 nov. 2015.
- BEZERRA, I. C. F. et al. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 92–101, 2018.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G.; DE MELLO, J. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 10 jun. 2013.
- BONTA, R. K. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 6, p. 349–364, 1 dez. 2017.
- BRGLEZ MOJZER, E. et al. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 7, jul. 2016.
- BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources : The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218–228, 2014.
- CABAN, M. et al. Overview of polyphenols and polyphenol-rich extracts as modulators of IGF-1, IGF-1R, and IGFBP expression in cancer diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 389–407, 1 jan. 2019.
- DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

ELBATANONY, M. M. et al. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum* L. leaves. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 89–94, 2019.

FADEL, O. et al. Separation and identification of polar polyphenols in oily formulation using high-performance thin-layer chromatography and mass spectroscopy techniques. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 25 (5), n. D506, p. 1–8, 2016.

FEDENKO, V. S.; SHEMET, S. A.; LANDI, M. UV–vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: An overview of *in vitro* and *in vivo* techniques. **Journal of Plant Physiology**, v. 212, p. 13–28, 1 maio 2017.

FELLAH, B. et al. Phenolic profiling and antioxidant capacity in flowers, leaves and peels of Tunisian cultivars of *Punica granatum* L. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 9, p. 3606–3615, 2018.

FERNANDES, A. J. D. et al. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–7, 2012a.

FERNANDES, A. J. D. et al. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012b.

FERREIRA, M. R. A. **Metodologias analíticas e quimiométricas para a avaliação de impressões digitais da droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz**. Recife, PE. Tese. Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/21471>>. Acesso em: 16 ago. 2019

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627–650, 1927.

FU, Y. et al. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 189–200, 2019.

GANZERA, M.; STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 211–233, 5 jan. 2018.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, 1 fev. 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GRANATO, D. et al. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266–279, 2016.

GWIAZDON, M.; BIESAGA, M. Phenolic compounds: Types, effects and research. **Analytical Chemistry and Microchemistry**, p. 105–107, 2017.

HUSSEIN, S. A. M. et al. Tannins from the leaves of *Punica granatum*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 819–823, 1997.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 547–562, jul. 2011.

KELLY, N. P.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. Strategies for enrichment and purification of polyphenols from fruit-based materials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 248–258, 2019.

KLEJDUS, B.; KOVÁČIK, J. Quantification of phenols in cinnamon: A special focus on “total phenols” and phenolic acids including DESI-Orbitrap MS detection. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 774–780, 1 maio 2016.

LI, Q.; TU, J.; ZHOU, B. The tannins from *Punica granatum* L, natural regulator of TGF- β 1/Smad signaling activity improves nephrectomy and adriamycin induced focal segmental glomerulosclerosis *in vivo*. **Journal of Functional Foods**, v. 57, p. 361–372, 2019.

LI, Y. et al. *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 227–235, 2016.

LIU, E. H. et al. Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2521–2544, 2008a.

LIU, Q. et al. Development and validation of a highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry method for simultaneous quantification of lenalidomide and flavopiridol in human plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 5, p. 620–627, 2008b.

LV, J. et al. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1442–1450, 1 jun. 2012.

MANSUR, A. R. et al. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. **Food Chemistry**, v. 293, p. 438–445, 2019.

MARTINS, P. M. et al. Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 510–518, jul. 2017.

MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 3, p. 1327–1336, 20 jan. 2012.

MILEVSKAYA, V. V.; PRASAD, S.; TEMERDASHEV, Z. A. Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the Lamiaceae and Hypericaceae families: A review. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 1036–1049, 1 mar. 2019.

OLATUNDE, O. O.; BENJAKUL, S.; VONGKAMJAN, K. Antioxidant and antibacterial properties of guava leaf extracts as affected by solvents used for prior dechlorophyllization. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. e12600, 2018.

PERVA-UZUNALIĆ, A. et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 597–605, 2006.

PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride--flavonoid complex. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465–470, 2001.

PICCOLELLA, S. et al. Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly) phenol seasonality? A case study from Mediterranean area. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 785–799, 2018.

PRASAD, K. N. et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 627–632, 2009.

RAMOS, R. T. M. et al. Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 3, p. 253, 2017.

RANJANA et al. Standardization and xanthine oxidase inhibitory potential of *Zanthoxylum armatum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 230, p. 1–8, 10 fev. 2019.

RATTMANN, Y. D. et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2012, p. 623940, 20 dez. 2012.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 154–169, 1 abr. 2017.

SANTOS, H. B. DOS. **Influência da sazonalidade nos perfis quali e quantitativo de polifenóis das cascas e folhas de *Libidibia ferrea* (Mart.exTul.) L.P. Queiroz (Jucá)**. Recife, PE. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/24540>>. Acesso em: 15 ago. 2019

SANTOS, R. . et al. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 85–89, 2011.

SARIKAHYA, N. B.; GOREN, A. C.; KIRMIZIGUL, S. Simultaneous determination of several flavonoids and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 173, p. 120–125, 2019.

SILVA, J. K. A. DA. **Avaliação em ratos do potencial antiobesidade de extratos brutos das folhas e cascas do caule de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)**. Recife, PE. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/29436>>. Acesso em: 18 ago. 2019

SILVA, K. G. H. et al. Stationary cuvette: a new approach to obtaining analytical curves by UV–VIS spectrophotometry. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 4, p. 265–271, 2009.

SILVA, L.; PEZZINI, B.; SOARES, L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 96, 2015.

SOARES, L. A. L. et al. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *phyllanthus niruri* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 203–207, 2003.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural Product Research**, v. 33, n. 17, p. 2579–2582, 2019.

SOUZA, J. A. L. DE et al. Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, n. 56, p. 437–443, 2018.

STANEK, N.; JASICKA-MISIAK, I. HPTLC phenolic profiles as useful tools for the authentication of honey. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 11, p. 2979–2989, 2018.

STANEK, N.; KAFARSKI, P.; JASICKA-MISIAK, I. Development of a high performance thin layer chromatography method for the rapid qualification and quantification of phenolic compounds and abscisic acid in honeys. **Journal of Chromatography A**, v. 1598, p. 209–215, 2019.

SUT, S. et al. Influence of different extraction techniques on the chemical profile and biological properties of *Anthemis cotula* L.: Multifunctional aspects for potential pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 173, p. 75–85, 2019.

SZULTKA, M. et al. Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 47, p. 47–67, 2013.

TUNG MUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 5, n. 3, p. 93, 25 ago. 2018.

VAF AEI, A.; BIN MOHAMAD, J.; KARIMI, E. HPLC profiling of phenolics and flavonoids of *Adonidia merrillii* fruits and their antioxidant and cytotoxic properties. **Natural Product Research**, v. 33, n. 17, p. 2531–2535, 2019.

VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1430, p. 16–78, 22 jan. 2016.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Heidelberg, Germany: Springer Science & Business Media, 2009.

WANG, C. et al. High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC–diode array detection and HPLC–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2016.

XU, C. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721–731, 2017.

ZHANG, L. et al. Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 543–546, 2010.

ZUORRO, A.; IANNONE, A.; LAVECCHIA, R. Water–organic solvent extraction of phenolic antioxidants from brewers' spent grain. **Processes**, v. 7, n. 3, 2019.

6 EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE *CINNAMOMUM VERUM*, *EUGENIA UNIFLORA* E *PUNICA GRANATUM* COMO ANTIOXIDANTES E MODIFICADORES DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A utilização em larga escala da terapia antibiótica nas últimas décadas decorre, em grande parte, como resultado do processo do envelhecimento populacional, que influi no aumento de infecções associadas às doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento, tais como doenças metabólicas, cardiovasculares e neoplásicas. Estas condições estão frequentemente associadas ao estresse oxidativo e atuam diretamente no ônus farmacêutico global (CÖMERT; GÖKMEN, 2018; RIOS et al., 2016).

Conforme último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) para resistência microbiana, a maioria dos antibióticos atualmente disponíveis são considerados modificações de classes existentes e soluções a curto prazo (WHO, 2017). Dentre as 51 novas drogas candidatas, apenas 8 foram classificadas como tratamentos inovadores que agregam valor ao atual arsenal terapêutico (SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; RAMASAMY, 2018; WHO, 2017). Outrossim, o déficit de antimicrobianos, sobretudo para o tratamento de infecções por microrganismos multidroga-resistentes, implica em altos custos hospitalares, morbidade e mortalidade (FUENTEFRÍA et al., 2018; THEURETZBACHER, 2013; WINTER et al., 2013).

Frente ao exposto, estudos relacionam o uso popular de plantas cultivadas no nordeste brasileiro como agentes antimicrobianos e antioxidantes (BIASI-GARBIN et al., 2016; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; FERREIRA et al., 2013), destacando-se os compostos fenólicos no combate a microrganismos multidroga-resistentes (DE ARAÚJO et al., 2014; SILVA-ROCHA et al., 2015; VAMBE et al., 2018; YANG et al., 2014). A caracterização espectrofotométrica e cromatográfica dos extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* demonstrou presença significativa destes compostos, o que viabilizou estudos de atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro*, os quais serão abordados nesta seção.

6.1 REFERENCIAL TEÓRICO

6.1.1 Resistência microbiana: Aspectos gerais e impactos

A resistência aos antimicrobianos representa um crescente desafio para a ciência moderna. Sobretudo em ambiente hospitalar, o uso de antibióticos potentes e de amplo espectro, o tratamento inadequado ou subterapêutico, bem como a falta ou deficiência de medidas preventivas contribuem para o desenvolvimento da resistência a estes fármacos. Busca-se, para tanto, estratégias que prolonguem a eficácia dos antibióticos atualmente disponíveis, incentivem o uso racional destes e reduzam ou evitem a disseminação de microrganismos multidroga-resistentes (MDR). Compreender os mecanismos de resistência aos antibióticos constitui um passo fundamental para a descoberta de medidas terapêuticas eficazes (RICE, 2018; SEUKEP et al., 2016; YELIN; KISHONY, 2018).

Em acepção, a resistência antimicrobiana é definida como a resistência de microrganismos a um agente antimicrobiano ao qual eles eram habitualmente sensíveis (JINDAL; PANDYA; KHAN, 2015). Esse fenômeno evolutivo natural, propulsionado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos e pela disseminação global de microrganismos MDR afeta, principalmente, pacientes imunocomprometidos e debilitados, infligindo também em altos custos para a saúde pública de todos os países (HSIEH; AMIN, 2016; SEPTIMUS, 2018).

A resistência aos antibióticos foi documentada já no início da era dos antibióticos, quando em 1940, Howard Florey e Ernst Chain (Universidade de Oxford) retomaram as pesquisas de Fleming e produziram a penicilina em escala industrial (ALANIS, 2005). Ao longo de anos após este feito, o desenvolvimento de cepas resistentes já acontecia com uma regularidade perturbadora. A principal causa foi e continua a ser a falta de uso racional dos antimicrobianos, resultando em seu uso excessivo, apesar dos controles mais recentes sobre prescrição, compra e venda em todo o mundo (BECKETT; HARBARTH; HUTTNER, 2015; FAIR; TOR, 2014; GOOSSENS et al., 2005; GRABE; RESMAN, 2019). A antibioticoterapia desregrada na matéria-prima animal e vegetal também colabora com a propagação da resistência, devido à utilização profilática destes fármacos em animais de criação, na aquicultura e na horticultura (AMINOV, 2010; CENTNER, 2016; FAIR; TOR, 2014; PÄRNÄNEN et al., 2019).

Com o advento e utilização indiscriminada de antibióticos de amplo espectro, a pressão seletiva dos microrganismos tornou a resistência uma preocupação mundial e urgente. O aumento do número de infecções, sobretudo hospitalares, causadas por agentes MDR tornou o tratamento progressivamente difícil e a escolha de antibióticos cada vez mais limitada. Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) mostram que 55,7% dos pacientes que tiveram alta de 325 hospitais receberam antibióticos durante a internação, sendo 37,2% dessas prescrições desnecessárias ou aprimoráveis (FRIDKIN et al., 2014; POWERS, 2004; USA, 2013). O CDC estima ainda que 2 milhões de pacientes adquirem anualmente infecções graves por MDR, representando pelo menos 23.000 óbitos/ano, com custo direto de US\$ 20 bilhões e perda para a sociedade de US\$ 35 bilhões, devido a 150.000 de casos anuais corresponderem a eventos adversos relacionados com o uso de fármacos antimicrobianos. A alarmante previsão é de 10 milhões de mortes por MDR até 2050 (SEPTIMUS, 2018).

No cenário brasileiro, dados epidemiológicos de hospitais da região Sul apontam que maior taxa de infecção por MDR remonta a partir de 9 dias de internamento (MARTINS et al., 2012). Um estudo realizado por Ferraz e colaboradores (2016) com 110 pacientes internados em um hospital de ensino do Campo Grande/MS demonstrou que 42,6% dos pacientes com mais de 21 dias de internação pertenciam ao grupo infectado por MDR, onde 48,4% destes vieram a óbito e 83,3% necessitaram de cuidados semi-intensivos ou intensivos, evidenciando o elevado custo financeiro para o país e o difícil manejo das infecções causadas por MDR.

6.1.2 Antimicrobianos disponíveis: Histórico e principais representantes

Os antimicrobianos representam uma das quimioterapias mais bem-sucedidas da história da Medicina. No início da nova "era antibiótica", entre 1904 e 1908, Paul Ehrlich e Alexander Fleming foram cruciais para o desenvolvimento destes fármacos (HSIEH; AMIN, 2016). Em 1904, Ehrlich juntamente com Alfred Bertheim e Sahachiro Hata produziram centenas de derivados organoarsênicos. Em 1909, eles descobriram um sexto composto da 600ª série testada, que curou coelhos infectados com sífilis, com potencial tratamento humano (EHRlich; HALTA, 1910).

Devido aos efeitos colaterais graves, uma forma mais solúvel e menos tóxica deste composto, chamado salvarsan (arsfenamina ou Ehrlich 606), foi desenvolvida. Conhecido como neosalvarsan, este se tornou o medicamento mais recomendado até que foi substituído pela penicilina na década de 1940 (MAHONEY; ARNOLD; HARRIS, 1943).

A descoberta de antibióticos iniciou oficialmente em 1928, quando Fleming escreveu seu primeiro artigo sobre a penicilina, publicado em 1929 (BENDINER, 1989). Fleming demonstrou que a penicilina tinha boa solubilidade, causava lise bacteriana e era atóxica para animais. Entretanto, a droga inicialmente não era acessível para uso médico, era restrita a uso militar (ALHARBI et al., 2014).

A sulfa, nomeadamente sulfonamido-crisoidina (KI-730, Prontosil®), foi sintetizada por Josef Klarer e Fritz Mietzsch e testada por Gerhard Domagk para diferentes tipos de infecções (DOMAGK, 1935). Como não possuía patente e apresentava baixo custo de produção, ocorreu produção massiva de derivados de sulfonamida por muitas empresas (AMINOV, 2010). Simultaneamente, novos antimicrobianos foram descobertos por Waksman e Woodruff, que estabeleceram técnicas para identificar e isolar actinomicina até 1940 (WAKSMAN; WOODRUFF, 1940), seguido do isolamento de estreptomicina (WAKSMAN; WOODRUFF, 1942). Embora a penicilina venha sendo utilizada por quase 80 anos, alguns patógenos incluindo *Streptococcus pyogenes* e *Treponema pallidum*, são suscetíveis a este antibiótico até os dias atuais (BRADLEY, 2014; WHO, 2016).

Não obstante o vasto número de antibióticos disponíveis e seus diversos mecanismos de ação (Quadro 9), a mais recente classe terapêutica descoberta foi a dos lipopeptídeos em 1986, sendo a daptomicina aprovada em 2003 pela *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2003). Os “novos” antibióticos recentemente comercializados pertencem às classes terapêuticas já conhecidas, como lipoglicopeptídeos (dalbavancina) e cefalosporinas (ceftarolina, ceftobiprole). A combinação de classes terapêuticas existentes torna-se a primeira escolha no combate a MDR. Novas associações são apresentadas, tais como por exemplo ceftolozano/tazobactam e ceftazidima/avibactam (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019; KOULENTI et al., 2019). Sob este paradigma, outras estratégias para o desenvolvimento novos antibióticos para tratamento de MDR ganharam evidência, tais como design de fármacos baseado em modelos estruturais, desenvolvimento de inibidores de *quorum sensing* e busca por novas moléculas ou associações com compostos naturais (HSIEH; AMIN, 2016; KHAN; QAIS; AHMAD, 2018).

Quadro 9 - Classes de antimicrobianos atualmente disponíveis, contendo principais representantes, formas de apresentação e mecanismo de ação

Classe	Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Aminoglicosídeos	Framicetina	1953	1955	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Natural	Adesivo, solução oftálmica, pomada oftálmica	Inibem a síntese proteica ligando-se à unidade ribossômica 30S ou 70S
	Gentamicina	1963	1979	<i>Micromonospora purpurea</i>	Natural	Solução injetável, solução oftálmica, creme, pomada	
	Kanamicina	1957	1973	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Natural	Solução injetável	
	Neomicina	1949	1954	<i>Streptomyces fradiae</i>	Natural	Solução oral, comprimido, pomada	
	Plazomicina	2009	2018	-	Semissintética	Solução injetável	
	Sisomicina	1970	-	<i>Micromonospora inyoensis</i>	Natural	Solução oftálmica, pomada	
	Streptomicina	1943	1946	<i>Streptomyces griseus</i>	Natural	Solução injetável	
	Tobramicina	1967	1975	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Natural	Solução inalatória, solução injetável	

(Continuação Quadro 9)

Classe	Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Antimicobacterianos	Capreomicina	1960	1969	<i>Streptomyces capreolus</i>	Natural	Solução injetável	Inibe a síntese de proteínas ao se ligar à unidade ribossômica 70S.
	Etambutol	1961	1967	-	Sintética	Comprimido, comprimido revestido	Inibe arabinosil transferases envolvidas na biossíntese da parede celular
	Etionamida	1956	1965	-	Sintética	Comprimido, comprimido revestido	Inibe a síntese de ácidos micólicos, essenciais para a parede celular
	Isoniazida	1952	1952	-	Sintética	Comprimido	Inibe a síntese de ácidos micólicos, essenciais para a parede celular
	Pirazinamida	1936	1952	-	Sintética	Comprimido	Inibe a ácido graxo sintase, essencial para a síntese de ácidos graxos. Também altera o potencial da membrana celular
	Rifampicina	1965	1971	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Semissintética	Cápsula, solução injetável	Inibe a RNA polimerase dependente de DNA, levando à supressão da síntese de RNA

(Continuação Quadro 9)

Classe		Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
β-lactâmicos	Carbapenêmicos	Imipenem	1976	1985	<i>Streptomyces cattleya</i>	Semissintética	Solução injetável	Liga-se as proteínas de ligação à penicilina (PBPs)
	Cefalosporinas	Cefalosporina C	1948	1964	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Natural	Protótipo. Não Comercializável	Interfere na síntese de peptidoglicano da parede celular, por inibição de enzimas envolvidas no processo de transpeptidação
	Oxazolidínicos	Ácido clavulânico	1974	1985	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Semissintética	Comprimido, comprimido revestido, comprimido mastigável, pó para reconstituição (oral), suspensão oral, solução injetável	Inibidor de β-lactamase bacteriana
	Monobactâmicos	Aztreonam	1981	1987	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Semissintética	Solução injetável	Inibe a síntese da parede celular por ligação a PBP3
	Penicilina	Benzilpenicilina	1928	1938	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	Natural	Solução injetável	Liga-se as proteínas de ligação à penicilina (PBPs)

(Continuação Quadro 9)

Classe		Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Ácido carboxílicos		Mupirocina	1971	1987	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Natural	Creme, pomada	Liga-se a sintetase bacteriana de transferência de isoleucil-RNA (tRNA), à inibição RNA
Cloranfenicol		Cloranfenicol	1946	1948	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Natural	Solução oftálmica, solução injetável, solução otológica	Liga-se a proteína L16 da subunidade ribossomal 50S
Esteroides		Ácido fusídico	1962	1983	<i>Fusidium coccineum</i>	Natural	Creme, adesivo, suspensão oral, pomada, solução oftálmica	Inibe a translocação do fator de alongamento G (EF-G) ribossomal
Estreptograminas	Policetídeos	Estreptogramina A	1993	1999	<i>Streptomyces virginiae</i>	Semissintética	Solução injetável	Bloqueiam a formação da ligação peptídica entre a cadeia peptidil-tRNA ligada ao ribossomo 50S e aminoacil-tRNA
	Depsipeptídeos	Estreptogramina B	1970	1998	<i>Streptomyces graminofaciens</i>	Semissintética	Solução injetável	
Glicilciclinas		Tigeciclina	1999	2005	-	Sintética	Solução injetável	Liga-se à subunidade ribossômica 30S para impedir que o amino-acil-tRNA se ligue ao local A ribossomal

(Continuação Quadro 9)

Classe		Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Glicopeptídeos	Glicopeptídeo	Teicoplanina	1978	1987	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Natural	Solução injetável	Impedem a incorporação das subunidades do peptídeo N-acetilmurâmico (NAM) - e N-acetilglucosamina (NAG) na matriz peptidoglicana
		Vancomicina	1953	1958	<i>Streptomyces orientalis</i>	Natural	Solução oral, solução injetável, cápsulas	
	Lipoglicopeptídeos	Oritavancina	1996	2014	-	Semissintética	Solução injetável	
		Dalbavancina	2002	2014	-	Semissintética	Solução injetável	
Lincosamidas		Lincomicina	1963	1964	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Semissintética	Solução intravenosa, cápsula	Liga-se às subunidades 50 S dos ribossomos bacterianos, impedindo a formação de ligações peptídicas após a transcrição
Lipopeptídeos		Daptomicina	1986	2003	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Semissintética	Solução injetável	Liga-se à parede celular, causando despolarização e perda do potencial da membrana e inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA

(Continuação Quadro 9)

Classe		Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Macrolídeos	Macrolídeos	Eritromicina	1948	1951	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Semissintética	Grânulo e pó para reconstituição, suspensão e solução oral, solução injetável, comprimido, (revestido e de liberação retardada) cápsula, cápsula de liberação retardada, gel, pomada	Ligam-se reversivelmente ao local P na subunidade 50S ribossomal
		Josamycina	1967	-	<i>Streptomyces narbonensis</i> var. <i>josamyceticus</i>	Semissintética	Não reportado	
		Midecamicina	1975	-	<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	Semissintética	Pó para suspensão oral, cápsula	
		Spiramicina	1952	1955	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Semissintética	Cápsula	
		Fidaxomicina	1975	2011	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i> subspecies <i>hamdenesis</i>	Semissintética	Comprimido, comprimido revestido	
	Cetolídeos	Telitromicina	1997	2004	-	Semissintética	Comprimido, comprimido revestido	Liga-se a domínios II e V do rRNA 23S da subunidade ribossômica 50S

(Continuação Quadro 9)

Classe	Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	1952	1953	-	Sintética	Cápsula, suspensão oral, comprimidos	Inibe o ciclo do ácido cítrico e a síntese de DNA, RNA e proteínas
Oxazolidinonas	Linezolida	1985	2000	-	Sintética	Comprimido, comprimido revestido, solução injetável, suspensão, pó para suspensão	Ligam-se a um local no RNA ribossômico 23S bacteriano da subunidade 50S e impedem a formação de um complexo funcional de iniciação 70S
	Tedizolida	2008	2014	-	Sintética	Comprimido, solução injetável	
Pirimetaminas	Trimetoprim	1962	1973	-	Sintética	Comprimido, comprimido revestido, comprimido mastigável, pó para reconstituição (oral), suspensão oral, solução injetável	Inibidor da dihidrofolato redutase
Polipeptídeos	Polimixina	1947	1959	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Semissintética	Solução injetável	Aumenta a permeabilidade iônica da membrana, alterando o lipopolissacarídeo (LPS) e causando extravasamento do conteúdo citoplasmático

(Continuação Quadro 9)

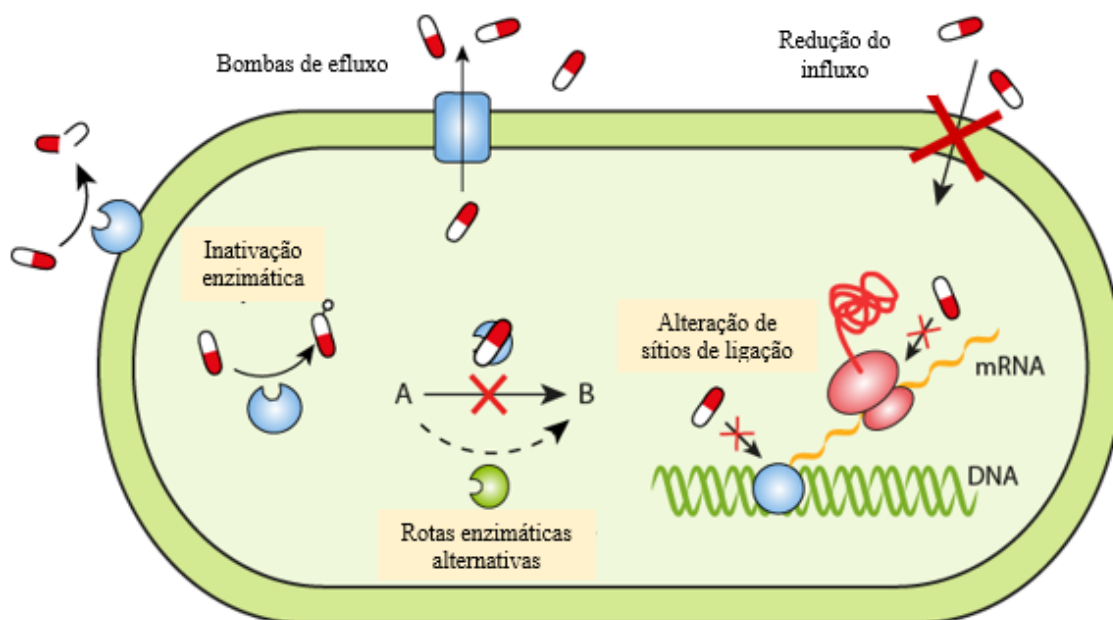
Classe		Fármaco	Descoberta	Aprovação (FDA)	Origem	Síntese	Forma de Apresentação	Mecanismo de Ação
Quinolonas	Fluoroquinolonas	Delafloxacino	2000	2017	-	Sintética	Comprimido, solução injetável	Inibem a topoisomerase II e topoisomerase IV, necessárias para replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano
		Norfloxacino	1961	1968	-	Sintética	Comprimido, comprimido revestido, solução	
	Naftiridonas	Ácido nalidíxico	1960	1967	-	Sintética	Comprimido	
Sulfonamidas		Sulfametoxazol	1961	1961	-	Sintética	Comprimido	Compete com o PABA (ácido p-aminobenzoico) pela ligação à di-hidrofolato sintetase, interferindo na síntese de purinas
Tetraciclinas	Tetraciclinas	Clortetraciclina	1945	1952	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Semissintética	Pomada, pomada oftálmica	Bloqueiam a síntese de proteínas bacterianas por ligação à subunidade ribossômica 30S
		Minociclina	1961	1971	-	Semissintética	Cápsula, cápsula de liberação prolongada, comprimido, (revestido e de liberação prolongada), pó para reconstituição (via oral)	
	Fluorociclinas	Eravaciclina	2010	2018	-	Sintética	Solução injetável	

Fonte: Adaptado de Durand e colaboradores (2018) e do DrugBank (2019).

6.1.3 Mecanismos de resistência bacteriana

Muitos pesquisadores estão envolvidos na busca de uma maior compreensão da resistência aos antimicrobianos, visando estratégias de combate. Este mecanismo de escape é gerado e transmitido por diferentes maneiras (Figura 14). Através da transferência horizontal de genes, por exemplo, integrons transportados em transposons permitem que bactérias compartilhem mecanismos de resistência (BRADLEY, 2014; FURI et al., 2016). Outro mecanismo conhecido de resistência é a ocorrência de mutações espontâneas em genes, os quais são transmitidos verticalmente à prole após o processo de replicação bacteriana (HOLMES et al., 2016).

Figura 14 - Principais mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: Adaptado de Gullberg (2019).

Em outros casos ocorre resistência intrínseca, que se refere à presença de genes bacterianos que produzem fenótipos de resistência. Qualquer um dos elementos genéticos adicionais são capazes de promover a transmissão da resistência, e o tipo de elemento envolvido difere com o gênero. Isto posto, há diferentes mecanismos de escape para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DAVIES; DAVIES, 2010; MUNTA; BAYER; ARIAS, 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

A inibição enzimática constitui o meio mais comum de inativação, e é baseada em estratégias de modificação da estrutura química dos antimicrobianos. As formas mais comuns são: hidrólise, sobretudo em fármacos β -lactâmicos; transferência de grupos funcionais (acil, fosforil, tiol, nucleotídeo, ADP-ribosil e glicosil), que ocorre em aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifamicina e lincosamida; e outras modificações químicas (redox, liase), que ocorrem em tetraciclina, rifamicina e estreptogramina (BHULLAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017; WRIGHT, 2005). As β -lactamases representam um desafio para o tratamento de infecções causadas por Gram-negativos. Estas incluem penicilinases, que conferem resistência a penicilinas; cefalosporinases AmpC (por exemplo, MOXs, MIR, família FOX, família CMI dentre outras mediadas por plasmídeos) e enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e inibidores de β -lactamases (por exemplo, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (KOULENTI et al., 2019; OLIVEIRA; PAIVA; LIMA, 2019; PATERSON, 2006; WALSH et al., 2011).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do Inglês “*Extended-spectrum beta-lactamase*”) (por exemplo, SHV-1, TEM-1, TEM-2, CTX-Ms e outras) também constituem um grupo importante de enzimas inativadoras que conferem resistência a penicilinas e cefalosporinas. Além disso, muitos microrganismos produtores de TEM e SHV exibem resistência simultânea a tetraciclinas, sulfonamidas e aminoglicosídeos. A maioria das cepas produtoras CTX-M também são resistentes a fluoroquinolonas (DE SOUSA OLIVEIRA et al., 2016; LAHLAOU; KHALIFA; MOUSSA, 2014). As carbapenemases (por exemplo, família IMP, família VIM, KPCs, OXAs e outras), são enzimas capazes de inativar todos os agentes β -lactâmicos, exceto aztreonam, sendo divididas em três classes: metalo- β -lactamases (classe B) e serina carbapenemases (classes A e D) (BONOMO, 2017).

Apenas as penicilinases configuram um mecanismo de inibição enzimática produzido por Gram-positivos. Outros mecanismos como modificações de proteínas de ligação a penicilina (PBPs) (PBP2a, mutação PBP20/superexpressão de PBP4 enterocócica ou PBP5) e de parede celular (aumento de espessura e alvo de peptidoglicano modificado) ganham destaque, pois conferem resistência contra antimicrobianos de última escolha, tais como cefalosporinas de quarta geração e vancomicina (ROSSOLINI et al., 2010). A mais alarmante é PBP2a (também chamada PBP20), uma proteína modificada que confere resistência a penicilinas e cefalosporinas. Esta proteína é o produto do gene *mecA* e genes homólogos *mecB* e *mecC*, todos de origem plasmídica. Estas PBPs modificadas alteram o sítio de ação, fazendo

com que os agentes β -lactâmicos percam ou diminuam a afinidade com a proteína alvo, promovendo resistência (BECKER et al., 2014; LI et al., 2017).

O principal constituinte da bicamada lipídica em bactérias Gram-negativas é o lipopolissacarídeo que, devido à sua hidrofobicidade, dificulta a passagem de compostos hidrofílicos. Assim, são necessárias porinas de membrana externa (Omps), que são proteínas que ajudam na passagem de solutos hidrofílicos. Alguns fatores podem afetar a capacidade do antimicrobiano de ultrapassar as porinas, como sua carga, sua conformação e seu tamanho, existindo algumas porinas típicas, como OmpF, OmpC e OmpE (CAMA; HENNEY; WINTERHALTER, 2019; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Cada espécie bacteriana produz poros específicos e a perda ou comprometimento de uma ou mais Omps é um fator comum no estabelecimento de resistência. Por exemplo, a perda de OprD em *Pseudomonas aeruginosa* confere resistência a imipenem e meropenem; em outras espécies, a perda de OmpF pode levar a microrganismos MDR. Este fenômeno resulta em um aumento nas concentrações inibitórias mínimas para antimicrobianos hidrofílicos e reduz as escolhas antibacterianas na prática clínica (DE SOUSA OLIVEIRA et al., 2016; PANG et al., 2019). Estudos demonstram que a pressão seletiva exercida pelo uso prolongado de antibióticos é um fator importante no desenvolvimento de bactérias MDR. Os mecanismos mais comuns envolvidos nestes casos são a modificação das porinas, a diminuição da expressão das porinas e as mutações, que impedem que o antibiótico penetre na célula (RICE, 2018).

Um mecanismo de resistência altamente eficiente é a produção de uma bomba de efluxo, um sistema dependente de prótons que efetua remoção ativa do antibiótico do interior da célula. O efluxo de fármacos por bactérias Gram-positivas é comumente mediado por um único transportador, localizado na membrana citoplasmática das famílias de bombas MF, SMR ou ABC (SCHINDLER; KAATZ, 2016). Por outro lado, bactérias Gram-negativas são mais complexas devido à presença da membrana externa. Destas bombas, a proteína melhor caracterizada é a transportadora de tetraciclina (TetB) de *Escherichia coli*, que demonstrou funcionar como um sistema antiporte eletroneutral, catalisando a troca de um complexo tetraciclina-divalente-metal-cátion para um próton (KABRA et al., 2019; KANJI; HASAN; HASAN, 2019; PAGÈS; AMARAL, 2009).

Os antibióticos que visam a maquinaria de tradução das células bacterianas são potentes inibidores. No entanto, ao longo de décadas de uso clínico, bactérias tornaram-se resistentes a antibióticos que inibem a síntese proteica. Um mecanismo notável dessa resistência é a modificação do alvo molecular desses antibióticos. Comumente, isso pode surgir através de

mutações pontuais em genes selecionados, resultando em resistência relativamente rápida e fácil. Mudanças pequenas em uma sequência de aminoácidos alteram a estrutura da proteína de forma suficiente para impedir a ligação e a ação destes antibióticos (BULKLEY et al., 2010; KUMARIYA et al., 2019).

Os primeiros relatos de alterações estruturais ribossômicas foram descritos em mutantes de *Escherichia coli* resistentes a eritromicina, os quais apresentavam alterações das proteínas ribossômicas, notavelmente das proteínas L4 e L22 (HELSER; DAVIES; DAHLBERG, 1971). Lai, Dahlberg e Weisblum (1973) mostraram que a metilação específica do RNAr 23S em *Staphylococcus aureus* confere resistência à família de antibióticos macrolídeos-lincosamida-estreptogramina. A daptomicina, a mais recente classe terapêutica comercializável para o tratamento de infecções por enterococos resistentes a vancomicina (VRE), tem seu uso ameaçado pelo surgimento deste tipo de resistência (MUNITA et al., 2013; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; REYES; BARDOSSY; ZERVOS, 2016).

6.1.4 Compostos fenólicos como alternativa antimicrobiana sinérgica

Agentes modificadores da resistência microbiana representam uma estratégia atraente para combater a disseminação de MDR, uma vez que podem facilitar a recuperação de antibióticos bem estabelecidos. Ademais, a associação entre fármacos geralmente é menos onerosa do que a utilização de um único candidato a antimicrobiano (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012). A sinergia (quando a eficácia combinada de dois medicamentos é maior que a soma de atividades individuais) entre antibióticos tem sido explorada, com base em resultados de aprimoramento de solubilidade, biodisponibilidade e de modificação/inibição de mecanismos de resistência bacteriana (AYAZ et al., 2019; HAZRA et al., 2018).

Antimicrobianos naturais podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, incluindo plantas, animais, bactérias, algas e fungos. Atualmente, há crescente interesse no uso de derivados vegetais como alternativa aos antibióticos comuns. Uma vantagem significativa reside na menor propensão para o desenvolvimento de resistência bacteriana, devido aos compostos naturais atuarem simultaneamente em mais de um sítio de ligação (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; MARTELLI; GIACOMINI, 2018).

Fitocompostos podem aumentar a eficácia de outras classes de antibióticos por várias maneiras: por melhorar a permeabilidade da membrana, por inibir a síntese de enzimas ou por bloquear reações bioquímicas (WAGNER, 2011). Combinações mono e multi-extratos contendo terpenos, por exemplo, têm demonstrado efeito sinérgico com aminoglicosídeos, β -lactâmicos, glicopeptídeos e fluoroquinolonas, baseadas em mecanismos multifarmacofóricos (ZACCHINO et al., 2017a). Em recente trabalho realizado por Zacchino e colaboradores (2017b), abordando o emprego de metabólitos secundários como adjuvantes à terapia antimicrobiana, 48% dos compostos descritos eram polifenóis, 25% terpenos e 27% outras classes de compostos. Desse modo, a busca de substâncias de origem natural para o desenvolvimento de novas drogas e/ou terapia antimicrobiana combinada continua sendo uma estratégia importante no combate à resistência bacteriana.

6.1.5 *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* como reservatórios de metabólitos antimicrobianos

Polifenóis, terpenoides, alcaloides, polipeptídeos e poliacetilenos são metabólitos secundários conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana. Adicionalmente, a maioria desses metabólitos também é considerada como material GRAS, “*Generally Recognized As Safe*”, ou seja, considerados seguros pela FDA e, conseqüentemente, tendo importância econômica (PIMENTEL-MORAL et al., 2018; SIMOES; BENNETT; ROSA, 2009).

Compostos fenólicos têm sido descritos como ativos antimicrobianos com eficácia significativa frente a *Staphylococcus aureus* (PAGLIARULO et al., 2016), *Enterococcus* spp. (DAHMER et al., 2019), *Candida* spp. (FERREIRA et al., 2013; PINNA et al., 2019) e Gram-negativos com fenótipo MDR (BENAMEUR et al., 2019; DEY; RAY; HAZRA, 2015). Considerando aplicação frente a microrganismos MDR, *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* destacam-se por apresentarem uso tradicional e científico como agentes antimicrobianos (Seção 4) e por serem ricas em compostos fenólicos (Seção 5).

Considerando o uso frente a microrganismos MDR, o extrato metanólico do caule de *C. verum* apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1,51 mg/mL frente a Gram-positivos e Gram-negativos MDR (KOH et al., 2013), bem como CIM e Concentração Bactericida Mínima (CBM), respectivamente, de 0,4 mg/mL e 1,6 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae* e de 3,1 mg/mL e 6,2 mg/mL para *Escherichia coli*, ambas produtoras de β -lactamase de espectro estendido (extrato etanólico) (RATH; PADHY, 2014).

O extrato metanólico do caule de *P. granatum* apresentou atividade antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Chromobacterium violaceum* (KOH; THAM, 2011), bem como aumentou a atividade dos fármacos cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, tetraciclina e oxacilina contra *S. aureus* (UPADHYAY et al., 2014). A atividade *in vitro* frente a microrganismos da cavidade oral, bactérias MDR e o sinergismo com fármacos antibacterianos/antifúngicos também foram descritos para extratos de *P. granatum* (Seção 4).

Extratos hidroalcoólicos de partes aéreas de *E. uniflora* foram ativos contra *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, com CIM de 31,25 µg/mL (LAGO et al., 2011). Extratos hidroalcoólicos das sementes e das folhas de *Eugenia* spp. foram ativos contra biofilme de *Candida albicans*, com CIM de 15,62 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente e reduzindo a viabilidade do biofilme em 54-55% (SARDI et al., 2017). A CIM para o óleo essencial de *E. uniflora* foi 256 µg/mL para *S. aureus* e 1,0 mg/mL para *E. coli*; apresentando sinergismo com amicacina (PEREIRA et al., 2017). Frente ao exposto, a avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana sinérgica dos extratos brutos e frações enriquecidas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* foi conduzida, tendo em vista as quantidades significativas de flavonoides e outros compostos fenólicos presentes nessas amostras.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Atividade antioxidante

6.2.1.1 Radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A avaliação do potencial antioxidante *in vitro* dos extratos brutos, frações enriquecidas e frações hidrolisadas para remoção do radical livre DPPH[•] (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) foi realizada segundo protocolo de Mensor e colaboradores (2001), com adaptações. Todas as soluções utilizadas neste ensaio foram preparadas em etanol e acondicionadas em frascos âmbar. Como padrão antioxidante, foi utilizado BHT (hidroxitolueno butilado, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA).

A solução do radical DPPH[•] (0,03 mM) foi preparada no dia da análise. Soluções estoque dos derivados vegetais foram preparadas na concentração de 1 mg/mL e solubilizadas

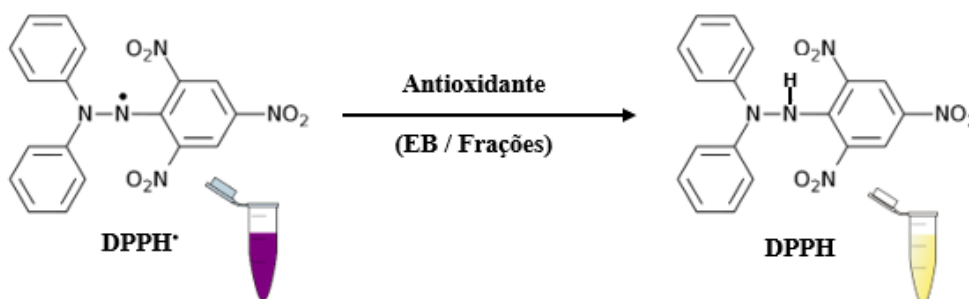
em vórtex por 1 min. A partir das soluções estoque, foram preparadas soluções teste em concentrações variando na faixa de 2,5 a 250 µg/mL. Para cada concentração avaliada, um controle negativo (apenas DPPH[•]), um controle positivo (apenas BHT) e um branco (amostra sem DPPH[•]) foram mensurados.

Em tubos Eppendorf[®], 500 µL da solução teste e 200 µL de DPPH[•] 0,03 mM (exceto brancos) foram aliquotados. Após 30 minutos de reação (Figura 15), a absorbância foi determinada a 517 nm por espectrofotômetro (AJX-1900 Micronal[®]). A porcentagem de atividade antioxidante (AA) foi calculada pela equação:

$$AA(\%) = \frac{100 - (Aa \times 100)}{Ac}$$

Onde Aa = Absorbância da amostra e Ac = Absorção do controle. A concentração correspondente a 50% de remoção do radical DPPH[•] (CI₅₀) também foi calculada, utilizando curva de calibração linear de concentração de extrato *versus* atividade antioxidante correspondente.

Figura 15 - Esquema geral da reação para o ensaio DPPH[•]: A solução contendo o radical (coloração roxa) é reduzida pelos compostos fenólicos presentes em *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*, tornando-se amarela.



Fonte: Próprio autor, com estruturas químicas do PubChem (2019) *

*Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=dpph>>. Acesso em 03 set 2019.

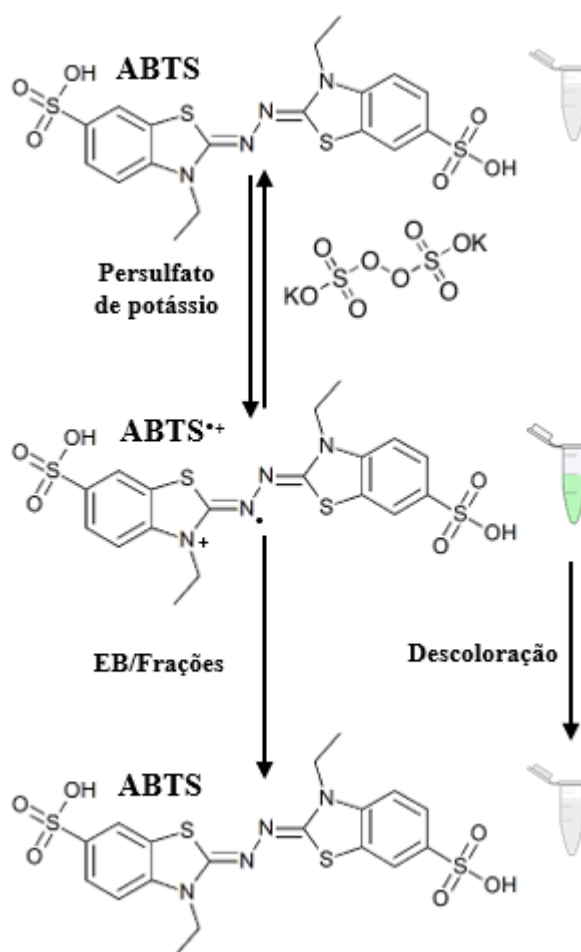
6.2.1.2 Radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

A capacidade redutora dos extratos/frações foi testada frente ao radical ABTS^{•+} e realizada como descrito por Re e colaboradores (1999). Todas as soluções deste ensaio foram preparadas em etanol e acondicionadas em frascos âmbar. O radical foi preparado na ausência de luz, através da mistura de 5 mL de uma solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM), armazenando-se a solução resultante na ausência de luz e em temperatura de 23 ± 2 °C por 16 horas.

Posteriormente, a solução contendo o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída até absorvância de $0,70 \pm 0,05$ uA a 734 nm (espectrofotômetro AJX-1900, Micronal®). Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 1,5 e 2 mM foi utilizado para a construção de uma curva padrão.

Soluções teste dos EBs e frações enriquecidas foram preparadas nas concentrações de 100; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para a reação (Figura 16), uma alíquota de 30 μL de cada solução teste foi transferida para um tubo contendo 3 mL da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos. Após 6 minutos, a absorvância foi medida a 734 nm (espectrofotômetro AJX-1900 Micronal®). Os resultados foram expressos como valores de Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET), equivalente a μmol Trolox por g de extrato (VAN DEN BERG et al., 1999).

Figura 16 - Esquema geral da reação para o ensaio $\text{ABTS}^{\bullet+}$: A solução contendo o radical é preparada a partir de reação em persulfato de potássio (coloração verde), e é reduzida pelos compostos fenólicos presentes em *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*, tornando-se incolor



Fonte: Próprio autor, com estruturas químicas do PubChem (2019) *

*Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=abts> >. Acesso em 03 set 2019.

6.2.2 Atividade antimicrobiana

6.2.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

A atividade antimicrobiana dos EBs e frações enriquecidas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* foi realizada frente a vinte e duas bactérias disponibilizadas pelo Hospital Militar de Área do Recife (MHR) e pela Universidade Federal de Pernambuco (Coleção do Departamento de Antibióticos, UFPEDA). Nas análises foram incluídas cepas Gram-positivas e Gram-negativas pertencentes a *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos, com linhagens multidroga-resistentes.

Os experimentos foram submetidos ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco sob registro nº 99925418.8.0000.5208 e aprovação nº 3.012.185 (Anexo C). Os sítios de infecção, a identificação bioquímica e o fenótipo de resistência das cepas foram previamente descritos e cedidos pelos fornecedores (Tabela 6). Para todos os testes de atividade antimicrobiana, os microrganismos foram manipulados sob condições estéreis e cultivados em ágar Mueller Hinton (MH) (Merck®, Darmstadt, Alemanha), a 37 °C por 24h. Os inóculos foram calibrados por suspensão de colônias em solução salina a 0,9% (v/v), ajustando-se turbidimetricamente a 0,5 na escala de McFarland em espectrofotômetro (AJX-1900 Micronal®) a 600 nm.

6.2.2.2 Determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima

O ensaio de suscetibilidade foi determinado por microdiluição em caldo, de acordo com critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para os fármacos de referência e por metodologia adaptada de Ferreira e colaboradores (2013), para os extratos brutos e frações. Para tanto, as amostras foram solubilizadas em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO):água (1:9 v/v) em concentração de 2 mg/mL. O inóculo calibrado (0,5 McFarland) foi diluído em solução salina 0,9% (1:50) e em caldo Muller-Hinton (MH) (Merck®, Darmstadt, Alemanha) (1:20) a fim de se obter concentração final de 10^5 UFC/mL. Em uma placa de 96 poços, 100 µL do inóculo preparado foram adicionados em todos os poços. Nos poços da linha A foram adicionados 100 µL da solução 2 mg/mL do extrato bruto ou fração a ser testado.

Tabela 6 - Origem e fenótipo de resistência dos microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana

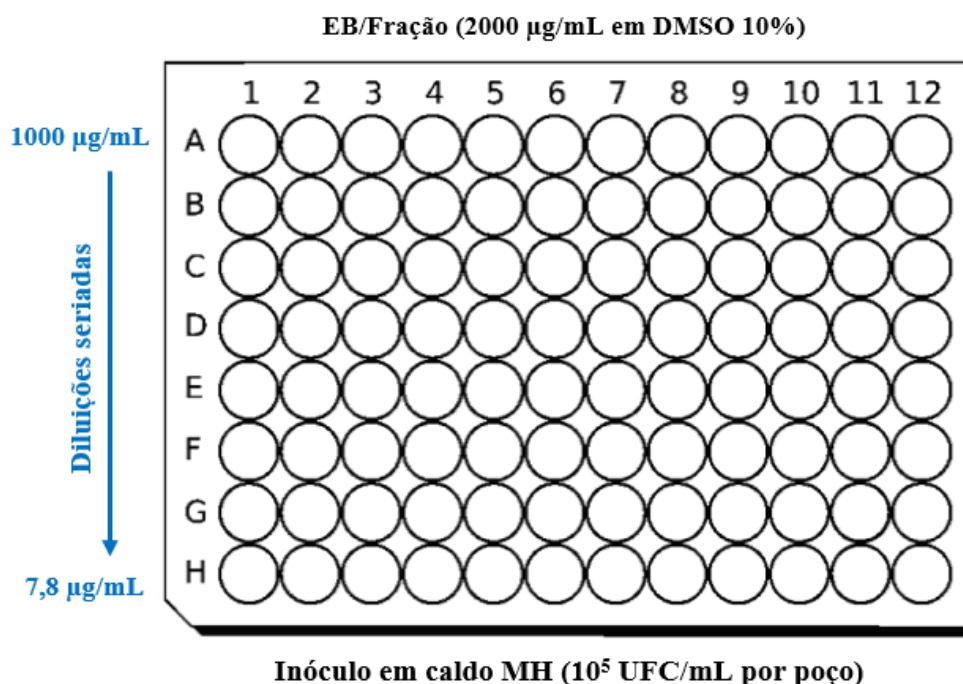
	CEPAS	ORIGEM	FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA
Gram-positivos	<i>Bacillus megaterium</i> UFPEDA462	ND	AMP; ERI; CIP; GEN; TET; CAZ; OXA; CXM, CTX
	<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA620	Hemocultura	AMP; CAZ; CIP; CTX; CXM; TET
	<i>Streptococcus agalactiae</i> MHR059VS	Secreção vaginal	Nenhum antibiótico
	<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA02 ^A	ATCC 25293	Cepa padrão
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> MHR073HC ^B	Hemocultura	AMP; AZI; CLIN; ERI; PEN; PTZ
	<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA	ATCC 16642	Cepa padrão
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UFPEDA833	Urocultura	AMP; TET
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i> MHR001UC	Urocultura	AMP; CEF, CIP, LEV, SXT
	<i>Escherichia coli</i> MHR044UC ^C	Urocultura	AMC; AMP; CAZ; CEF; CIP; FEP; LEV; SXT
	<i>Escherichia coli</i> UFPEDA224	ATCC 25922	Cepa padrão
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MHR180PC ^D	Ponta de cateter	AMC; AMP; CAZ; CEF; CFO; CIP; CRO; CST; CXM; ERT; FEP; GEN; IMI; LEV; NIT; PTZ; SXT
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MHR098UC ^D	Urocultura	AMC; AMP; CAZ; CEF; CFO; CIP; CRO; CXM; ERT; GEN; LEV; NIT; PTZ; SXT
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MHR180UC ^D	Urocultura	AMC; AMP; CAZ; CEF; CFO; CIP; CRO; CST; CXM; ERT; FEP; GEN; IMI; LEV; NIT; PTZ; SXT
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA396	ND	AMP; CAZ CEF; CIP; CTX; CXM, TET
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MHR173SN	Secreção nasal	Nenhum antibiótico
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MHR169TA ^B	Aspirado traqueal	AMI; AZT; CAZ; CIP; CST; FEP; GEN; LEV; PTZ
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MHR001UC ^B	Urocultura	AMI; AZT; FEP; CAZ; CIP; LEV; PTZ
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA416	ATCC 27853	Cepa padrão
	<i>Salmonella enteritidis</i> UFPEDA414	Escara	AMP; CAZ, CEF; CIP; CTX; CXM
	<i>Serratia marcescens</i> MHR172TA	Aspirado traqueal	AMC; AMI; AMP; CAZ; CEF; CFO; CIP; CRO; CXM; FEP; LEV; NIT; PTZ; SXT
	<i>Serratia marcescens</i> UFPEDA352	ND	AMP; CIP; CEF; CTX; CXM; ERI; GEN

^A MSSA: *S. aureus* metilicina-resistente; ^B Multidroga-resistente; ^C Produtor de β -lactamase de espectro estendido (ESBL); ^D Produtor de carbapenemase; ATCC: *American Type Culture Collection*; AMC: amoxicilina-clavulanato, AMI: amicacina; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; AZT: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefalotina; CFO: cefoxitina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; CST: colistina; CXM: cefuroxima; ERI: eritromicina; ERT: ertapenem; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; IMI: imipenem; LEV: levofloxacina; NIT: nitrofurantoína; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; PTZ: piperacilina tazobactam; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina; ND: não determinada.

Fonte: Próprio autor.

Diluições seriadas foram realizadas da linha A até a linha H, para obter concentrações variando de 1000 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17) dos extratos brutos/frações. O meio de cultura, o inóculo preparado em sistema DMSO-água (1:9 v/v) e soluções a 2 mg/mL de azitromicina, ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina (Pfizer® Inc., Nova York, EUA) foram utilizados como controle de esterilidade, controle negativo e padrões, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h e observadas quanto a presença ou ausência de crescimento. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração dos extratos brutos/frações capaz de reduzir visivelmente o crescimento bacteriano em 100%, comparando-se com o controle positivo. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), alíquotas de 5 μL de cada poço do experimento de CIM foram transpostas para placas de Petri (60×10 mm) contendo ágar Muller Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. A CBM correspondeu à menor concentração de EBs/frações capaz de inibir o crescimento visível do inóculo (FERREIRA et al., 2013).

Figura 17 - Representação do ensaio de determinação da CIM dos extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*



EB: Extrato Bruto; DMSO: Dimetilsufóxido; MH: Muller Hinton; UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Fonte: Próprio autor.

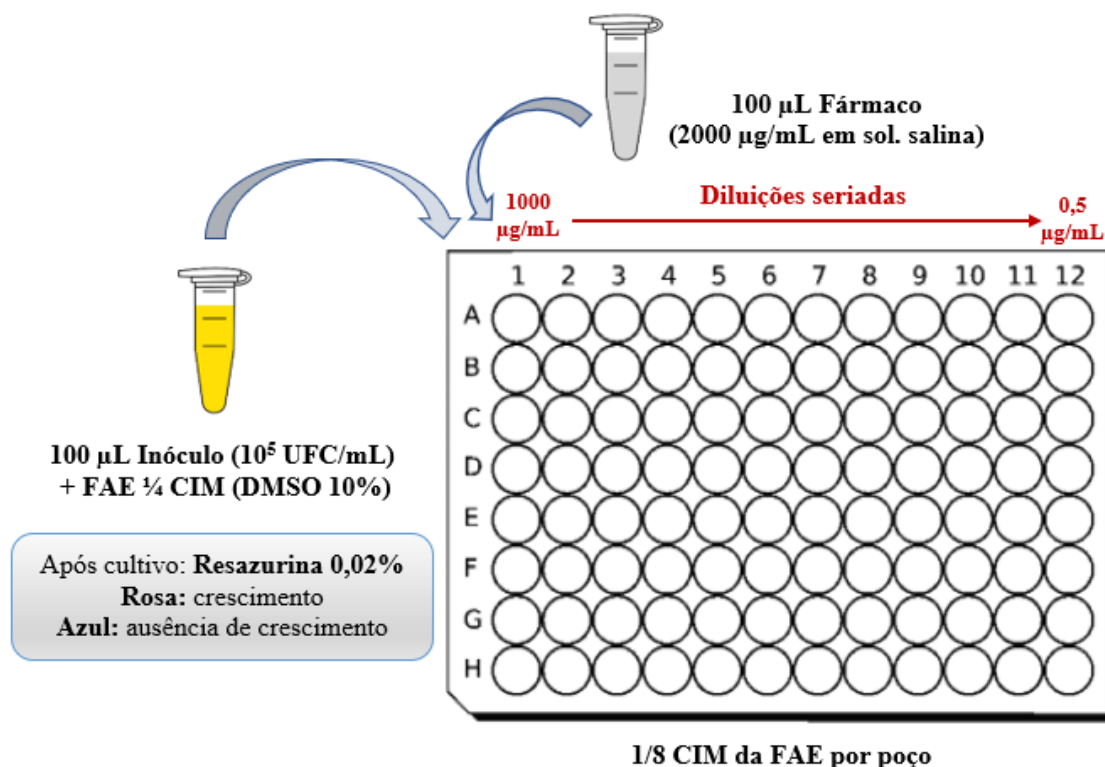
6.2.2.3 Determinação da atividade sinérgica das frações acetato de etila

Em metodologia adaptada de Coutinho, Costa e Lima (2008), a atividade moduladora das FAEs sob o desempenho de antibióticos convencionais foi testada, em concentrações subinibitórias. Para tanto, a partir dos resultados obtidos no experimento de CIM, as cepas consideradas resistentes aos antibióticos testados e simultaneamente suscetíveis às FAE foram selecionadas. Soluções das FAEs a 2 mg/mL foram preparadas em sistema DMSO-água (1:9 v/v), e soluções dos fármacos azitromicina, ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina (Pfizer® Inc., Nova Iorque, EUA) foram preparadas a 2 mg/mL em solução salina.

Para a análise, o inóculo calibrado (0,5 McFarland) foi diluído em caldo Muller Hinton (Merck®, Darmstadt, Alemanha) até a obtenção de concentração final de 10^5 UFC/mL por poço. Em tubos Eppendorf®, um volume de 1,5 mL do inóculo preparado e um volume correspondente a 1/4 da CIM de cada FAE foi adicionado, a fim de atingir 1/8 da CIM da FAE por poço. Em placas de 96 poços, 100 µL desta mistura foi adicionado horizontalmente aos poços. No poço 1 foram adicionados 100 µL da solução antibiótica a ser testada e diluições seriadas foram realizadas até o 12º poço, a fim de obter concentrações variando de 1000 a 0,5 µg/mL (Figura 18).

Utilizou-se o meio de cultura e o inóculo preparado em DMSO-água (1:9 v/v) como controle de esterilidade e controle negativo, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h e 20 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) foram adicionados a cada poço, incubando-se as placas por 3 horas a 35 °C. A presença ou ausência de crescimento bacteriano foi evidenciada pelo aparecimento de coloração rósea ou azul, respectivamente. O efeito modulador foi determinado a partir do percentual de redução da CIM individual de cada antimicrobiano testado na presença das FAEs; sendo interpretado como antagônico (aumento da CIM), sinérgico (redução da CIM) ou inerte (sem redução) (COUTINHO; COSTA; LIMA, 2008).

Figura 18 - Representação do ensaio de avaliação da interferência das frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* na resistência aos antimicrobianos convencionais



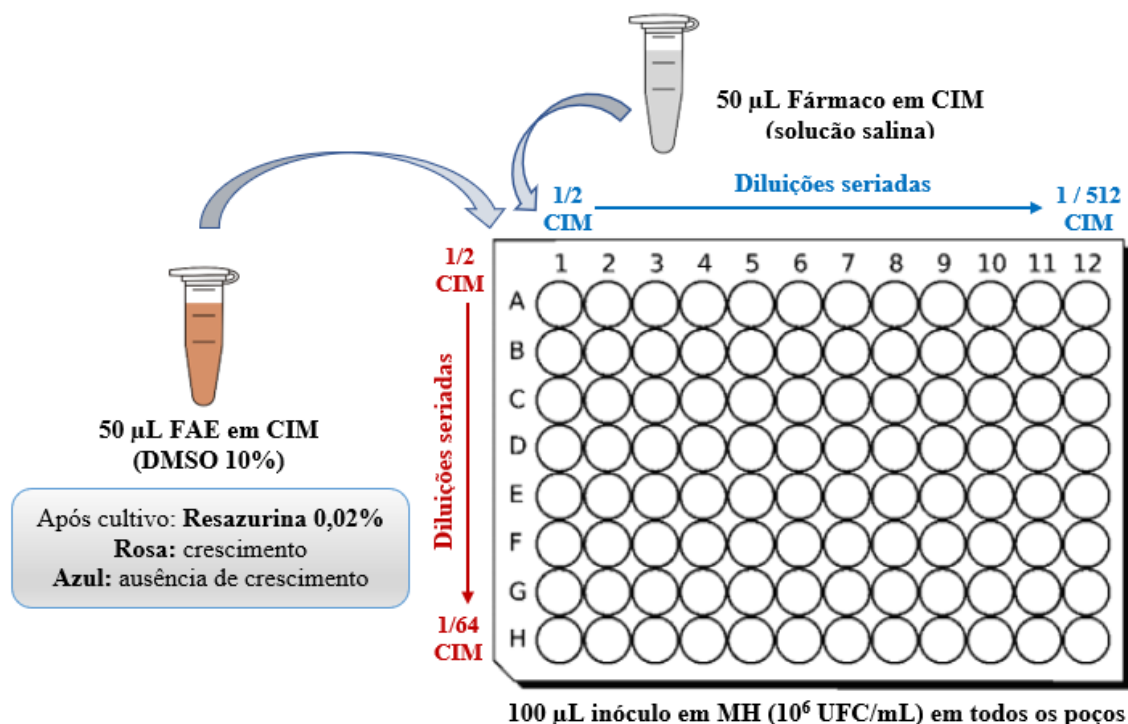
Fonte: FAE: Fração acetato de etila; CIM: Concentração Inibitória Mínima; DMSO: Dimetilsufóxido; UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Próprio autor.

As associações consideradas sinérgicas no ensaio de modulação foram selecionadas para avaliação pelo método *Checkerboard*. Para tanto, FAEs a 2 mg/mL em DMSO-água (1:9 v/v) foram associadas aos mesmos antibióticos e cepas previamente utilizados. Novas soluções foram preparadas de modo a obter-se concentrações subinibitórias variando de 1/2 a 1/64 do valor de CIM das FAEs e de 1/2 para 1/512 do valor de CIM para o antibiótico testado.

Em placa de 96 poços, 50 µL da FAE foram adicionados na orientação vertical e 50 µL da solução antibiótica foram adicionados na orientação horizontal. Subsequentemente, 100 µL do inóculo padronizado a 10^6 UFC/mL foram adicionados a cada poço, incubando-se por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, 20 µL de resazurina aquosa a 0,02% foram adicionados em todas as placas, incubando por 3 horas a 35 °C para a análise de presença ou ausência de crescimento microbiano (Figura 19).

Figura 19 - Representação do ensaio *Checkerboard* para avaliação do sinergismo entre as frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* e antimicrobianos convencionais



FAE: Fração acetato de etila; CIM: Concentração Inibitória Mínima; DMSO: Dimetilsufóxido; MH: Muller Hinton; UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Fonte: Próprio autor.

Para avaliar a atividade antimicrobiana das combinações, calculou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), conforme equação:

$$FICI = \frac{CIM \text{ fármaco} + \text{extrato/fração}}{CIM \text{ fármaco}} + \frac{CIM \text{ fármaco} + \text{extrato/fração}}{CIM \text{ extrato/fração}}$$

Os resultados foram interpretados como: $FICI \leq 0,5$, sinergismo; $0,5 < FICI < 4$ sem interação e $FICI > 4$, antagonismo (WEI; XU; WU, 2011).

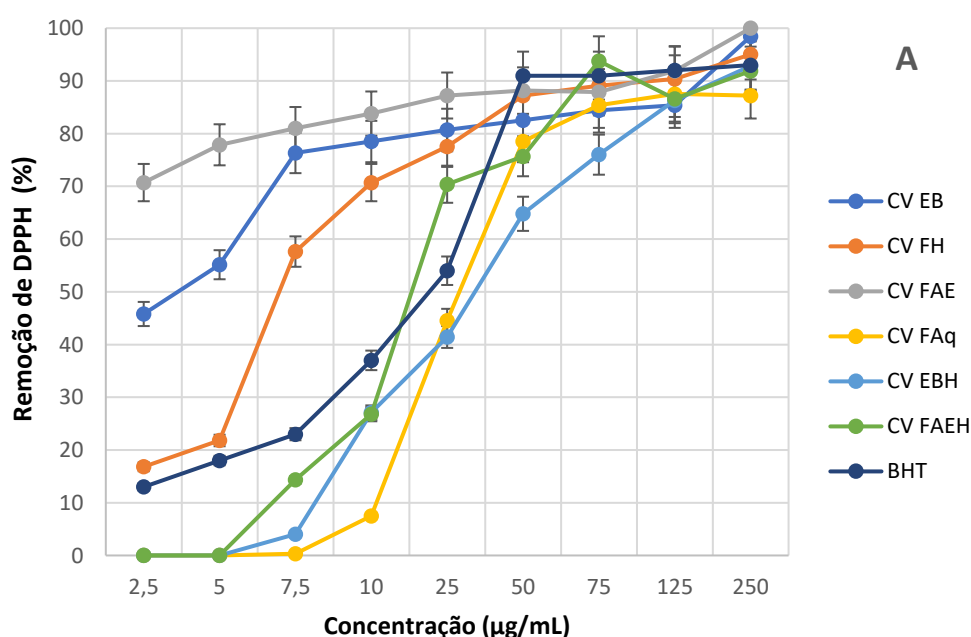
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

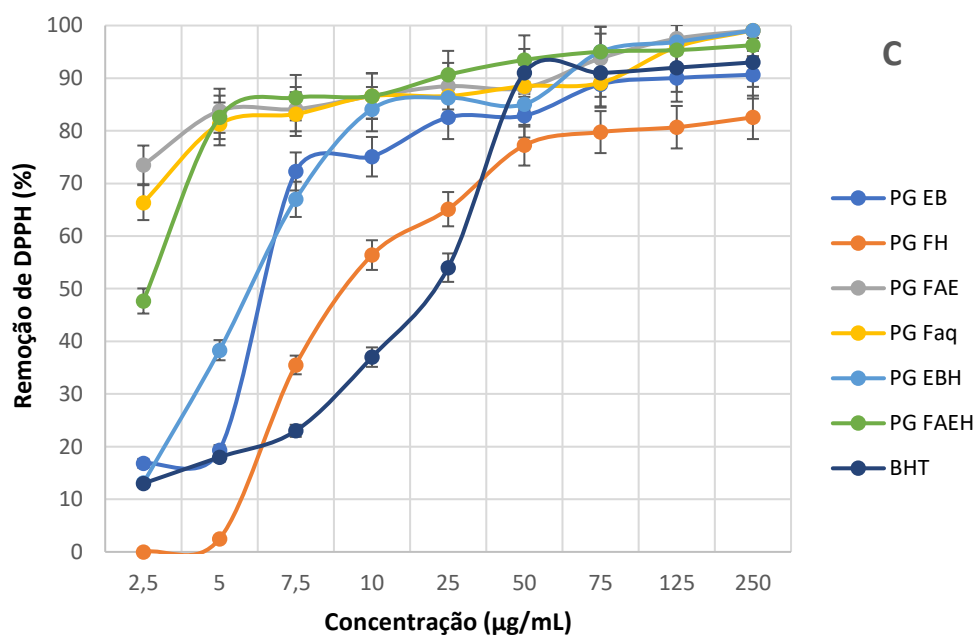
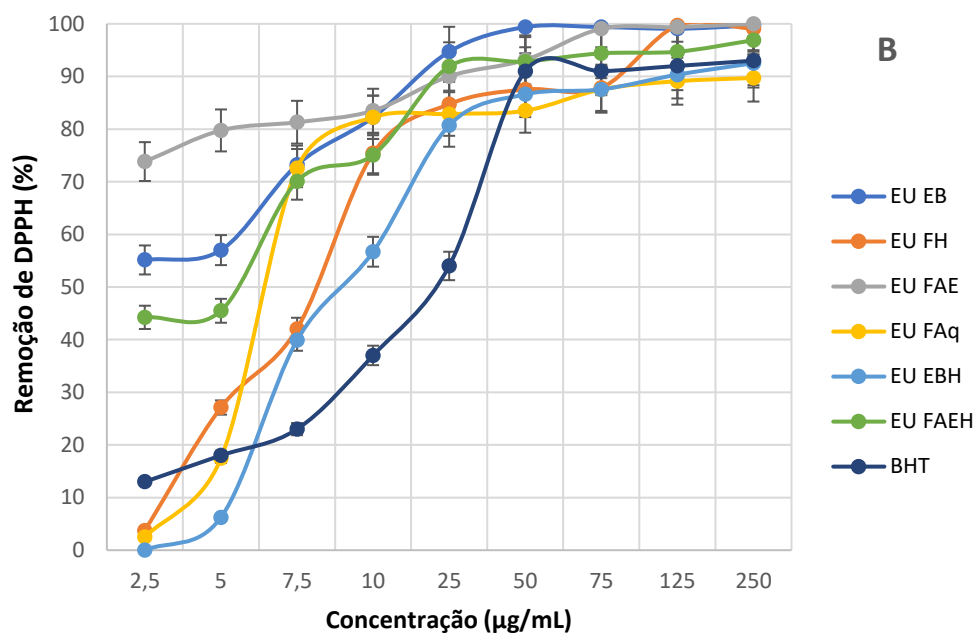
6.3.1 Atividade antioxidante

O perfil antioxidante foi determinado com o objetivo de investigar o potencial dos extratos brutos e seu desempenho após o fracionamento. Os ensaios DPPH e ABTS são os testes mais comuns para avaliação da atividade antioxidante, devido à sua sensibilidade, rapidez e uso de radicais estáveis. Essa remoção é baseada em diferentes mecanismos e a reatividade dos compostos fenólicos depende de suas estruturas químicas (CHEN et al., 2018; OLSZOWY; DAWIDOWICZ, 2018).

Na presença de um composto redutor tal como flavonoides, o radical DPPH[•] pode ser removido através da doação de hidrogênio ou elétron, tornando-se uma molécula diamagnética estável com absorvância reduzida (MAREČEK et al., 2017). A Figura 20 mostra uma curva dose-resposta da atividade de eliminação do radical DPPH[•] por extratos brutos e frações das folhas de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*. O Quadro 10 traz as concentrações, em µg/mL, correspondentes a 50% de remoção do radical DPPH[•] (CI₅₀) pelos extratos brutos/frações analisados.

Figura 20 - Percentual de remoção do radical DPPH[•] pelos extratos brutos/frações das folhas de *C. verum* (A), *E. uniflora* (B) e *P. granatum* (C)





CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; EB: extrato bruto; EBH: extrato bruto após hidrólise; FAEH: fração de acetato de etila; FAEH: fração de acetato de etila após hidrólise; FAq: fração aquosa; FH: fração hexânica; BHT: Hidroxitolueno butilado

Fonte: Próprio autor.

Quadro 10 - CI_{50} dos extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* para remoção do radical DPPH*

CI_{50} para remoção do radical DPPH* ($\mu\text{g/mL}$)								
	CI_{50}	R^2		CI_{50}	R^2		CI_{50}	R^2
CV EB	3,51	0,9523	EU EB	2,18	0,9999	PG EB	7,00	0,9876
CV FH	5,36	0,9328	EU FH	7,77	0,9328	PG FH	9,84	0,9749
CV FAE	1,82	0,9508	EU FAE	1,46	0,9908	PG FAE	1,64	0,9999
CV FAq	29,01	0,9999	EU FAq	6,83	0,9999	PG FAq	2,11	0,9999
CV EBH	34,23	0,9999	EU EBH	9,79	0,9182	PG EBH	5,98	0,9987
CV FAEH	13,95	0,9935	EU FAEH	5,46	0,9999	PG FAEH	2,67	0,9999
BHT	20,51	0,9955	BHT	20,51	0,9955	BHT	20,51	0,9955

CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; EB: extrato bruto; EBH: extrato bruto após hidrólise; FAEH: fração de acetato de etila; FAEH: fração de acetato de etila após hidrólise; FAq: fração aquosa; FH: fração hexânica; BHT: Hidroxitolueno butilado

Fonte: Próprio autor.

A avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH demonstrou variação entre os diferentes extratos e frações, o que está diretamente relacionado às diferenças no perfil fitoquímico das espécies vegetais. O menor valor de CI_{50} , que corresponde à maior atividade de eliminação do radical DPPH*, foi obtido para a FAE de *E. uniflora* (1,46 $\mu\text{g/mL}$, R^2 0,9908), o que corrobora com o maior teor de compostos fenólicos apresentados para esta espécie (28% de rutina e 4,58% de miricitrina) (Seção 5). Em uma extração etanólica supercrítica em duas etapas, Martinez-Correa e colaboradores (2011) encontraram um valor de CI_{50} ligeiramente superior de 5 $\mu\text{g/mL}$ para *E. uniflora*. Ademais, a CI_{50} do EB de *E. uniflora* foi inferior à encontrada por Cunha e colaboradores (2016), onde o extrato etanólico obtido por maceração das folhas apresentou apenas 20% de remoção de DPPH* na concentração de 240 $\mu\text{g/mL}$.

Em contraste, a FAq de *C. verum* apresentou a maior CI_{50} (29,01 $\mu\text{g/mL}$, R^2 0,9998) dentre as amostras analisadas. Entretanto, Prasad e colaboradores (2009) avaliaram o potencial antioxidante de diferentes espécies de *Cinnamomum* spp. e concluíram que *C. verum* tem a maior atividade de remoção de DPPH (92% a 100 $\mu\text{g/mL}$), em extrato etanólico de folhas obtido pelo método de alta pressão hidrostática. Nesta mesma concentração, 100 $\mu\text{g/mL}$, a FAq de *C. verum* obtida neste estudo exibiu remoção acima de 85% no teste DPPH, mesmo apresentando a mais alta CI_{50} .

Em destaque, as CI_{50} de todas as FAEs foram onze vezes menores que o valor do CI_{50} para o controle BHT (20,51 $\mu\text{g/mL}$, R^2 0,9955). Todas as frações hexânicas apresentaram valores de CI_{50} maiores que o EB correspondente, o que vai de acordo com o enriquecimento de compostos fenólicos promovido pela partição. Em geral, a estrutura química dos flavonoides confere atividade antioxidante significativa, e os resultados obtidos são sugestivos de um mecanismo de transferência de elétrons. Neste tipo de reação, as amostras reagem instantaneamente mesmo em baixas concentrações, o que pode ser observado na Figura 20A, 20B e 20C (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Sabe-se que o DPPH $\cdot$ reage com polifenóis, mas não com ácidos fenólicos e açúcares, compostos mais hidrossolúveis. Além disso, em ensaios de DPPH para matrizes complexas tais como extratos vegetais, tem sido relatadas limitações de acessibilidade estérica ao radical ou dificuldades para detecção de sinergismos e/ou antagonismos (JABBARI; JABBARI, 2016; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). A fim de esclarecer alguns desses possíveis efeitos, os experimentos de DPPH foram realizados também usando EB e FAE hidrolisados.

A manutenção dos valores reduzidos de CI_{50} para os EBH e as FEAH de *E. uniflora* e *P. granatum* está relacionada à presença de ácidos livres e agliconas, como ácido gálico, elágico e quercetina, respectivamente; enquanto *C. verum* apresenta derivados C-glicosilados, levando à diminuição da atividade antioxidante nas amostras hidrolisadas. A redução crucial da remoção do DPPH $\cdot$ nas amostras hidrolisadas de *C. verum* sugere também atividade sinérgica mediada por taninos condensados (Seção 5). Considerando os resultados da FAEH de *P. granatum*, a manutenção da propriedade antioxidante pode ser correlacionada ao maior teor de quercetina, em comparação a *E. uniflora* (Seção 5).

O ensaio antioxidante para ABTS é aplicável a ambos compostos hidrofílicos e lipofílicos (MATHEW; ABRAHAM, 2006). O grupo cromóforo do cátion ABTS $^{+}$ é gerado diretamente pela utilização de persulfato de potássio como agente oxidante. A Tabela 7 mostra os resultados do ensaio ABTS expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET).

Tabela 7 - Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox dos extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* para remoção do radical ABTS^{•+}

Amostras	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (μM ET/g extrato)			
	EB	FH	FAE	FAq
CV	55,59 ± 0,001	52,96 ± 0,005	73,24 ± 0,002	25,43 ± 0,002
EU	76,74 ± 0,003	65,05 ± 0,001	78,45 ± 0,001	64,06 ± 0,004
PG	68,62 ± 0,001	67,00 ± 0,004	68,99 ± 0,003	27,52 ± 0,003

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. ET: Equivalentes Trolox; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; EB: Extrato Bruto; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FAq: Fração Aquosa.

Fonte: Próprio autor.

A equação da curva de calibração Trolox obtida foi $y = 0,0003x - 0,6403$, com coeficiente de correlação consistente ($R^2 = 0,9993$). Em concordância com os resultados do teste DPPH, a FAE de *E. uniflora* exibiu os maiores valores de CAET (78,45 μM ET/g) e a FAq de *C. verum* demonstrou os menores valores (CAET 25,43 μM ET/g). Considerando a CAET da quercetina citada por Salah e colaboradores (1995) em etanol (4,72 μM/g) no ensaio ABTS, a CAET mais inexpressiva (FAq de *C. verum*) ainda foi cerca de 5 vezes superior ao resultado obtido por Salah.

O menor declínio da CAET entre 100-250 μg/mL e reação pronunciada até a concentração mais alta (dados não mostrados) representa ainda mecanismo de transferência de elétrons. Entretanto, compostos fenólicos com grupos laterais volumosos ou anéis múltiplos (ex: punicalagina, presente na espécie *P. granatum*) (SOUZA et al., 2018) podem impedir a difusão e orientação em relação ao radical ABTS^{•+}. Nesse contexto, o extrato e as frações analisados também podem atuar parcialmente por transferência mais lenta de átomos de hidrogênio para o cátion ABTS^{•+}.

Recentemente, Chen e colaboradores (2018) sugeriram que em meios polares, como o etanol, o mecanismo de reação mais plausível para flavonoides pode ser a via de transferência de átomos de hidrogênio. Além disso, os perfis químicos das plantas demonstraram compostos fenólicos de pequeno peso molecular (ex: ácido gálico e clorogênico), proporcionando taxas iniciais rápidas e mostrando um aumento linear em baixas concentrações. Com objetivo de selecionar derivados de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* com capacidade de atuação em mais alvos terapêuticos, foram considerados estudos de atividade antimicrobiana, posteriormente ao potencial antioxidante comprovado.

6.3.2 Atividade antimicrobiana

6.3.2.1 Determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima

O potencial antimicrobiano dos extratos brutos e frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* foi verificado em uma triagem frente a vinte e duas bactérias, distribuídas em dez gêneros diferentes, incluindo isolados clínicos hospitalares. Os valores de CIM/CMB estão descritos na Tabela 8 (Gram-positivos) e Tabela 9 (Gram-negativos). Este estudo foi realizado com o objetivo de selecionar cepas resistentes a antibióticos sintéticos e simultaneamente suscetíveis aos ativos vegetais.

As cepas Gram-positivas mostraram-se mais sensíveis aos extratos e frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*. Dentre as Gram-negativas, *Serratia marcescens* mostrou-se mais susceptível as FAE de *E. uniflora* e *P. granatum* (CIM de 7,81 µg/mL); entretanto *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* exibiram baixa sensibilidade a maioria dos extratos e frações avaliados (CIM $\geq$ 1000 µg/mL). Essa resistência pode ser mediada pelo lipopolissacarídeo da membrana, que contribui para a integridade estrutural desses bacilos e dificulta a interação entre os fitoquímicos e a membrana externa (REGIEL-FUTYRA et al., 2017).

Os menores valores de CIM neste estudo (7,81 µg/mL) foram obtidos para as FAE de *E. uniflora* e *P. granatum* contra os isolados clínicos Gram-positivos de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus epidermidis*. Em relação à cepa *Enterococcus faecalis*, a CIM encontrada foi no mínimo 30 vezes menor que o fármaco ciprofloxacina, o que confirma a atividade inibitória das amostras testadas. Além disso, a literatura cita que quando o valor de CBM obtida corresponde a um valor até quatro vezes maior que o da respectiva CIM em ensaios para ativos vegetais, é plausível que o extrato tenha atividade antimicrobiana (KANG et al., 2011). Essa relação foi observada em todos os extratos ativos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* testados. Vale ressaltar que os valores de CBM encontrados para os ativos sugerem mecanismo de ação bactericida. Para as amostras de EB/frações que apresentaram valores de CIM superiores a 1000 µg/mL, ou seja, total crescimento bacteriano, a CBM não foi determinada.

Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima para extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* e para fármacos convencionais frente a bactérias Gram-positivas

Cepas	Origem	Concentração Inibitória Mínima/Concentração Bactericida Mínima (µg/mL)														AMP	AZI	CIP	GEN
		<i>C. verum</i>				<i>E. uniflora</i>				<i>P. granatum</i>									
		EB	FH	FAE	FAq	EB	FH	FAE	FAq	EB	FH	FAE	FAq						
<i>B. megaterium</i> UFPEDA462	ND	* / ND	* / ND	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	1000 / >1000	1000 / >1000	125 / 500	1000 / >1000	128 / 256	32 / 64	64 / 128	16 / 32		
<i>E. faecalis</i> UFPEDA620	Hemocultura	500 / 1000	1000 / >1000	125 / 250	250 / 1000	125 / 250	250 / 500	15,62 / 31,25	125 / 250	125 / 500	125 / 500	7,81 / 31,25	31,25 / 64,5	256 / 512	128 / 256	256 / 512	128 / 256		
<i>S. agalactiae</i> MHR059VS	Secreção vaginal	* / ND	* / ND	31,25 / 62,5	* / ND	125 / 250	250 / 500	7,81 / 15,62	62,5 / 125	15,62 / 31,25	62,5 / 250	7,81 / 15,62	125 / 250	0,12 / 0,24	0,12/ 0,24	0,12/ 0,24	0,12 / 0,24		
<i>S. aureus</i> UFPEDA02 ^A	ATCC 25293	250 / 500	250 / 1000	125 / 250	250 / 500	125 / 250	250 / 500	62,5 / 125	125 / 250	125 / 250	250 / 500	62,5 / 125	125 / 250	3,12 / 6,24	0,39 / 0,78	3,12 / 6,24	0,39 / 0,78		
<i>S. epidermidis</i> MHR073HC ^B	Hemocultura	* / ND	* / ND	250 / 1000	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	7,81 / 15,62	250 / 500	125 / 250	500 / 1000	7,81 / 15,62	250 / 500	512 / 1024	128 / 256	128 / 256	64 / 128		
<i>S. pyogenes</i> UFPEDA	ATCC 16642	250 / 500	250 / 500	250 / 500	250 / 500	250 / 500	250 / 500	125 / 250	250 / 500	125 / 250	250 / 500	125 / 250	250 / 500	3,12 / 6,24	3,12 / 6,24	3,12 / 6,24	3,12 / 6,24		
<i>S. saprophyticus</i> UFPEDA833	Urocultura	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	500 / 1000	1000 / >1000	125 / 250	500 / 1000	500 / 1000	1000 / >1000	500 / 1000	1000 / >1000	32 / 64	0,39 / 0,78	16 / 32	16 / 32		

^A MSSA: *S. aureus* metilina-sensível; ^B Multidroga-resistente; ATCC: *American Type Culture Collection*; EB: Extrato Bruto; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FAq: Fração Aquosa; AMC: amoxicilina-clavulonato; AMI: amicacina; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; AZT: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefalotina; CFO: cefoxitina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; CST: colistina; CXM: cefuroxima; ERI: eritromicina; ERT: ertapenem; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; IMI: imipenem; LEV: levofloxacina; NIT: nitrofurantoína; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; SXT: sulfametoxazol/trimetoprima; TET: tetraciclina; ND: não determinado; * sem inibição; - não testado.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima para extratos brutos/frações de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* e para fármacos convencionais frente a bactérias Gram-negativas

Cepas	Origem	Concentração Inibitória Mínima/Concentração Bactericida Mínima (µg/mL)														AMP	AZI	CIP	GEN
		<i>C. verum</i>				<i>E. uniflora</i>				<i>P. granatum</i>									
		EB	FH	FAE	FAq	EB	FH	FAE	FAq	EB	FH	FAE	FAq						
<i>E. aerogenes</i> MHR062UC	Urocultura	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	62.5 / 125	250 / 500	62.5 / 125	125/ 250	250 / 500	1000 / >1000	125/ 250	500 / 1000	64 / 128	-	32 / 64	16 / 32		
<i>E. coli</i> MHR001UC	Urocultura	* / ND	* / ND	500 / 1000	* / ND	1000 / >1000	* / ND	125/ 250	1000 / >1000	125/ 250	250 / 500	125/ 250	250 / 500	32 / 64	-	32 / 64	16 / 32		
<i>E. coli</i> MHR044UC ^c	Urocultura	* / ND	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	250 / 500	500 / 1000	125/ 250	500 / 1000	250 / 500	500 / 1000	125/ 250	250 / 500	>1024/ ND	-	256 / 128	128 / 64		
<i>E. coli</i> UFPEDA224	ATCC 25922	1000 / 1000	* / ND	500 / 1000	500 / 1000	125/ 250	500 / 1000	15.62/ 31.25	62.5 / 125	125/ 250	500 / 1000	15.62 / 31.25	62.5 / 125	0.39 / 0.78	-	0.39 / 0.78	0.39 / 0.78		
<i>K. pneumoniae</i> MHR180PC ^d	Ponta de cateter	* / ND	* / ND	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	* / ND	1000 / >1000	500 / 1000	250 / 500	* / ND	1024 / >1024	-	512 / 256	512 / 256		
<i>K. pneumoniae</i> MHR098UC ^d	Urocultura	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	1000 / >1000	1000 / >1000	125/ 250	250 / 500	500 / 1000	1000 / >1000	125/ 250	1000 / >1000	512 / 256	-	256 / 512	256 / 512		
<i>K. pneumoniae</i> MHR180UC ^d	Urocultura	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	1000 / >1000	* / ND	250 / 500	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	250 / 500	1000 / >1000	1024 / >1024	-	512 / 256	512 / 256		
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA396	ND	* / ND	* / ND	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	* / ND	1000 / >1000	500 / 1000	250 / 500	* / ND	128 / 256	-	32 / 64	32 / 64		
<i>P. aeruginosa</i> MHR173SN	Secreção nasal	1000 / >1000	1000 / >1000	500 / 1000	500 / 1000	500 / 1000	1000 / >1000	250 / 500	250 / 500	500 / 1000	500 / 1000	250 / 500	500 / 1000	-	-	0.39 / 0.78	0.39 / 0.78		
<i>P. aeruginosa</i> MHR169TA ^b	Aspirado traqueal	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	* / ND	500 / 1000	1000 / >1000	1000 / >1000	1000 / >1000	500 / 1000	* / ND	-	-	>1024 / ND	>1024 / ND		
<i>P. aeruginosa</i> MHR001UC ^b	Urocultura	* / ND	* / ND	500 / 1000	500 / 1000	500 / 1000	500 / 1000	250 / 500	250 / 500	500 / 1000	500 / 1000	250 / 500	1000 / >1000	-	-	512 / 256	512 / 256		
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA416	ATCC 27853	1000 / >1000	1000 / >1000	500 / 1000	500 / 1000	500 / 1000	1000 / >1000	250 / 500	250 / 500	500 / 1000	500 / 1000	250 / 500	500 / 1000	-	-	0.39 / 0.78	0.39 / 0.78		
<i>S. enteritidis</i> UFPEDA414	Escara	* / ND	* / ND	1000 / >1000	* / ND	1000 / >1000	* / ND	500 / 1000	* / ND	1000 / >1000	* / ND	500/ 1000	* / ND	64 / 128	-	64/ 128	64 / 128		
<i>S. marcescens</i> MHR172TA	Aspirado traqueal	500 / 1000	250 / 500	125/ 250	250 / 500	31.25 / 62.5	62.5 / 125	15.62 / 31.25	31.25 / 62.5	125/ 250	125/ 250	15.62 / 31.25	31.25 / 62.5	128 / 256	-	64 / 128	64 / 128		
<i>S. marcescens</i> UFPEDA352	ND	250 / 500	125/ 250	62.5 / 125	125/ 250	31.25 / 62.5	31.25 / 62.5	7.81 / 15.62	15.62 / 31.25	62.5 / 125	125/ 250	7.81 / 15.62	31.25 / 62.5	32 / 64	-	16 / 32	16 / 32		

^b Multidroga-resistente; ^c Produtor de β-lactamase de espectro estendido (ESBL); ^d Produtor de carbapenemase. ATCC: *American Type Culture Collection*; EB: Extrato Bruto; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FAq: Fração Aquosa; AMC: amoxicilina-clavulonato; AMI: amicacina; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; AZT: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefalotina; CFO: cefoxitina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; CST: colistina; CXM: cefuroxima; ERI: eritromicina; ERT: ertapenem; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; IMI: imipenem; LEV: levofloxacina; NIT: nitrofurantoína; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; SXT: sulfametoxazol/trimetoprima; TET: tetraciclina; ND: não determinado; * sem inibição; - não testado.

Fonte: Próprio autor.

O processo de fracionamento proporcionou o aumento da atividade antimicrobiana nas frações acetato de etila para Gram-positivos, exceto *C. verum* para *Bacillus megaterium* UFPEDA462 e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA; e *P. granatum* para *Streptococcus pyogenes* UFPEDA e *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA833. Nestes, as CIM permaneceram inalteradas quando comparadas aos respectivos extratos brutos. Este fato pode estar atrelado a fatores de virulência inerentes a estes microrganismos, onde *B. megaterium* e *S. pyogenes* constituem cocos encapsulados (LINO, 2010; LÓPEZ; ALIPPI, 2010) e *S. saprophyticus* um produtor de adesinas e urease, estando esta última descrita também em Gram-negativos como *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (CARVALHO, 2014). A presença de urease também pode estar relacionada aos altos valores de CIM/ausência de atividade das amostras analisadas contra *K. pneumoniae*.

Estudos prévios demonstraram atividade antibacteriana do extrato da casca de *C. verum*, em valores mais baixos de CIM, de 1,51 µg/mL (KOH et al., 2013) e 0,4 µg/mL (RATH; PADHY, 2014) frente a Gram-positivos e Gram-negativos multirresistentes, respectivamente. Neste trabalho, as CIM obtidas para *C. verum* para Gram-positivos variaram de 250-1000 µg/mL para o EB e de 125-500 µg/mL para a FAE. A menor concentração obtida (250 µg/mL) para o EB frente a *S. aureus* UFPEDA02, *S. pyogenes* UFPEDA e *S. marcescens* UFPEDA352, em comparação aos trabalhos supracitados pode ser resultante do uso das folhas, que apresentam maiores teores de óleos voláteis do que as cascas, compostos estes com reconhecida atividade antimicrobiana (Seções 4 e 5); e também é devido à perda destes compostos por direcionamento da extração para incremento de compostos fenólicos.

O extrato metanólico da romã a 0,05% (v/v) inibiu a produção de enterotoxina estafilocócica de *Staphylococcus aureus* (BRAGA et al., 2005), bem como o extrato da romã obtido por alta pressão demonstrou atividade contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* MRSA (ALEXANDRE et al., 2019) e sinergismo com penicilina frente a *S. aureus* MRSA (ENDO et al., 2018). No entanto, há poucas pesquisas acerca da atividade antibacteriana dos extratos de folhas de *C. verum* e *P. granatum*, considerando que a coleta desse farmacógeno é menos prejudicial ao arbusto e também mais disponível, devido à sazonalidade da romã. No experimento de determinação de CIM aqui apresentado, o extrato bruto e frações enriquecidas das folhas de *P. granatum* apresentaram atividade frente a todos os Gram-positivos testados, com CIM variando de 15,62-1000 µg/mL e de 7,81-125 µg/mL, respectivamente.

Em relação a *E. uniflora*, os extratos das folhas foram descritos como eficazes contra leveduras, incluindo formas planctônicas de *Candida glabrata* e *Candida krusei* (CIM de 15,62 µg/mL para ambas) (FERREIRA et al., 2013; LAGO et al., 2011) e formas sésseis de *Candida albicans*, reduzindo a viabilidade do biofilme em 54-55% (SARDI et al., 2017). Alguns estudos atribuem as atividades antimicrobianas de *E. uniflora* também a seus óleos essenciais (FIGUEIREDO et al., 2019; PEREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018; VICTORIA et al., 2012). As CIM dos bioativos das folhas de *E. uniflora* testados neste trabalho apresentaram valores compreendidos entre 125-1000 µg/mL para o EB e de 7,81-500 µg/mL para as FAE, o que claramente evidencia que a atividade bacteriana pode ser também via compostos fenólicos (Seção 5).

Estudos indicam que o mecanismo bactericida proporcionado por compostos fenólicos é mediado principalmente via agregação celular, sendo demonstrado para compostos como catequina, galangina, galato de epicatequina e formononetina (CUSHNIE; LAMB, 2011; PARK et al., 2017). Entretanto, a redução do número de unidades formadoras de colônias (UFC) observada no experimento de CBM pode estar atribuída à aglomeração bacteriana e não à morte celular *per si*. Uma abordagem abrangente para elucidar o efeito bactericida de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*, neste caso, seria testes complementares de curva de morte celular (ou método *time-kill*) associado a microscopia das bactérias tratadas.

Considerando a relação estrutura/atividade, compostos como flavonóis, flavan-3-óis e taninos condensados danificam a membrana citoplasmática bacteriana por geração de peróxido de hidrogênio (BUCEKOVA et al., 2018; TAJIMA et al., 2016); e taninos hidrolisáveis e isoflavonas estão relacionados à inibição da síntese de ácidos nucleicos, através da inibição da di-hidrofolato redutase (BETTS et al., 2015; SANTOS et al., 2016) e/ou topoisomerase (BARIK; TALUKDAR, 2018). Flavonas e isoflavonas também podem inibir o metabolismo energético, através da inibição da ATP sintase bacteriana (GÓRNIAK; BARTOSZEWSKI; KRÓLICZEWSKI, 2019; MEHTA, 2018).

Outros mecanismos antimicrobianos também têm sido propostos para flavonoides, como inibição da síntese da parede celular por inibição de D-alanina-D-alanina ligase (SINGH et al., 2018) e inibição da síntese da membrana celular por inibição de enzimas que atuam na biossíntese de ácidos graxos, como a FabG, Fab e FabZ (FARHADI et al., 2019).

6.3.2.2 Determinação da atividade sinérgica das frações acetato de etila

Baseada no perfil de suscetibilidade obtido para as FAEs, foi realizada a avaliação da interferência dessas frações enriquecidas na resistência aos antibióticos convencionais. A seleção dos fármacos levou em consideração os diferentes espectros e mecanismos de ação, incluindo neste estudo um representante β -lactâmico, um macrolídeo, uma fluoroquinolona e um aminoglicosídeo.

Escherichia coli MHR 044UC; *Klebsiella pneumoniae* MHR 098UC; *Pseudomonas aeruginosa* MHR 169AT, *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414 e *Staphylococcus epidermidis* MHR 073HC foram selecionadas para o ensaio modulatório, utilizando concentrações fixas das FAEs equivalentes a 1/8 de cada valor de CIM. A seleção das cepas foi baseada na suscetibilidade às FAEs e resistência aos fármacos testados. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antibióticos convencionais frente a cepas multidroga-resistentes, na ausência e presença de concentrações subinibitórias (1/8 da CIM) das frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*

Cepas	CIM individual ($\mu\text{g/mL}$)		CIM Combinada ($\mu\text{g/mL}$)			% CIM Reduzido			Interpretação
			CV	EU	PG	CV	EU	PG	
<i>S. epidermidis</i>	AMP	512	250	125	125	51,2	75,6	75,6	sinergismo
MHR073HC	AZI	128	*	*	*	-	-	-	antagonismo
<i>E. coli</i>	CIP	256	250	250	250	0	0	0	Inerte
MHR044UC	GEN	128	*	*	*	-	-	-	antagonismo
<i>K. pneumoniae</i>	CIP	256	62,5	62,5	125	75,6	75,6	51,2	sinergismo
MHR098UC	GEN	256	250	250	250	0	0	0	inerte
<i>P. aeruginosa</i>	CIP	>1024	62,5	31,2	31,2	100	>100	>100	sinergismo
MHR169TA	GEN	>1024	500	500	500	51,2	51,2	51,2	sinergismo
<i>S. enteritidis</i>	AMP	64	*	*	*	-	-	-	antagonismo
UFPEDA414	GEN	64	62,5	31,2	31,2	2,3	51,3	51,3	sinergismo

CIM: concentração inibitória mínima; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; * sem inibição; - não calculado.

Fonte: Próprio autor.

Neste ensaio utilizando concentrações subinibitórias para as FAEs, quinze das trinta combinações demonstraram efeito sinérgico, nove foram antagônicas e seis inertes. Dentre as drogas testadas, ciprofloxacina foi a mais potenciada, seguida de gentamicina e ampicilina. A azitromicina apresentou modulação negativa frente a *S. epidermidis* (Gram-positivo).

Considerando *P. aeruginosa* MHR169TA com fenótipo resistente a colistina, nenhuma FAE mostrou atividade antibacteriana significativa no teste de determinação da CIM. Entretanto, quando as FAEs foram incorporadas ao meio de crescimento, foi observada uma redução drástica na CIM para ciprofloxacina e gentamicina (acima de 100%). Apesar da não-modulação da combinação FAEs-gentamicina para *K. pneumoniae* MHR098UC produtora de carbapenemase (KPC), as frações enriquecidas reduziram significativamente a CIM da fluoroquinolona. A modulação para ciprofloxacina deve ser considerada relevante, considerando que 96,2% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* oriundos de hospitais brasileiros são tipo KPC (BARTOLLETTI et al., 2016) e a resistência a aminoglicosídeos e quinolonas é atualmente prevista nessas linhagens (ANTOCHEVIS et al., 2018).

Efeito desfavorável foi verificado para *S. enteritidis* multirresistente, onde as FAEs não reduziram a CIM da ampicilina, apresentando antagonismo. Tendo em vista o fenótipo de resistência deste microrganismo a cefalosporinas de terceira geração (ex: cefotaxima), presume-se produção de β -lactamases, atuando no rompimento da ligação amida e desativando a porção β -lactâmica da ampicilina (REGIEL-FUTYRA et al., 2017). Neste caso, as FAEs foram ineficazes para a prevenção e/ou redução deste mecanismo enzimático de inativação. Contraditoriamente no trabalho de Andrade e colaboradores (2019), as FAEs em associação com a ampicilina demonstraram redução da CIM para este fármaco frente a *S. epidermidis* multirresistente. Após a adição do extrato aquoso de casca de *Ziziphus joazeiro*, rico em rutina e quercetina, a CIM da ampicilina contra *S. epidermidis* ATCC 12228 foi reduzida em 2,5 vezes (ANDRADE et al., 2019).

A cepa *E. coli* MHR044UC, produtora de β -lactamase de espectro estendido, não foi sensibilizada por nenhuma combinação. Em relação ao efeito modulatório dos aminoglicosídeos, Oliveira e colaboradores (2011) demonstraram atividade do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Stylidium rotundifolium* combinado com gentamicina frente a linhagens de *E. coli* multirresistentes, reduzindo a CIM inicial de 2500 $\mu\text{g/mL}$ para 19,5 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, os constituintes majoritários de *S. rotundifolium* eram taninos condensados, os quais são relatados como inibidores de bomba de efluxo – mecanismo crucial em cepas multirresistentes (TINTINO et al., 2016). As frações enriquecidas neste estudo foram compostas principalmente por flavonoides, e os resultados apresentados para *E. coli* ESBL estão de acordo com o ensaio modulatório da resistência a ciprofloxacina apresentado por Oliveira e colaboradores (2015), onde a flavonolignana silavinina demonstrou efeito inerte frente *E. coli*.

A evidência de sinergismo *in vitro* frente a cepas MDR fornece maior probabilidade de uma terapia *in vivo* bem-sucedida. Desse modo, estas associações podem ser úteis na seleção de combinações de antimicrobianos mais promissoras para a terapia prática de infecções bacterianas graves (AIYEGORO; OKOH, 2009). Trabalhos anteriores reportam compostos fenólicos como epicatequina galato, catequina galato e flavonas atuando como compostos moduladores da resistência a β -lactâmicos em cepas *S. aureus* MRSA (ALVAREZ; DEBATTISTA; PAPPANO, 2008; SHIBATA et al., 2005; STAPLETON et al., 2004).

As quinze associações consideradas sinérgicas foram testadas para ensaio *Checkerboard*. O Índice de Concentração Inibitória Fracionada foi calculado (Tabela 11), a fim de verificar o comportamento das FAEs através de concentrações subinibitórias, uma vez que essa interpretação não é possível no ensaio modulatório. As concentrações subinibitórias de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* (FICI $\leq 0,5$) aumentaram a atividade antimicrobiana dos agentes, além de reduzir a CIM individual das FAEs, exceto para combinação com *C. verum* FAE-gentamicina contra *S. enteritidis* UFPEDA41, a qual foi equivalente ao resultado do estudo de modulação.

Associações de antibióticos convencionais e derivados vegetais têm sido relatadas como intensificadores farmacológicos, além de minimizar simultaneamente efeitos colaterais tóxicos das drogas sintéticas. Em relação aos flavonoides, seu baixo peso molecular integrado aos vários grupos hidroxilas permite a formação de ligações iônicas ou pontes de hidrogênio com enzimas, receptores ou vários outros biomarcadores nas células bacterianas (WAGNER; EFFERTH, 2017; ZACCHINO et al., 2017a, 2017b).

Tabela 11 - Teste *Checkerboard* de associação das frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* com agentes antimicrobianos, frente a cepas multidroga-resistentes

Cepas	ATB CIM ($\mu\text{g/mL}$)		FAE CIM ($\mu\text{g/mL}$)			CIM Combinada ($\mu\text{g/mL}$) ATB/FAE			FICI Individual ATB/ FAE			FICI (ATB + FAE)		
			CV	EU	PG	CV	EU	PG	CV	EU	PG	CV	EU	PG
<i>S. epidermidis</i> MHR073HC	AMP	512	250	7,81	7,81	0,98/31,25	0,98/0,98	1,95/0,98	0,002/0,125	0,002/0,125	0,004/0,125	0,127	0,127	0,129
<i>K. pneumoniae</i> MHR098UC	CIP	256	1000	125	125	31,25/31,25	15,62/7,81	15,62/7,81	0,122/0,031	0,061/0,063	0,061/0,063	0,153	0,124	0,124
<i>P. aeruginosa</i> MHR169TA	CIP	>1024	1000	500	500	31,25/7,81	15,62/7,81	15,62/7,81	0,031/0,008	0,015/0,016	0,015/0,016	0,039	0,031	0,031
	GEN	>1024	1000	500	500	125/31,25	31,25/15,62	62,5/31,25	0,122/0,031	0,031/0,031	0,061/0,062	0,153	0,062	0,123
<i>S. enteritidis</i> UFPEDA414	GEN	64	1000	500	500	31,25/62,5	15,62/31,25	15,62/31,25	0,488/0,063	0,244/0,063	0,244/0,063	0,551	0,307	0,307

ATB: antibiótico; FAE: fração de acetato de etila; CIM: concentração inibitória mínima; FICI: índice de concentração inibitória mínima fracionada; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*.

Fonte: Próprio autor.

O uso indiscriminado de antimicrobianos proporciona a seleção e a disseminação de mecanismos de resistência, incluindo substituições específicas de aminoácidos em alvos (ex: DNA girase e topoisomerase IV), alterações nas proteínas da membrana externa ou superexpressão das bombas de efluxo para a evasão de quinolonas (CHU et al., 2018; RUIZ; PONS; GOMES, 2012; VINUÉ et al., 2016). Em relação aos aminoglicosídeos, o RNA desempenha um papel fundamental na ligação do ribossomo-droga (XU et al., 2017). A gentamicina, particularmente, apresenta efeitos colaterais bem reportados, como ototoxicidade que pode levar à perda auditiva permanente (NGUYEN; JEYAKUMAR, 2019) e respostas terapêuticas menos eficazes quando aplicada em monoterapia (PHE et al., 2019). Nesse sentido, combinações sinérgicas configuram alternativas promissoras para a redução de dose efetiva antimicrobiana.

Alguns mecanismos têm sido propostos para atividade sinérgica e moduladora da resistência a antibióticos proporcionada pelos flavonoides. Para moléculas de galoil flavan-3-ols, é postulado que estes modulem a resistência a β -lactâmicos pela redução da d-alanilação do ácido teicóico da parede celular, resultando na inativação da proteína 2a de ligação à penicilina (PBP2a) (SANTIAGO et al., 2015a), ou inserindo-se na membrana citoplasmática (BERNAL et al., 2010; GOMES et al., 2018) e induzindo mudanças estruturais que resultam na deslocalização de PBP2a (RONDEVALDOVA et al., 2018). Estes mecanismos contemplam a redução da CIM na combinação *C. verum* FAE-ampicilina para *S. epidermidis* MHR073HC comparada com as CIM individuais, uma vez que esta fração demonstra presença de taninos condensados (Seção 5).

Para compostos como flavonas, isoflavonas, flavonóis e taninos hidrolisáveis há atribuição do aumento da eficácia dos antibióticos β -lactâmicos por inibição de β -lactamases (CHEYPRATUB; LEEANANSAKSIRI; EUMKEB, 2018), inativação de bombas de efluxo (LECHNER; GIBBONS; BUCAR, 2008; RONDEVALDOVA et al., 2018), desestabilização da membrana citoplasmática (WANG; WANG; XIE, 2010) e interrupção da síntese de PBP2a (SANTIAGO et al., 2015b). A inibição da topoisomerase tem sido relacionada a quercetina e glicosídeos de kaempferol quando associados a fluoroquinolonas (LIU et al., 2009; PRAKASH et al., 2018), como também a associação de mais de um mecanismo de sinergismo (ENDO et al., 2018). Isto posto, *E. uniflora* e *P. granatum*, contendo maiores teores dessas classes de compostos fenólicos (Seção 5) exibiram notáveis reduções das CIM combinadas pelo ensaio *Checkerboard*, sugerindo atuação sinérgica por vários mecanismos, destacando-se os FICI obtidos para ciprofloxacina e gentamicina.

Trabalhos recentes sugerem atuação antimicrobiana de flavonoides, taninos hidrolisáveis e taninos condensados via comunicação intercelular tipo *quorum sensing*, interrompendo a interação entre N-acil-homoserina lactonas (moléculas de sinalização sintetizadas por bactérias Gram-negativas) e peptídeos autoindutores (sinalizadores Gram-positivos) a seus respectivos receptores (BODEDE et al., 2018; MAISURIA et al., 2019; MANNER; FALLARERO, 2018; QUECAN et al., 2019). Este mecanismo é relevante, sobretudo, para redução da adesão e da formação de biofilme por *P. aeruginosa* (VIPIN et al., 2019; XU et al., 2019), o que também pode ter contribuído para o potencial sinérgico de *E. uniflora* e *P. granatum* para a cepa *P. aeruginosa* MHR169TA testada.

As propriedades antioxidantes apresentadas pelas FAEs de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* também podem contribuir para o desempenho antimicrobiano sinérgico *in vivo*, mantendo a homeostase redox. A homeostase redox é crucial para permitir o equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e moléculas antioxidantes, necessárias para controlar o processo de infecção. As EROs são produzidas fisiologicamente e desempenham um papel importante nas defesas imunológicas do hospedeiro contra microrganismos patogênicos. EROs em níveis elevados exibem efeitos deletérios em todas as estruturas celulares, causando danos também às células hospedeiras (STAERCK et al., 2017; WAGNER, 2011). Nesse sentido, o somatório de atividades antioxidantes e antimicrobianas apresentado pelas FAEs pode contribuir para o controle de infecções tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.4 CONCLUSÃO

A partição dos extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* em sistema acetona:água proporcionou obtenção de três frações com diferentes graus de atividade. As frações acetato de etila apresentaram desempenho superior para os testes antioxidantes e antibacterianos *in vitro*, quando comparadas com seus respectivos extratos brutos e demais frações, dado o enriquecimento de flavonoides promovido pela partição. Nos ensaios para remoção de radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, a metodologia empregada permitiu inferência de atividade antioxidante mediada por transferência de elétrons; entretanto, ensaios que possibilitem avaliação de relação estrutura-atividade são necessários, para a completa exclusão de mecanismo mediado por transferência de átomos de hidrogênio.

No que diz respeito aos testes antibacterianos, a maior eficácia das FAEs é devida ao aumento da disponibilidade de moléculas de flavonoides frente aos microrganismos testados. Cocos Gram-positivos demonstraram maior suscetibilidade a FAEs individuais, devido à composição da parede celular. No entanto, quando combinado com antibióticos convencionais, houve um aumento dos espectros das FAEs, incluindo bacilos Gram-negativos. Este efeito sinérgico foi mais pronunciado para ciprofloxacina e gentamicina contra *K. pneumoniae* KPC e *P. aeruginosa* colistina-resistente. Um mecanismo plausível pode ser a interação flavonoide-membrana, o que facilitaria o acesso desses antimicrobianos a seus alvos intracelulares; contudo, estudos tipo *time-kill*, microscopia e de formação/erradicação de biofilme são necessários para melhor compreensão de mecanismos antimicrobianos associados.

Finalmente, as propriedades antioxidantes apresentadas pelas FAEs podem contribuir para a homeostase redox, em estudos futuros para modelos antibacterianos *in vivo*. Interações sinérgicas baseadas em ativos vegetais representam, portanto, um valioso e vasto campo a ser explorado, sobretudo para a utilização clínica de compostos modificadores de resistência, considerando a iminente ameaça bacteriana.

6.5 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007–1021, 2012.
- AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics : Implications in antimicrobial chemotherapy. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1147–1152, 2009.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697–705, 2005.
- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. **Food Research International**, v. 115, p. 167–176, 1 jan. 2019.
- ALHARBI, S. A. et al. What if Fleming had not discovered penicillin? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 289–293, 2014.
- ALVAREZ, M. A.; DEBATTISTA, N. B.; PAPPANO, N. B. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. **Folia Microbiologica**, v. 53, n. 1, p. 23, 2008.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.
- ANDRADE, J. C. et al. UPLC-MS-ESI-QTOF characterization and evaluation of the antibacterial and modulatory antibiotic activity of *Ziziphus joazeiro* Mart. aqueous extracts. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 105–112, 2019.
- ANTOCHEVIS, L. C. et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from Brazilian hospitals : What (still) remains active? **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 173–177, 2018.
- AYAZ, M. et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 294–303, 2019.
- BARIK, P.; TALUKDAR, P. Established Phytoligands from *Tridax Procumbens* Linn. Against Bacterial Dna-Gyrase B Receptor: Molecular Docking Approach. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 12, p. 582–593, 2018.
- BARTOLLETI, F. et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849, 2016.
- BECKER, K. et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 794–804, 2014.
- BECKETT, C. L.; HARBARTH, S.; HUTTNER, B. Special considerations of antibiotic prescription in the geriatric population. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 3–9, 2015.

BENAMEUR, Q. et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla(ESBL) producing multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolates. **Natural Product Research**, v. 33, n. 18, p. 2647–2654, 2019.

BENDINER, E. Alexander Fleming: player with microbes. **Hospital Practice**, v. 24, n. 2, p. 283–316, 1989.

BERNAL, P. et al. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated β -lactam resistance by delocalizing PBP2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 24055–24065, 2010.

BETTS, J. W. et al. *In vitro* activity of epigallocatechin gallate and quercetin alone and in combination versus clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 2145–2148, 2015.

BHULLAR, K. et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34953, 2012.

BIASI-GARBIN, R. P. et al. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

BODEDE, O. et al. *Quorum sensing* inhibitory potential and *in silico* molecular docking of flavonoids and novel terpenoids from *Senegalia nigrescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, p. 134–146, 2018.

BONOMO, R. A. β -Lactamases: A focus on current challenges. p. 1–16, 2017.

BRADLEY, J. S. Which antibiotic for resistant Gram-positives, and why? **Journal of Infection**, v. 68, p. S63–S75, 2014.

BRAGA, L. et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 541–547, 2005.

BUCEKOVA, M. et al. Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9061, 2018.

BULKLEY, D. et al. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17158–17163, 2010.

CAMA, J.; HENNEY, A. M.; WINTERHALTER, M. Breaching the barrier: quantifying antibiotic permeability across Gram-negative bacterial membranes. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3531–3546, 2019.

CARVALHO, A. J. D. **Identificação de proteínas de superfície de *Staphylococcus saprophyticus* e análise de fatores de virulência**. Goiânia, GO Dissertação. Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal de Goiás - UFG, 2014. Disponível em: < <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5496> >. Acesso em: 11 nov. 2019.

CENTNER, T. J. Efforts to slacken antibiotic resistance: Labeling meat products from animals raised without antibiotics in the United States. **Science of the Total Environment**, v. 563, p. 1088–1094, 2016.

CHEN, X. et al. Is antioxidant activity of flavonoids mainly through the hydrogen-atom transfer mechanism? **Food Research International**, 2018.

CHEYPRATUB, P.; LEEANANSAKSIRI, W.; EUMKEB, G. The synergy and mode of action of *Cyperus rotundus* L. extract plus ampicillin against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

CHU, X.-M. et al. Quinoline and quinolone dimers and their biological activities: an overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.

CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76–93, 2018.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, G. M.; LIMA, E. O. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis*. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.

CUNHA, F. A. B. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 2016.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99–107, 2011.

DAHMER, J. et al. Antibacterial activity of *Discaria americana* Gillies ex Hook (Rhamnaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 111635, jul. 2019.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

DE ARAÚJO, A. A. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.

DE SOUSA OLIVEIRA, K. et al. Mechanisms of antibacterial resistance: Shedding some light on these obscure processes? In: KON, K.; RAI, M. (Eds.). **Antibiotic Resistance**. 1. ed. London (UK): Elsevier, 2016. p. 19–33.

DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1474–1480, 2015.

DOMAGK, G. Ein beitrage zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. **DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 61, n. 07, p. 250–253, 1935.

DRUGBANK. **DrugBankAntibiotics molecules**, 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 30 set. 2019

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371–382, 2019.

EHRlich, P.; HALTA, S. **Die experimentelle chemotherapie der Spirillosen**. [s.l.] Springer, 1910. v. 8

ENDO, E. H. et al. Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 48–54, 1 dez. 2018.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 6, p. 25–64, 28 ago. 2014.

FARHADI, F. et al. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. **Phytotherapy research**, v. 33, n. 1, p. 13–40, 2019.

FDA. **Cubicin (Daptomycin) Injection Company: Cubist Pharmaceuticals, Inc. Application No.: 021572 Approval Date: 9/12/2003**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-572_Cubicin.cfm>. Acesso em: 16 set. 2019.

FERRAZ, C. C. B.; ORTEGA, F. B.; SILVA, R. B.; LEITE, L. R. C.; HILDEBRAND, C. R. Fatores associados a infecções hospitalares causadas por microorganismos multirresistentes num hospital de ensino. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde (PECIBES)**, v. 2, n. 2, p. 52–57, 2016.

FERREIRA, M. R. A. et al. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008–3013, 2013.

FIGUEIREDO, P. L. B. et al. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 30–38, 2019.

FRIDKIN, S. et al. Vital signs: improving antibiotic use among hospitalized patients. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, n. 9, p. 194–200, mar. 2014.

FUENTEFRÍA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, 2018.

FURI, L. et al. Dissemination of novel antimicrobial resistance mechanisms through the insertion sequence mediated spread of metabolic genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1008, 2016.

GOMES, F. M. S. et al. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 175–178, 2018.

- GOOSSENS, H. et al. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9459, p. 579–587, fev. 2005.
- GÓRNIK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, p. 241–272, 2019.
- GRABE, M. J.; RESMAN, F. Antimicrobial Stewardship: What we all just need to know. **European Urology Focus**, v. 5, n. 1, p. 46–49, 2019.
- GULLBERG. **Resistance Mechanisms – Antibiotic Resistance – ReAct**. Disponível em: <<https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/>>. Acesso em: 3 out. 2019.
- HAZRA, B. M. et al. Synergistic interaction between plant products and antibiotics against potential pathogenic bacteria. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**, p. 88–152, 2018.
- HELSE, T. L.; DAVIES, J. E.; DAHLBERG, J. E. Change in methylation of 16S ribosomal RNA associated with mutation to kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. **Nature New Biology**, v. 233, n. 35, p. 12–14, 1971.
- HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016.
- HSIEH, L.; AMIN, A. **Antimicrobial Stewardship: Hospital Strategies to Curb Antibiotic Resistance**. London (UK): Academic Press (Elsevier), 2016.
- JABBARI, M.; JABBARI, A. Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 489, p. 392–399, 2016.
- JINDAL, A. K.; PANDYA, K.; KHAN, I. D. Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 2, p. 178–181, 2015.
- KABRA, R. et al. Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 141, p. 15–24, 2019.
- KANG, C.-G. et al. Evaluation of antimicrobial activity of the methanol extracts from 8 traditional medicinal plants. **Toxicological Research**, v. 27, n. 1, p. 31, 2011.
- KANJI, A.; HASAN, R.; HASAN, Z. Efflux pump as alternate mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 66, n. 1, p. 20–25, 2019.
- KHAN, M. S.; QAIS, F. A.; AHMAD, I. *Quorum sensing* interference by natural products from medicinal plants: Significance in combating bacterial infection. In: **Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors**. [s.l.] Springer, 2018. p. 417–445.
- KOH, C.-L. et al. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 6217–6228, 2013.
- KOH, K. H.; THAM, F.-Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 2, p. 144–148, 2011.

- KOULENTI, D. et al. Infections by multidrug-resistant Gram-negative Bacteria: What's new in our arsenal and what's in the pipeline? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 3, p. 211–224, 2019.
- KUMARIYA, R. et al. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 171–177, 2019.
- LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827–9837, 2011.
- LAHLAOUI, H.; KHALIFA, A. B. H.; MOUSSA, M. BEN. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 9, p. 400–404, 2014.
- LAI, C.-J.; DAHLBERG, J. E.; WEISBLUM, B. Structure of an inducibly methylatable nucleotide sequence in 23S ribosomal ribonucleic acid from erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 457–460, 1973.
- LECHNER, D.; GIBBONS, S.; BUCAR, F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 345–348, 2008.
- LI, Y. et al. Microbial pathogenicity and virulence mediated by integrons on Gram-positive microorganisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 481–486, 2017.
- LINO, L. M. I **Factores de virulência em *Streptococcus pyogenes***. Lisboa, PT. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Universidade de Lisboa, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/2783/1/ulfc090590_tm_Lara_Lino.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- LIU, M.-H. et al. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 3, p. 489–492, 2009.
- LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413–420, 2006.
- LÓPEZ, A. C.; ALIPPI, A. M. Búsqueda de factores de virulencia en cepas de *Bacillus cereus* y de *Bacillus megaterium* aisladas de miel. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, n. 3, p. 216–225, 2010.
- MAHONEY, J. F.; ARNOLD, R. C.; HARRIS, A. D. Penicillin treatment of early syphilis - a preliminary report. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 33, n. 12, p. 1387–1391, 1943.
- MAISURIA, V. B. et al. Proanthocyanidin interferes with intrinsic antibiotic resistance mechanisms of Gram-negative bacteria. **Advanced Science**, p. 1802333, 2019.
- MANNER, S.; FALLARERO, A. Screening of natural product derivatives identifies two structurally related flavonoids as potent *quorum sensing* inhibitors against gram-negative bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1346, 2018.

- MAREČEK, V. et al. ABTS^{•+} and DPPH[•] methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, v. 73, p. 40–45, 2017.
- MARTELLI, G.; GIACOMINI, D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 91–105, 5 out. 2018.
- MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006, 1 jan. 2011.
- MARTINS, A. F. et al. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 2, p. 108–112, 2012.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 198–206, 2006.
- MEHTA, S. Review of heterocyclic scaffolds for the inhibitors of ATP synthase. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 505–508, 2018.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH[•] free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.
- MUNITA, J. M. et al. A liaF codon deletion abolishes daptomycin bactericidal activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2831–2833, 2013.
- MUNITA, J. M.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Evolving resistance among Gram-positive pathogens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_2, p. S48–S57, 2015.
- NGUYEN, T.; JEYAKUMAR, A. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 120, p. 15–19, 2019.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium* antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 12, p. 1265–1270, 2011.
- OLIVEIRA, D. R. DE et al. *In vitro* antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. **BioMed Research International**, v. 2015, n. ID 292797, p. 7 pg, 2015.
- OLIVEIRA, P. H. et al. The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 841, 2017.
- OLIVEIRA, V. R. M.; PAIVA, M. C.; LIMA, W. G. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 101459, 2019.
- OLSZOWY, M.; DAWIDOWICZ, A. L. Is it possible to use the DPPH[•] and ABTS^{•+} methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? **Chemical Papers**, v. 72, n. 2, p. 393–400, 2018.

PAGÈS, J.-M.; AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 826–833, 2009.

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, p. 824–831, jan. 2016.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019.

PARK, W. et al. Inhibitory effects of flavonoids from *Spatholobus suberectus* on sortase A and sortase A-mediated aggregation of *Streptococcus mutans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 27, n. 8, p. 1457–1460, 2017.

PÄRNÄNEN, K. M. M. et al. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. **Science Advances**, v. 5, n. 3, 2019.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S20–S28, 2006.

PEREIRA, N. L. F. et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 512–518, 2017.

PHE, K. et al. Outcomes of empiric aminoglycoside monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 4, p. 346–348, 2019.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols—A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 260, p. 85–94, 2018.

PINNA, R. et al. Antimicrobial effect of *Thymus capitatus* and *Citrus limon* var. pompia as raw extracts and nanovesicles. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, 2019.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development - The past, the present, and the future. **Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10 Suppl 4, p. 23–31, nov. 2004.

PRAKASH, O. et al. Exploring the potentials of quercetin and kaempferol combinations along with regular antibiotics for the effective management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology**, v. 8, n. 3, p. 6–9, 2018.

PRASAD, K. N. et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 627–632, 2009.

QUECAN, B. X. V. et al. Effect of quercetin rich onion extracts on bacterial *quorum sensing*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 867, 2019.

- RATH, S.; PADHY, R. N. Monitoring *in vitro* antibacterial efficacy of 26 Indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 3, p. 133–141, 1 set. 2014.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- REGIEL-FUTYRA, A. et al. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 76–117, 2017.
- REYES, K.; BARDOSSY, A. C.; ZERVOS, M. Vancomycin-resistant enterococci: Epidemiology, infection prevention, and control. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 953–965, 2016.
- RICE, L. B. Antimicrobial stewardship and antimicrobial resistance. **The Medical clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 805–818, set. 2018.
- RIOS, A. C. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. **Microbiological Research**, v. 191, p. 51–80, 2016.
- RONDEVALDOVA, J. et al. *In vitro* Anti-staphylococcal synergistic effect of isoflavone metabolite demethyltexasin with amoxicillin and oxacillin. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 1, p. 24–29, 2018.
- ROSSOLINI, G. M. et al. Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants *versus* anti-Gram-positive agents. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 582–588, 2010.
- RUIZ, J.; PONS, M. J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 196–203, 2012.
- RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.-L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive care**, v. 5, n. 1, p. 21, 2015.
- SALAH, N. et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 339–346, 1995.
- SANTIAGO, C. et al. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 178, 2015a.
- SANTIAGO, C. et al. Prevention of cell-surface attachment and reduction of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) level in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms by *Acalypha wilkesiana*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 79, 2015b.
- SANTOS, R. DOS et al. Interference of flavonoids and carotenoids on the antimicrobial activity of some drugs against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 3, 2016.

SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018.

SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 1 abr. 2017.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS^{•+}, DPPH[•], and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 782–796, 2015.

SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 1–13, 2016.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial resistance: An antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach. **The Medical clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819–829, set. 2018.

SEUKEP, J. A. et al. Antibacterial and antibiotic-resistance modifying activity of the extracts and compounds from *Nauclea pobeguinii* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 193, jul. 2016.

SHIBATA, H. et al. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 549–555, fev. 2005.

SHRIVASTAVA, S. R.; SHRIVASTAVA, P. S.; RAMASAMY, J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p. 76, 2018.

SILVA-ROCHA, W. P. et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 6, 2015.

SIMOES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, p. 746–757, 2009.

SINGH, S. P. et al. Competitive inhibition of quercetin and apigenin at the ATP binding site of D-Alanine-D-Alanine ligase of *Helicobacter pylori*—A molecular modeling approach. **Current Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 340–348, 2018.

SOUZA, J. A. L. DE et al. Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, n. 56, p. 437–443, 2018.

STAERCK, C. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 56–65, 2017.

- STAPLETON, P. D. et al. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 5, p. 462–467, 2004.
- TAJIMA, N. et al. Determination of reactive oxygen generated from natural medicines and their antibacterial activity. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 214–218, 2016.
- THEURETZBACHER, U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 63–69, 2013.
- TINTINO, S. R. et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 9–13, ago. 2016.
- UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- USA. **Antibiotic Resistance Threats in the United States** Atlanta, Georgia Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2013). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance>>. Acesso em 20 ago 2019.
- VAMBE, M. et al. Antibacterial screening, synergy studies and phenolic content of seven South African medicinal plants against drug-sensitive and-resistant microbial strains. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 250–259, 2018.
- VAN DEN BERG, R. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 511–517, 1999.
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.
- VINUÉ, L. et al. Mutations that enhance the ciprofloxacin resistance of *Escherichia coli* with qnrA1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1537–1545, 2016.
- VIPIN, C. et al. Anti-biofilm and cytoprotective activities of quercetin against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 464–471, 2019.
- WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34–37, 2011.
- WAGNER, H.; EFFERTH, T. Novel hybrid combinations containing synthetic or antibiotic drugs with plant-derived phenolic or terpenoid compounds. **Phytomedicine**, 2017.
- WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 581, 1940.
- WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 207–210, 1942.
- WALSH, T. R. et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 355–362, 2011.

WANG, Q.; WANG, H.; XIE, M. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 11, p. 893–898, 2010.

WEI, G.-X.; XU, X.; WU, C. D. *In vitro* synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 6, p. 565–572, 2011.

WHO. **World Health Organization Guidelines for the Treatment of *Treponema pallidum* (syphilis)**. Geneva, Switzerland. WHO. Document Production Services, 2016.

WHO. **Antibacterial Agents in Clinical Development: an Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline, Including Tuberculosis**. Geneva, Switzerland: WHO/EMP/IAU/2017.11, 2017.

WINTER, J. DA S. et al. Microbiologic isolates and risk factors associated with antimicrobial resistance in patients admitted to the intensive care unit in a tertiary care hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 9, p. 846–848, 2013.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 2005.

XU, Z. et al. Effect of aminoglycosides on the pathogenic characteristics of microbiology. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 357–364, 2017.

XU, Z. et al. Lonicerin, an anti-*algE* flavonoid against *Pseudomonas aeruginosa* virulence screened from *Shuanghuanglian formula* by molecule docking based strategy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 111909, 2019.

YANG, C. et al. Isolation and characterization of new phenolic compounds with estrogen biosynthesis-inhibiting and antioxidation activities from *Broussonetia papyrifera* leaves. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94198, 2014.

YELIN, I.; KISHONY, R. Antibiotic Resistance. **Cell**, v. 172, n. 5, p. 1136- 1136.e1, 2018.

ZACCHINO, S. A. et al. Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. **Phytomedicine**, v. 37, p. 14–26, 2017a.

ZACCHINO, S. A. et al. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, p. 27–48, 2017b.

7 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO COMPREENDENDO ATIVOS DE *CINNAMOMUM VERUM*, *EUGENIA UNIFLORA* E *PUNICA GRANATUM*

Flavonoides e taninos presentes nas folhas de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* demonstraram expressivas atividades antioxidante e antimicrobiana frente a microrganismos multidroga-resistentes, tanto isoladamente como em associação sinérgica com antimicrobianos tradicionais, tornando-se promissores candidatos ao desenvolvimento de formulações. O desenvolvimento farmacotécnico requer conhecimento acerca das características físico-químicas do princípio ativo e excipientes, bem como de opções de veiculação disponíveis e viáveis (FAHR; LIU, 2007; KRAJNOVIC et al., 2018; VAN HOOGEVEST; LIU; FAHR, 2011).

O uso de nanopartículas, interfaces coloidais, associação com macromoléculas e dispositivos médicos tem sido algumas das alternativas apresentadas diante das limitações de biodisponibilidade dos compostos fenólicos (LU; KELLY; MIAO, 2016; SQUILLARO et al., 2018). Dentre estas tecnologias, os sistemas dispersos emulsionados constituem formulações versáteis, pois permitem a compartimentalização de mais de um ativo em uma das suas fases, considerando as características de polaridade/solubilidade de cada componente. Ademais, permitem emprego em diferentes vias de administração como a via oral, tópica e parenteral (LU; KELLY; MIAO, 2016; MARTO et al., 2016; WEI et al., 2019).

Nesta seção serão abordados sistemas de liberação para compostos fenólicos e prospecção tecnológica de veiculação de ativos de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum*; bem como a incorporação de seus extratos brutos e frações enriquecidas em sistemas emulsionados, incluindo estudos de eficiência de incorporação, de estabilidade preliminar e acelerada dessas formulações.

7.1 REFERENCIAL TEÓRICO

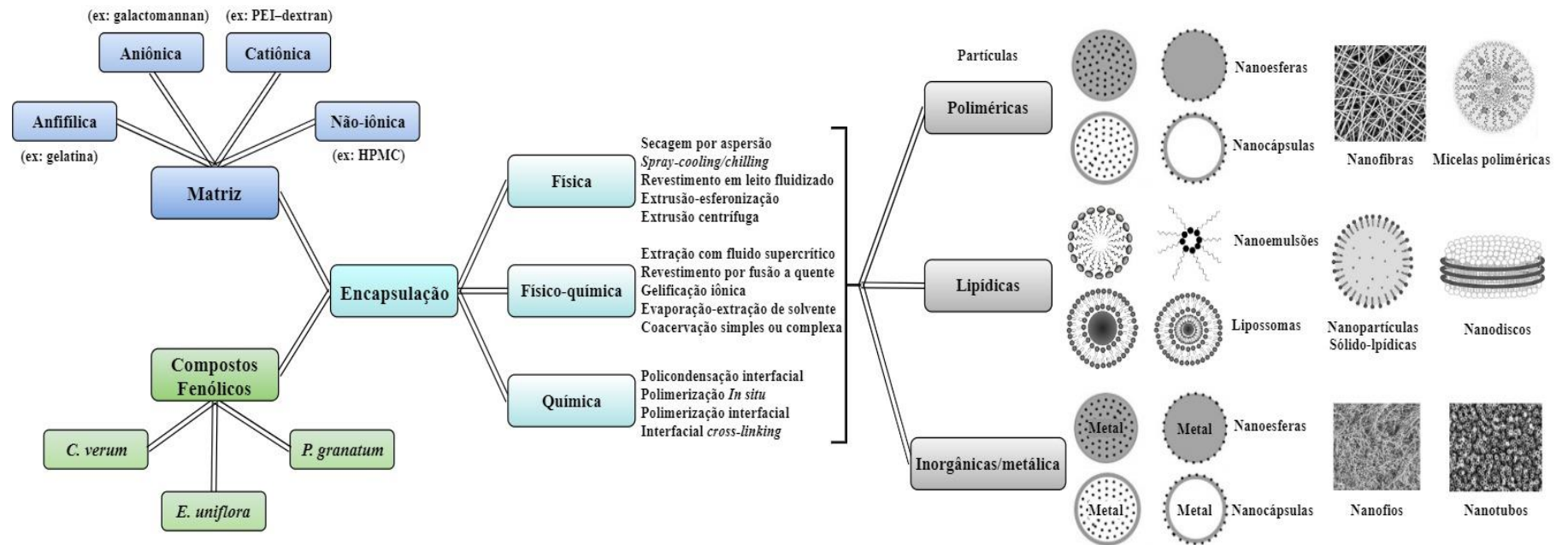
7.1.1 Sistemas de liberação para compostos fenólicos

Idealmente, um composto puro e isolado deve ser usado como ativo no desenvolvimento de uma formulação. Contudo, esta abordagem nem sempre é a mais viável ou bem-sucedida. Dentre os motivos plausíveis para o emprego de matrizes complexas tais como os ativos vegetais, enfatiza-se o sinergismo com compostos intrínsecos, a perda de atividade após o isolamento, dificuldade na purificação e a possibilidade de atuar em vários alvos simultaneamente (GUO et al., 2018; ZORZI et al., 2015).

Crescente é o número de publicações relacionadas ao uso de nanotecnologia para associação de metabólitos secundários. Duas vertentes distintas podem ser observadas nos trabalhos que envolvem extratos vegetais e Nanotecnologia. A primeira abordagem engloba o uso da matriz vegetal para a síntese de nanopartículas metálicas, baseada em “química verde” (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; NAZAR et al., 2018; PERVEZ; STYLIOS, 2018) e a segunda considera o uso de nanossistemas para melhorar as propriedades biofarmacêuticas e tecnológicas dos extratos vegetais (ANWAR; FARHANA, 2018; NAM et al., 2018; SANTANA et al., 2019). Esta última tem sido largamente testada para compostos fenólicos (ESFANJANI; ASSADPOUR; JAFARI, 2018; GHAYOUR et al., 2019; PIMENTEL-MORAL et al., 2019).

A tendência de incorporação de polifenóis em nanossistemas reside no fato de que usualmente suas concentrações eficazes *in vivo* são de magnitude superior aos níveis necessários para alcançar atividade *in vitro* (LIANG et al., 2017; LU; KELLY; MIAO, 2016b). A efetividade depende da incrementação da biodisponibilidade, o que é desafiador pois, apenas uma fração dessas moléculas permanece disponível após administração oral. A Figura 21 traz um diagrama de possibilidades nanotecnológicas atuais para veiculação dos ativos estudados nas Seções 5 e 6, com informações de Maurya e colaboradores (2019) e Volpedo e colaboradores (2019).

Figura 21 - Diagrama de possibilidades nanotecnológicas para veiculação de compostos fenólicos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*



PEI = Polietilenimina; HPMC = Hidroxipropilmetilcelulose

Fonte: Próprio autor.

7.1.2 *Status quo de formas farmacêuticas e sistemas de liberação contendo ativos de Cinnamomum verum, Eugenia uniflora e Punica granatum*

Na era da Medicina baseada em evidências, os ensaios clínicos controlados e randomizados têm uma posição de primazia em informar aos clínicos, farmacêuticos e outros tomadores de decisão sobre a eficácia comparativa e segurança de novas opções terapêuticas (SCHULTZ et al., 2019). Nesse sentido, publicações e patentes que apresentem triagens clínicas em suas redações fornecem subsídios às tendências tecnológicas e à inteligência competitiva. Além disso, as visões gerais de patentes também contribuem para compreender ativos relevantes, seus alvos moleculares, sistemas de entrega e significado comercial. Consequentemente, essa abordagem é crucial para o monitoramento de mudanças tecnológicas no campo farmacêutico e para decidir estratégias futuras de pesquisa (ERNST; OMLAND, 2011; JEON, J., LEE, C., & PARK, 2011; JOUNG; KIM, 2017; LEE et al., 2018; ROHRBECK; GEMÜNDEN, 2011; YOON et al., 2017).

7.1.2.1 *Cinnamomum verum*

No que se refere a artigos científicos, Ranasinghe e colaboradores (2017) demonstraram veiculação do extrato aquoso da casca do caule *C. verum* em cápsulas, com trinta adultos em período de 3 meses, aumentando gradualmente as doses mensais (85 mg no primeiro mês, 250 mg no segundo mês e 500 mg no terceiro mês). Neste trabalho, apenas a redução da pressão arterial sistêmica foi significativa após administração oral, não havendo resultados significativos para a redução da glicose e colesterol, proposta majoritária para os ensaios clínicos supracitados, ratificando a problemática da biodisponibilidade oral dos compostos fenólicos.

Quando o mesmo grupo de pesquisa conduziu um ensaio clínico para diabetes mellitus tipo II, entretanto, sugeriram que as cápsulas de *C. verum* fossem aplicadas como suplementação dietética, por ausência de efeitos hipoglicemiantes (RANASINGHE et al., 2017b). A evidência científica dos efeitos clínicos da canela está sendo profundamente estudada em metanálise, podendo-se inferir que os resultados preliminares ainda são inconsistentes devido às diferenças metodológicas e à não padronização das formulações orais (DEYNO et al., 2019).

Atualmente existem 64 ensaios clínicos registrados para *C. verum*, incluindo 37 estudos concluídos, 15 estudos recrutados e 2 estudos finalizados (USA, 2019). A maioria dos ensaios concluídos está focada nos efeitos hipoglicemiantes, cardioprotetores e hipocolesterolêmicos. Os ensaios em andamento compreendem principalmente estudo de biodisponibilidade, ação anti-inflamatória, tratamento de síndrome metabólica e efeito antiestrogênico. Em referência à avaliação do potencial antimicrobiano, apenas um estudo clínico de Fase III (nº NCT03061916) iniciado em 2017 pelo pesquisador Nadhel Ahmed Mukred Mohamed (Universidade do Cairo, Egito) compara os efeitos antimicrobianos de extratos aquosos de canela a 20% e gengibre a 20% em comparação ao gluconato de clorexidina 0,2% para o tratamento de infecções orais causadas por *Streptococcus mutans* (USA, 2019).

Foi realizado um levantamento de patentes internacionais durante o mês de maio de 2019 na plataforma *Derwent World Patents Index* (DWPI), envolvendo *C. verum* e sua sinonímia *C. zeylanicum*. Neste, foram encontradas 22 patentes contendo dados de estudos pré-clínicos e clínicos (CLARIVATE ANALYTICS, 2019), os quais estão apresentados no Quadro 11. Dentre estas patentes, a IN201401953-I1, a WO2008059310-A1, a WO2009001362-A2 e a WO2014104884-A1 envolvem a produção de formas sólidas, soluções e sistemas dispersos para administração oral, com finalidade antioxidante, hipocolesterolêmica e para o tratamento de diabetes.

Com ação imunomodulatória, as patentes IN201621039902-A e IN201200607-I4 desenvolvem uma forma sólida e sistemas dispersos para via enteral, tópica ou inalatória visando o tratamento da asma e distúrbios brônquicos alérgicos, respectivamente. A patente US2005175718-A1 desenvolve formas sólidas, soluções e/ou suspensões para utilização antialérgica enteral, parenteral ou tópica; e a invenção WO2018083614-A1 desenvolve uma pastilha contendo composição herbal para o aumento da imunidade.

Utilizando *C. verum* para finalidade antimicrobiana, as patentes WO2018185676-A1 e CN105343724-A desenvolvem, respectivamente, um sistema disperso e; sprays, supositórios, comprimidos efervescentes e pomadas para o tratamento tópico de vulvovaginites. A invenção WO2019040035-A2 desenvolve lipossomas para a veiculação tópica/transdérmica de saponinas para fins diversos; e as invenções KR1901974-B1, WO2018087766-A1, CN105395393-A e IN201741039068-A desenvolvem sistemas dispersos para uso tópico; e a CN107375111-A desenvolve microagulhas solúveis, todas para o tratamento da acne.

Quadro 11 - Patentes relacionadas nas plataformas DWPI e INPI para ativos de *Cinnamomum verum*

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
1. WO2019040035-A2	Lipossoma/composição tópica ou transdérmica	Cosmético, conservante, antimicrobiano, composição farmacêutica, dispositivo médico e/ou desinfetante	Saponinas de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Extração eficiente, entrega eficiente e estabilização da dispersão lipossomal
2. WO2018185676-A1	Sistemas ou solução dispersa compreendendo azeite ozonizado com um valor de peróxido de 50-350 mEqO ₂ /kg, compreendendo pelo menos um extrato vegetal líquido/tópico	Tratamento de vaginose e/ou vulvovaginites de origem bacteriana e/ou fúngica	Óleos essenciais	Tratamento de vulvovaginites causadas por <i>C. glabrata</i> e/ou <i>G. vaginalis</i> em 10-20 dias com intervalos de 72 horas entre uma aplicação
3. KR1901974-B1	Sistema disperso composto por pó cerâmico, extrato vegetal e ingredientes cosméticos/tópica	Hidratante para peles sensíveis, purificante e calmante, prevenindo a acne e inibindo bactérias	Fermentado do extrato bruto	Alta adsorção, baixa irritação e efeitos sinérgicos, como regulação da produção de sebo
4. IN201621039902-A	Cápsula compreendendo uma composição herbal/via enteral, tópica ou parenteral ou por via inalatória	Tratamento de distúrbios respiratórios como asma e doenças associadas	Partes aéreas	Econômica e ecológica. Diminuição da contagem de leucócitos e do nível de histamina no líquido de lavagem broncoalveolar
5. WO2018087766-A1	Sistema disperso compreendendo uma composição herbal ou suas moléculas ativas/tópica	Tratamento ou prevenção de acne	Casca do caule	Diminuição da produção de sebo, efeitos anti-inflamatórios, prebióticos e antibióticos
6. WO2018163214-A2	Forma sólida compreendendo uma composição herbal ou suas moléculas ativas/enteral	Aumento de testosterona, por inibição de aromatase	Polifenóis de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Maior atividade androgênica em animais tratados
7. WO2016147142-A1	Sistemas dispersos, formas sólidas, soluções ou suspensões compreendendo uma composição herbal/enteral, tópica, inalatória ou parenteral	Infecção do trato urinário, úlceras estomacais, neuropatia, doença arterial periférica	Extratos brutos, frações e/ou compostos isolados das folhas e/ou casca do caule	Reduz a carga de microrganismos até seis meses
8. IN201401953-I1	Comprimidos compreendendo uma composição herbal/enteral	Agente antioxidante, anti-hiperglicêmico e anti-catarata e para tratamento de diabetes	Partes aéreas	Efeito herbal sinérgico

(Continuação Quadro 11)

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
9. WO201883614-A1	Pastilha compreendendo uma composição herbal/enteral	Reforço da imunidade	Planta inteira	Melhora a força geral, energia, resposta imune, funcionamento saudável do sistema respiratório, digestão e rejuvenescimento
10. CN107375111-A	Microagulhas solúveis cônicas ou triangulares compreendendo éster de óleo de xisto de sulfonato de sódio e uma composição herbal/tópica	Tratamento de acne	Casca do caule	Segura, econômica, conveniente, não tóxica, reduzida, sem recorrência da acne e melhora o metabolismo da pele
11. IN201741039068-A	Creme constituído por extratos vegetais/tópica	Tratamento de acne	Casca do caule	Propriedades anti-acne e efeito iluminador
12. CN105395393-A	Creme constituído por uma composição herbal a 25%, óleo de xisto sulfonato 2-6% de acetato de sódio, lactato de mentol 1-5%, matriz comum e água deionizada/tópica	Tratamento de acne	Casca do caule	Reduz a acne em 50%
13. WO2017033209-A1	Formas sólidas, sistemas dispersos, suspensões, soluções e/ou microesferas compreendendo uma composição herbal/enteral ou tópica	Para tratar doenças maculares relacionadas à idade, edema macular diabético e oclusão de veias retinianas	Associação de partes aéreas de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Regulação negativa do fator de crescimento endotelial vascular em células epiteliais retinianas, eficácia de ligação e inibição da angiogênese
14. WO2014104884-A1	Cápsulas gelatinosas compreendendo extratos vegetais; vitamina B3; alfa tocoferol; coenzima Q10; óleo de peixe compreendendo ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexanóico; beta-glucano; e/ou colecalciferol/enteral	Prevenção e/ou tratamento de uma doença selecionada do grupo que consiste em hipercolesterolemia, aterosclerose, acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes mellitus e doença cardíaca coronária	Casca do caule	Redução de colesterol
15. CN105343724-A	Sprays, supositórios, comprimidos efervescentes, unguentos que incluam uma composição herbal/tópica	Tratamento de doenças ginecológicas	Casca do caule	Eficácia de 88% no tratamento de doenças ginecológicas

(Continuação Quadro 11)

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
16. US2011250239-A1	Nanoemulsão compreendendo uma composição herbal aquosa, um transportador compreendendo um componente lipofílico, um surfactante e um álcool/tópica	Prevenir ou tratar doenças de pele (por exemplo, dermatite atópica, psoríase e rosácea)	Casca do caule	Reduz a apresentação de antígenos epiteliais, exibindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias
17. WO2009154237-A1	Comprimido, pó, cápsula, injeção, creme, loção, pomada, xarope ou grânulo compreendendo um ativador tirosina-proteína-quinase (Tie2) de extratos vegetais combinados/enteral, parenteral ou tópica	Prevenção e/ou tratamento de inchaço	Casca do caule	Melhora a função de recuperação linfática em teste pré-clínico
18. US2009087501-A1	Creme dental e colutório contendo dois ingredientes ativos vegetais/bucal	Tratamento de doenças da cavidade oral	Associação de partes aéreas de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado
19. IN201200607-I4	Cápsula gelatinosa, pó, aerossol, emulsão ou solução compreendendo um extrato vegetal /inalatória ou enteral	Tratamento de doenças brônquicas e reações alérgicas	Casca do caule	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado
20. WO2011068815-A1	Pó, solução, sistemas dispersos, goma de mascar, filme ou tira, lenço, implante e/ou fio dental compreendendo compostos fenólicos, íons estanho, íons de zinco e associações/bucal	Tratamento de doenças ou condições da cavidade oral, como xerostomia, gengivite, placa, tártaro, cárie ou doença periodontal	Casca do caule	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado
21. WO2008121412-A1	Cápsula ou comprimido compreendendo proantocianidina/enteral	Tratamento de doença de Alzheimer	Proantocianidina	Capacidade de ligação a polipeptídios tau e evita a agregação dos mesmos, em ensaios de tioflavina T; para tratar distúrbios neurológicos de mamíferos
22. US2005175718-A1	Formas, soluções ou suspensões sólidas compreendendo uma composição herbal/enteral, parenteral ou tópica	Inibição de resposta alérgica, em dermatite atópica e rinite alérgica	Casca do caule	Atenua e/ou previne a incidência de choque anafilático

Registro INPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
(Continuação Quadro 11) 1. PI 0318652-0 A	Xarope, comprimidos, cápsulas e pós, em composição herbal/enteral	Tratamento de distúrbios funcionais gastrointestinais, como síndrome do intestino irritável e diarreia	Folhas e casca	Alívio imediato da azia e ação digestiva, colerética e para melhorar a imunidade
2. PI 0305315-6 A	Spray, aerossol, unguento ou solução semelhante a unguento, em composição herbal/tópica	Acaricida	Trans-cinamaldeído, álcool cinamílico, aldeído salicílico, isotiocianato de alilo e isotiocianato de butilo de derivados de <i>C. verum</i>	Contra <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e <i>Dermatophagoides farina</i>
3. PI 0203212-0 A2	Spray em composição herbal/bucal	Anti-tabagismo	Partes aéreas	Higienizador bucal anti-tabaco, auxiliando contra o vício
4. BR 11 2016 017244 2 A2	Xaropes, comprimidos e/ou cápsulas em composição herbal/enteral	Redução do peso corporal	Capsaicinoides de <i>Cinnamomum</i> spp. e/ou extratos e/ou derivados	Facilita a absorção intestinal do ingrediente ativo
5. BR 11 2016 002182 7 A2	Sistemas dispersos contendo transferossomas, em uma composição herbal/tópica	Substituir o déficit da produção de vitaminas e/ou tratamento dérmico ou outras condições, como dermatite seborreica	Partes aéreas	Pode ser incorporado a um produto protetor solar, pós-sol ou cosméticos para liberar vitamina D, C, B7 ou vitamina E
6. PI 1003031-0 A2	Xarope para adultos e crianças, composição herbal a ser mantida sob refrigeração/enteral	Tratamento da asma brônquica	Casca do caule	Reduz a tosse, chiado, cansaço e catarro

DWPI: *Derwent World Patents Index*; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Intelectual.

Fonte: Próprio autor.

Em referência à utilização de *C. verum* como único composto de origem natural descrito nas formulações, a patente WO2008121412-A1 desenvolve cápsulas ou comprimidos contendo proantocianidinas para o tratamento da doença de Alzheimer (via oral). Apenas a patente WO2011068815-A1 reivindica formas sólidas, soluções, suspensões, sistemas dispersos e/ou implantes contendo compostos fenólicos derivados de *C. verum* associados a íons estanho e zinco, para o tratamento de infecções/inflamações da mucosa oral.

Em levantamento na plataforma do Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) realizado em maio de 2019 foram encontrados seis documentos (BRASIL, 2019) para sistemas de liberação contendo ativos de *C. verum*, os quais também estão descritos no Quadro 1. A invenção PI 0305315-6 desenvolve spray, aerossol, pomada ou solução para via tópica, com ação acaricida. A patente PI02032120A2 apresenta um spray higienizador bucal, com ação anti-tabagismo; a invenção BR1120160172442A2 desenvolve xaropes, comprimidos e/ou cápsulas de uso enteral, para redução do peso corporal. A invenção BR1120160021827A2 desenvolve sistemas dispersos contendo transferossomas, para aplicação tópica. A patente PI10030310A2 reivindica um xarope de uso adulto ou infantil, para uso oral no tratamento de asma brônquica, redução de tosse, chiado, cansaço e catarro.

Dentre as invenções brasileiras para *C. verum*, apenas a PI0318652-0 A relata estágio pré-clínico de desenvolvimento. A patente desenvolve xaropes, comprimidos, cápsulas e pós para tratamento enteral de distúrbios funcionais gastrointestinais, como síndrome do intestino irritável e diarreia. Na plataforma INPI, nenhuma invenção foi relatada para ensaios clínicos envolvendo ativos de *C. verum*.

7.1.2.2 *Eugenia uniflora*

Considerando o desenvolvimento de sistemas de liberação contendo ativos de *E. uniflora* Oliveira e colaboradores (2009) avaliaram a eficácia da descontaminação de escovas dentais pelo óleo essencial das folhas. Este ensaio clínico cruzado duplo cego, teve uma amostra de 28 universitários entre 19 e 25 anos de idade, de ambos os sexos e que não utilizavam antibióticos ou antissépticos. Após o período estabelecido de uma semana, realizou-se contagem para *Streptococcus mutans* nas escovas e foi concluído que o spray foi eficaz na descontaminação.

Em outro estudo clínico relatado, Jovito e colaboradores (2009) avaliaram a atividade higienizadora bucal de *E. uniflora* em 40 voluntários de ambos os sexos, com idades entre 21 e 24 anos, que fizeram o uso de um dentifrício (contendo: extrato hidroalcoólico do fruto maduro a 3% (a cada 10 mL), conservantes (parabenos) 0,02 g; e base de dentifrício qsp) três vezes ao dia durante 22 dias. Após o término do tratamento, foram determinados os índices de acúmulo de biofilme dental, doença gengival e contagem de *S. mutans* salivar. O dentifrício a base de *E. uniflora* demonstrou eficácia semelhante ao dentifrício controle.

Um estudo clínico de Fase II foi continuado por Jovito e colaboradores (2016), após a confirmação da atividade antibacteriana *in vitro* do dentifrício supracitado. Este ensaio foi registrado na plataforma *Clinical Trials Gov* (nº NCT02648139) em 2016 e representa o único estudo clínico registrado mundialmente para *E. uniflora* até o momento (USA, 2019). O estudo foi iniciado em 2008 e concluído em 2010, tendo como responsável o pesquisador Irlan de Almeida Freires, da Universidade Federal da Paraíba (Brasil). O ensaio foi randomizado, controlado, duplo-cego e investigou a eficácia clínica em curto prazo do dentifrício quando utilizado três vezes ao dia, durante sete dias consecutivos em 50 crianças de 10 e 12 anos, de ambos os sexos, que apresentavam sinais clínicos de gengivite. O diagnóstico de gengivite (desfecho primário) foi avaliado e comprovado pelo Índice de Sangramento Gengival e acúmulo de biofilme dentário. O desfecho secundário foi avaliado e comprovado pelo Índice Simplificado de Higiene Oral.

Considerando levantamento de patentes internacionais na plataforma DWPI envolvendo sistemas de liberação de ativos de *E. uniflora*, foram encontradas duas patentes (CLARIVATE ANALYTICS, 2019), apresentadas no Quadro 12. A primeira patente WO2009057126-A1, reivindica formas sólidas, sistemas dispersos e/ou suspensões contendo extratos de raízes, folhas, sementes, frutos ou a planta inteira do gênero *Eugenia* spp. (em concentrações variando entre 10-80%) associada à *Cinnamomum* spp. (em concentrações variando entre 10-80%, opcionalmente) para o tratamento de diabetes e doenças relacionadas (via oral). A segunda patente (DE102011102824-A1) envolve a produção de soluções, suspensões, sistemas dispersos, formas sólidas, aerossóis, emplastos e/ou cataplasmas contendo extratos de folhas, flores ou frutos para inibição tópica da tirosinase, para profilaxia, tratamento e/ou controle de distúrbios de pigmentação cutânea. Nenhuma atividade antimicrobiana foi relatada para *E. uniflora* na plataforma DWPI.

Quadro 12 - Patentes relacionadas nas plataformas DWPI e INPI para ativos de *Eugenia uniflora*

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
1. DE102011102824-A1	Soluções, suspensões, sistemas dispersos, formas sólidas, aerossóis, emplastos, emplastos ou pensos compreendendo extrato de <i>E. uniflora</i> e um ou mais filtros UV/tópica	Inibição da tirosinase para profilaxia, tratamento e/ou controle de distúrbios da pigmentação da pele	Extratos de folhas, folhas ou frutos	Redução do teor de melanina e de hormônio estimulador de α -melanócitos
2. WO2009057126-A1	Formas sólidas, sistemas dispersos, suspensões compreendendo uma composição herbal/oral	Tratar diabetes e distúrbios relacionados	Raízes, brotos, folhas, sementes, frutos ou plantas inteiras de <i>Eugenia</i> spp. e <i>Cinnamomum</i> spp.	Atividade mimética da insulina observada nas associações de extratos vegetais, acima das atividades individuais dos extratos
Registro INPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
1. BR 10 2013 023341-2 A2	Não especificada/não especificada	Analgesia	Sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados (incluindo curzereno)	Potencial antinociceptivo pronunciado, efeitos adversos mínimos apresentados e variedade de compostos ativos presentes
2. BR 10 2016 015604 1 A2	Composições herbais sólidas e/ou líquidas/enteral, tópica e/ou parenteral	Tratamento da dor mediada pelo receptor p2x7	Óleos essenciais	Futuros anti-inflamatórios com novo mecanismo de ação

DWPI: *Derwent World Patents Index*; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Intelectual.

Fonte: Próprio autor.

Em levantamento na plataforma INPI (maio de 2019) para o desenvolvimento de sistemas de liberação contendo ativos de *E. uniflora*, dois documentos foram relacionados (BRASIL, 2019). A invenção BR1020130233412A2 não especificou o sistema de liberação em desenvolvimento, bem como a possível via de administração, mas reivindica o efeito analgésico de sesquiterpenos oxigenados e não-oxigenados (incluindo curzereno) de *E. uniflora*. Em relação a ensaios pré-clínicos, apenas a patente BR1020160156041A2 traz uma composição herbal a base de óleos essenciais de *Eugenia* spp. em forma sólida e/ou líquida para uso entérico, tópico e/ou parenteral para o tratamento da dor mediada pelo receptor p2x7, em modelo murino de edema de pata. Na plataforma INPI, nenhuma invenção foi relatada para ensaios clínicos envolvendo ativos de *E. uniflora*.

7.1.2.3 *Punica granatum*

Em relação a estágios pré-clínicos de desenvolvimento, Amal e colaboradores (2015) desenvolveram uma membrana de quitosana-colágeno-amido para a veiculação do extrato aquoso do pericarpo da romã, com proposta antimicrobiana e cicatrizante. Para tanto, este sistema foi testado frente a *P. aeruginosa* e em modelo de ferida em porcos-da-Índia, demonstrando propriedade antipseudomonal e de redução da superfície da ferida.

Nanopartículas de PLGA-PEG (ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico)-polietilenoglicol (SHIRODE et al., 2015) e de sulfato de polietilenimina-dextran (TIYABOONCHAI; RODLEANG; OUNAROON, 2015), têm sido testadas como carreadores de ativos de *P. granatum*, apresentando fotoestabilidade comprovada em testes de irradiação e de preservação de atividades cicatrizante, antimicrobiana e antitumoral. Sob a perspectiva de desenvolvimento de sistemas dispersos, Arabzadeh e colaboradores (2018) desenvolveram um dentifrício contendo extrato aquoso liofilizado da romã com proposta anti-halitose. No preparo de um hidrogel a base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), extrato da casca da romã e sulfato de zinco, Houston e colaboradores (2017) demonstraram preservação da atividade antiviral e anti-inflamatória da formulação.

Sistemas dispersos contendo 5% de extrato bruto de romã em PEG 400 e 4000 – tipo organogel, pomada e creme foram desenvolvidos por Mo e colaboradores (2015), onde a pomada permitiu a manutenção das propriedades físico-químicas do extrato. Em estudo prévio, o mesmo grupo de pesquisa testou a incorporação do extrato bruto de romã nas concentrações de 5%, 2.5% e 1% (m/m) em sistemas dispersos contendo PEG 4000 para uso tópico e a

concentração de 5% apresentou estabilidade superior e preservação das atividades analgésica e anti-inflamatória em modelos murinos (MO et al., 2013). Portanto, o grupo estabeleceu a concentração de 5% de extrato bruto de romã para o estudo supracitado.

No que tange a artigos científicos envolvendo testes clínicos, Vasconcelos e colaboradores (2003) desenvolveram um gel contendo carbopol 940, trietanolamina e 540 mg de extrato liofilizado do pericarpo da romã e testaram em 60 pacientes (19 a 62 anos) com candidíase associada à estomatite protética, em estudo duplo-cego por 15 dias. Os resultados mostraram atividade antifúngica tópica (VASCONCELOS et al., 2003). Nóbrega e colaboradores (2015) apresentaram colutório a base de extrato de *P. granatum* (6,25%), em perspectiva de higiene oral. O estudo foi randomizado, duplo-cego e prospectivo, com adolescentes, por 14 dias. O colutório não foi eficaz na redução do biofilme dentário e da inflamação gengival, entretanto, mostrou efeito inibitório na contagem de colônias de estreptococos orais (NÓBREGA et al., 2015).

Prakash e colaboradores (2017) realizaram estudo clínico duplo-cego, randomizado e controlado para testar a eficácia de um gel de carboximetilcelulose contendo extrato de romã a 10% em PEG no tratamento de gengivite, por 2 semanas. Os índices gengival, de placa e de sangramento foram acompanhados por até 60 dias pós-tratamento. Efeito inibitório sobre interleucinas pró-inflamatórias foi observado (PRAKASH et al., 2017).

Em relação ao potencial de *P. granatum* para a indústria farmacêutica, existem atualmente 98 estudos clínicos registrados, incluindo 68 estudos concluídos, 4 estudos recrutados e 2 estudos finalizados. Os ensaios clínicos concluídos concentraram-se no tratamento de gengivites, infecções bacterianas e fotoenvelhecimento, além de efeito cardioprotetor, antitumoral e hipoglicemiante. Os ensaios recrutados compreendem o uso do fruto no tratamento de desordens inflamatórias cutâneas e subcutâneas, deficiência auditiva e efeito hiperglicemiante pós-prandial (USA, 2019).

P. granatum tem sido bastante explorada no segmento Odontológico, para atividade antimicrobiana. Quatro estudos clínicos investigam o efeito de colutórios a base de extrato de romã, única forma farmacêutica registrada na plataforma *Clinical Trials Gov*, com propostas antibacterianas (nº NCT03623048, pesquisadora Randa Abdel Rahman, Universidade do Cairo, Egito), anti-sangramento gengival (nº NCT02939092, pesquisadora Heba Moahmed Fouad, Universidade do Cairo, Egito), antibiofilme (nº NCT02949583, Pesquisadora Danúbia Roberta de Medeiros Nóbrega, Universidade Estadual da Paraíba, Brasil) e anti-inflamatória (nº NCT02155361, pesquisador Mesbah Shams; Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Irã).

O acesso à plataforma internacional DWPI permitiu análise de invenções destinadas à veiculação de ativos de *P. granatum*, resultando em 34 patentes (CLARIVATE ANALYTICS, 2019), descritas no Quadro 13. Dentre estas, com proposta anti-inflamatória a CN108904436-A desenvolve um creme composto de extrato vegetal do fruto e fermentado de *Lactobacillus* spp. para uso tópico; a WO2016038404-A1 produz pó, gel e/ou pomada para uso tópico e a CN101797325-A desenvolve comprimidos, cápsulas, pílulas, soluções orais ou grânulos compreendendo uma composição herbal a base de extrato de casca de romã para inflamações ginecológicas. A patente WO2006022502-A1 destina-se a formulações contendo ácido quebulágico, punicalagina, corilagina ou pedunculagina isoladas para ação imunomodulatória parenteral ou enteral. Com proposta analgésica, a WO2018002144-A1 desenvolve cápsulas de gelatina ou emulsões contendo uma composição herbal para uso entérico ou tópico, incluindo prevenção e/ou tratamento de dor periférica. A WO2007117352-A2 desenvolve emulsão óleo/água compreendendo extrato de *P. granatum* para o tratamento tópico de inflamações em imunossuprimidos, incluindo alívio da dor.

Para ação hipoglicemiante, a patente IN201841004297-A desenvolve nanolipossomas contendo extrato em pó de romã para uso tópico ou entérico e a patente WO2017167168-A1 produz comprimido, cápsula ou gel contendo ácidos tânicos de *P. granatum* para o tratamento de hiperglicemia e hiperlipidemia. A US2010239553-A1 desenvolve formas sólidas e sistemas dispersos para o tratamento da diabetes associada ao câncer, utilizando ácidos elágicos. A WO2018002888-A1 desenvolve também forma sólida, solução, suspensão, sistema disperso (enteral) ou emulsões (parenteral) compreendendo ácido elágico e sal de elagato de colina para o tratamento de câncer, doenças metabólicas e neurodegenerativas.

Quanto à atividade antimicrobiana, a patente US2019000909-A1 desenvolve uma solução aquosa compreendendo polifenóis para uso tópico/transdérmico e a patente WO2008068533-A2, cuja forma sólida, sistema disperso, solução ou suspensão pode compreender extrato da casca da romã no tratamento enteral ou parenteral de infecções. A invenção US2018103648-A1 produz goma de mascar, colutório ou pó contendo extrato da casca do fruto para tratamento tópico de faringites e/ou amigdalites.

Quadro 13 - Patentes relacionadas nas plataformas DWPI e INPI para ativos de *Punica granatum*

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
1. US2019000909-A1	Solução aquosa compreendendo polifenóis e peróxido de hidrogênio/enteral, tópica ou transdérmica	Inibição ou inativação da virulência microbiana	Polifenóis da casca	Tratamento de diarreia, tecido infectado e aceleração da cicatrização de feridas
2. CN108904436-A	Creme compreendendo um extrato vegetal e um fermentado <i>Lactobacillus</i> spp./tópico	Efeitos anti-inflamatório e antienvhecimento	Extrato de romã a 0,01 a 10 partes por produto de fermentação	Efeitos anti-inflamatórios, antienvhecimento e anti-contaminante em células epidérmicas humanas
3. IN201841004297-A	Nanolipossomas compreendendo extrato em pó, lecitina de soja e colesterol/tópica ou enteral	Remoção de radicais livres envolvidos no diabetes e no controle dos níveis de glicose no sangue	Cascas da romã	Biodisponibilidade e estabilidade incrementadas devido ao menor tamanho de partícula
4. WO2017033209-A1	Formas sólidas, sistemas dispersos, suspensões, soluções e/ou microesferas compreendendo uma composição herbal/enteral ou tópica	Para tratar doenças maculares relacionadas à idade, edema macular diabético e oclusão de veias retinianas	Associação de partes aéreas de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Regulação negativa do fator de crescimento endotelial vascular em células epiteliais retinianas, eficácia de ligação e inibição da angiogênese
5. US2018103648-A1	Goma de mascar, colutório ou pó compreendendo uma composição herbal/bucal	Atividade antimicrobiana para tratamento de faringite ou amidalite	Cascas da romã	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , atividade desinfetante
6. WO2018002888-A1	Formas sólidas, soluções ou sistemas dispersos (oral) ou suspensões, soluções ou emulsões estéreis (parenteral) compreendendo sal elagato de colina	Aumento da produção de urolitina; para tratamento de Doença de Alzheimer, doença de Parkinson e/ou tratamento da doença de Huntington; para prevenir ou tratar câncer, distúrbio metabólico, atrofia muscular e/ou inflamação	Ácido elágico	Homens, mulheres na pós-menopausa e mulheres grávidas podem utilizar
7. WO2018163214-A2	Forma sólida compreendendo uma composição herbal ou suas moléculas ativas/enteral	Aumento de testosterona, por inibição de aromatase	Polifenóis de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Maior atividade androgênica em animais tratados
8. WO2018002144-A1	Cápsulas ou emulsões de gelatina mole que compreendem extratos de ervas em forma livre, complexos com fosfolípidios, extratos lipofílicos ou isobutilamidas de ácidos graxos poli-insaturados isoladas/enteral ou tópica	Prevenção e/ou tratamento da dor periférica e estados inflamatórios, como inflamações cutâneas de diversas etiologias	Cascas da romã	Composição à base de plantas acrescida de diacereína. Melhora a atividade analgésica em modelo clínico de osteoartrite
9. WO2017167168-A1	comprimido, cápsula, comprimido mastigável ou gel compreendendo ácidos tânicos contendo mais de três moléculas galoil/enteral	Inibição de D-aminoácido oxidase (DAAO) para tratar a obesidade, hiperlipidemia, diabetes ou desordens do Sistema Nervoso Central (SNC)	Taninos	Redução das atividades do SNC mediadas por DAAO em testes pré-clínicos

(Continuação Quadro 13)

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
10. IN201503687-I3	Formas sólidas ou sistemas dispersos compreendendo uma combinação de ervas, alúmen vermelho; e opcionalmente transportar ou excipiente/tópica	Tratamento de leucorreia	Cascas da romã	Os detalhes dos testes são descritos, mas nenhum resultado é dado
11. EP3103465-A1	Gel, comprimido, filme mucoadesivo orodispersível ou comprimido de liberação retardada compreendendo uma combinação herbal/enteral	Prevenção e/ou tratamento de lesões mucosas presentes na boca, lábios, garganta e/ou área genital pela doença de Behçet ou infecção por herpes vírus ou infecções bacterianas	Polifenóis das sementes	Lise de xenobióticos por contato com a saliva, altamente tolerável e sem efeitos colaterais
12. WO2016150481-A1	Forma líquida, gel, emulsão, sólida ou injetável, que compreende uma composição herbal/enteral ou parentérica	Tratar ou prevenir doenças relacionadas à amiloide	Romã	Efeito contra a neurotoxicidade do peptídeo beta-amiloide (β)
13. WO2016118907-A1	Nanoemulsão compreendendo succinato de D- α -tocoferol, polietilenoglicol 1000 e um extrato hidrofílico ou um derivado/tópica	Supressão da formação de queloides	Romã	Aplicação em um local de incisão após a cirurgia
14. WO2016099944-A1	Formas sólidas, loções, adesivos ou uma solução compreendendo ácido elágico di-hidratado /enteral ou transdérmica	Tratamento da obesidade	Ácido elágico di-hidratado	Biodisponibilidade aumentada, reduz a glicemia máxima; estável por 24 meses; proporciona perda de peso e aumenta o nível de energia celular
15. WO2016038404-A1	Pó, gel e/ou pomada compreendendo uma composição herbal/tópica	Tratamento de feridas de gangrena seca, gangrena úmida e diabetes	Cascas da romã	Regeneração do tecido da ferida em 80 a 100%, 2 dias após a administração tópica
16. WO2015126930-A2	Aerossol ou vacina composta por um agente antimicobacteriano e um inibidor de urease, que pode ser um triterpenoide pentacíclico isolado ácidos isolados de vegetais/inalatória, tópica, enteral, parenteral e transdérmica	Tratamento de infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cascas da romã	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado
17. IN201301573-I3	Grânulo efervescente compreendendo um extrato metanólico vegetal, uma mistura ácida, base e excipiente/tópica	Prevenção de úlceras e efeito analgésico	Cascas da romã	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado
18. KR2015027933-A	Sistema disperso compreendendo extratos de ervas como ingredientes ativos/tópica	Tratamento de espinhas e doença inflamatória da pele	Romã	Atividade contra <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. acnes</i> , reduzindo oleosidade, eritema e diâmetro dos poros da pele

(Continuação Quadro 13)

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
19. CN103655647-A	Comprimidos ou cápsulas compreendendo composição herbal/enteral	Redução da diarreia associada a quimioterapia para o câncer	Decocto das cascas da romã	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado
20. IN201102605-I1	Nanoemulsão compreendendo uma composição herbal, e meio líquido que compreende uma solução de ácido bórico/tópica	Tratamento de feridas e desordens cutâneas	Flores	Biodisponibilidade, permeabilidade rápidas e eficientes, boa atividade de limpeza, com menos irritação
21. WO2012154740-A1	Esmalte compreendendo um iodóforo, dimetilsulfóxido e uma composição herbal/tópica	Tratamento de infecções ungueais	Partes aéreas	Cultura negativa após 12 semanas de tratamento, em 85% dos pacientes
22. WO2012013792-A1	Goma de mascar, comprimido orodispersível, filme ou um spray bucal composto por um extrato natural contendo antocianinas, um agente para melhorar a vigilância, e, opcionalmente, pelo menos um de luteína xantana de milho, mesozeaxantina e astaxantina/enteral	Aliviar o desconforto visual, melhorar a função visual e melhorar a vigilância	Partes aéreas	Alívio do desconforto relacionado a danos oxidativos, juntamente com um aprimoramento do estado de vigilância
23. WO2011068812-A1	Pó; solução, sistemas dispersos; goma de mascar; filme ou tira; lenço ou toalha; implante; e/ou fio dental composto por compostos fenólicos, íons estanho, íons de zinco/tópica	Tratamento da doença ou condição da cavidade oral, incluindo xerostomia, gengivite, placa, tártaro, cárie, ou doença periodontal	Partes aéreas	Limpeza da superfície dentária através da exfoliação, fornece espuma durante a escovação
24. WO2011041648-A1	Soluções, sistemas dispersos, formas sólidas, filmes, máscaras de pele e maquiagem compreendendo um composto anti-inflamatório (não-inibidor de NFkB) e com IC ₅₀ de cerca de 70 g/mL ou menos/tópica	Tratamento da hiperpigmentação pós-inflamatória, para reduzir o tamanho dos poros, tratamento da acne, para reduzir a produção de sebo e para mitigação de cicatrizes	Partes aéreas	Reduz/inibe a liberação de interleucina (IL)-1 e IL-8 da pele e fator nuclear κ B de células B ativadas (NF-kB) na pele e outros tecidos
25. CN101983722-A	Comprimidos, cápsulas, grânulos compreendendo colágeno, hialuronato de sódio, extrato vegetal e vitamina C/tópica ou enteral	Prevenção e tratamento de danos nos tecidos moles e inflamação simultânea	Partes aéreas	Aumenta a taxa de reparação de tecidos moles e geração de líquido sinovial
26. US2010239553-A1	Pós, comprimidos, grânulos dispersíveis, cápsulas, géis compreendendo uma ou mais espécies de fitosterol; quercetina; um ginsenosídeo e um astragalosídeo/enteral	Tratamento do câncer e doenças associadas, como diabetes e glaucoma	Ácidos elágicos	Tratamento do câncer de próstata de alto grau; mais, redução substancial da glicemia de jejum em 90 dias
27. CN101797325-A	Comprimidos, cápsulas, comprimidos, soluções orais ou grânulos compreendendo uma composição herbal/tópica ou enteral	Tratamento ginecológico de vaginite, cervicite, inflamação pélvica, endometrite, adnexite, episioíte e bartolinite	Cascas da romã	Efeito anti-inflamatório; redução da permeabilidade capilar, efeito de função imune e inibição de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , estreptococos beta-hemolíticos e <i>C. albicans</i>

(Continuação Quadro 13)

Registro DWPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
28. WO2010081485-A1	Pomada compreendendo extratos aquosos e lanolina ou/e vaselina/tópica	Tratamento de hemorroidas	Cascas da romã	Significativamente regride e, eventualmente, desaparece as hemorroidas
29. WO2008084282-A2	Forma sólida, sistema disperso, solução ou suspensão composta por dois ou mais extratos, em associação/enteral ou parenteral	Tratamento da osteoporose e outros distúrbios relacionados	Sementes	O extrato vegetal não é tóxico até as diluições de 1:10000
30. WO2008068533-A2	Forma sólida, sistema disperso, solução ou suspensão compreendendo um sal de cobre e/ou um sal de cobalto e/ou um sal de níquel; e um extrato vegetal/enteral ou parenteral	Tratar, melhorar ou prevenir a infecção microbiana	Cascas da romã	Eficaz contra bactérias resistentes multirresistentes Gram-positivas e Gram-negativas
31. WO2007117352-A2	Emulsão óleo/água composta por fenoxietanol, uma quantidade esfoliante eficaz de um ácido hidrofóbico hidroxicarboxílico, um tensoativo não iônico e um ingrediente ativo/ tópica	Tratamento da dor em condições de inflamação, imunossupressão, infecção e condições patofisiológicas dermatológicas	Partes aéreas	O sistema aumenta a liberação dérmica e concomitantemente a duração da atividade terapêutica
32. WO2006022502-A1	Forma sólida, suspensão, sistema disperso ou aerossol composto por ácido quebulágico, punicalagina, corilagina ou pedunculagina como ativo/enteral ou parenteral	Prevenção ou tratamento de uma doença imunológica (por exemplo, rejeição de transplante, doença de enxerto e doença autoimune)	Compostos fenólicos	Melhora a ativação das células T reguladoras <i>in vivo</i> e suprimir a resposta imune no modelo de leucócitos humanos alogênicos; controla a autoimunidade, doenças hipersensíveis e suprime a rejeição após o transplante
33. WO2019040035-A2	Lipossoma/composição tópica ou transdérmica	Cosmético, conservante, antimicrobiano, composição farmacêutica, dispositivo médico e/ou desinfetante	Saponinas de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Extração eficiente, entrega eficiente e estabilização da dispersão lipossomal
34. US2009087501-A1	Creme dental e colutório contendo dois ingredientes ativos vegetais/bucal	Tratamento de doenças da cavidade oral	Associação de partes aéreas de <i>C. verum</i> e <i>P. granatum</i>	Detalhes do teste são descritos, mas nenhum resultado é apresentado

(Continuação Quadro 13)

Registro INPI	Forma Farmacêutica e/ou Sistema de Liberação/Via de administração	Proposta Terapêutica	Farmacógeno/Ativos de Interesse	Vantagens/Principais Reinvidicações
1.BR1020170212203-A2	Dentifício/bucal	Antibiofilme e atividade antimicrobiana para higiene de dispositivos protéticos	Derivados do extrato bruto	Atividade antimicrobiana para bactérias orais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
2.BR112018077128-7A2	Não especificada, mas em composição herbal/não especificada	Prevenção e/ou tratamento da dor inflamatória osteoarticular e lesão na cartilagem	Extrato e/ou complexos com fosfolipídios	Não relatadas
3.BR1120170264170-A2	Não especificada, mas em composição herbal/não especificada	Tratamento e prevenção de distúrbios da cavidade oral, garganta e trato respiratório	Partes aéreas	Reduz a incidência de dor na garganta, infecção e uso de antibióticos, especialmente entre bebês e idosos
4.BR1120170264226-A2	Não especificada, mas em composição herbal/tópica	Tratamento de infecção por herpes vírus ou síndrome de Behçet	Partes aéreas	Redução das lesões mucosas da boca, garganta e área genital
5.BR1020150240520-A2	Biomembrana de liberação prolongada/tópica	Aceleração da cicatrização de feridas	Extrato aquoso contendo punicalagina A, punicalagina B, ácido elágico e ácido gálico	Completamente absorvível, sem geração de resíduos, proliferação rápida de células, deposição de colágeno, reparação de tecidos e uniformidade de cicatriz
6.BR1020150050380-A2	Sólido ou líquido/tópica	Antitumoral e indutor de apoptose	Decocto da romã	Não relatadas
7.BR1020150043287-A2	Cápsulas gelatinosas, xaropes, solução oral/não especificada	Tratamento de inflamação aguda, prevenção de complicações da inflamação crônica	Extrato aquoso liofilizado das folhas	Ação anti-inflamatória por mecanismos ainda não especificados
8.BR1020120180375-A2	Gel, comprimidos/bucal	Tratamento de candidíase associada a estomatite protética	Extrato, frações e compostos isolados da casca da romã	Inibição do crescimento fúngico e efeito sinérgico contra <i>C. albicans</i> quando associado com fluconazol
9. PI04037227-A	Colutório/bucal	Antimicrobiano, adstringente, antisséptico e cicatrizante	Pericarpo do fruto	Uso dermatológico e antisepsia oral humana e veterinária

DWPI: Derwent World Patents Index; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Intelectual.

Fonte: Próprio autor.

Também voltada para o tratamento de infecções orais, a patente US2009087501-A1 produz um dentifrício e/ou colutório contendo uma associação de *C. verum* e *P. granatum*. A patente EP3103465-A1 desenvolve comprimidos de liberação retardada a base de polifenóis das sementes para tratamento tópico/enteral de infecções bacterianas ou virais. A patente WO2012154740-A1 desenvolve um esmalte contendo uma composição herbal a base de romã para o tratamento de infecções ungueais. Relevante potencial demonstra a invenção WO2015126930-A2, que desenvolve um aerossol ou vacina para o combate de infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, compreendendo um ácido triterpenoide pentacíclico isolado do extrato das cascas da romã.

As patentes IN201503687-I3 e WO2011068812-A1 desenvolvem, respectivamente, formas sólidas e/ou sistemas dispersos compreendendo uma combinação herbal com extrato de casca de romã para o tratamento tópico de leucorreia; e formas sólidas, soluções, suspensões, sistemas dispersos e/ou implantes contendo compostos fenólicos derivados da romã para o tratamento de infecções/inflamações da mucosa oral.

Em levantamento na plataforma INPI (maio de 2019), para o desenvolvimento de sistemas de liberação contendo ativos de *P. granatum* foram encontrados nove documentos (BRASIL, 2019). A patente BR1120180771287A2 reivindica o extrato das cascas do fruto para prevenção e/ou tratamento da dor inflamatória osteoarticular e lesão da cartilagem; a patente BR1120170264226A2 reivindica composição fitoterápica contendo ativos de *P. granatum* para uso tópico para tratamento de herpes ou síndrome de Behçet e a patente BR1020150043287A2 reivindica cápsulas gelatinosas, xaropes, solução contendo extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas para o tratamento da inflamação aguda e prevenção de complicações da inflamação crônica.

No que se refere ao uso antimicrobiano de sistemas contendo *P. granatum*, a invenção brasileira BR1020170212203A2 desenvolve um dentifrício a base de subprodutos desta espécie, objetivando atividade antibiofilme e antimicrobiana para higiene de dispositivos protéticos. A invenção BR1120170264170A2 reivindica uma composição herbal para o tratamento e prevenção de distúrbios da boca, garganta e trato respiratório; a invenção PI04037227A apresenta uma solução antisséptica bucal com ação antimicrobiana, adstringente e cicatrizante utilizando pericarpo da romã. Finalmente, a patente BR1020120180375A2 desenvolve gel e/ou comprimido contendo frações/compostos isolados para uso bucal no tratamento da candidíase associada à estomatite protética.

Em estágios pré-clínicos para *P. granatum*, conforme busca no INPI, dois estudos foram encontrados. A patente BR1020150240520A2 desenvolve uma biomembrana para liberação prolongada contendo extrato aquoso rico em punicalagina A, punicalagina B, ácido elágico e ácido gálico para aceleração da cicatrização de feridas. A invenção BR1020150050380A2 reivindica uma forma sólida ou líquida para uso tópico a base do decocto de romã para atividade antitumoral e indutora de apoptose. Na plataforma INPI, nenhuma invenção foi relatada para ensaios clínicos envolvendo ativos de *P. granatum*.

7.1.3 Secagem por aspersão para produção de insumos farmacêuticos ativos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*

Os insumos farmacêuticos ativos de produtos fitoterápicos são constituídos, majoritariamente por extratos secos, os quais dentre as suas vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, padronização facilitada, maior concentração de compostos ativos e elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas. Entre os procedimentos de secagem, destaca-se a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Os secadores por atomização, ou “*spray dryers*”, utilizam uma carga bombeável (solução, suspensão fina, gel, emulsão etc.) para a obtenção de material pulverizado como produto final. A capacidade de produção deste tipo de equipamento varia desde escala piloto até produção industrial, com capacidade de até 25 t/h. Outra vantagem deste tipo de equipamento está na curta exposição ao ar quente, ao mesmo tempo que a evaporação do líquido das gotículas mantém a baixa temperatura do produto. Devido à ampla faixa de utilização e da forma conveniente final do produto, os secadores por atomização permitem aplicação em enorme variedade de produtos, incluindo alimentícios (ex: café, leite, amido), químicos (ex: detergente, corante, polímeros) e farmacêuticos (ex: plasma sanguíneo, enzimas), entre outros (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015; SCHUCK et al., 2016).

Dentre os fatores relacionados às características do material de entrada, o uso de adjuvantes na técnica de secagem por aspersão é uma prática comum. São utilizados amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina, entre outros. Para a secagem de extratos derivados de plantas, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *spray drying* é uma fase de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo inclusive afetar as características de biodisponibilidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

O dióxido de silício coloidal (Aerosil®), que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, tem sido amplamente empregado como adjuvante. Na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais, a utilização de Aerosil® confere resultados promissores (GALLO et al., 2011; GEORGETTI et al., 2008).

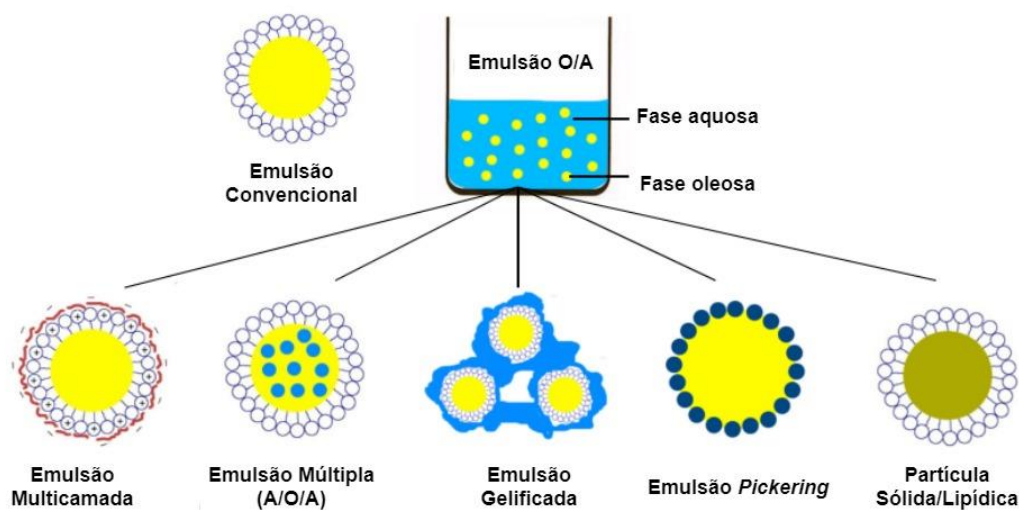
O emprego de Aerosil® demonstra vantagens como melhoramento das propriedades de fluidez de pós, aumento da tixotropia de líquidos, diminuição da umidade para ativos sensíveis e melhoria da distribuição dos ingredientes farmacêuticos em diversos tipos de formulações (GALLO et al., 2011). Nesse aspecto, o processo de secagem por aspersão empregando Aerosil® como adjuvante tem sido empregado com sucesso para secagem de derivados de *Cinnamomum verum* (HAN; CUI, 2012) e *Punica granatum* (MIRAVET et al., 2016; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

7.1.4 Emulsões como sistemas de liberação para compostos fenólicos derivados de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*

A incorporação de ativos naturais antimicrobianos em produtos para uso tópico tem sido cada vez mais utilizada, uma vez que o tratamento com antibióticos sistêmicos pode não ser ideal, devido ao custo elevado e aos possíveis efeitos adversos. Os antimicrobianos tópicos podem ser utilizados como terapia complementar ao tratamento sistêmico ou como monoterapia (MUELLER et al., 2012; SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017). A tecnologia de emulsão é geralmente aplicada para o encapsulamento de bioativos em soluções aquosas, os quais podem ser utilizados diretamente no estado fluido ou podem ser secos para a composição de pós após emulsificação (FANG, 2010; JADHAV et al., 2006; WADHWA et al., 2019).

Basicamente, uma emulsão consiste na dispersão de um líquido (fase dispersa) em outro (dispersante ou fase contínua), onde os componentes são imiscíveis entre si (ex: óleo e água). As emulsões podem ser classificadas de acordo com a orientação espacial das fases, onde um sistema de gotículas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de emulsão óleo em água (O/A) e um sistema que consiste em gotículas de água dispersas na fase oleosa é chamada de emulsão água em óleo (A/O) (Figura 22). Em consequência, emulsões multicamadas, múltiplas, gelificadas e Pickering podem ser desenvolvidas a partir destes sistemas (BURGUERA; BURGUERA, 2012; LONE et al., 2019; MAO; MIAO, 2015; MCCLEMENTS, 2015).

Figura 22 - Tipos de emulsões de acordo com a orientação espacial das fases



Fonte: Adaptado de Mao e Miao (2015).

Dentre os sistemas dispersos, as principais vantagens da utilização de emulsões incluem a estabilidade termodinâmica, facilidade de preparação e estabilidade prolongada. Permitem solubilização de maiores quantidades de fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis, devido à existência de microdomínios de polaridade diferente (HOLMBERG, 2018; WANG; ZHANG, 2013). Ademais, possuem diâmetro médio de gotículas inferior a $0,22\ \mu\text{m}$, o que também permite a esterilização por filtração; e têm baixa viscosidade, possibilitando diversas vias de administração, incluindo uso parenteral (HOLMBERG, 2018; JADHAV et al., 2006). O Quadro 14 apresenta as principais tipos e características de sistemas emulsionados.

Para que possam ser aplicadas às mais diversas áreas farmacêuticas, as emulsões devem apresentar um período definido e pré-determinado de estabilidade físico-química, sendo este dependente das aplicações pretendidas. A estabilidade é definida como a capacidade que o produto tem, do início ao fim de sua vida útil, e numa determinada embalagem, de manter as mesmas propriedades e características que tinha no momento em que sua fabricação foi concluída por um procedimento padronizado (MORAIS, 2008; HOLMBERG, 2018).

Quadro 14 - Principais tipos e características de sistemas emulsionados

Parâmetro	Microemulsões	Macroemulsões	Emulsões Múltiplas	Nanoemulsões
Aparência	Translúcida	Turva	Turva	Translúcida
Isotropia ótica	Isotrópica	Anisotrópica	Anisotrópica	Anisotrópica
Estabilidade	Termodinamicamente estável, longa estabilidade	Termodinamicamente instável, com eventual separação de fases	Termodinamicamente instável, com eventual separação de fases	Termodinamicamente instável, com eventual separação de fases
Tamanho da gotícula	10-100 nm	>500 nm	~ μm	20-200 nm
Preparação	Monofásica, condições medianas	Bifásica, exige potência energética	Bifásica, exige potência energética	Bifásica, exige elevada potência energética
Viscosidade	Baixa	Alta	Alta	Baixa
Concentração de tensoativo	Alta	Baixa	Baixa	Moderada

Fonte: Adaptado de Burguera; Burguera (2012) e de Wang; Zhang (2013).

O grande desafio da estabilização reside no fato que as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e propensos a agregação, devido à grande área interfacial das gotículas dispersas. A relativa estabilidade é o resultado do equilíbrio entre as forças de repulsão e de atração entre as gotículas vizinhas. A natureza dos componentes da emulsão (óleo, água, tensoativos etc.) desempenha papéis dominantes nessa interação, e alterações nas condições ambientais, como por exemplo, pH, força iônica e temperatura, podem resultar em mudanças no equilíbrio da força, influenciando assim na estabilidade da emulsão (MAO; MIAO, 2015).

Os mecanismos de estabilização de uma emulsão podem ser do tipo eletrostático, estérico e eletroestérico, sendo a estabilidade controlada pelas propriedades do filme interfacial formado entre as fases imiscíveis e pelas características físico-químicas da camada de adsorção formada na superfície das gotículas dispersas. Estas propriedades incluem além da diminuição do valor da tensão interfacial, as características da solução contínua próxima a interface, que são dependentes da composição e da concentração do agente tensoativo e/ou polímero utilizado (BURGUERA; BURGUERA, 2012; MAO; MIAO, 2015; MORAIS, 2008). O avanço das técnicas analíticas, que predizem com precisão a estabilidade a longo prazo, e o conhecimento acerca da microestrutura do sistema emulsionado são de fundamental importância para a sua captação industrial e comercialização.

Emulsões a base de quercetina foram preparadas com sucesso por Censi e colaboradores (2012), destinadas à aplicação tópica. Diagramas de fase ternários foram plotados e parâmetros físico-químicos da microemulsão foram determinados, como pH (5,3), distribuição e tamanho de partícula (10-50 nm), bem como eficiência de encapsulação ($98,00 \pm 1,70\%$) e estudo de permeabilidade *ex vivo* demonstrando resultados satisfatórios (CENSI et al., 2012). Também foram reportados estudos de preparação de microemulsões para hesperetina (TSAI et al., 2010), hesperidina (KILOR; SAPKAL; VAIDYA, 2015), narigenina (TSAI et al., 2015) e antocianinas (DESNITA; WAHDANINGSIH; HERVIANTI, 2016), demonstrando aplicabilidade para veiculação de outros flavonoides e demais compostos fenólicos.

7.1.4.1 Emulsões Pickering

Tradicionalmente, os tensoativos iônicos ou não-iônicos são utilizados como agentes emulsionantes. Emulsões mais estáveis são obtidas utilizando-se agentes emulsionantes ou uma combinação de agentes emulsionantes com valores de equilíbrio hidrofílico–lipofílico (EHL) próximos ao que é exigido para a fase oleosa. Entretanto, alguns surfactantes iônicos podem ser intrinsecamente tóxicos, causar baixa tolerância fisiológica e irritabilidade e/ou alterar a farmacocinética de medicamentos co-administrados (ALWADANI; FATEHI, 2018; FERREIRA et al., 2010; HOWARD MURAD; RAFAEL AKYUZ, 2007; MARTO et al., 2016).

Emulsões estabilizadas por partículas sólidas, também chamadas de emulsões tipo Pickering (Figura 23), são consideradas uma estratégia atraente para a incorporação de ativos. A estabilização deve-se à dupla molhabilidade, que permite o acúmulo espontâneo de partículas na interface líquido-líquido, estabilizada contra coalescência por exclusão de volume e impedimento estérico. Uma característica fundamental desses tipos de sistemas é a formação de uma camada coloidal flexível, porém robusta, na interface. Nesse tipo de emulsão, um dos líquidos umedece as partículas sólidas em maior extensão que o outro, sendo o líquido com as menores propriedades umectantes considerado a fase dispersa. A eficácia da estabilização de emulsões Pickering depende, como um todo, do tamanho, forma, concentração, molhabilidade (ângulo de contato) e interações entre as partículas (MARTO et al., 2016).

Figura 23 - Representação de estabilização de uma micela em uma emulsão Pickering



Fonte: Adaptado de Ku Leuven (2019).

Emulsões Pickering demonstram maior estabilidade contra coalescência e amadurecimento de Ostwald, fenômenos comuns de instabilidade em sistemas dispersos. O tamanho, a carga e a estrutura química das partículas estabilizantes são essenciais para a estabilização. Geralmente as partículas devem ser substancialmente menores que o tamanho da gota de emulsão alvo, a presença de carga previne a agregação na interface e as partículas com estrutura deformáveis facilitam o revestimento das gotículas (MARTO et al., 2016).

As emulsões estabilizadas por partículas sólidas permitem formação de gotículas grandes e estáveis até o tamanho de milímetros, quando comparadas às emulsões clássicas estabilizadas por tensoativos. Muitas partículas sólidas podem ser usadas em emulsões Pickering, incluindo partículas orgânicas (ex: amido) ou inorgânicas (ex: argila). Estudos têm sido conduzidos utilizando derivados de celulose e outros agentes emulsionantes em substituição aos tensoativos iônicos ou não-iônicos, uma vez que estes compostos exibem comprovada tolerância fisiológica (LUNTER; DANIELS, 2012; MARTO et al., 2016).

Nesse sentido, um estudo recente aborda a compartimentalização de óleos essenciais de *C. verum* em emulsões do tipo Pickering (FASIHI et al., 2019). Entretanto, há uma lacuna de publicações referentes ao emprego desses sistemas para *E. uniflora* e *P. granatum*, sobretudo, no que se refere à incorporação de compostos fenólicos.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Obtenção de extratos brutos e frações secas por aspersão

A secagem por aspersão foi realizada em mini *spray dryer* (LM MSD 1.0, Labmaq do Brasil®), com câmara de secagem e ciclone em aço inox. A câmara de secagem possui altura total com a tampa de 0,68 m, diâmetro da tampa de 0,24 m e diâmetro do corpo da câmara de 0,20 m. O ciclone possui altura total de 0,54 m e diâmetro maior de 0,095 m. O conjunto atomizador utilizado foi tipo nebulização duplo fluido (pneumático), composto pelo extensor e capa do bico atomizador tipo mistura interna e externa, construído em aço inox (Labmaq do Brasil®), com capa do bico atomizador de 1,0 mm. A vazão de ar comprimido foi de 2,4 m³/h e do ar de secagem de 90 m³/h.

Os extratos brutos (EBs) foram obtidos por turbólise e as frações acetato de etila (FAEs) por particionamento, conforme protocolo descrito na Seção 5. Com exceção da etapa de liofilização, as soluções aquosas dos EBs/FAEs resultantes foram misturadas em etanol PA (1:1 v/v), acrescentando-se sílica hidrofílica (Aerosil® 130) na proporção de 5%, 10% e 15% (m/v), como amostras independentes. Os derivados vegetais (extratos e frações) foram transportados até o atomizador por bomba peristáltica na vazão de 0,0007 m³/h. A temperatura do ar de secagem foi ajustada para 120 °C e a temperatura registrada de saída do produto foi de 90 °C, obtendo-se os EBs/FAEs secos por aspersão (SPA). O rendimento do processo foi calculado como a razão entre a massa de sólidos do pó obtido após a secagem e a massa de sólidos da solução atomizada:

$$RS(\%) = \left(\frac{m \text{ pó}}{m \text{ sol}} \right) \times 100$$

Onde RS = Rendimento de secagem (%), *m pó* = massa obtida do produto em pó (g) e *m sol* = massa do EB/FAE na solução alimentada (g).

7.2.2 Obtenção e caracterização dos sistemas dispersos emulsionados

7.2.2.1 Construção de diagramas pseudoternários

Os diagramas pseudoternários foram construídos a partir da metodologia de titulações consecutivas, utilizando como fonte de agitação mecânica dois métodos (ultraturrax – IKA® e sonda ultrassônica – Ultronique®), a fim de determinar em quais concentrações dos componentes seriam produzidas emulsões, microemulsões, nanoemulsões ou separação de fases (FERREIRA et al., 2010; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012). Foi utilizada como fase oleosa triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico (Myritol® 312) acrescido de monooleato de sorbitano 80 (Span® 80), e como fase aquosa a água destilada acrescida de monolaurato de sorbitano etoxilado 20 (Tween® 20).

Os sistemas dispersos foram preparados utilizando diferentes proporções óleo/tensoativo, seguindo a razão 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, partindo de cada sistema foram obtidas 9 formulações, utilizado de titulações crescentes com água ultrapurificada. Para ambas as metodologias o ciclo de obtenção foi o mesmo: 2 minutos sob agitação mecânica. O procedimento foi realizado em duplicata e analisado por caracterização macroscópica (FERREIRA et al., 2010).

7.2.2.2 Método de obtenção e avaliação preliminar do desempenho das formulações

As regiões correspondentes à formação de emulsão foram identificadas nos diagramas pseudoternários e a proporção de cada componente na formulação foi determinada. A formulação eleita (Tabela 12) foi empregada como referência para o estudo de avaliação da eficiência de incorporação dos EBs/FAEs de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA utilizando 5%, 10% ou 15% de sílica hidrofílica (Aerosil® 130) como adjuvante, em percentual de 5%, 10% e 15% de incorporação em sistemas estabilizados por tensoativos (Quadro 15).

Tabela 12 - Composição final da emulsão

COMPONENTES	PERCENTUAL
Myritol® 312	10%
Tween® 20, Span® 80	5%
EB/FAE SPA em água ultrapurificada	85%

EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

Quadro 15 - Delineamento experimental para avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo extrato bruto/fração acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

Método	Quantidade de Extrato/Fração incorporado	Teor de Aerosil® 130		
		5%	10%	15%
Ultraturrax	5%	Experimento 1	Experimento 4	Experimento 7
	10%	Experimento 2	Experimento 5	Experimento 8
	15%	Experimento 3	Experimento 6	Experimento 9

SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

A homogeneização e dispersão das formulações foram realizadas durante 10 minutos (T = 40 °C) em ultraturrax a 9 600 rpm (T25, IKA®), totalizando 54 formulações. Após 24 horas da preparação, os sistemas foram avaliados quanto às características macroscópicas, pH (Seven easy, Mettler Toledo®), tamanho de gotícula (Mastersizer 2000S, Malvern®) e estabilidade após centrifugação a 370.33, 876.51 e 1597.44 g (Centrífuga Rotanta 460RF, Hettich®).

7.2.2.3 Avaliação da eficiência do método de dispersão

O teor de incorporação dos EBs/FAEs e o teor de Aerosil® 130 empregado para cada formulação foram eleitos a partir dos sistemas que apresentaram menores tamanhos médios de gotículas (d_{50}) e estabilidade frente à centrifugação. Estabelecido estes teores (Tabela 13), sistemas estabilizados por tensoativos foram avaliados frente à diferentes condições de preparo, em experimentos otimizados através de ensaio fatorial 2^3 (Quadro 16) utilizando diferentes tempos e potências pelos diferentes meios de homogeneização: ultraturrax (T25, IKA®) e sonda ultrassônica modelo (UP200S, Heilscher®), totalizando 84 formulações (Quadro 17).

Tabela 13 - Teores de incorporação dos extratos brutos/frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* e de Aerosil® 130 utilizados para avaliação do método de dispersão

AMOSTRAS	Extrato Bruto SPA		Fração Acetato de Etila SPA	
	Teor de Aerosil® 130	Teor de incorporação	Teor de Aerosil® 130	Teor de incorporação
<i>Cinnamomum verum</i>	15%	5%	15%	10%
<i>Eugenia uniflora</i>	15%	5%	10%	5%
<i>Punica granatum</i>	15%	15%	15%	10%

SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

Quadro 16 - Delineamento experimental para avaliação do método de dispersão das formulações contento extrato bruto/fração acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

MÉTODO	PARÂMETRO	Níveis		
		-1	0	+1
Ultraturrax	Tempo (min)	5	10	15
	Rotação (rpm)	8 000	9 600	13 600
Sonda ultrassônica	Tempo (min)	5	10	15
	Potência (%)	20	30	40

SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

Quadro 17 - Otimização experimental para avaliação da eficiência do método de dispersão das formulações contendo extrato bruto/fração acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

Experimento	FATORES		MÉTODO			
	A	B	Ultraturrax		Sonda ultrassônica	
			Tempo (min)	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Potência (%)
1	-1	-1	5	8 000	5	20
2	1	-1	15	8 000	15	20
3	-1	1	5	13 600	5	40
4	1	1	15	13 600	15	40
5 (C)	0	0	10	9 600	10	30
6 (C)	0	0	10	9 600	10	30
7 (C)	0	0	10	9 600	10	30

SPA: seco por aspersão.

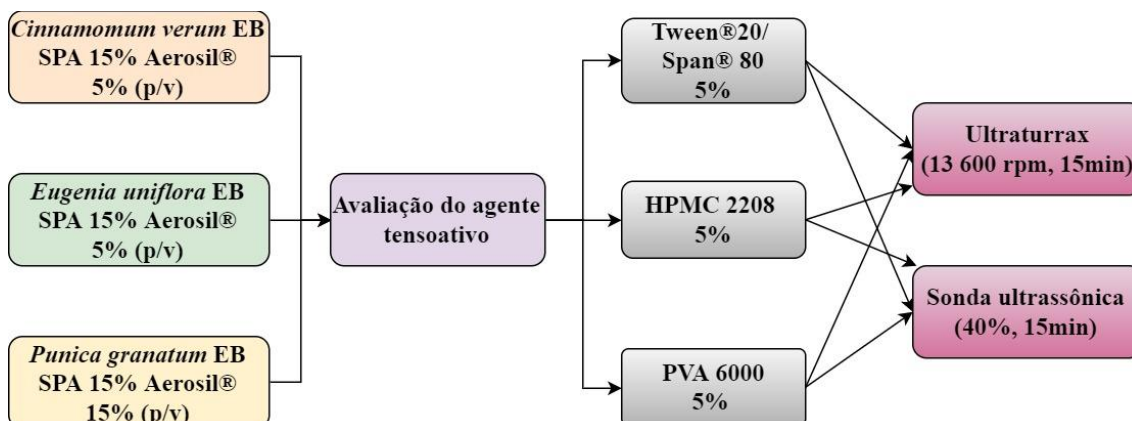
Fonte: Próprio autor.

As emulsões foram preparadas conforme descrito e após 24 horas de fabricação os sistemas foram avaliados quanto às características macroscópicas, pH (Seven easy, Mettler Toledo®), tamanho de gotícula (Mastersizer 2000S, Malvern®), potencial Zeta (Zetasizer Nano ZS90, Malvern®) e estabilidade após centrifugação a 1300, 2000 e 2700 rpm (Centrífuga Rotanta 460RF, Hettich®).

7.2.2.4 Avaliação de desempenho de agentes tensoativos

Ao selecionar as condições dos métodos de dispersão que permitiram melhor estabilidade, os sistemas emulsionados contendo EBs de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA foram preparados e avaliados quanto a diferentes agentes tensoativos: monooleato de sorbitano 80 (Span® 80)/monolaurato de sorbitano etoxilado 20 (Tween® 20); hidroxipropilmetilcelulose (HPMC 2208) e álcool polivinílico (PVA 6000), conforme fluxograma apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Fluxograma de preparação dos sistemas emulsionados para avaliação dos diferentes agentes tensoativos



EB: extrato bruto; SPA: seco por aspersão; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico.

Fonte: Próprio autor.

Para o preparo das emulsões, nos sistemas contendo tensoativos a fase hidrofílica foi constituída pela solução aquosa do EB SPA (5% para *C. verum* e *E. uniflora* e 15% para *P. granatum*, p/v) acrescida de Tween® 20 (2,24g para 50 mL de formulação); enquanto que a fase oleosa foi composta por composta por Myritol® 312 (10%) e Span® 80 (0,26g para 50 mL de formulação).

Para os sistemas estabilizados pelos polímeros HPMC/PVA, suspensões (5% p/v) foram preparadas em água ultrapurificada por aquecimento a 80 °C sob agitação (400 rpm) durante 3 h (PC-420D, Corning®), até obtenção de uma solução translúcida. Após resfriamento à temperatura de 25 °C, a fase aquosa foi composta pela dispersão de HPMC ou PVA adicionada do EB SPA (5% para *C. verum* e *E. uniflora* e 15% para *P. granatum*, p/v); enquanto a fase oleosa foi constituída de Myritol® 312 (10%).

Ambas as fases foram aquecidas até 40 °C e em seguida a fase oleosa foi vertida na fase aquosa (WOLLENWEBER; OSCHMANN; DANIELS, 2002). Cada mistura foi homogeneizada de acordo com o método, tempo e rotação/potência descritos (Quadro 18).

Quadro 18 - Métodos e condições de dispersão selecionados para incorporação de extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA em sistemas estabilizados por tensoativos, hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico

AMOSTRAS	Ultraturrax Tempo 15 min/Rotação 13 600 rpm			Sonda ultrassônica Tempo 15 min/Potência 40%		
	Tween®20/ Span®80	HPMC 2208	PVA 6000	Tween®20/ Span®80	HPMC 2208	PVA 6000
<i>Cinnamomum verum</i> EB 5% (15% Aerosil®)	Experimento 1	Experimento 4	Experimento 7	Experimento 10	Experimento 13	Experimento 16
<i>Eugenia uniflora</i> EB 5% (15% Aerosil®)	Experimento 2	Experimento 5	Experimento 8	Experimento 11	Experimento 14	Experimento 17
<i>Punica granatum</i> EB 15% (15% Aerosil®)	Experimento 3	Experimento 6	Experimento 9	Experimento 12	Experimento 15	Experimento 18

SPA: seco por aspersão; EB: Extrato Bruto; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico

Fonte: Próprio autor.

7.2.2.4.1. *Caracterização das emulsões*

Após a fabricação, as emulsões estabilizadas por tensoativos e as tipo Pickering ficaram em repouso por 24 horas, para posterior avaliação dos seguintes parâmetros:

a) Resistência à Centrifugação

Um volume de 10 mL de cada sistema foi transferido para tubos tipo Falcon (com capacidade para 15 mL) e submetido à centrifugação em três diferentes velocidades de rotação (370.33, 876.51 e 1597.44 g), por 3 minutos a 24 °C (Centrífuga Rotanta 460RF, Hettich®). Ao término de cada ciclo, as emulsões foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, cremagem e separação de fases (FERREIRA, 2016; ISAAC et al., 2009).

b) Aspectos Macroscópicos

As emulsões foram avaliadas para alterações visíveis resultantes de instabilidade, tais como mudanças de cor, cremagem, coalescência e/ou separação de fases (FERREIRA, 2016).

c) Análise do Tamanho de Gotículas

As emulsões foram submetidas à análise do tamanho de gotícula por difratometria a laser em analisador (Mastersizer 2000, Malvern Instruments®) acoplado a unidade de dispersão em meio líquido (Hidro 2000, Malvern Instruments®). O tamanho das gotículas de cada emulsão foi determinado em triplicata 24 h após a preparação. As distribuições de tamanho de gotículas foram caracterizadas pelo diâmetro (d) d_{10} , d_{50} e d_{90} , correspondentes ao diâmetro em volume com 10%, 50% e 90% do volume da fase interna distribuídas em gotas menores que esse tamanho, respectivamente. Para a determinação do tamanho das gotículas, cerca de 50 a 150 µL de cada emulsão foram adicionados a aproximadamente 500 mL de água ultrapurificada, até alcançar o índice de obscuração necessário (entre 2 e 10%), sendo mantidos sob agitação a 1500 rpm no próprio equipamento. As análises foram realizadas após 30 segundos de agitação, com intervalos de 30 segundos entre cada medição. Os dados representaram a média de três determinações (FERREIRA, 2016).

d) Índice de Cremagem

A taxa de formação de creme foi determinada pela medição do índice de cremagem (IC). Os valores de IC foram obtidos a partir da relação entre a altura total da camada de creme e a altura total da camada de emulsão. As alturas foram medidas diretamente nos tubos de armazenamento, com a ajuda de uma escala graduada (FERREIRA, 2016; MACEDO et al., 2006; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012).

e) Determinação do pH

As emulsões foram analisadas em pHmetro previamente calibrado (Seven easy, Mettler Toledo®) com soluções tampão (pH 4,0 e 7,0). Os dados representaram a média de três determinações (FERREIRA, 2016).

f) Aspectos Microscópicos

A análise microscópica das emulsões foi realizada através de microscopia de luz (Imager.Z1, Carl Zeiss®) com auxílio do software AxionVision® (FERREIRA, 2016).

g) Viscosidade Capilar

A viscosidade foi determinada em viscosímetro capilar (viscosímetro de Ostwald), com base na fluidez das formulações preparadas. As análises foram realizadas a 30 °C, com em triplicata, e as determinações não foram superiores a 2% calculados em desvio. A viscosidade foi calculada segundo a equação:

$$V = K \times t$$

onde: V = viscosidade; K: constante capilar (0,3099 mm²/s²) e t = tempo (s) (FERREIRA, 2016).

h) Análise de Potencial Zeta

O potencial Zeta das emulsões foi mensurado em Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments®). As medições foram feitas a 25 °C em amostras previamente diluídas em água ultrapurificada (1:500, v/v), utilizando cubetas do tipo DTS1060 (FERREIRA, 2016).

7.2.2.4.2. Estudos de estabilidade

a) **Estabilidade Intrínseca**

Alíquotas de 10 mL de cada emulsão foram armazenadas verticalmente em tubos tipo Falcon (com capacidade para 15 mL) sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C), e avaliadas quanto à presença de fenômenos de instabilidade (cremagem, coalescência ou separação de fases) após 1, 2, 4, 6 e 24 h de preparação (FERREIRA, 2016).

b) **Ciclo gelo/degelo**

Alíquotas de 2 mL foram transferidas para tubos Eppendorf® e armazenadas verticalmente em ciclos repetidos de temperatura: -28 °C/16h e 25 °C/8h. A avaliação macroscópica das amostras foi realizada durante 7 ciclos (FERREIRA, 2016).

c) **Estabilidade Acelerada**

Amostras de 10 mL de cada uma das emulsões foram transferidas para tubos tipo Falcon (capacidade de 15mL) hermeticamente fechados e armazenadas em posição vertical sob diferentes condições: temperatura ambiente (25 ± 2 °C), baixa temperatura (4 ± 2 °C) e alta temperatura (40 ± 2 °C). Os aspectos macroscópicos (cor, odor e aparência) e índice de cremagem das amostras foram avaliados após 1, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento.

As amostras também foram armazenadas em embalagens plásticas (capacidade 50 mL) sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 1, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Durante o período de armazenamento as amostras foram caracterizadas quanto ao pH, potencial Zeta, tamanho de gotícula, viscosidade capilar e microscopia. Todos os testes foram realizados em triplicata (FERREIRA, 2016).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Extratos brutos e frações obtidos por *spray drying*

A técnica de secagem por aspersão apresenta vantagens como maior estabilidade físico-química do produto obtido e facilidade de sua derivação em outras formas farmacêuticas. A utilização de Aerosil® como adjuvante tem demonstrado desempenho superior, em comparação com β -ciclodextrina, celulose microcristalina e hidrolisado de gelatina (Gelita-Sol P), permitindo efeito positivo sobre a estabilidade dos produtos obtidos frente à umidade residual e melhores características tecnológicas, além de proporcionar a formação de partículas maiores e a otimização do rendimento do processo de secagem (DE PAULA et al., 1998; DE SOUZA et al., 2000; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Nesse sentido, a influência da concentração de sílica hidrofílica foi analisada na secagem de soluções de extratos brutos (EBs) e frações acetato de etila (FAEs) de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum*.

A viscosidade, o conteúdo de sólidos, a tensão superficial do produto fluído a secar, além do fluxo de alimentação, influenciam diretamente o tamanho de partícula (SHAW, 1997; SOARES, 2002). A adição de etanol aos EBs/FAEs visou a diminuição da viscosidade da solução a ser alimentada, por facilitar a solubilização dos componentes vegetais, resultando também em menores gastos de energia e pressão e maior eficiência do processo de secagem (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A adição de Aerosil® 130 a 5%, 10% e 15%, em relação ao teor de sólidos nas soluções, causou redução significativa na higroscopicidade macroscópica dos produtos secos, não ocorrendo formação de aglomerados, como esperado em derivados vegetais liofilizados (DE OLIVEIRA; DE FREITAS; FREIRE, 2012; PETROTOS et al., 2016; SOLLOHUB; CAL, 2010). A Tabela 14 apresenta os rendimentos dos EBs/FAEs da canela, pitangueira e romãzeira secos aspersão.

Considerando os produtos secos derivados de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* as FAEs apresentaram maiores rendimentos de secagem (>60%) em relação aos EBs (28-64%), o que é tecnologicamente atraente, uma vez que as frações enriquecidas apresentaram maiores teores de ativos fenólicos (Seção 5) e consequente maior atividade antibacteriana (Seção 6). Nesse sentido, os teores de Aerosil® empregados no processo de *spray drying* foram avaliados quanto à eficiência de incorporação dos EBs/FAEs em sistemas dispersos emulsificados.

Tabela 14 - Rendimentos dos extratos brutos/frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

AMOSTRA	Parâmetro	EB 5% Aerosil® 130	EB 10% Aerosil® 130	EB 15% Aerosil® 130	FAE 5% Aerosil® 130	FAE 10% Aerosil® 130	FAE 15% Aerosil® 130
<i>Cinnamomum verum</i>	Volume (mL)	2 985	3 500	3 000	650	550	670
	RS (%)	3,00	1,54	3,00	0,01	0,05	0,06
	% Aerosil® / volume	0,1579	0,1711	0,5294	0,0050	0,0056	0,0106
	Aerosil® (g)	4,713	5,989	15,882	0,003	0,031	0,071
	Secagem amostra (g)	32,49	48,39	30,00	0,3957	0,2570	0,3571
	Rendimento (%)	34,47	48,39	28,33	57,87	84,26	75,66
<i>Eugenia uniflora</i>	Volume (mL)	3 200	2 990	3 000	2 340	1 230	1 390
	RS (%)	4,67	4,92	4,92	0,10	0,35	0,11
	% Aerosil® / volume	0,2458	0,5467	0,8682	0,0053	0,0389	0,0174
	Aerosil® (g)	7,865	16,345	26,047	0,123	0,478	0,241
	Secagem amostra (g)	98,13	88,54	76,18	1,4831	1,5000	1,4945
	Rendimento (%)	62,38	54,17	43,87	60,22	83,38	83,07
<i>Punica granatum</i>	Volume (mL)	3 000	3 000	3 000	1 320	1 450	1 700
	RS (%)	6,07	5,55	5,55	0,64	0,73	0,27
	% Aerosil® / volume	0,3195	0,6167	0,9794	0,0337	0,0811	0,1476
	Aerosil® (g)	9,584	18,500	29,382	0,445	1,176	0,810
	Secagem amostra (g)	97,3	122,86	118,45	1,3963	1,424	2,6149
	Rendimento (%)	50,76	66,41	64,03	72,07	87,70	88,42

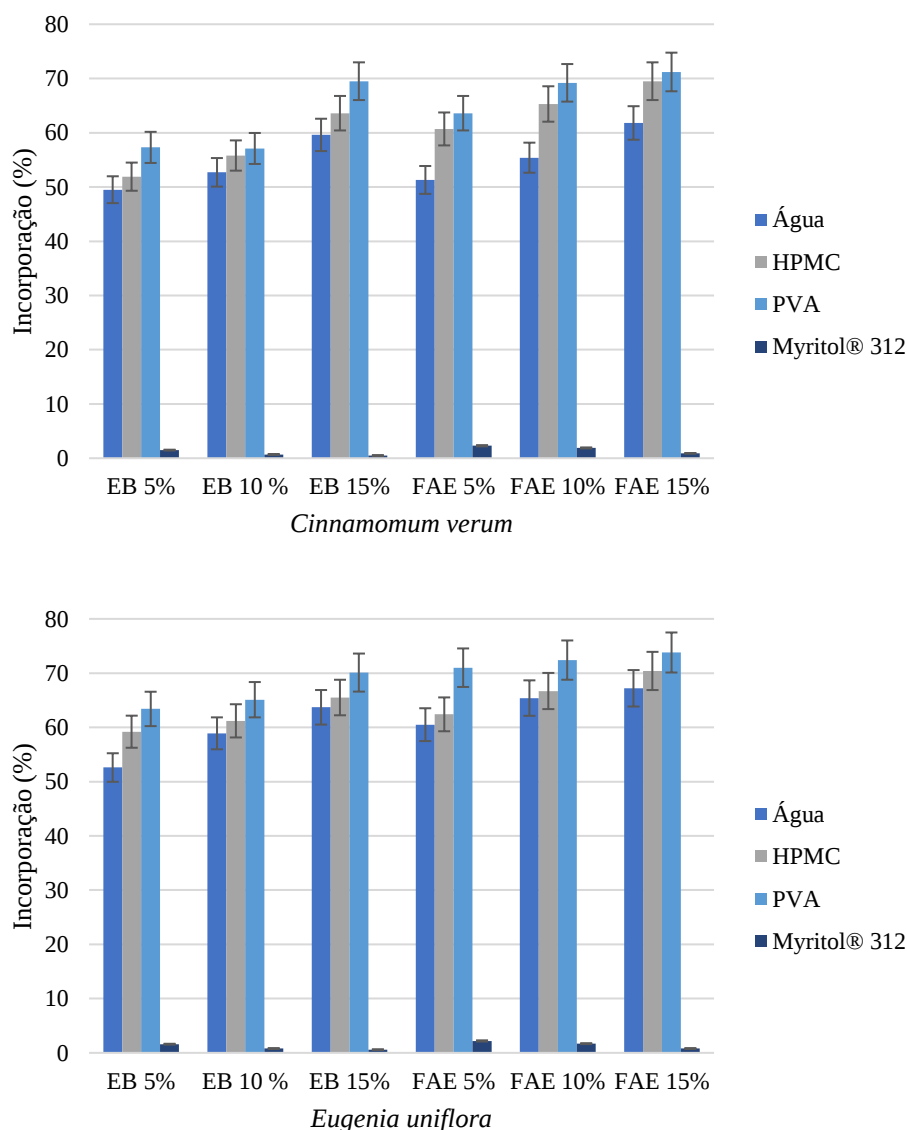
SPA: seco por aspersão; EB: Extrato Bruto; FAE: Fração Acetato de Etila. RS: Rendimento de secagem

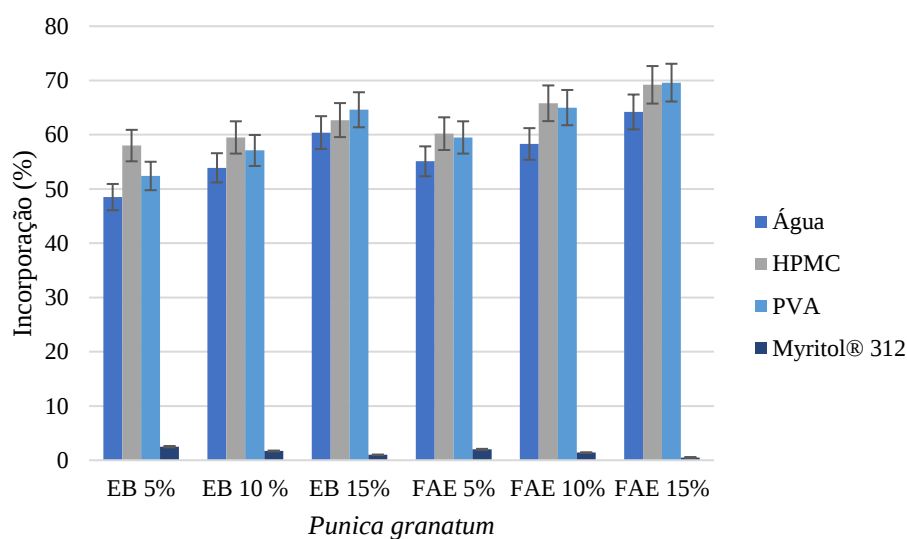
Fonte: Próprio autor.

7.3.2 Obtenção e caracterização das emulsões

A primeira etapa para incorporação dos EBs e FAEs de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* nos sistemas dispersos consistiu na avaliação da solubilidade de cada EBs/FAEs secos por aspersão (SPA) nos componentes aquosos e oleosos das formulações. Os resultados estão apresentados na Figura 25, demonstrando maior solubilidade nos componentes aquosos das formulações. Dessa forma, os EBs/FAEs SPA foram incorporados à fase aquosa, nas proporções equivalentes em resíduo seco necessário para obtenção do respectivo teor de incorporação (5%, 10% ou 15%).

Figura 25 - Perfil de solubilização dos extratos brutos/frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA nos componentes da formulação





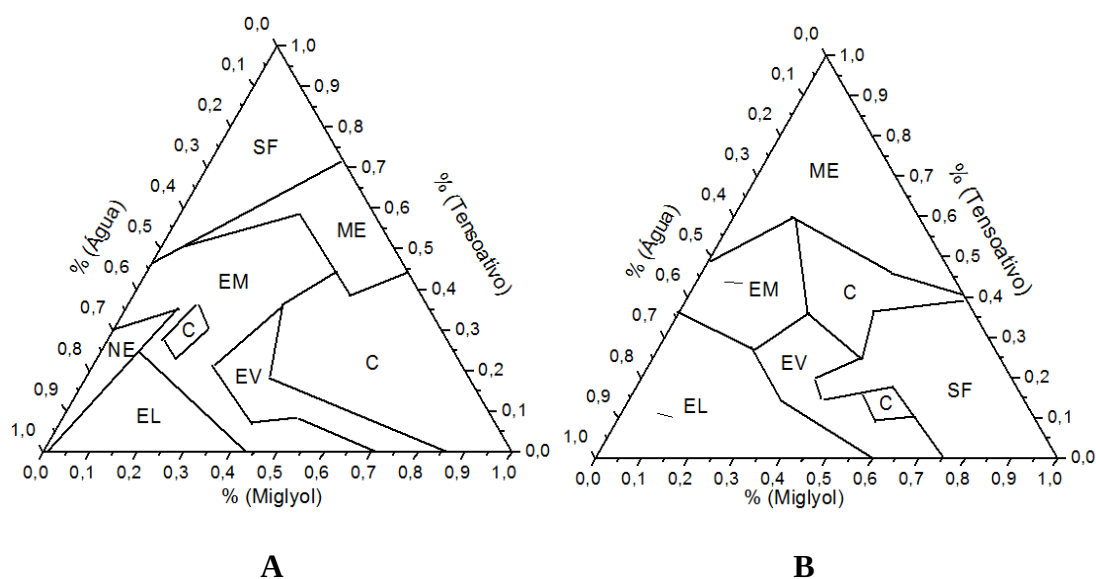
SPA: seco por aspersão; EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico.

Fonte: Próprio autor.

Nos diagramas pseudoternários foram obtidas 81 formulações. De acordo com a inspeção visual, foi possível evidenciar regiões de separação de fases, de formação de microemulsões (formulação translúcida e uniforme), nanoemulsões (formulação azulada, líquida e uniforme), cremes (formulação branca, opaca, de consistência semissólida e uniforme) e três diferentes tipos de emulsões: viscosas (formulação branca, opaca e uniforme), intermediária (formulação branca, opaca, ligeiramente fluida e uniforme) e líquida (formulação branca, líquida, opaca, com aspecto leitoso e uniforme). Estas regiões podem ser visualizadas na Figura 26.

Os diagramas permitiram a identificação de regiões correspondentes a emulsões em ambos os métodos de dispersão. Entretanto, as emulsões obtidas por método ultrassônico apresentaram-se com melhores características macroscópicas. Este fato reside da obtenção de gotículas com menores tamanhos, devido à geração de bolhas de cavitação por diferenças de pressão durante a propagação das ondas acústicas (LEONG et al., 2009; O'SULLIVAN et al., 2015). As bolhas de cavitação dispersam e atenuam as ondas ultrassônicas devido ao diferencial de impedância acústica entre as fases líquida e gasosa, resultando na dispersão parcial ou completa das ondas. Essas cavitações induzidas acusticamente resultam na ruptura de gotículas da fase dispersa, em escala micro (LEONG et al., 2018; O'SULLIVAN et al., 2015).

Figura 26 - Diagramas de fases pseudoternários obtidos por ultraturrax e sonda ultrassônica



A: ultraturrax; B: sonda ultrassônica; SF: separação de fases; ME: microemulsão; NE: nanoemulsão; EM: emulsão; EV: emulsão viscosa; EL: emulsão líquida; C: creme.

Fonte: Elaborado por Kássia Teixeira (2018).

Das formulações obtidas a partir do diagrama de fases pseudoternários, foi selecionada uma formulação-base de consistência líquida, composta por 85% de água ultrapurificada, 10% de Myritol® 312 e 5% de tensoativo (89,6% de Tween® 20 e 10,4% de Span® 80). Emulsões líquidas apresentam maior aceitabilidade, devido suas características sensoriais de fluidez, além da possibilidade de redução de fenômenos de floculação, relacionados ao maior teor de água na formulação (DECCACHE et al., 2010; DICKINSON, 2019; ISAAC et al., 2009).

Após a escolha das regiões de formação de emulsões líquidas, novas amostras dos sistemas dispersos contendo os tensoativos Tween® 20 e Span® 80 foram preparadas e avaliadas após 24 horas. De acordo com o conjunto dos resultados obtidos neste estudo, os quais consideraram o aspecto visual (homogêneo e branco), menor tamanho de gotícula ($d_{50} = 0,984 \mu\text{m}$), potencial Zeta (-28,95 mV) e pH de 4,25, as condições de preparo para as emulsões contendo tensoativos foram definidas em rotação de 9 600 rpm durante 10 minutos, em ultraturrax. Em consequência, a formulação-base foi definida e testada para a incorporação dos EBs/FAEs SPA de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* nestas condições.

7.3.2.1 Avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo extrato bruto/frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*

A formulação eleita e as condições de preparo definidas foram empregadas no estudo de avaliação da eficiência de incorporação dos EBs e FAEs SPA de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*, utilizando 5%, 10% ou 15% de sílica hidrofílica (Aerosil 130®) como adjuvante e em percentual de 5%, 10% e 15% de incorporação dos ativos.

Após 24 horas da preparação, as 54 formulações obtidas (3 espécies vegetais $\times$ 2 bioativos $\times$ 3 percentuais de Aerosil® 130 $\times$ 3 percentuais de incorporação) foram avaliadas quanto às características macroscópicas, pH, tamanho de gotícula, potencial Zeta e estabilidade após centrifugação a 370.33, 876.51 e 1597.44 g. Os resultados para os EBs estão apresentados no Quadro 19 e para as FAEs no Quadro 20.

Considerando os menores tamanhos de gotículas como primeira escolha para a estabilidade dos sistemas emulsionados, foram eleitos os EBs SPA de *C. verum* com 15% de Aerosil® 130 incorporado a 5% (p/v), de *E. uniflora* com 15% de Aerosil® 130 incorporado a 5% (p/v) e de *P. granatum* com 15% de Aerosil® 130 incorporado a 15% (p/v) para os estudos posteriores de avaliação do método de dispersão. No que tange às FAEs, as formulações eleitas foram as FAEs SPA de *C. verum* com 15% de Aerosil® 130 incorporada a 10% (p/v), de *E. uniflora* com 10% de Aerosil® 130 incorporada a 5% (p/v) e de *P. granatum* com 15% de Aerosil® 130 incorporada a 10% (p/v), seguindo os mesmos critérios.

As respectivas preparações apresentaram ainda resistência à mais alta força g de centrifugação, com índices de cremagem $\leq 15\%$ para os EBs SPA e $\leq 25\%$ para as FAEs SPA; potencial Zeta (mV) de -29,3 (*C. verum*); -42,6 (*E. uniflora*) e -39,7 (*P. granatum*) para os EBs SPA e de -34,6 (*C. verum*); -43,2 (*E. uniflora*) e -31,1 (*P. granatum*) para as FAEs SPA; bem como valores médios de pH de 4,87 (*C. verum*); 4,35 (*E. uniflora*) e 4,69 (*P. granatum*) para os EBs SPA e de 5,07 (*C. verum*); 4,08 (*E. uniflora*) e 4,40 (*P. granatum*) para FAEs SPA; corroborando a estabilidade alcançada e apresentando valores de pH compatíveis com a aplicação cutânea (LEONARDI; GASPARG; CAMPOS, 2002; MENDES et al., 2016).

Quadro 19 - Respostas experimentais de avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

Força g	RESISTÊNCIA À CENTRIFUGAÇÃO											
	<i>Cinnamomum verum</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				<i>Punica granatum</i>			
	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%
370,33	5%	20%	20%		5%				5%	15%	15%	15%
	10%				10%		15%	15%	10%	15%	15%	15%
	15%	20%	15%	15%	15%			15%	15%	15%	15%	15%
876,51	5%	20%	20%		5%				5%	15%	15%	15%
	10%				10%		15%	15%	10%	15%	15%	15%
	15%	20%	15%	15%	15%			15%	15%	15%	15%	15%
1597,44	5%	20%	20%		5%				5%	15%	15%	15%
	10%				10%		15%	15%	10%	15%	15%	15%
	15%	20%	15%	15%	15%			15%	15%	15%	15%	15%
PARÂMETROS ESTÁTICOS (25 °C)												
pH	<i>Cinnamomum verum</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				<i>Punica granatum</i>			
	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%
	5%	4,97 ± 0,04	4,91 ± 0,02	4,69 ± 0,03	5%	4,29 ± 0,02	4,31 ± 0,02	4,38 ± 0,01	5%	4,49 ± 0,02	4,46 ± 0,01	4,47 ± 0,02
d ₅₀ (µm)	10%	4,97 ± 0,01	4,84 ± 0,01	4,77 ± 0,03	10%	4,28 ± 0,02	4,31 ± 0,04	4,33 ± 0,01	10%	4,47 ± 0,04	4,46 ± 0,03	4,46 ± 0,01
	15%	5,06 ± 0,02	5,00 ± 0,02	4,87 ± 0,04	15%	4,32 ± 0,01	4,34 ± 0,03	4,35 ± 0,02	15%	4,69 ± 0,02	4,61 ± 0,03	4,63 ± 0,04
	5%	NM	NM	29,19 ± 0,01	5%	21,22 ± 0,01	25,47 ± 0,02	14,31 ± 0,01	5%	15,60 ± 0,01	18,51 ± 0,01	17,78 ± 0,02
Potencial Zeta (mV)	10%	NM	NM	23,98 ± 0,01	10%	15,60 ± 0,01	10,85 ± 0,01	15,35 ± 0,01	10%	16,49 ± 0,02	16,81 ± 0,01	16,53 ± 0,02
	15%	NM	NM	20,47 ± 0,02	15%	15,44 ± 0,02	14,29 ± 0,02	13,22 ± 0,01	15%	15,21 ± 0,02	17,36 ± 0,01	17,45 ± 0,01
	5%	NM	NM	-26,7 ± 0,02	5%	-30,2 ± 0,02	-29,9 ± 0,03	-42,9 ± 0,02	5%	-37,7 ± 0,01	-26,5 ± 0,02	-28,3 ± 0,01
Potencial Zeta (mV)	10%	NM	NM	-26,9 ± 0,02	10%	-33,5 ± 0,01	-30,5 ± 0,01	-43,2 ± 0,01	10%	-36,9 ± 0,02	-27,6 ± 0,03	-28,2 ± 0,03
	15%	NM	NM	-29,3 ± 0,04	15%	-35,7 ± 0,02	-31,8 ± 0,01	-42,6 ± 0,01	15%	-39,7 ± 0,01	-27,4 ± 0,01	-29,5 ± 0,03

Os dados representam média ± desvio padrão; ■ separação de fases; ■ cremagem (com índice, em %) d₅₀ : diâmetro de 50% das gotículas; NM : não mensurado, separação de fases. SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

Quadro 20 - Respostas experimentais de avaliação preliminar do desempenho das formulações contendo frações acetato de etila de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

Força g	RESISTÊNCIA À CENTRIFUGAÇÃO											
	<i>Cinnamomum verum</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				<i>Punica granatum</i>			
	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%
370,33	5%			25%	5%	10%	25%	25%	5%	10%	10%	10%
	10%	25%	25%	25%	10%	25%	25%	25%	10%	10%	10%	10%
	15%		25%	25%	15%	25%	25%	25%	15%	10%	10%	10%
876,51	5%			25%	5%		25%	25%	5%	10%	10%	10%
	10%	25%	25%	25%	10%	25%	25%	25%	10%	10%	10%	10%
	15%		25%	25%	15%	25%	25%	25%	15%	10%	10%	10%
1597,44	5%			25%	5%		25%	25%	5%	10%	10%	10%
	10%	25%	25%	25%	10%	25%	25%	25%	10%	10%	10%	10%
	15%		25%	25%	15%	25%	25%	25%	15%	10%	10%	10%
PARÂMETROS ESTÁTICOS (25 °C)												
pH	<i>Cinnamomum verum</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				<i>Punica granatum</i>			
	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%	Aerosil®	15%	10%	5%
	5%	5,35 ± 0,02	5,59 ± 0,03	5,93 ± 0,03	5%	3,96 ± 0,02	4,08 ± 0,03	4,20 ± 0,04	5%	4,00 ± 0,01	4,11 ± 0,01	4,46 ± 0,02
	10%	5,06 ± 0,02	4,73 ± 0,04	5,59 ± 0,01	10%	3,87 ± 0,02	3,91 ± 0,02	4,08 ± 0,03	10%	4,10 ± 0,04	4,21 ± 0,02	4,51 ± 0,01
	15%	5,13 ± 0,04	5,07 ± 0,02	5,90 ± 0,05	15%	4,20 ± 0,03	4,28 ± 0,03	4,46 ± 0,01	15%	4,24 ± 0,04	4,40 ± 0,03	4,98 ± 0,01
d ₅₀ (µm)	5%	23,34 ± 0,02	22,21 ± 0,01	14,74 ± 0,01	5%	23,03 ± 0,01	12,83 ± 0,02	13,86 ± 0,01	5%	13,23 ± 0,01	13,35 ± 0,03	14,09 ± 0,02
	10%	12,95 ± 0,01	13,18 ± 0,02	13,53 ± 0,01	10%	13,66 ± 0,01	12,86 ± 0,01	12,83 ± 0,01	10%	12,65 ± 0,04	12,62 ± 0,01	12,73 ± 0,03
	15%	27,33 ± 0,01	13,03 ± 0,01	14,28 ± 0,02	15%	13,52 ± 0,02	13,22 ± 0,02	12,94 ± 0,01	15%	12,94 ± 0,02	12,44 ± 0,01	12,90 ± 0,01
Potencial Zeta (mV)	5%	-23,9 ± 0,01	-31,3 ± 0,01	-34,3 ± 0,02	5%	-44,1 ± 0,02	-41,9 ± 0,03	-40,9 ± 0,02	5%	-31,6 ± 0,02	-29,1 ± 0,02	-28,9 ± 0,01
	10%	-32,9 ± 0,02	-37,3 ± 0,02	-36,3 ± 0,02	10%	-43,5 ± 0,01	-47,2 ± 0,01	-43,2 ± 0,01	10%	-37,6 ± 0,02	-32,2 ± 0,01	-29,0 ± 0,02
	15%	-36,1 ± 0,02	-34,6 ± 0,04	-28,6 ± 0,04	15%	-45,5 ± 0,02	-39,8 ± 0,01	-38,8 ± 0,01	15%	-30,0 ± 0,01	-31,1 ± 0,01	-26,6 ± 0,03

Os dados representam média ± desvio padrão; ■ separação de fases; ■ cremagem (com índice, em %) d₅₀: diâmetro de 50% das gotículas. SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

7.3.2.2 Avaliação do método de dispersão

Com base nos resultados de avaliação preliminar do desempenho das formulações, foram eleitos os sistemas contendo EBs SPA de *C. verum* (15% de Aerosil®) incorporado a 5% (p/v), *E. uniflora* (15% de Aerosil®) incorporado a 5% (p/v) e *P. granatum* (15% de Aerosil®) incorporado a 15% (p/v) para os estudos posteriores de avaliação do método de dispersão. As emulsões contendo FAEs SPA estudadas na avaliação do método de dispersão foram as que empregaram *C. verum* (15% de Aerosil®) incorporada a 10% (p/v), *E. uniflora* (10% de Aerosil®) incorporada a 5% (p/v) e *P. granatum* (15% de Aerosil®) incorporada a 10% (p/v).

Utilizando planejamento fatorial tipo 2³ para as diferentes formas de obtenção, foram testadas 84 formulações (3 espécies vegetais × 2 bioativos × 2 métodos × 7 experimentos). Avaliou-se as variáveis tempo (5, 10 e 15 min) e potência pelos diferentes meios de homogeneização: ultraturrax (8 000, 9 600 e 13 600 rpm) e sonda ultrassônica (20, 30 e 40%), a fim de verificar a metodologia mais vantajosa para obtenção das emulsões.

Para a escolha das emulsões mais promissoras foram realizadas análises macroscópicas de pH, de resistência após centrifugação, de tamanho de gotícula (d₅₀) e de potencial Zeta após 24h de preparo. Os Quadros 21 e 22 apresentam os aspectos de resistência à centrifugação e de pH para os sistemas dispersos contendo EBs SPA e para os sistemas dispersos contendo FAEs SPA, respectivamente. Os gráficos de superfície-resposta do d₅₀ (diâmetro de 50% das gotículas, em µm) e do potencial Zeta (mV) para as emulsões contendo EBs SPA de *C. verum* 15% de Aerosil® incorporado a 5% (p/v) (Figura 27), *E. uniflora* 15% de Aerosil® incorporado a 5% (p/v) (Figura 28) e *P. granatum* 15% de Aerosil® incorporado a 15% (p/v) (Figura 29) também são apresentados.

Considerando à resistência a centrifugação, todos os sistemas emulsionados não apresentaram separação de fases à mais alta rotação (1597,44 g), bem como os valores de pH das formulações mantiveram-se sem alterações ao longo das variações dos níveis no mesmo método de homogeneização. A combinação das variáveis tempo e potência influenciaram positivamente na redução do tamanho das gotículas, como demonstrado nos gráficos de superfície-resposta para todos os sistemas dispersos contendo EBs SPA.

Quadro 21 - Influência das variáveis tempo e potência nos sistemas emulsionados contendo extratos brutos SPA com 15% de Aerosil® para *C. verum* (5% p/v), *E. uniflora* (5% p/v) e *P. granatum* (15%, p/v), homogeneizados por ultraturrax e sonda ultrassônica

ULTRATURRAX															
Variáveis codificadas		Variáveis naturais		Cinnamomum verum				Eugenia uniflora				Punica granatum			
				(Força G)			pH	(Força G)			pH	(Força G)			pH
(min)	(rpm)	(min)	(rpm)	370,33	876,51	1597,44		370,33	876,51	1597,44		370,33	876,51	1597,44	
-1	-1	5	8 000				4,37 ± 0,03				4,67 ± 0,03				4,24 ± 0,05
1	-1	15	8 000				4,32 ± 0,04				4,88 ± 0,05				4,10 ± 0,03
-1	1	5	13 600				4,27 ± 0,04				4,64 ± 0,02				4,05± 0,02
1	1	15	13 600				4,21 ± 0,05				4,71 ± 0,02				4,08 ± 0,04
0	0	10	9 600				4,28 ± 0,05				4,81 ± 0,03				4,09 ± 0,03
0	0	10	9 600				4,27 ± 0,02				4,80 ± 0,03				4,08 ± 0,05
0	0	10	9 600				4,26 ± 0,03				4,77 ± 0,04				4,06 ± 0,01
SONDA ULTRASSÔNICA															
Variáveis codificadas		Variáveis naturais		Cinnamomum verum				Eugenia uniflora				Punica granatum			
				(Força G)			pH	(Força G)			pH	(Força G)			pH
(min)	(%)	(min)	(%)	370,33	876,51	1597,44		370,33	876,51	1597,44		370,33	876,51	1597,44	
-1	-1	5	20				4,99 ± 0,04				4,74 ± 0,02				4,56 ± 0,02
1	-1	15	20				5,04 ± 0,03				4,75 ± 0,03				4,55 ± 0,05
-1	1	5	40				4,92 ± 0,05				4,76 ± 0,01				4,56 ± 0,03
1	1	15	40				4,95 ± 0,02				4,75 ± 0,05				4,53 ± 0,02
0	0	10	30				4,94 ± 0,01				4,77 ± 0,04				4,49 ± 0,01
0	0	10	30				4,96 ± 0,03				4,78 ± 0,02				4,51 ± 0,02
0	0	10	30				4,94 ± 0,04				4,77 ± 0,01				4,52 ± 0,03

Os dados representam média ± desvio padrão.  Creme e sedimentação;  sem alteração;  creme. SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

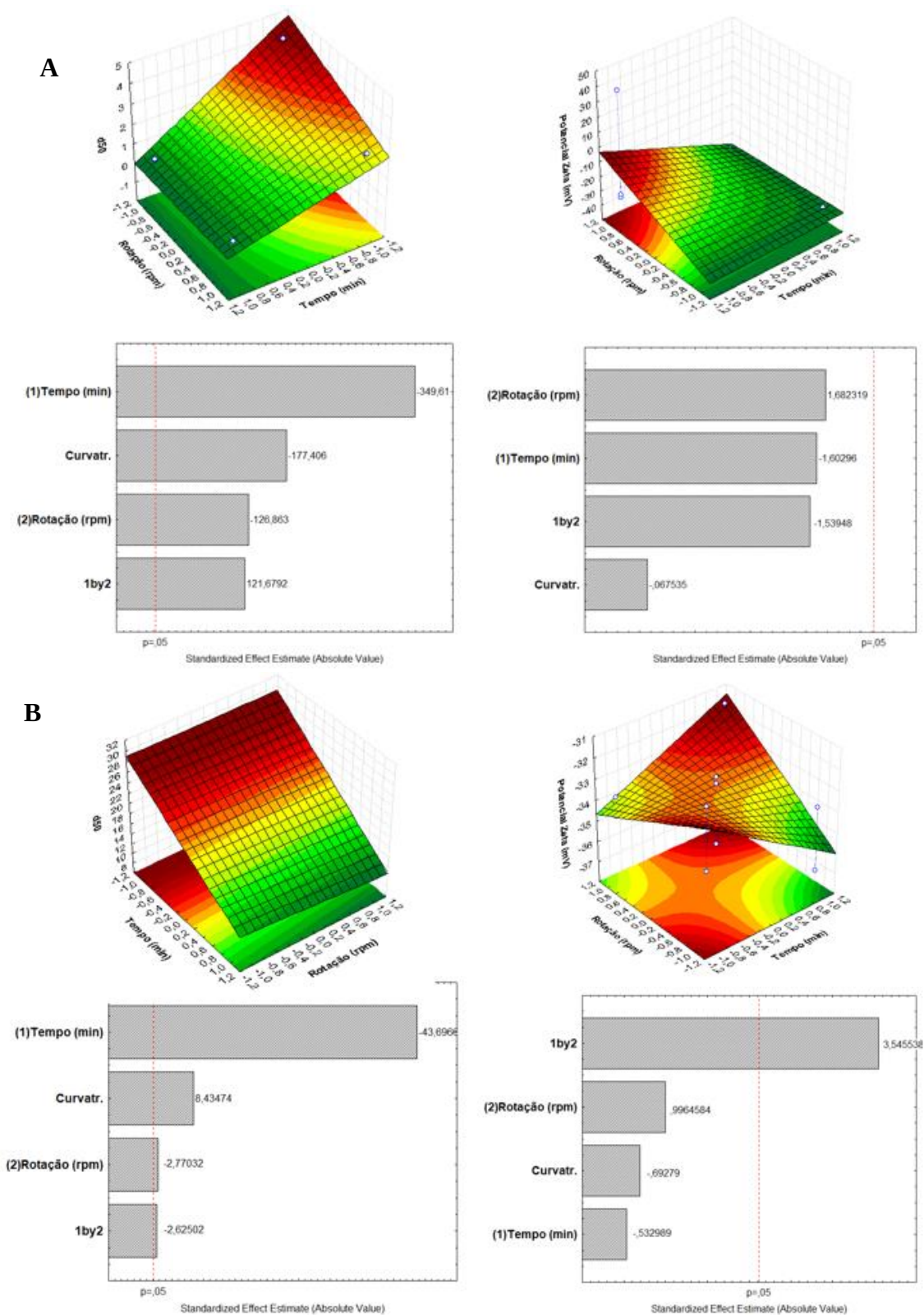
Quadro 22 - Influência das variáveis tempo e potência nos sistemas emulsionados contendo frações acetato de etila SPA com 15% de Aerosil® para *C. verum* (10% p/v) e *P. granatum* (10%, p/v) e com 10% de Aerosil® para *E. uniflora* (5% p/v), homogeneizados por ultraturrax e sonda ultrassônica

ULTRATURRAX															
Variáveis codificadas		Variáveis naturais		<i>Cinnamomum verum</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				<i>Punica granatum</i>			
				(Força G)			pH	(Força G)			pH	(Força G)			pH
				(min)	(rpm)	370,33		876,51	1597,44	(min)		(rpm)	370,33	876,51	
-1	-1	5	8 000				5,71 ± 0,01				4,14 ± 0,04				4,49 ± 0,03
1	-1	15	8 000				5,69 ± 0,03				4,12 ± 0,04				4,47 ± 0,01
-1	1	5	13 600				5,62 ± 0,03				4,10 ± 0,03				4,42 ± 0,04
1	1	15	13 600				5,60 ± 0,02				4,08 ± 0,05				4,41 ± 0,05
0	0	10	9 600				5,68 ± 0,04				4,09 ± 0,02				4,39 ± 0,05
0	0	10	9 600				5,67 ± 0,01				4,11 ± 0,02				4,40 ± 0,07
0	0	10	9 600				5,68 ± 0,02				4,10 ± 0,04				4,39 ± 0,05
SONDA ULTRASSÔNICA															
Variáveis codificadas		Variáveis naturais		<i>Cinnamomum verum</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				<i>Punica granatum</i>			
				(Força G)			pH	(Força G)			pH	(Força G)			pH
				(min)	(%)	370,33		876,51	1597,44	(min)		(%)	370,33	876,51	
-1	-1	5	20				6,02 ± 0,01				4,47 ± 0,02				4,99± 0,03
1	-1	15	20				5,84 ± 0,02				4,44 ± 0,03				5,01 ± 0,03
-1	1	5	40				5,75 ± 0,02				4,52 ± 0,02				4,92 ± 0,04
1	1	15	40				5,88 ± 0,02				4,53 ± 0,01				4,92 ± 0,05
0	0	10	30				5,89 ± 0,01				4,49 ± 0,04				4,81 ± 0,04
0	0	10	30				5,91 ± 0,03				4,50 ± 0,03				4,81 ± 0,02
0	0	10	30				5,93 ± 0,02				4,51 ± 0,01				4,82 ± 0,02

Os dados representam média ± desvio padrão.  Creme e sedimentação;  sem alteração;  creme. SPA: seco por aspersão.

Fonte: Próprio autor.

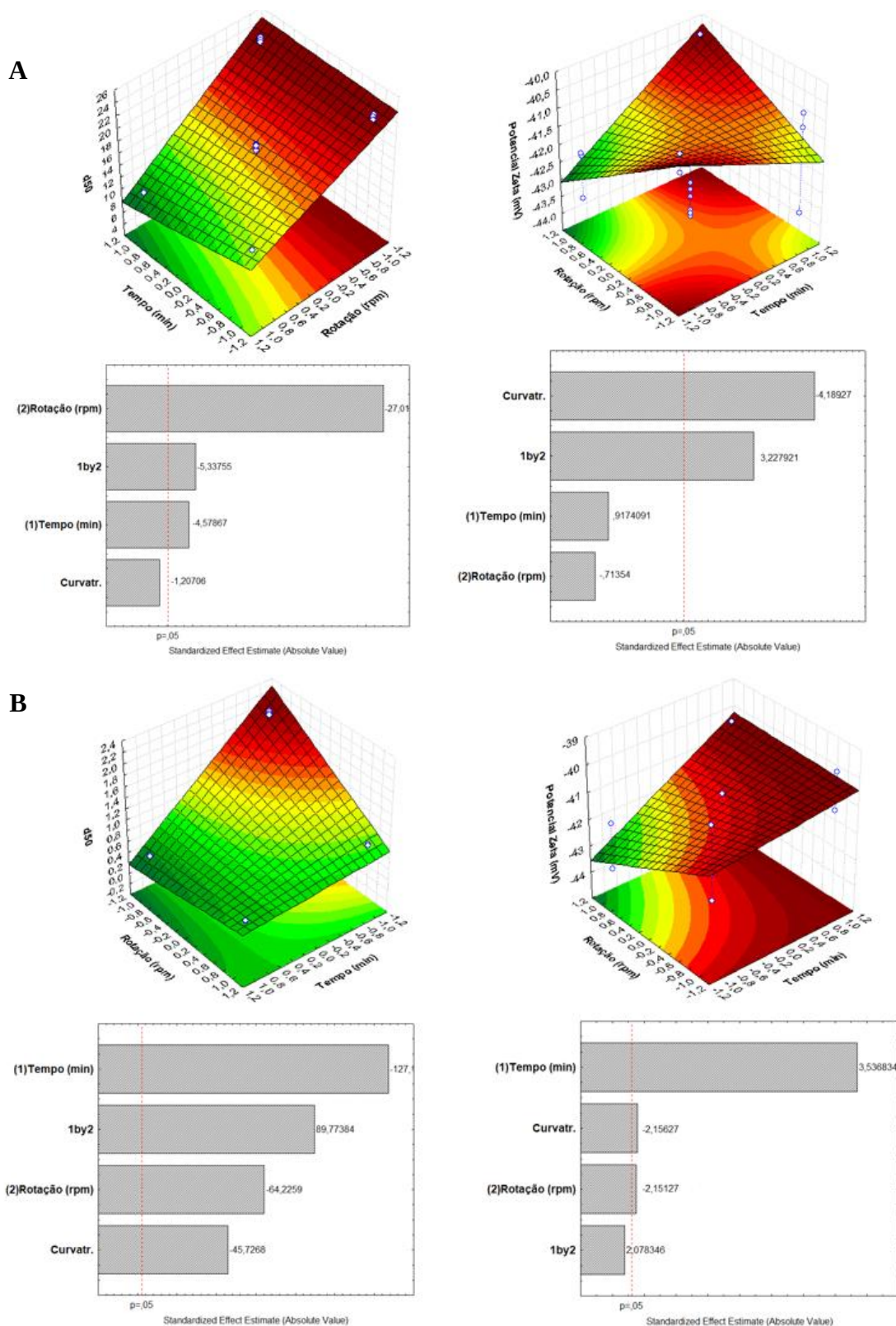
Figura 27 – Superfície-resposta para o d_{50} (μm) e para o potencial Zeta (mV) nas variáveis tempo (min) versus rotação (rpm) de emulsões contendo extratos brutos de *C. verum* SPA (15% de Aerosil[®]), incorporados a 5% (p/v).



SPA: seco por aspersão; A. homogeneização por ultraturrax; B. homogeneização por sonda ultrassônica.

Fonte: Elaborado por Dr^a Magda R. A. Ferreira (2018).

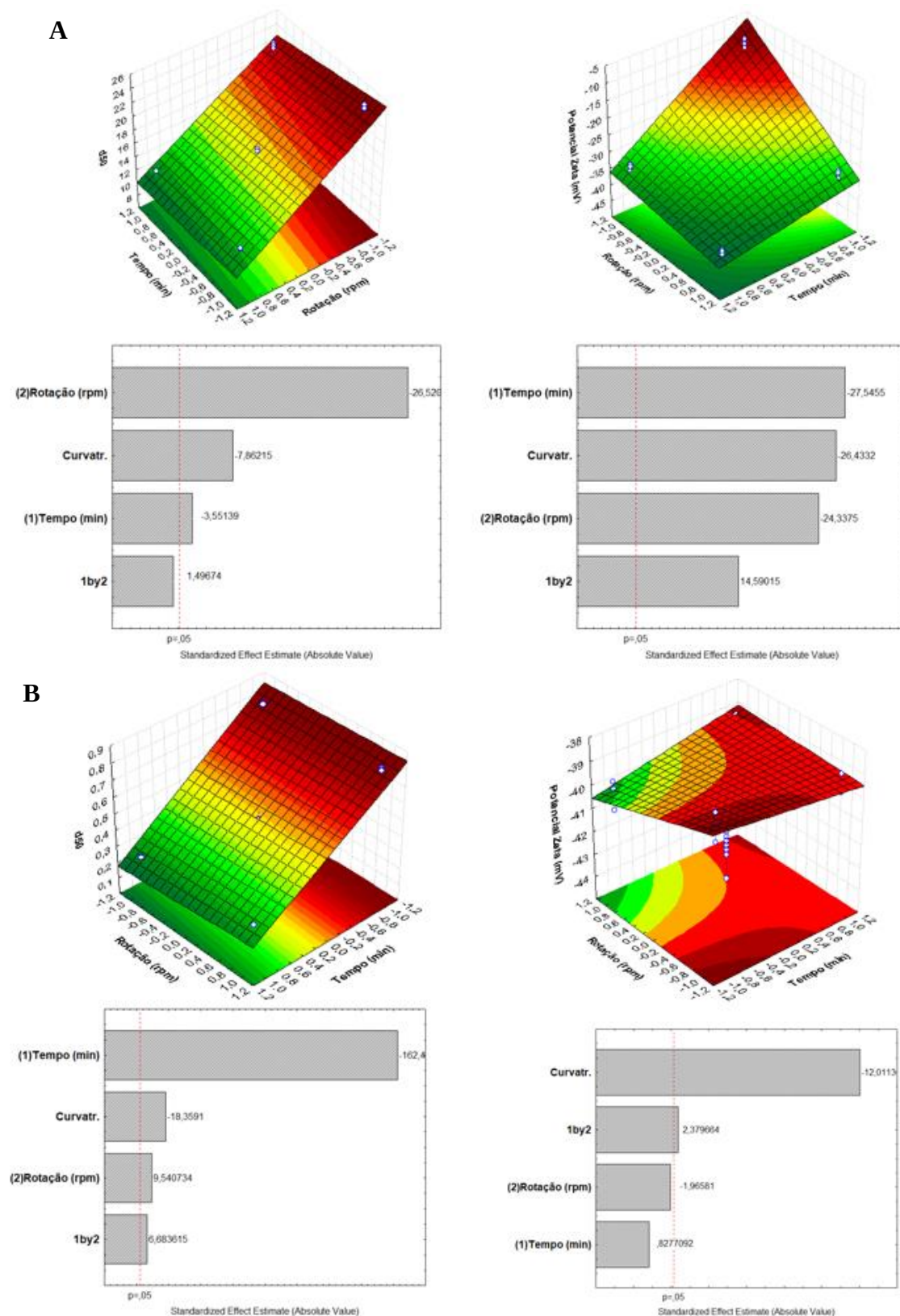
Figura 28 – Superfície-resposta para o d50 (μm) e para o potencial Zeta (mV) nas variáveis tempo (min) versus rotação (rpm) de emulsões contendo extratos brutos de *E. uniflora* SPA (15% de Aerosil®), incorporados a 5% (p/v).



SPA: seco por aspersão; A. homogeneização por ultraturrax; B. homogeneização por sonda ultrassônica.

Fonte: Elaborado por Dr^a Magda R. A. Ferreira (2018).

Figura 29 – Superfície-resposta para o d_{50} (μm) e para o potencial Zeta (mV) nas variáveis tempo (min) versus rotação (rpm) de emulsões contendo extratos brutos de *P. granatum* SPA (15% de Aerosil®), incorporados a 15% (p/v).



Para os sistemas dispersos contendo EBs SPA de *C. verum* preparados por ultraturrax, em particular, as variáveis tempo e potência combinadas não influenciaram nos valores de potencial Zeta, o que pode ser atribuído aos maiores valores preliminares de potencial Zeta (-29,3 mV), acrescido do maior tamanho de gotículas (20,47 µm), demonstrando maior instabilidade desses sistemas quando preparados por este método. Entretanto, nestes mesmos sistemas, a combinação das variáveis permitiu a redução significativa do tamanho médio das gotículas tanto no método de preparação por ultraturrax quanto por sonda ultrassônica.

Considerando os resultados significativos da combinação das variáveis, assumiu-se o nível mais alto (nível +1) para os parâmetros tempo de preparo e potência dos homogeneizadores, para o estudo de avaliação dos diferentes agentes tensoativos e posteriores testes de estabilidade.

7.3.2.3 Avaliação do desempenho dos agentes tensoativos

O estudo de performance dos diferentes agentes tensoativos: monolaurato de sorbitano etoxilado 20 (Tween® 20) e monooleato de sorbitano 80 (Span® 80); hidroxipropilmetilcelulose (HPMC 2208) e álcool polivinílico (PVA 6000) na estabilização dos sistemas emulsionados foi conduzido apenas com os EBs SPA. Este fato residiu na quantidade inferior obtida de produto seco por aspersão, devido ao reduzido volume de solução inicial das FAEs disponíveis para secagem, o que impossibilitou o alcance do percentual requerido para os estudos de desempenho de tensoativos e de estabilidade.

7.3.2.3.1. Caracterização e estabilidade das emulsões

a) **Estabilidade Intrínseca**

Quanto à estabilidade intrínseca, avaliada durante as primeiras 24 horas (Tabela 15), as preparações estabilizadas por tensoativos apresentaram formação de creme após centrifugação aplicando-se a maior força (1597,44 g), havendo separação de fases para a formulação contendo EB *C. verum* SPA (15% Aerosil®) 5% (p/v) homogeneizada em ultraturrax. Em contrapartida, todos os sistemas preparados por sonda ultrassônica apresentaram índice de cremagem zero à maior força aplicada, o que indica estabilidade superior em condições de estresse.

O ensaio de resistência à centrifugação é uma técnica bastante utilizada que possibilita rápidas informações sobre a estabilidade de emulsões. A centrifugação simula um aumento da força de gravidade, aumentando o movimento das gotículas e antecipando possíveis instabilidades como precipitação, separação de fases, sedimentação ou coalescência (ROLAND et al., 2003; SAMRUDHI; PADMINI, 2016).

No que tange ao tamanho médio das gotículas, os sistemas obtidos por ultraturrax possibilitaram dispersões na região de nanoemulsões e os sistemas obtidos por sonda ultrassônica permitiram tamanhos na região de microemulsões. Entretanto, a formulação Pickering contendo EB de *P. granatum* SPA (15% Aerosil®) 15% (p/v) estabilizada por álcool polivinílico (PVA 6000) apresentou-se com tamanho de gotículas na região de nanoemulsão, preparada em sonda ultrassônica.

O PVA possui grupos hidroxila hidrofílica e ácido acético hidrofóbico em sua estrutura molecular (IKEUCHI-TAKAHASHI et al., 2018) e o EB de *P. granatum* apresenta expressiva quantidade de elagitaninos (Seção 5), sobretudo de alto peso molecular (ex: punicalagina) (LI; TU; ZHOU, 2019), o que possivelmente dificulta a compartimentalização destes ativos na interface por impedimento estérico à molécula de PVA 6000, que possui baixo peso molecular (6000) em relação à HPMC 2208 (164,000). Em sistemas Pickering, o tamanho da gotícula é dependente do peso molecular do estabilizador empregado (OK; ALTUN, 2018; WOLLENWEBER; OSCHMANN; DANIELS, 2002).

Quando todas as gotículas em uma emulsão têm o mesmo tamanho, diz-se que ela é monodispersa, e o diâmetro da gota pode ser usado para caracterizar a emulsão. Na prática, emulsões contendo ativos vegetais contêm uma variedade de tamanhos de gotas diferentes e são referidas como sendo polidispersas (MCCLEMENTS, 2015; ZORZI et al., 2015). O índice de polidispersão (IPD), que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi acima de 1 para todas as dispersões obtidas, indicando a formação de sistemas polidispersos.

Tabela 15 - Estabilidade intrínseca de sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

Estabilizante	Emulsão	Índice de Cremagem (1597,44 g)	d ₁₀ (µm)	d ₅₀ (µm)	d ₉₀ (µm)	IPD	Potential Zeta (mV)	Viscosidade (cSt)	Índice de Cremagem (repouso)	Macroscopia
T20S80	CV 15AC UT	S	0,48 ± 0,16	16,21 ± 1,96	41,83 ± 0,51	2,55 ± 1,20	-29,3 ± 0,95	1,42 ± 0,03	15%	He, B
	EU 15AC UT	20%	2,47 ± 0,08	8,25 ± 0,10	16,56 ± 0,21	1,71 ± 0,20	-42,6 ± 1,70	1,55 ± 0,09	20%	He, V
	PG 15AA UT	20%	2,63 ± 0,15	8,13 ± 0,21	16,32 ± 0,10	1,68 ± 0,16	-39,7 ± 1,80	1,56 ± 0,06	20%	He, M
	CV 15AC US	0%	0,09 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,96 ± 0,01	3,78 ± 0,01	-16,9 ± 0,41	1,90 ± 0,14	0%	Ho, B
	EU 15AC US	0%	0,08 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,88 ± 0,03	3,63 ± 0,03	-26,9 ± 0,30	1,70 ± 0,16	0%	Ho, A
	PG 15AA US	0%	0,08 ± 0,08	0,20 ± 0,01	0,87 ± 0,02	3,95 ± 0,03	-35,3 ± 0,46	1,91 ± 0,02	0%	Ho, A
EP - HPMC 5%	CV 15AC UT	20%	3,62 ± 0,17	21,57 ± 0,51	43,53 ± 0,22	1,85 ± 0,25	-16,6 ± 0,28	1,56 ± 0,17	15%	He, B
	EU 15AC UT	20%	4,70 ± 0,10	13,86 ± 0,21	30,91 ± 0,10	1,88 ± 0,17	-27,3 ± 3,36	1,78 ± 0,08	20%	He, V*
	PG 15AA UT	30%	4,26 ± 0,17	12,99 ± 0,12	36,10 ± 0,20	2,45 ± 0,18	-27,1 ± 0,86	1,83 ± 0,07	15%	He, M*
	CV 15AC US	0%	0,21 ± 0,08	1,20 ± 0,29	3,04 ± 0,10	2,36 ± 0,10	-11,9 ± 0,29	2,00 ± 0,07	0%	Ho, B
	EU 15AC US	0%	0,15 ± 0,01	1,03 ± 0,02	2,70 ± 0,02	2,48 ± 0,02	-30,4 ± 0,49	2,07 ± 0,26	0%	Ho, A
	PG 15AA US	0%	0,19 ± 0,10	1,59 ± 0,01	4,61 ± 0,04	2,78 ± 0,01	-27,2 ± 0,49	2,13 ± 0,17	0%	Ho, A*
EP - PVA 5 %	CV 15AC UT	20%	4,55 ± 0,51	12,66 ± 0,38	37,54 ± 1,96	2,61 ± 0,27	-25,8 ± 0,36	1,70 ± 0,08	15%	He, B
	EU 15AC UT	15%	2,70 ± 0,21	7,69 ± 0,19	23,48 ± 0,21	2,70 ± 0,20	-40,0 ± 0,79	2,01 ± 0,13	15%	He, V
	PG 15AA UT	30%	2,71 ± 0,22	7,46 ± 0,51	17,98 ± 0,76	2,05 ± 0,22	-34,6 ± 0,33	2,04 ± 0,02	15%	He, M
	CV 15AC US	0%	0,14 ± 0,02	0,46 ± 0,04	1,19 ± 0,02	2,28 ± 0,03	-26,2 ± 0,61	2,09 ± 0,06	0%	Ho, B
	EU 15AC US	0%	0,16 ± 0,02	0,51 ± 0,01	1,26 ± 0,02	2,16 ± 0,01	-34,0 ± 0,42	2,17 ± 0,16	0%	Ho, A
	PG 15AA US	0%	0,35 ± 0,15	4,60 ± 0,37	18,94 ± 0,10	4,04 ± 0,20	-33,6 ± 0,22	2,29 ± 0,02	0%	Ho, A

SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP : Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico ; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação; d₁₀: diâmetro médio de 10% das gotículas; d₅₀: diâmetro médio de 50% das gotículas; d₉₀: diâmetro médio de 90% das gotículas; IPD: índice de polidispersão; He: Heterogêneo; Ho: Homogêneo; V: verde; M:marrom; B: branco; A: Amarelo; S: separação de fases; *precipitação.

Fonte: Próprio autor.

Faz-se importante ter conhecimento da distribuição completa de tamanho das partículas, a fim saber sobre a possível origem e natureza de qualquer instabilidade no sistema. No caso de separação por ação da gravidade ou floculação não há perda da identidade individual de cada gota, porém no caso de coalescência ou amadurecimento de Ostwald, há um aumento no tamanho médio de partículas. Contudo, é mais conveniente usar para representar esta distribuição uma medida de tendência central e uma medida da dispersão da distribuição (MCCLEMENTS, 2015).

O emprego de tensoativos não iônicos resulta na formação de uma monocamada ao redor da gotícula dispersa, uma vez que permanece na interface óleo-água, atingindo saturação e tornando menor o tamanho da gotícula, em comparação aos sistemas Pickering. Ademais, os menores tamanhos de partícula estão de acordo com estudos anteriores que utilizam mesma composição de fase oleosa e mistura de tensoativos (FERREIRA, 2016; MACEDO et al., 2006).

O potencial Zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas entre as gotículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade de um dado sistema disperso. Entretanto, não há faixas preestabelecidas de potencial que sejam preditoras de estabilidade entre diferentes formulações, mas a variação deste parâmetro em uma mesma formulação é indício da ocorrência de fenômenos que podem levar à instabilidade (WIĄCEK; CHIBOWSKI, 1999; XU et al., 2007). No estudo de estabilidade intrínseca, os sistemas não apresentaram variação relevante deste parâmetro após 24 horas de fabricação.

O parâmetro viscosidade exerce importante contributo para a determinação da fluidez adequada, bem como do perfil de estabilidade da formulação, quando interpretada concomitantemente com o tamanho das gotículas. Inversamente proporcional ao diâmetro das gotículas dispersas, a menor viscosidade presume menor velocidade de sedimentação e, consequentemente, maior estabilidade (CHEN; TAO, 2005; ORELLANA; BARET, 2019; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012). As formulações mostraram-se de consistência líquida e não apresentaram variação relevante após 24 horas de preparo.

Os sistemas dispersos contendo EBs SPA também foram avaliados quanto a alterações visíveis, tais como mudanças de cor, cremagem, coalescência, e/ou separação de fases após o período de 24h. Todas as preparações obtidas por sonda ultrassônica mostraram-se homogêneas, apresentando coloração branca (*C. verum*), verde (*E. uniflora*) e marrom (*P. granatum*) quando preparadas em ultraturrax; e branca (*C. verum*) e amarela (*E. uniflora* e *P. granatum*), quando homogeneizadas em sonda ultrassônica.

b) Ciclo gelo/degelo

A estabilidade gelo/degelo de emulsões é influenciada por vários fatores, incluindo a composição da formulação, as condições de homogeneização e condições de congelamento/descongelamento (MCCLEMENTS, 2015). A Tabela 16 apresenta o estudo de ciclo gelo/degelo (-28 °C/16h e 25 °C/8h) conduzido por 7 dias.

Houve estabilidade superior das formulações contendo PVA como agente estabilizante, tanto na preparação em ultraturrax quanto por ultrassom, evidenciada pela manutenção da cor e homogeneidade durante todo o período testado. A estabilização estérica de Pickering, bem como da formação de redes tipo gel tem sido atribuída à maior estabilidade dessas emulsões sob condições de congelamento/descongelamento (ZHU et al., 2017).

Os fenômenos de desestabilização por congelamento e descongelamento de sistemas emulsionados ocorrem por dois aspectos: cristalização das fases aquosa e/ou lipídica e alterações nas condições físico-químicas das gotículas, tais como mudanças drásticas no pH e força iônica, bem como aumentos notáveis nos níveis osmóticos, de pressão e de viscosidade (DEGNER et al., 2014). As emulsões estabilizadas por Tween®20/Span®80 e HPMC quando preparadas em ultraturrax apresentaram separação de fases relevante após o segundo ciclo, bem como formação de creme.

O tipo de adsorção da HPMC ao componente lipídico dispersado é do tipo multicamada (LI et al., 2013) e gotículas de óleo revestidas por várias camadas de emulsificantes e/ou biopolímeros tendem a aumentar a estabilidade da coalescência quando expostas ao congelamento/descongelamento (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). Entretanto, apenas a formulação contendo EB SPA de *P. granatum* estabilizada por HPMC apresentou separação de fases. Vale ressaltar que a referida formulação se apresentou homogênea até o 3º ciclo do estudo. A cristalização da fase aquosa e consequente precipitação de elagitaninos/flavonoides adsorvidos às multicamadas de HPMC parece ser o mecanismo mais plausível para a separação de fases observada apenas nesta formulação, tendo em vista a precipitação observada nas preparações de *C. verum* e *E. uniflora* estabilizadas por HPMC.

Tabela 16 - Estudo de ciclo gelo/degelo dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA

Estabilizante	Emulsão	Índice de cremagem (após o 7º dia)	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6	Ciclo 7
T20S80	CV 15AC UT	S	S	S	S	S	S	S	S
	EU 15AC UT	S	He, V	S	S	S	S	S	S
	PG 15AA UT	0%	He, M	S	S	S	S	S	S
	CV 15AC US	0%	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B
	EU 15AC US	0%	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*
	PG 15AA US	0%	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
EP - HPMC 5%	CV 15AC UT	17,1%	He, B	He, B	He, B	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*
	EU 15AC UT	S	He, V	S	S	S	S	S	S
	PG 15AA UT	S	He, M	S	S	S	S	S	S
	CV 15AC US	14,3%	Ho, B	Ho, B	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*
	EU 15AC US	0%	Ho, A	He, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
	PG 15AA US	S	Ho, M	Ho, M	Ho, M*	He, V*	He, V*	He, V*	S
EP - PVA 5 %	CV 15AC UT	0%	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B
	EU 15AC UT	0%	Ho, V	Ho, V	Ho, V	Ho, V	Ho, V	Ho, V	Ho, V
	PG 15AA UT	0%	Ho, M	Ho, M	Ho, M	He, M	He, M	He, M*	He, M*
	CV 15AC US	0%	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B
	EU 15AC US	0%	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A
	PG 15AA US	0%	Ho, M	Ho, M	Ho, M	Ho, M	Ho, M	Ho, M	Ho, M

SPA: secos por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®, EP : Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico ; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA : 15% de incorporação; He: Heterogêneo; Ho: Homogêneo; V : verde; M: marrom; B : branco; A : Amarelo; S : separação de fases; *precipitação.

Fonte: Próprio autor.

c) Estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada dos sistemas estabilizados por tensoativos (Tween® 20/Span® 80) e por partículas coloidais (HPMC 2208 e PVA 6000) contendo EBs SPA de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* foi avaliada por um período de 180 dias, em diferentes condições de temperatura (4, 25 e 40 °C).

As emulsões armazenadas sob resfriamento (4 °C) apresentaram estabilidade superior, quando comparadas às respectivas formulações armazenadas a 25 e 40 °C. As Tabelas 17, 18 e 19 trazem os aspectos macroscópicos, e as Figuras 30, 31 e 32 apresentam os índices de cremagem das formulações durante 180 dias a 2, 25 e 40 °C, respectivamente. O armazenamento a baixa temperatura reduz a incidência de colisão entre as gotículas de sistemas dispersos (FERREIRA, 2016). Além disso, todas as emulsões contendo tensoativos apresentaram separação de fases ao último período analisado, tanto à temperatura de 25 °C como a 40 °C, sendo os sistemas estabilizados por partículas coloidais mais estáveis nas mesmas condições.

É descrito que sistemas Pickering estabilizados por HPMC quando armazenados em temperaturas acima de 35 °C exibem aumento no tamanho médio das partículas, em resposta à desidratação das cadeias de HPMC e subsequente perda de proteção das nanopartículas (VERMA et al., 2011). Este fenômeno foi evidenciado macroscopicamente para todos os sistemas HPMC preparados por ultraturrax, bem como para a formulação contendo EBs SPA de *P. granatum* em HPMC e homogeneizada por sonda ultrassônica, acarretando separação de fases e maiores índices de cremagem a 40 °C. A maior estabilidade das formulações de *C. verum* e *E. uniflora* ultrassonicadas é discutível, à luz do menor teor de incorporação desses EBs SPA (5% p/v) e da maior presença de ativos lipofílicos nos EBs dessas espécies, tais como óleos essenciais (MISHRA et al., 2008; VICTORIA et al., 2012)

As análises microscópicas dos sistemas emulsionados e armazenados a 25 °C no dia 01 e do dia 90 de preparo estão apresentadas na Figura 33 (preparação por ultraturrax, dia 01), Figura 34 (preparação por ultraturrax, dia 90), Figura 35 (preparação por sonda ultrassônica, dia 01) e Figura 36 (preparação por sonda ultrassônica, dia 90). Os resultados desta análise demonstraram aspecto branco das gotículas de óleo, devido às características de refração do Myritol® 312 (1,448-1,450 a 20 °C) (TRAUL et al., 2000). Em síntese, as imagens microscópicas apresentam concordância com os dados obtidos na análise do tamanho médio de gotícula, os quais estão apresentados na Figura 37.

Tabela 17 - Avaliação macroscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento em temperatura de 4°C

Estabilizante	Emulsão	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
T20S80	CV 15AC UT	He, B	He, B*	He, B*	S	S	S	S	S	S	S
	EU 15AC UT	He, V	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	S
	PG 15AA UT	He, M	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	S	S
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	He, B	He, B	S
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	He, A*
	PG 15AA US	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	He, A*	S
EP - HPMC 5%	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*
	EU 15AC UT	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*
	PG 15AA UT	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
	PG 15AA US	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
EP - PVA 5 %	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B
	EU 15AC UT	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V
	PG 15AA UT	He, M	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
	PG 15AA US	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*

SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico ; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA = 15% de incorporação; He: Heterogêneo; Ho: Homogêneo; V: verde; M: marrom; B: branco; A: Amarelo; S: separação de fases; *precipitação.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 18 - Avaliação macroscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento em temperatura de 25°C

Estabilizante	Emulsão	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
T20S80	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B	S	S	S	S	S	S	S
	EU 15AC UT	He, V	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	S	S
	PG 15AA UT	He, M	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	S	S	S	S
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	He, B	He, B	S
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	S
	PG 15AA US	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	S	S
EP - HPMC 5%	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*
	EU 15AC UT	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*	He, V*
	PG 15AA UT	He, M*	He, M*	He, M*	S	S	S	S	S	S	S
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
	PG 15AA US	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
EP - PVA 5 %	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B	He, B
	EU 15AC UT	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V	He, V
	PG 15AA UT	He, M	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*
	PG 15AA US	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	He, A*

SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico ; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA : 15% de incorporação; He: Heterogêneo; Ho: Homogêneo; V: verde; M: marrom; B: branco; A: Amarelo; S: separação de fases; *precipitação.

Fonte: Próprio autor.

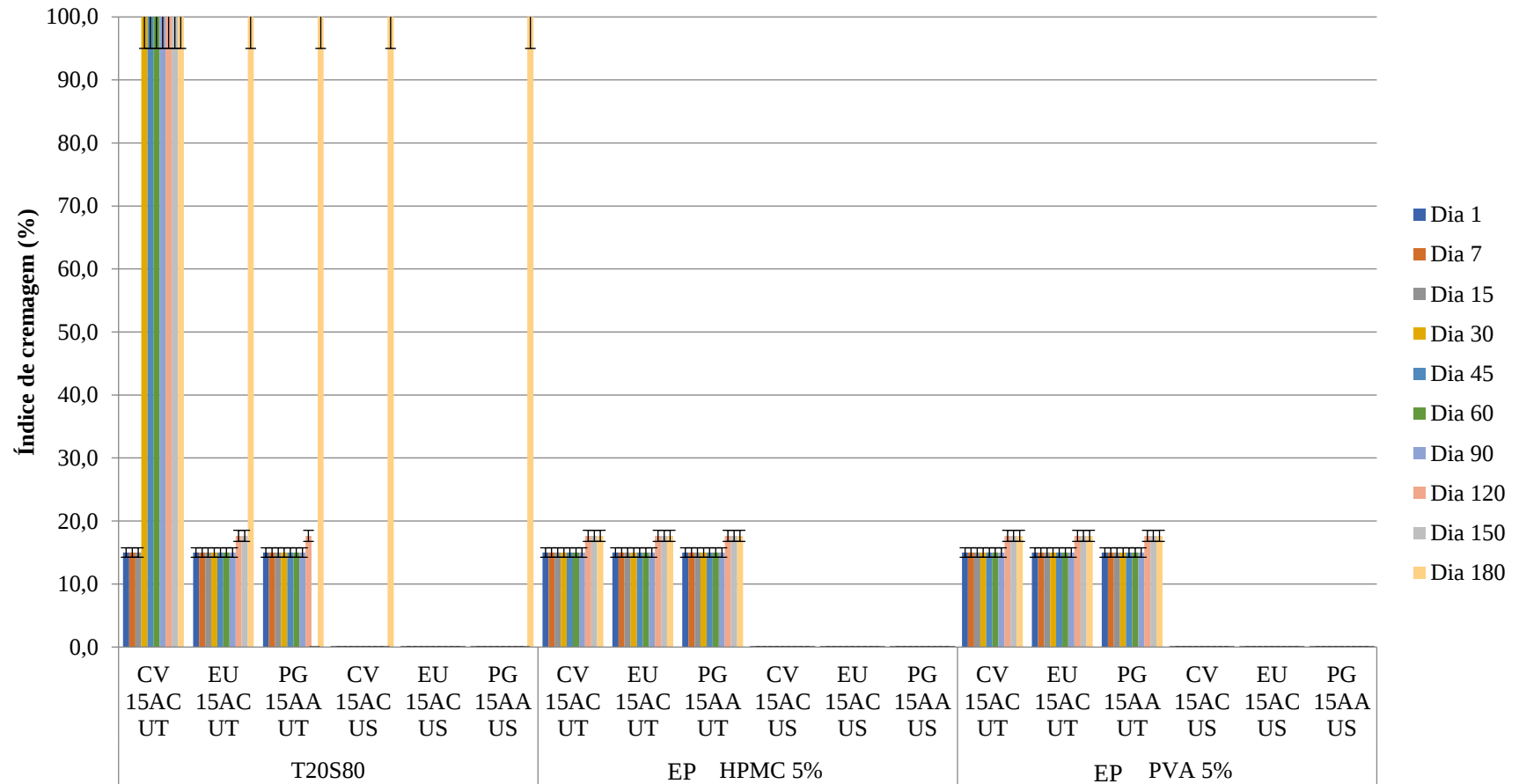
Tabela 19 - Avaliação macroscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento em temperatura de 40°C

Estabilizante	Emulsão	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
T20S80	CV 15AC UT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	EU 15AC UT	He, V	He, V*	He, V*	S	S	S	S	S	S	S
	PG 15AA UT	He, M	He, M*	He, M*	He, M*	He, M*	S	S	S	S	S
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B	Ho, B#	S	S	S	S	S	S
	EU 15AC US	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	S	S
	PG 15AA US	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	He, A*	He, A*	S	S	S
EP - HPMC 5%	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	He, B*	S	S
	EU 15AC UT	He, V*	He, V*	He, V*	S	S	S	S	S	S	S
	PG 15AA UT	He, M*	He, M*	He, M*	S	S	S	S	S	S	S
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	Ho, B*	He, B*	He, B*
	EU 15AC US	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	Ho, A*	He, A*
	PG 15AA US	Ho, A*	Ho, A*	He, A*	S	S	S	S	S	S	S
EP - PVA 5 %	CV 15AC UT	He, B	He, B	He, B	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#
	EU 15AC UT	He, V	He, V	He, V	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#
	PG 15AA UT	He, M	He, M*	He, M*	He, M*#	He, M*#	He, M*#	S	S	S	S
	CV 15AC US	Ho, B	Ho, B	Ho, B	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#	He, B#
	EU 15AC US	Ho, A	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	He, A*#	He, A*#	He, A*#	He, A*#	He, A*#	He, A*#
	PG 15AA US	Ho, A	Ho, A	Ho, A*	Ho, A*#	He, A*#	He, A*#	S	S	S	S

SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico ; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA : 15% de incorporação; He: Heterogêneo; Ho: Homogêneo; V: verde; M: marrom; B: branco; A: Amarelo; S: separação de fases; *precipitação.

Fonte: Próprio autor.

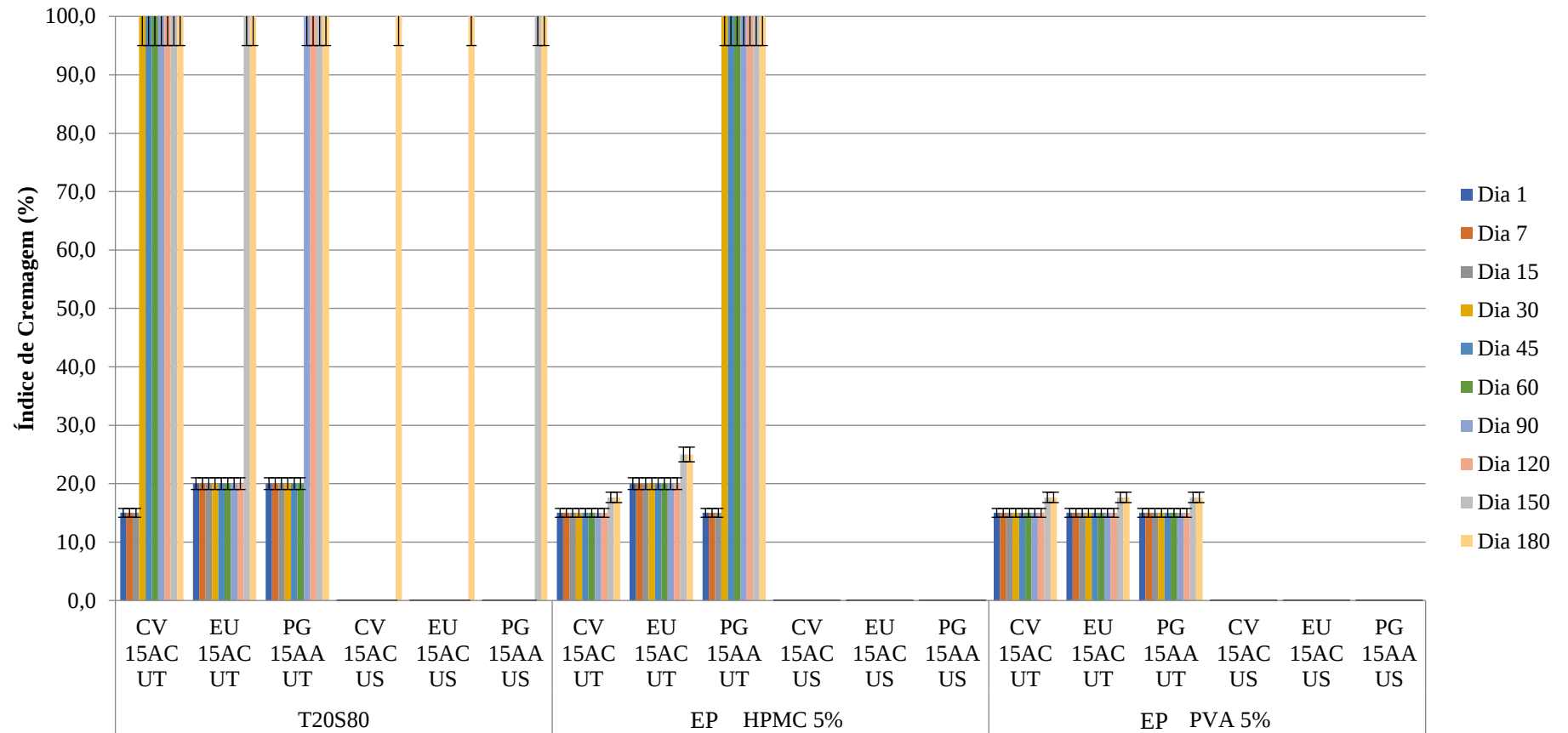
Figura 30 -Índice de cremagem dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 4 °C



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: ultraturrax; US: ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação.

Fonte: Próprio autor.

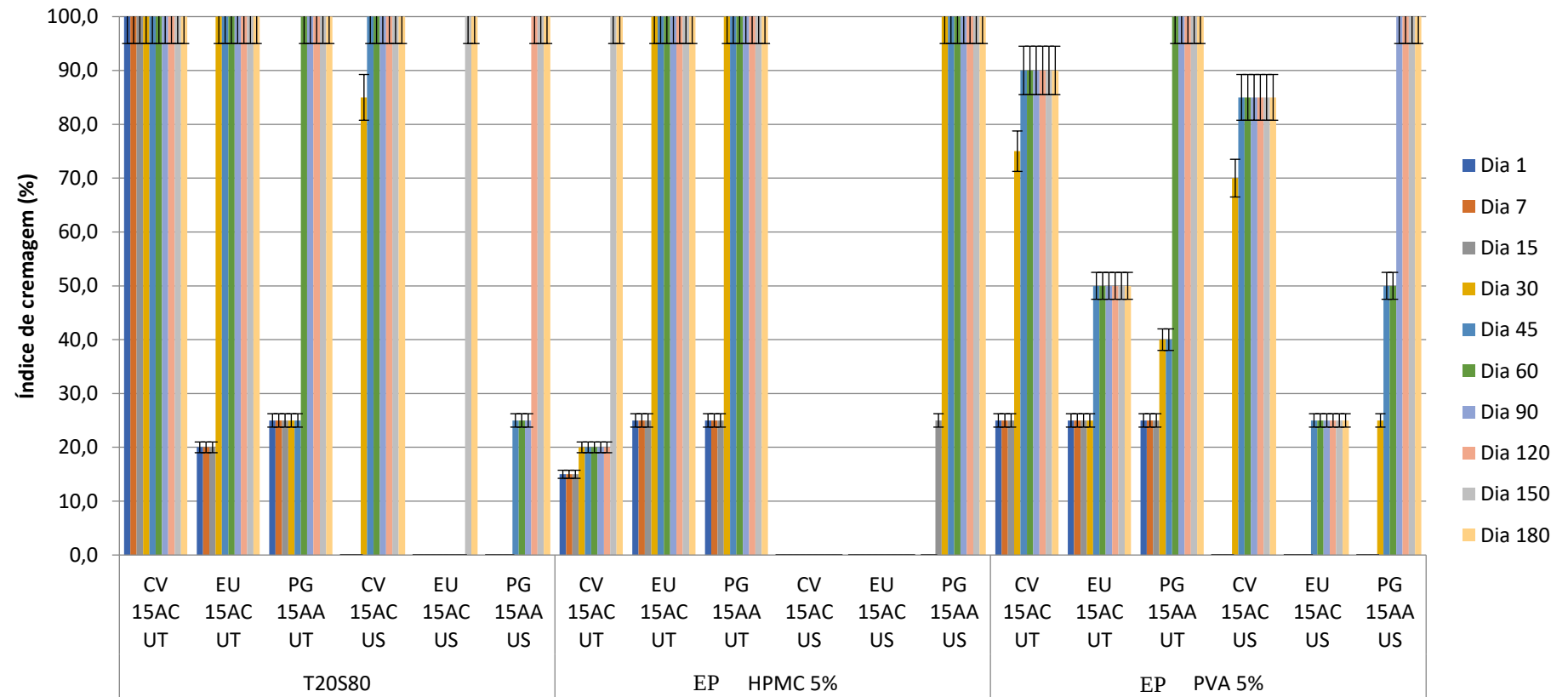
Figura 31 -Índice de cremagem dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação

Fonte: Próprio autor.

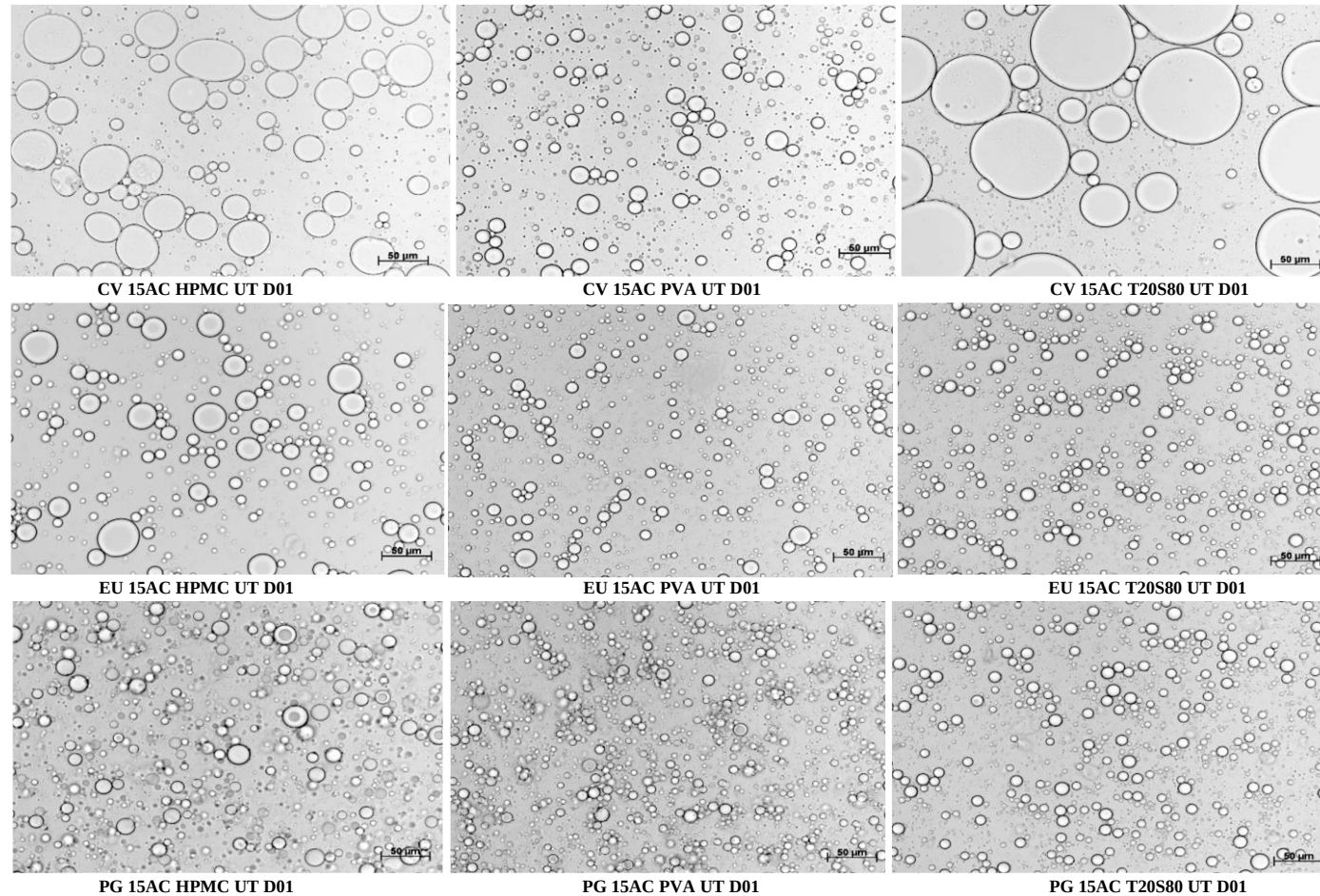
Figura 32 -Índice de cremagem dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 40 °C



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação.

Fonte: Próprio autor.

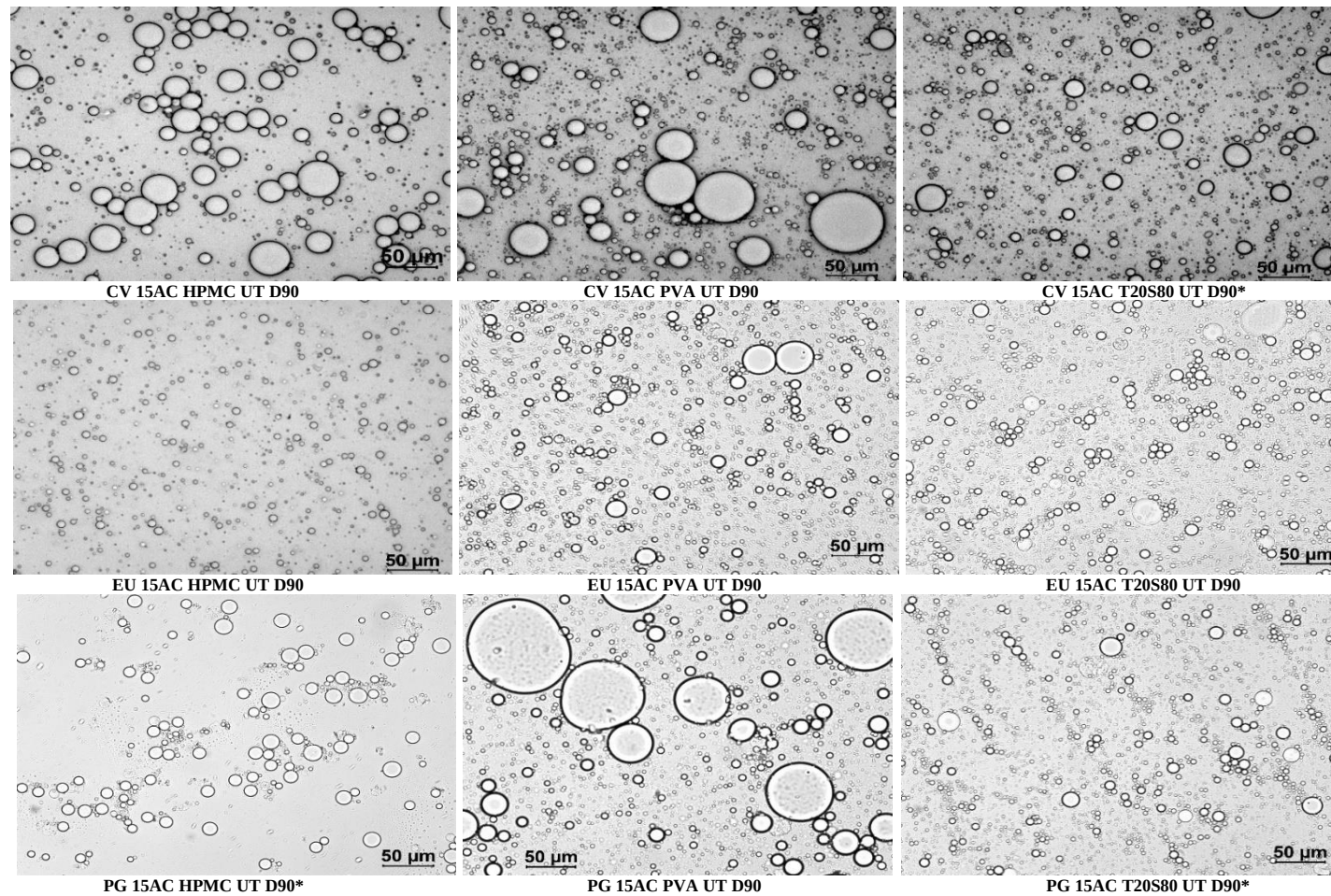
Figura 33 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA (ultraturrax, dia 01, armazenamento a 25 °C)



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; D01: dia 1. Escala: 50 µm.

Fonte: Próprio autor.

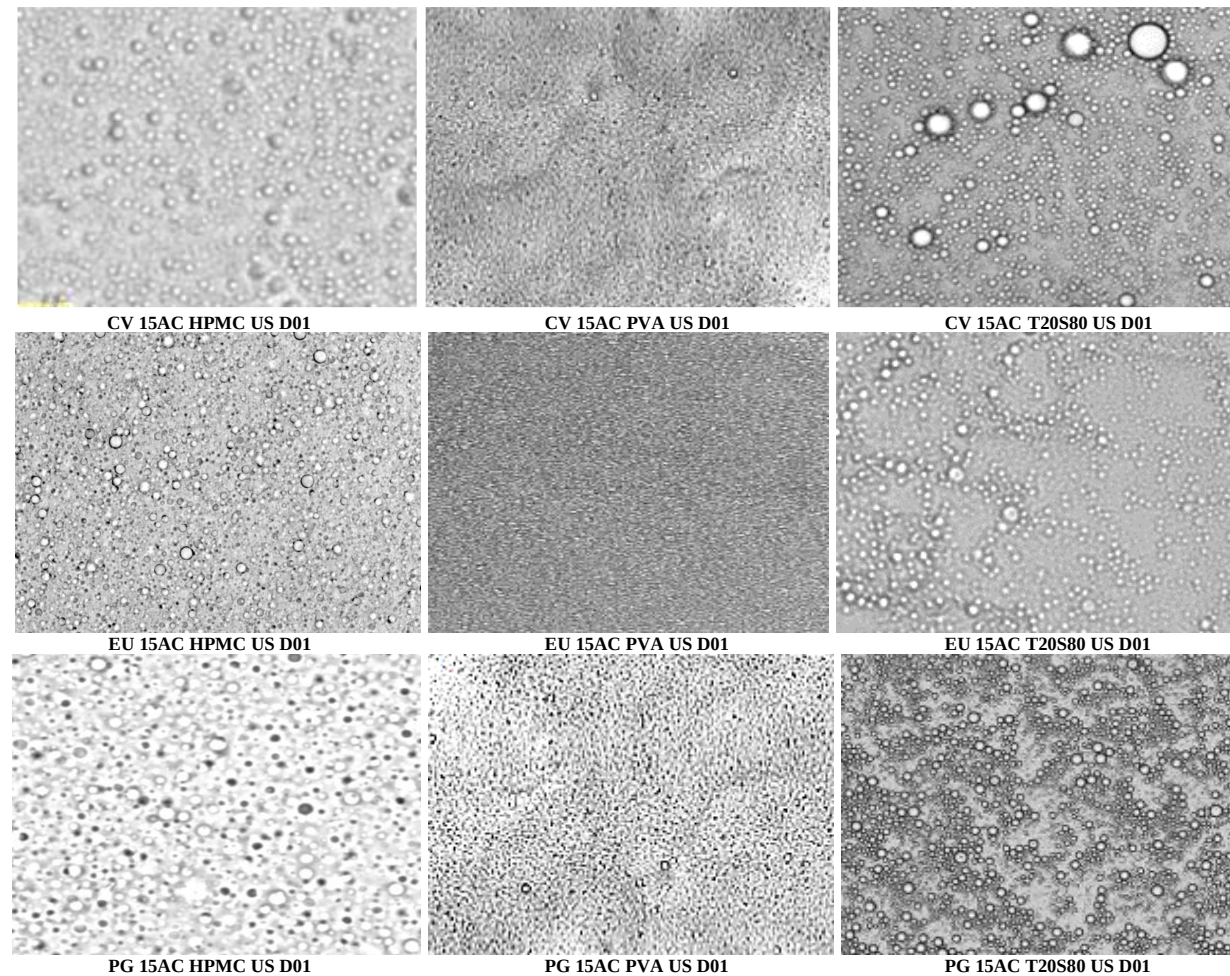
Figura 34 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA (ultraturrax, dia 90, armazenamento a 25 °C)



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; AC: 5% de incorporação; AA : 15% de incorporação; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; D01: dia 90. Escala: 50 µm. *Separação de fases.

Fonte: Próprio autor.

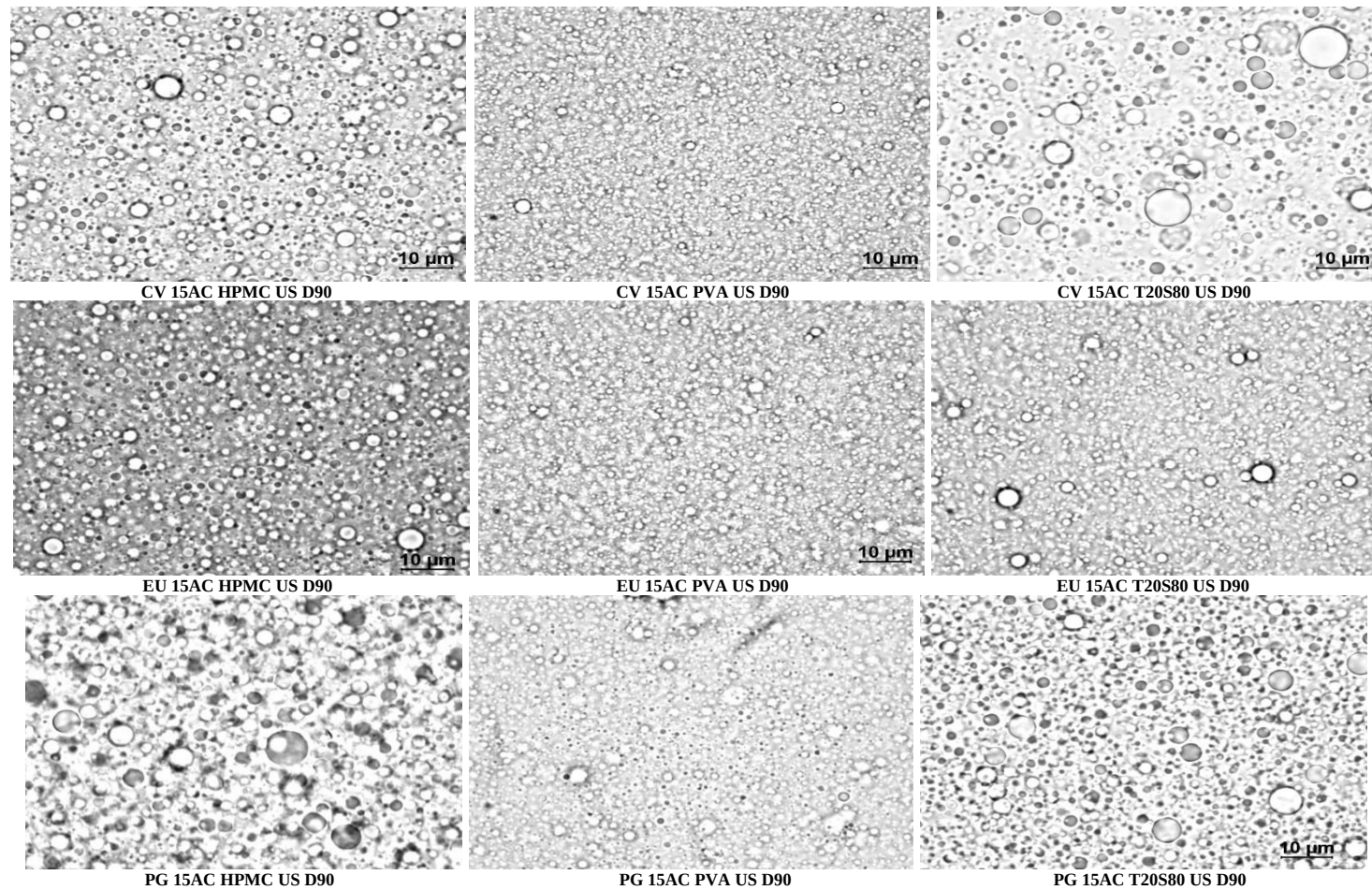
Figura 35 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA (sonda ultrassônica dia 01, armazenamento a 25 °C)



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; US: Sonda ultrassônica; D01: dia 1. Escala: 10 µm.

Fonte: Próprio autor.

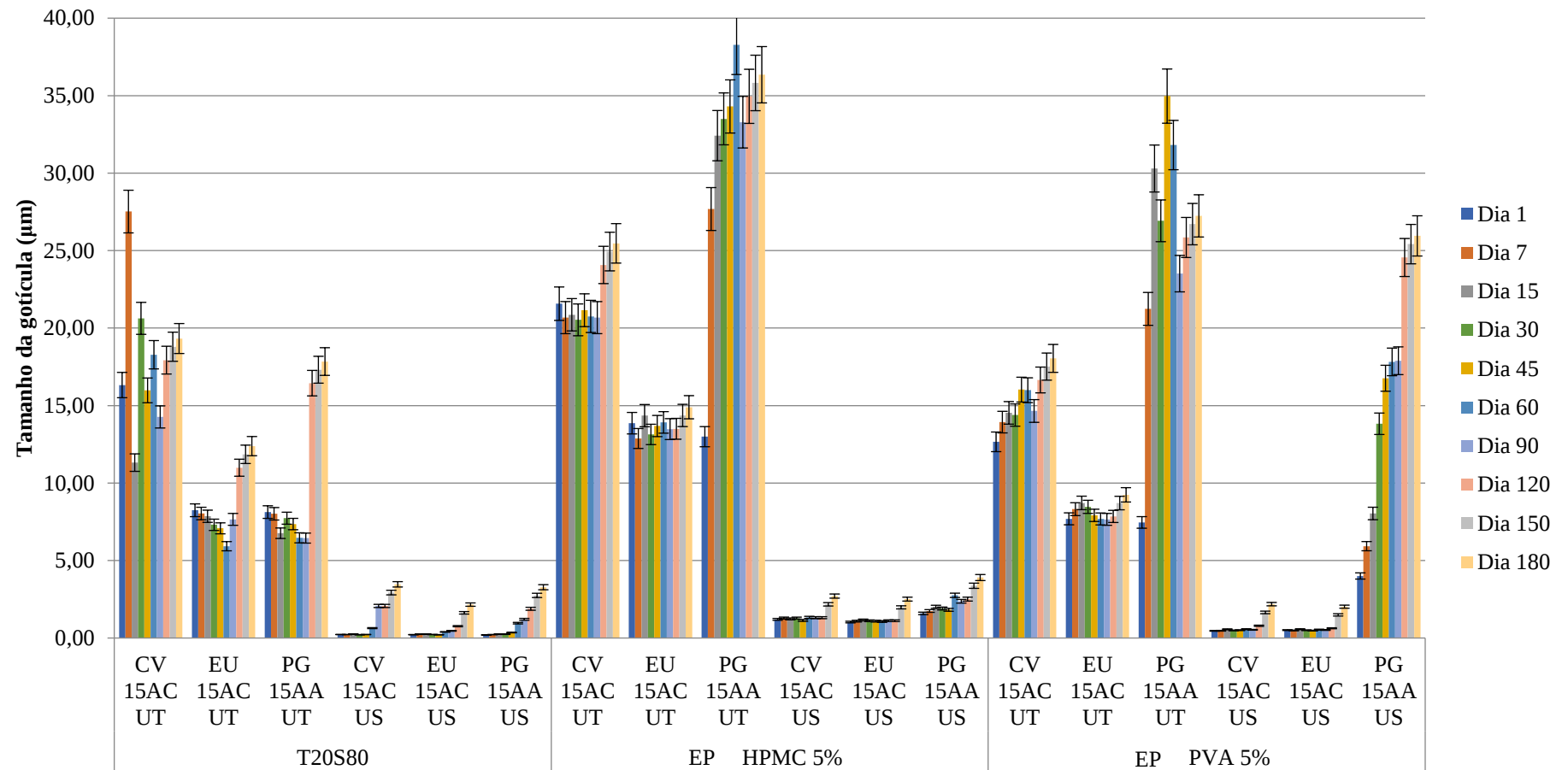
Figura 36 - Análise microscópica dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA (sonda ultrassônica, dia 90, armazenamento a 25 °C)



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; AC: 5% de incorporação; AA : 15% de incorporação; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; US: Sonda ultrassônica; D90: dia 90. Escala: 10 µm.

Fonte: Próprio autor.

Figura 37 - Tamanho médio de gotículas (μm) dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação

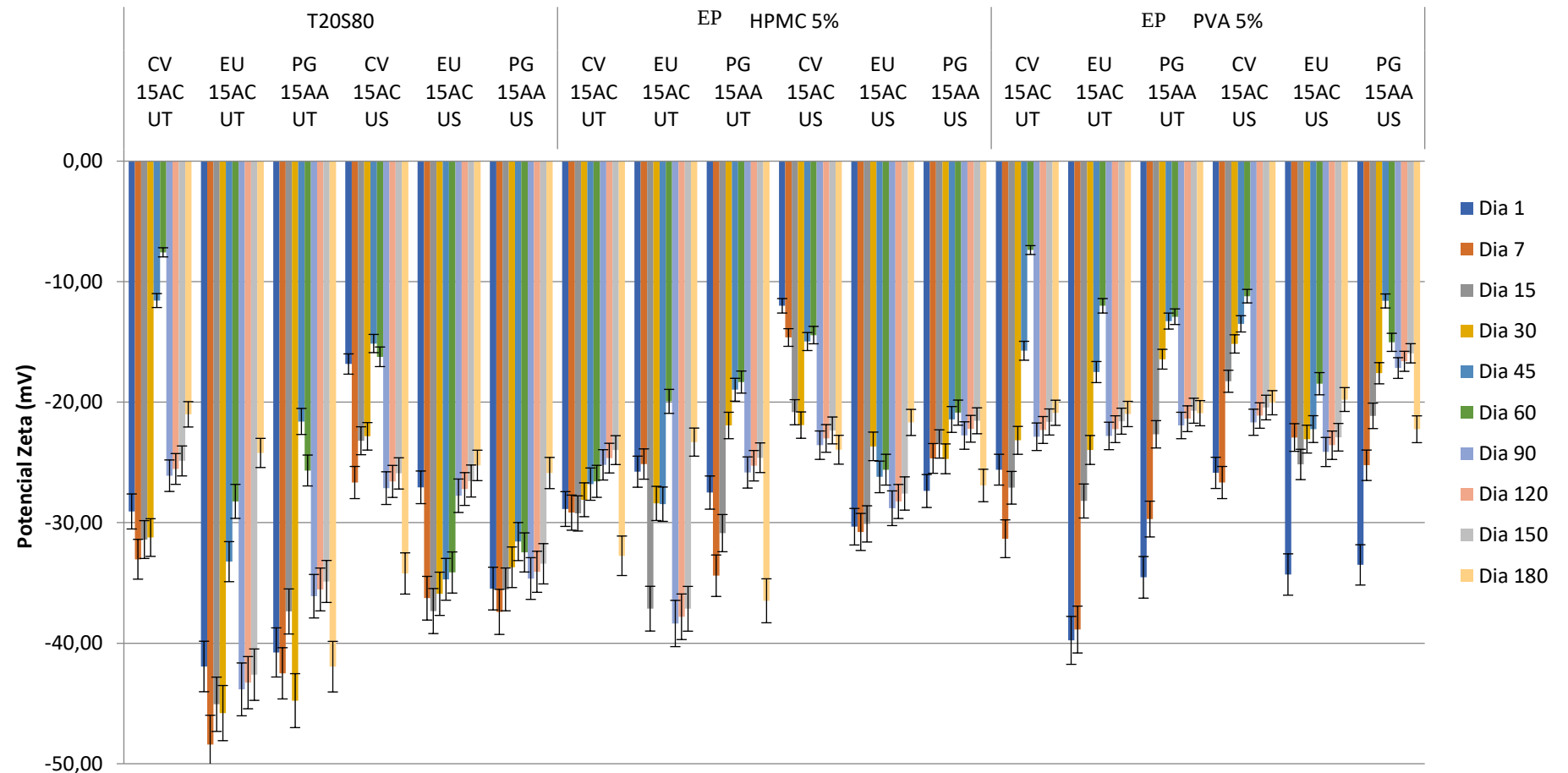
Fonte: Próprio autor.

Os dados de potencial Zeta (mV), de pH e de viscosidade capilar (cSt) estão apresentados nas Figuras 38, 39 e na Tabela 20, respectivamente. Considerando o conjunto destas análises, as emulsões apresentaram variações entre os diversos ativos vegetais, no que diz respeito aos sistemas estabilizados por tensoativos e aos sistemas estabilizados por HPMC e PVA (soluções coloidais). No que tange às inerentes diferenças entre os extratos incorporados, os resultados demonstraram que a composição química complexa das matérias-primas vegetais não proporcionou alterações significativas que pudessem desencadear a desestabilização dos sistemas produzidos por sonda ultrassônica, sobretudo quando estabilizados por partículas de PVA.

Como sistemas termodinamicamente instáveis, as emulsões não se formam espontaneamente; é necessária uma agitação mecânica dos seus componentes. A degradação física das emulsões é devida à tendência espontânea em direção a uma área interfacial mínima entre a fase dispersa e o meio dispersante (BURGUERA; BURGUERA, 2012). Micro e nanoemulsões exibem maior estabilidade à separação e agregação gravitacional, floculação e coalescência, devido ao menor tamanho de gotículas e à maior área de interface de gotículas líquidas (FRYD; MASON, 2012). Entretanto, estes sistemas demonstram maior susceptibilidade ao amadurecimento de Ostwald, um processo de migração líquida de moléculas de fase dispersa de gotas menores em gotas maiores, podendo resultar em perda do composto ativo associado (LU; KELLY; MIAO, 2016a; MCCLEMENTS, 2015).

Dependendo da hidrofobicidade e do tipo de nanotecnologia escolhida para veiculação de matrizes vegetais, os componentes podem estar solubilizados na fase aquosa externa; adsorvidos na superfície do carreador ou aprisionados no carreador (ZORZI et al., 2015). Neste trabalho, foram empregadas microemulsões do tipo O/A para a veiculação de EBs SPA de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*; consequentemente, os bioativos encontram-se majoritariamente solubilizados na fase aquosa dispersante.

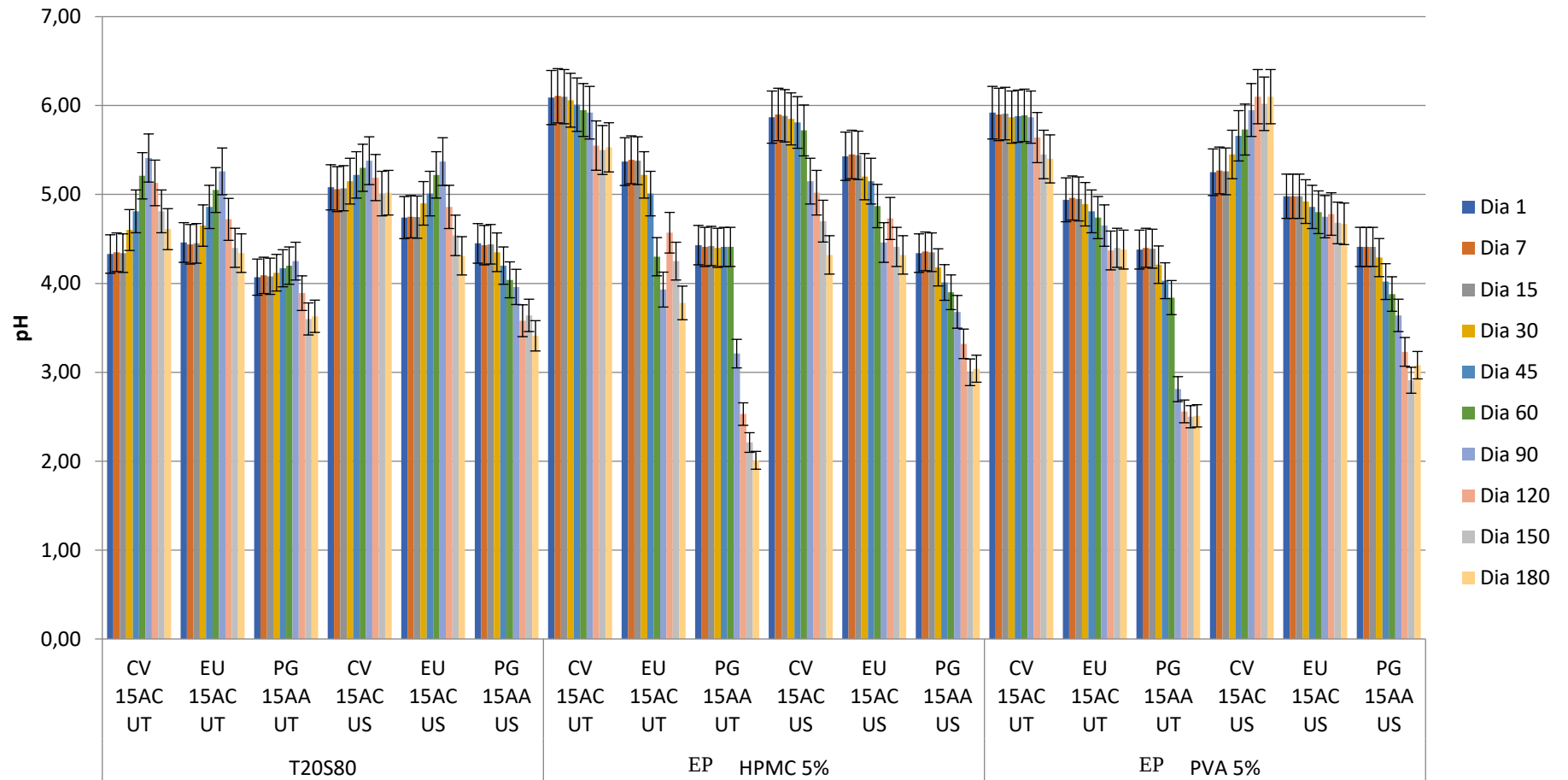
Figura 38 - Potencial Zeta (mV) dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação.

Fonte: Próprio autor.

Figura 39 - pH dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C



SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 20 - Viscosidade (cSt) dos sistemas dispersos estabilizados por tensoativos e por partículas coloidais (álcool polivinílico e hidroxipropilmetilcelulose), contendo extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* SPA durante 180 dias de armazenamento a 25 °C

Estabilizante	Emulsão	Dia 1	Dia 30	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
T20S80	CV 15AC UT	1,42 ± 0,03	NM	NM	NM	NM	NM
	EU 15AC UT	1,55 ± 0,09	1,55 ± 0,17	1,55 ± 0,06	1,55 ± 0,07	NM	NM
	PG 15AA UT	1,56 ± 0,06	1,56 ± 0,17	1,55 ± 0,03	1,55 ± 0,05	1,56 ± 0,18	NM
	CV 15AC US	1,90 ± 0,14	1,91 ± 0,28	NM	NM	NM	NM
	EU 15AC US	1,70 ± 0,16	1,70 ± 0,08	1,70 ± 0,09	1,70 ± 0,08	1,70 ± 0,08	NM
	PG 15AA US	1,91 ± 0,02	1,91 ± 0,07	1,91 ± 0,05	1,91 ± 0,05	NM	NM
EP - HPMC 5%	CV 15AC UT	1,56 ± 0,17	1,56 ± 0,09	1,56 ± 0,06	1,56 ± 0,06	1,56 ± 0,06	1,56 ± 0,06
	EU 15AC UT	1,78 ± 0,08	1,78 ± 0,15	1,77 ± 0,03	1,76 ± 0,07	1,77 ± 0,10	1,79 ± 0,10
	PG 15AA UT	1,83 ± 0,07	NM	NM	NM	NM	NM
	CV 15AC US	2,00 ± 0,07	2,00 ± 0,13	1,99 ± 0,10	2,01 ± 0,07	2,02 ± 0,12	2,00 ± 0,11
	EU 15AC US	2,07 ± 0,26	2,06 ± 0,52	2,06 ± 0,06	2,05 ± 0,22	2,07 ± 0,09	2,08 ± 0,14
	PG 15AA US	2,13 ± 0,17	2,13 ± 0,13	2,13 ± 0,02	2,15 ± 0,06	2,14 ± 0,15	2,13 ± 0,15
EP - PVA 5 %	CV 15AC UT	1,70 ± 0,08	1,70 ± 0,08	1,70 ± 0,05	1,72 ± 0,14	1,75 ± 0,11	1,73 ± 0,05
	EU 15AC UT	2,01 ± 0,13	2,01 ± 0,07	2,01 ± 0,02	2,01 ± 0,18	2,01 ± 0,02	2,01 ± 0,02
	PG 15AA UT	2,04 ± 0,02	2,04 ± 0,20	2,03 ± 0,11	2,03 ± 0,11	2,03 ± 0,11	2,03 ± 0,11
	CV 15AC US	2,09 ± 0,06	2,09 ± 0,13	2,09 ± 0,02	2,09 ± 0,02	2,09 ± 0,02	2,09 ± 0,02
	EU 15AC US	2,17 ± 0,16	2,17 ± 0,18	2,19 ± 0,18	2,17 ± 0,24	2,19 ± 0,26	2,17 ± 0,18
	PG 15AA US	2,29 ± 0,02	2,29 ± 0,12	2,29 ± 0,04	2,31 ± 0,12	2,30 ± 0,07	2,30 ± 0,08

SPA: seco por aspersão; CV: *C. verum*; EU: *E. uniflora*; PG: *P. granatum*; T20S80: Sistema Tween 20®/Span 80®; EP: Emulsão Pickering; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; UT: Ultraturrax; US: Ultrassom; AC: 5% de incorporação; AA: 15% de incorporação; NM : não mensurado, por separação de fases.

Fonte: Próprio autor.

As diferenças de composição dos extrativos representou, portanto, o principal contributo à variação no pH das emulsões obtidas. O pH das formulações demonstrou variações ao longo dos 180 dias do ensaio; entretanto, com caráter intra-preparações e mantiveram-se dentro da faixa ácida, o que é desejável para preparações de uso dermatológico (ISAAC et al., 2009).

Pode-se observar ainda o aumento dos valores de pH ao longo do estudo para os sistemas estabilizados por tensoativos e a redução desses valores para os sistemas Pickering. Os valores de pH iniciais para esses sistemas mostram-se na faixa de 5-6 (exceto para *P. granatum*, com valores compreendidos entre 4 e 5); enquanto que para os sistemas estabilizados por tensoativos os valores iniciais compreendem a faixa de 4 a 5.

Luo e colaboradores (2012) demonstraram obtenção de menores tamanhos de partículas na presença de pH alcalino em sistemas dispersos Pickering estabilizados pelos próprios flavonoides. Os autores demonstraram mudança considerável na carga das partículas de rutina em função do pH nesses sistemas, provando que este efeito foi dominante na estabilização dos sistemas e sugerindo mecanismo estabilizador devido à presença de grupos hidroxila fracamente ionizantes. Entretanto, a estabilização também é dependente do tipo de partícula sólida estabilizante empregada e da presença de outros compostos fenólicos na fase aquosa. Nesse sentido, a redução dos valores de pH observada para as emulsões estabilizadas por HPMC e por PVA durante os 180 dias é compatível com o aumento do tamanho das gotículas observado, fenômeno esperado e sugestivo de início de coalescência.

Os valores de pH superiores iniciais apresentados para os sistemas Pickering corroboram com a estabilidade apresentada, bem como com a instabilidade dessas emulsões para espécie *P. granatum*. Os menores valores de pH apresentados e consequente instabilidade dos sistemas Pickering para *P. granatum* pode ser inferido à presença de compostos fenólicos de alto peso molecular (ex: elagitaninos) nesta espécie, em comparação com *C. verum* e *E. uniflora* (Seção 5).

Os valores de pH baixos iniciais e o aumento progressivo ao longo dos 180 dias demonstrados nos sistemas estabilizados por tensoativos são compatíveis com os maiores tamanhos de gotículas apresentados e a separação de fases, respectivamente. Devido à diferença de densidade, a fase oleosa e a fase aquosa de uma emulsão são propensas à separação após um certo tempo de armazenamento, com formação de creme ou sedimentação. A separação é impulsionada pela força gravitacional (ou força centrífuga), e acontece quando a força gravitacional supera o movimento browniano (MAO; MIAO, 2015).

A lei de Stokes prevê a taxa de separação das gotículas, segundo a equação:

$$v = \frac{(\rho_a - \rho_o)d^2}{18\mu} g$$

Na qual: v = velocidade de sedimentação das gotículas (cm/s); $(\rho_a - \rho_o)$ = valor absoluto da diferença entre as massas específicas da fase aquosa e da fase oleosa (g/cm³); μ = viscosidade da fase contínua (g/cm.s); d = diâmetro das gotículas (cm) e g = aceleração devido à força de campo gravitacional ou centrífugo (cm/s²) (MAO; MIAO, 2015).

Nesse sentido, as propriedades de fluxo de uma emulsão estão dentre alguns de seus atributos físicos mais importantes em termos técnicos. A capacidade de medir, ajustar e, se possível, prever essas propriedades é muito importante (BARNES, 1994). A viscosidade pode ser definida como a resistência de um fluido ao fluxo, ou a uma alteração de sua forma. Se a viscosidade é constante e independente da tensão de cisalhamento, exibindo um comportamento de fluxo ideal, o fluido é dito newtoniano (LU; WANG; DUAN, 2016).

A viscosidade de líquidos com escoamento laminar, comportamento observado nas emulsões preparadas, é calculada através da velocidade de escoamento do líquido no interior de um tubo capilar, comumente utilizando-se viscosímetro de Ostwald. Ao longo dos 180 dias de estudo, em intervalos mensais, a viscosidade das formulações foi aferida (Tabela 20), mantendo-se inalterada durante todo o período de armazenamento a 25 °C. Este estudo permitiu, em conjunto com as outras determinações, a comprovação da estabilidade superior das emulsões tipo Pickering preparadas com HPMC e PVA, em comparação às estabilizadas pelos tensoativos Tween[®]20/Span[®]80.

7.4 CONCLUSÃO

As frações acetato de etila de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* apresentaram rendimentos acima de 60% no processo de secagem por aspersão utilizando Aerosil® 130 como adjuvante. Este dado é tecnologicamente atraente, uma vez que estas frações são enriquecidas em compostos fenólicos e, conseqüentemente, farmacologicamente ativas.

No estudo de eficiência de incorporação dos extratos/frações supracitados em sistemas dispersos emulsionados pelos tensoativos monooleato de sorbitano 80 (Span® 80) e monolaurato de sorbitano etoxilado 20 (Tween® 20), os melhores resultados foram alcançados para os extratos brutos obtidos com 15% de Aerosil® e com teor de incorporação de 5%, 5% e 15% (p/v) para de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum*, respectivamente. Para as frações acetato de etila, a melhor performance foi obtida para *C. verum* com 15% de Aerosil® incorporada a 10% (p/v); *E. uniflora* com 10% de Aerosil® incorporada a 5% (p/v) e de *P. granatum* com 15% de Aerosil® incorporada a 10% (p/v).

As variáveis tempo e potência influenciaram positivamente no desempenho do preparo das emulsões contendo extratos brutos/frações acetato de etila secos por aspersão, elegendo-se as condições de 15 min, 13 600 rpm (ultraturrax) e 40% (sonda ultrassônica) para confecção das formulações. A estabilidade intrínseca e acelerada foi conduzida para os extratos brutos, e dentre as emulsões estabilizadas por Tween®20/Span®80, hidroxipropilmetilcelulose e álcool polivinílico, as emulsões preparadas por sonda ultrassônica e do tipo Pickering (destacadamente as de álcool polivinílico) demonstraram estabilidade superior, em comparação às preparadas com tensoativos não-iônicos.

Estudos futuros são necessários para o esclarecimento das interações entre os derivados presentes nos extratos brutos de *C. verum*, *E. uniflora* e *P. granatum* e as partículas coloidais das emulsões Pickering, fundamentais para a compreensão da estabilização desses sistemas. Ademais, estudos de estabilidade intrínseca/acelerada para as emulsões contendo as frações acetato de etila, análises de doseamento dos bioativos presentes nos extratos brutos incorporados e testes de atividade biológica pós-fabricação são necessários, visando a comprovação da viabilidade terapêutica desses sistemas.

7.5 REFERÊNCIAS

- ALWADANI, N.; FATEHI, P. Synthetic and lignin-based surfactants: Challenges and opportunities. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 2, p. 126–138, 2018.
- AMAL, B. et al. Preparation and characterisation of *Punica granatum* pericarp aqueous extract loaded chitosan-collagen-starch membrane: Role in wound healing process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 5, 2015.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. **Spray drying techniques for food ingredient encapsulation**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2015.
- ANWAR, E.; FARHANA, N. Formulation and evaluation of phytosome-loaded maltodextrin-gum arabic microsphere system for delivery of *Camellia sinensis* extract. **Journal of Young Pharmacists**, v. 10, n. 2, 1, p. S56–S62, 2018.
- ARABZADEH, A. et al. Anti-halitosis tooth paste: From persian manuscripts toward clinic. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 5, n. 4, p. 15–23, 2018.
- BARNES, H. A. Rheology of emulsions - A review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p. 89–95, 1994.
- BRASIL. **INPI - Instituto Nacional da Propriedade Intelectual**. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/>>. Acesso em: 31 maio. 2019.
- BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, v. 96, p. 11–20, 2012.
- CENSI, R. et al. Permeation and skin retention of quercetin from microemulsions containing Transcutol® P. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 9, p. 1128–1133, 2012.
- CHEN, G.; TAO, D. An experimental study of stability of oil–water emulsion. **Fuel processing technology**, v. 86, n. 5, p. 499–508, 2005.
- CLARIVATE ANALYTICS. **Derwent World Patents Index**. Disponível em: <<https://clarivate.com/products/dwpi-reference-center/>>. Acesso em: 31 maio. 2019.
- DE OLIVEIRA, W. P.; DE FREITAS, L. A. P.; FREIRE, J. T. Drying of pharmaceutical products. **Transport phenomena in particulate systems**, p. 148, 2012.
- DE PAULA, I. C. et al. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 3, p. 235–241, 1998.
- DE SOUZA, K. C. B. et al. The adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. flavicarpa. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 331–336, 2000.
- DECCACHE, D. S. et al. Development of methodologies for dimethylaminoethanol glycolate assay in association with sunscreens in dermocosmetic formulation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 705–713, 2010.

- DEGNER, B. M. et al. Factors influencing the freeze-thaw stability of emulsion-based foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 98–113, 2014.
- DESNITA, R.; WAHDANINGSIH, S.; HERVIANTI, S. Span 60 as surfactant of topical microemulsion of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) ethanol extract and antioxidant activity test using DPPH method. **Int. J. PharmTech Res**, v. 9, p. 198–203, 2016.
- DEYNO, S. et al. Efficacy and safety of cinnamon in type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes patients: A meta-analysis and meta-regression. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 156, p. 107815, 2019.
- DICKINSON, E. Strategies to control and inhibit the flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 209–223, 2019.
- ERNST, H.; OMLAND, N. The Patent Asset Index – A new approach to benchmark patent portfolios. **World Patent Information**, v. 33, n. 1, p. 34–41, 2011.
- ESFANJANI, A. F.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 56–66, 2018.
- FAHR, A.; LIU, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. **Expert opinion on drug delivery**, v. 4, n. 4, p. 403–416, 2007.
- FANG, Z. Encapsulation of polyphenols e a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.
- FASIHI, H. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of carbohydrate-based films enriched with cinnamon essential oil by Pickering emulsion method. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 147–154, 2019.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 3, p. 1383–1390, 2010.
- FERREIRA, M. R. A. **Metodologias analíticas e quimiométricas para a avaliação de impressões digitais da droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz**. Recife, PE. Tese. Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/21471>>. Acesso em: 16 ago. 2019
- FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 493–518, 2012.
- GALLO, L. et al. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v. 208, n. 1, p. 205–214, 2011.
- GEORGETTI, S. R. et al. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1521–1527, 2008.
- GHAYOUR, N. et al. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 394–403, 2019.

GUO, J. et al. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. **ACTA Biomaterialia**, v. 72, p. 35–44, 2018.

HAN, C.; CUI, B. Improvement of the bioavailability and glycaemic metabolism of cinnamon oil in rats by liquid loadable tablets. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

HOLMBERG, K. Quarter century progress and new horizons in microemulsions. In: **Micelles**. [s.l.] Routledge, 2018. p. 161–192.

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, mar. 2017.

HOWARD MURAD; RAFAEL AKYUZ. **Topical Therapeutic Delivery System**, 2007.

IKEUCHI-TAKAHASHI, Y. et al. Influence of polysorbate 60 on formulation properties and bioavailability of morin-loaded nanoemulsions with and without low-saponification-degree polyvinyl alcohol. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 5, p. 754–760, 2018.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2009.

JADHAV, K. R. et al. Applications of microemulsion based drug delivery system. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, p. 267–273, 2006.

JEON, J., LEE, C., & PARK, Y. How to use patent information to search potential technology partners in open innovation. **Journal of Intellectual Property Rights**, v. 16, n. 5, p. 385–393, 2011.

JOUNG, J.; KIM, K. Monitoring emerging technologies for technology planning using technical keyword based analysis from patent data. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 114, p. 281–292, 2017.

JOVITO, V. DE C. et al. Avaliação *in vivo* de dentifrício contendo extrato da *Eugenia uniflora* L.(Pitanga) sobre indicadores de saúde bucal. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 9, n. 1, p. 81–86, 2009.

JOVITO, V. DE C. et al. *Eugenia uniflora* dentifrice for treating gingivitis in children: Antibacterial assay and randomized clinical trial. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 4, p. 387–392, 2016.

KILOR, V. A.; SAPKAL, N.; VAIDYA, G. Design and development of novel microemulsion based topical formulation of Hesperidin. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 238–245, 2015.

KRAJNOVIC, T. et al. Drug delivery system for emodin based on mesoporous silica SBA-15. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, 2018.

KU LEUVEN. **Porous Materials and Coatings - Pickering Emulsions**. Disponível em: <<https://www.mtm.kuleuven.be/Onderzoek/Ceramics/old-info/Porous>>. Acesso em: 1 out. 2019.

LEE, C. et al. Early identification of emerging technologies: A machine learning approach using multiple patent indicators. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 127, p. 291–303, 2018.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro**, v. 77, n. 5, p. 563–569, 2002.

LEONG, T. S. H. et al. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721–727, 2009.

LEONG, T. S. H. et al. Applications of Ultrasonic Emulsification. In: **Ultrasonic Production of Nano-emulsions for Bioactive Delivery in Drug and Food Applications**. [s.l.] Springer, 2018. p. 23–32.

LI, Q.; TU, J.; ZHOU, B. The tannins from *Punica granatum* L, natural regulator of TGF- β 1/Smad signaling activity improves nephrectomy and adriamycin induced focal segmental glomerulosclerosis *in vivo*. **Journal of Functional Foods**, v. 57, p. 361–372, 2019.

LI, X. et al. Competitive adsorption between sugar beet pectin (SBP) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) at the oil/water interface. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 573–580, jan. 2013.

LIANG, J. et al. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 286–292, 1 ago. 2017.

LONE, I. H. et al. Concept of Reverse Micelle Method For the Synthesis of Nano-Structured Materials. **Current Nanoscience**, v. 15, n. 2, p. 129–136, 2019.

LU, G.; WANG, X.-D.; DUAN, Y.-Y. A critical review of dynamic wetting by complex fluids: from Newtonian fluids to non-Newtonian fluids and nanofluids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 236, p. 43–62, 2016.

LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 1–9, 2016

LUNTER, D. J.; DANIELS, R. New film forming emulsions containing Eudragit® NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 291–298, 2012.

LUO, Z. et al. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 84–90, 2012.

MACEDO, J. P. F. et al. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. **Aaps Pharmscitech**, v. 7, n. 1, p. E146–E152, 2006.

MARTO, J. et al. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 8, p. 1093–1107, 2016.

MAO, L.; MIAO, S. Structuring food emulsions to improve nutrient delivery during digestion. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 439–451, 2015.

MAURYA, A. et al. Encapsulation of polyphenols into micro- and nanoparticles for improved health effects. **Research Methods and Applications in Chemical and Biological Engineering**, p. 169, 2019.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques**. [s.l.] CRC press, 2015.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55–79, 2018.

MENDES, B. R. et al. Critical assessment of the pH of children's soap. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 3, p. 290–295, 2016.

MIRAVET, G. et al. Spray-drying of pomegranate juice with prebiotic dietary fibre. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 3, p. 633–640, 2016.

MISHRA, A. K. et al. Antimicrobial activity of essential oils from the leaves of *Cinnamomum* spp. **National Academy Science Letters-India**, v. 31, n. 11–12, p. 341–345, 2008.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, mar. 2013.

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, n. 3, p. 901–908, jul. 2013.

MO, J. et al. Physicochemical properties, *in vitro* release and skin permeation studies of a topical formulation of standardized pomegranate rind extract. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 29–36, jan. 2015.

MORAIS, J. M. D. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. Ribeirão Preto, SP. Tese. Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo (USP), 2008. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-23072008-152433/publico/Tese.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

MUELLER, R. S. et al. A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 330–41, e62, ago. 2012.

NAM, S. et al. Development of Resveratrol-loaded herbal extract-based nanocomposites and their application to the therapy of ovarian cancer. **Nanomaterials**, v. 8, n. 6, jun. 2018.

NAZAR, N. et al. Cu nanoparticles synthesis using biological molecule of *P. granatum* seeds extract as reducing and capping agent: Growth mechanism and photo-catalytic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1203–1210, 2018.

NÓBREGA, R. DE M. et al. A randomized, controlled clinical trial on the clinical and microbiological efficacy of *Punica granatum* Linn mouthwash. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 15, n. 1, p. 301–308, 2015.

O'SULLIVAN, J. et al. Comparison of batch and continuous ultrasonic emulsification processes. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 114–121, 2015.

OK, S.; ALTUN, A. Interactions of poly (vinyl alcohol) and poly (N-isopropylacrylamide) with tannic acid and pyrazole derivatives: The identification of H-bonds for revealing a ``Two-Molecules'' carrier system. **European Polymer Journal**, v. 108, p. 472–484, nov. 2018.

OLIVEIRA, C. et al. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L.(Pitanga). **Brazilian Dental Science**, v. 12, n. 2, 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia. São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4 (Ago./Set. 2010), p. 641-650**, 2010.

ORELLANA, L. A. C.; BARET, J.-C. Rapid Stabilization of droplets by particles in microfluidics: Role of droplet formation. **ChemSystemsChem**, 1(1-2), 16-24., 2019.

PERVEZ, M. N.; STYLIOU, G. K. Investigating the synthesis and characterization of a novel "green" H₂O₂-assisted, water-soluble chitosan/polyvinyl alcohol nanofiber for environmental end uses. **Nanomaterials**, v. 8, n. 6, jun. 2018.

PETROTOS, K. et al. Production and encapsulation of polyphenols derived from clarifies waste by using a combination of macroporous resins and spray drying. **International Journal of Food and Biosystems Engineering. Accepted for publication**, 2016.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols—A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 260, p. 85–94, 2018.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Polyphenols-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): Optimization by multi-response surface methodology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, p. 660–667, 2019.

PRAKASH, J. et al. Effect of *Punica granatum* extract gel on gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β , interleukin-8 and CCL28 levels: Randomised controlled clinical trial. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 11, p. ZC12–ZC17, nov. 2017.

RANASINGHE, P. et al. *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) as a potential pharmaceutical agent for type-2 diabetes mellitus: Study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 18, n. 1, 2017a.

RANASINGHE, P. et al. Evaluation of pharmacodynamic properties and safety of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) in healthy adults: a phase I clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, 2017b.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.

ROHRBECK, R.; GEMÜNDEN, H. G. Corporate foresight: Its three roles in enhancing the innovation capacity of a firm. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 78, n. 2, p. 231–243, 2011.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1–2, p. 85–94, 2003.

SAMRUDHI, P.; PADMINI, R. Honey based clotrimazole microemulsion for topical delivery. **American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 11, 2016.

SANTANA, E. A. et al. Simultaneous extraction and obtention of a novel nano-dispersion from *Mikania glomerata* Spreng: Monitoring coumarin content and increasing the biological and industrial potential of a classical cultivated herb. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 49–56, 2019.

SCHUCK, P. et al. Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: A comprehensive critical review. **Drying Technology**, v. 34, n. 15, p. 1773–1790, 2016.

SCHULTZ, A. et al. An introduction to clinical trial design. **Paediatric Respiratory Reviews**, 2019.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. **Advances in Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 95–110, 2017.

SHAW, F. V. Spray drying as an alternative granulation technique. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 75–98, 1997.

SHIRODE, A. B. et al. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 475, 2015.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek-Celastraceae: desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. Porto Alegre, RS. Tese. Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2002.

Disponível em:

<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/147612/000332556.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 20 out. 2019.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587–597, 2010.

SQUILLARO, T. et al. Nano-delivery systems for encapsulation of dietary polyphenols: An experimental approach for neurodegenerative diseases and brain tumors. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 303–317, 1 ago. 2018.

TIYABOONCHAI, W.; RODLEANG, I.; OUNAROON, A. Mucoadhesive polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles containing *Punica granatum* peel extract as a novel sustained-release antimicrobial. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 4, p. 426–432, jun. 2015.

TRAUL, K. A. et al. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 79–98, 2000.

TSAI, M.-J. et al. Preparation and evaluation of submicron-carriers for naringenin topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 481, n. 1–2, p. 84–90, 2015.

- TSAI, Y.-H. et al. *In vitro* permeation and *in vivo* whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 257–262, 2010.
- USA. **Clinical Trials Gov** Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 6 jul. 2019.
- VAN HOOGEVEST, P.; LIU, X.; FAHR, A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 11, p. 1481–1500, 2011.
- VASCONCELOS, L. C. D. et al. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, v. 46, n. 5–6, p. 192–196, jun. 2003.
- VERMA, S. et al. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, n. 1, p. 145–152, 2011.
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.
- VOLPEDO, G. et al. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, n. February, p. 1–14, 2019.
- WADHWA, G. et al. Encapsulation of babchi essential oil into microsponges: Physicochemical properties, cytotoxic evaluation and anti-microbial activity. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 1, p. 60–70, jan. 2019.
- WANG, X. Q.; ZHANG, Q. Microemulsions for drug solubilization and delivery. **Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs**, p. 287, 2013.
- WEI, Z. et al. Genipin-crosslinked ovotransferrin particle-stabilized Pickering emulsions as delivery vehicles for hesperidin. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 561–573, 2019.
- WIĄCEK, A.; CHIBOWSKI, E. Zeta potential, effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 159, n. 2–3, p. 253–261, 1999.
- WOLLENWEBER, C.; OSCHMANN, R.; DANIELS, R. Hypromellose-stabilisierte Emulsionen als Träger für homöopathische Urtinkturen. **Pharmazeutische Industrie**, v. 64, n. 1, p. 81–88, 2002.
- XAVIER-JÚNIOR, F. H. et al. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 4, p. 367–372, 2012.
- XU, M.-J. et al. Effects of Strength of Interfacial Film and Zeta potential on Oil-in-water Emulsion Stability. **Chinese Journal of Applied Chemistry**, v. 6, 2007.
- YOON, J. et al. Identifying product opportunities using collaborative filtering-based patent analysis. **Computers & Industrial Engineering**, v. 107, p. 376–387, 2017.

ZHANG, L. et al. Delivery of synergistic polyphenol combinations using biopolymer-based systems: Advances in physicochemical properties, stability and bioavailability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2019.

ZHU, X.-F. et al. Freeze-thaw stability of Pickering emulsions stabilized by soy and whey protein particles. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 173–184, 2017.

ZORZI, G. et al. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complexes matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–11, 2015.

8 CONCLUSÃO

Compostos fenólicos representam uma vasta classe de metabólitos secundários que exercem atividades farmacológicas diversificadas. *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* são espécies ricas nestes bioativos e de interesse ao Sistema Único de Saúde, devido à ampla utilização pela medicina popular brasileira. Atividade antimicrobiana tem sido descrita para estas espécies; contudo, poucos trabalhos relacionam sinergia de seus polifenóis com antimicrobianos frente a microrganismos multidroga-resistentes (MDR), que representam ameaça à saúde pública mundial. Sob a perspectiva de veiculação em sistemas de liberação para uso tópico, extratos brutos (EBs) e frações foram produzidos a partir das folhas dessas espécies.

Métodos espectrofotométricos e cromatográficos comprovaram o enriquecimento dos teores de flavonoides e taninos nas frações acetato de etila (FAE) derivadas. Rutina e quercetina, catequina (*C. verum*), ácido gálico/elágico (*E. uniflora* e *P. granatum*) e ácido clorogênico e miricitrina (*E. uniflora*) foram relatados. Em modelos de atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*, as FAEs apresentaram desempenho superior quando comparadas aos respectivos EBs. Cocos Gram-positivos demonstraram maior suscetibilidade às FAEs individuais e, em estudos de associação com antimicrobianos, destacaram-se as associações das FAEs com ciprofloxacina/gentamicina para *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e *Pseudomonas aeruginosa* colistina-resistente.

Em estudos de viabilidade tecnológica dos ativos, o processo de secagem por aspersão utilizando Aerosil®130 como adjuvante mostrou desempenho satisfatório para EBs e FAEs, com rendimentos superiores a 60% (FAEs). Testes de eficiência de incorporação destes ativos em sistemas dispersos demonstraram a concentração de 15% de Aerosil® favorável, utilizando-se os EBs a 5% (p/v) (*C. verum* e *E. uniflora*) e 15% (p/v) (*P. granatum*). Para as FAEs, 10% (p/v) (*C. verum* e *P. granatum*; 15% de Aerosil®) e 5% (p/v) (*E. uniflora*; 10% de Aerosil®) foram as melhores condições de incorporação.

Testes de estabilidade intrínseca e acelerada demonstraram que emulsões Pickering estabilizadas por álcool polivinílico/hidroxipropilmetilcelulose preparadas por sonda ultrassônica (40% potência/15 min) contendo EBs foram estáveis por 180 dias (25 °C), em comparação às estabilizadas pelos tensoativos Tween®20/Span®80. Prospecções da incorporação das FAEs/antimicrobianos, bem como ensaios de doseamento de ativos e de atividade biológica tópica pós-fabricação são necessárias, visando a comprovação da viabilidade terapêutica desses sistemas e captação pelo segmento industrial.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. **Food Research International**, v. 115, p. 167–176, 1 jan. 2019.
- BEHERA, S. et al. Evaluation of antibacterial activity of three selected fruit juices on clinical endodontic bacterial strains. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 9, n. 5, p. 217, nov. 2017.
- BENAMEUR, Q. et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla(ESBL) producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. **Natural Product Research**, v. 33, n. 18, p. 2647–2654, 2019.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in *Clinical Trials*. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.
- DA VINCI, L. In: HARDING, R. C. **Space policy in developing countries: the search for security and development on the final frontier**. Ed. Routledge, 248p., p. 8, 2012.
- DAHMER, J. et al. Antibacterial activity of *Discaria americana* Gillies ex Hook (Rhamnaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 111635, jul. 2019.
- DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1474–1480, 2015.
- GARCIA, J. A. A. et al. Phytochemical profile and biological activities of ‘Ora-pro-nobis’ leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.
- KOH, C.-L. et al. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 6217–6228, 2013.
- KOH, K. H.; THAM, F.-Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 2, p. 144–148, 2011.
- KON, K.; RAI, M. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and new antimicrobial approaches**. [s.l.] Academic press, 2016.
- LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827–9837, 2011.
- LELOUP, J. Y. Em: Henriques Jr, Lauro. **Palavras de poder: Entrevistas instigantes com grandes mestres do mundo**. v. 2., p. 23, Alaúde Editorial, 2017.
- LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 1–9, 1 jan. 2016.

MARTELLI, G.; GIACOMINI, D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 91-105, 2018.

MCCREATH, S. B.; DELGODA, R. **Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies**. [s.l.] Academic Press, 2017.

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, p. 824–831, jan. 2016.

PEREIRA, N. L. F. et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 512–518, 2017.

PINNA, R. et al. Antimicrobial Effect of *Thymus capitatus* and *Citrus limon* var. pompia as raw extracts and nanovesicles. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, 2019.

RATH, S.; PADHY, R. N. Monitoring *in vitro* antibacterial efficacy of 26 Indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 3, p. 133–141, 1 set. 2014.

SANTANA, E. A. et al. Simultaneous extraction and obtention of a novel nano-dispersion from *Mikania glomerata* Spreng: Monitoring coumarin content and increasing the biological and industrial potential of a classical cultivated herb. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 49–56, 2019.

SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 1 abr. 2017.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial Resistance: An Antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. **The Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819–829, set. 2018.

UBEROS, J. et al. Phenolic acid content and antiadherence activity in the urine of patients treated with cranberry syrup (*Vaccinium macrocarpon*) vs. trimethoprim for recurrent urinary tract infection. **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. A, p. 608–616, 2015.

UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

USA. **Antibiotic Resistance Threats in the United States** Atlanta, Georgia Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance>>

ZORZI, G. et al. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complexes matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–11, 2015.

APÊNDICE A – PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO BR1020190160870



02/08/2019 870190074565
16:11
29409161811250555

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 016087 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Composição farmacêutica para veiculação de ativos vegetais, preferencialmente compostos fenólicos, isolados ou associados com ativos não vegetais convencionais, respectivo processo de obtenção e usos

Resumo: A presente invenção consiste no produto, processo e uso de sistemas dispersos contendo frações ricas em compostos fenólicos obtidos de *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* e *Punica granatum*, para veiculação de ativos na forma de emulsões livres de surfactantes, minimizando possíveis efeitos adversos causados por tensoativos não iônicos. Demonstra ter incremento do teor de flavonoides das folhas das espécies vegetais supracitadas, após processo de enriquecimento do extrato bruto, comprovado após doseamento UV-Visível e análises cromatográficas. Há potencialização da atividade antioxidante das frações enriquecidas em relação aos seus respectivos extratos brutos, considerando a remoção dos radicais livres DPPH• e ABTS•+. Pronunciada atividade antimicrobiana in vitro frente a microrganismos multidroga-resistentes é alcançada, sobretudo após a associação das frações enriquecidas a antimicrobianos convencionais, evidenciada em experimentos de atividade modulatória e ensaios Checkerboard. Extratos brutos veiculados em sistemas dispersos demonstram considerável estabilidade preliminar e acelerada, especialmente os sistemas do tipo Pickering. A incorporação das frações demonstra relevante estabilidade preliminar e permite continuação da investigação dos ativos associados a fármacos sintéticos, bem como a análise da preservação das atividades biológicas.

Figura a publicar: 17

APÊNDICE B – ARTIGO 1

Drug Delivery Systems for Phenolic Compounds from *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* and *Punica granatum*: Challenges and Possibilities

Lima, L. B.^{a,b}; Oliveira, J. H. P.^c; Ferreira, M. R. A.^{a,b}; Daniels, R.^d; Soares, L. A. L.^{a,b*}

^a *Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil*

^b *Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil*

^c *Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Brazil*

^d *Pharmaceutical Technology and Biopharmacy Department, Eberhard Karls University of Tübingen, Germany*

Revista: Expert Opinion on Drug Delivery

ISSN: 1742-5247

ID do manuscrito: EODD-2019-ST-0140

Fator de Impacto: 5,40 (2018)

Qualis CAPES: A1

Status: Sob Revisão

Expert Opinion on Drug Delivery

 Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Home

Author

Review

Author Dashboard

Author Dashboard

1 Submitted Manuscripts

1 Manuscripts with Decisions

Start New Submission

Legacy Instructions

5 Most Recent E-mails

English Language Editing Service

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
CE: Kenney, Zoe	EODD-2019-ST-0140.R1	Drug Delivery Systems for phenolic compounds from <i>Cinnamomum verum</i> , <i>Eugenia uniflora</i> and <i>Punica granatum</i> : Challenges and possibilities View Submission	15-Sep-2019	15-Sep-2019
Under Review				

APÊNDICE C – ARTIGO 2

Chemical profile and biological analysis of extracts from leaves of *Cinnamomum verum*, *Eugenia uniflora* and *Punica granatum*: a promising natural alternative against multidrug-resistant bacteria

Lima, L. B.^{a,b}; Silva, W. A. V.^a; Machado, J. C. B.^{a,b}; Bezerra, S. L. S.^{a,c}; Procopio, T. F.^d; Moura, M. C.^d; Napoleão, T. H.^d; Ferreira, M. R. A.^{a,b}; Soares, L. A. L.^{a,b*}

^a Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil

^c Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Brazil

^d Biochemical Department, Federal University of Pernambuco, Brazil.

Revista: Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants

ISSN 2214-7861

Fator de Impacto: 1,97 (2018)

Qualis CAPES: B1

Status: Submetido

Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants
Chemical profile and biological analysis of extracts from leaves of *Cinnamomum*
***verum*, *Eugenia uniflora* and *Punica granatum*: a promising natural alternative against**
multidrug-resistant bacteria

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	antibacterial; antioxidant; herbal drugs; HPLC-DAD; modulatory activity; TLC
Corresponding Author:	Luiz Alberto Lira Soares, Ph.D. BRAZIL
First Author:	Liliane Bezerra de Lima
Order of Authors:	Liliane Bezerra de Lima Wliana Alves Viturino da Silva Sarah Luanne Silva Janaina Carla Barbosa Machado Thamara Figueiredo Procópio Maiara Celine de Moura Thiago Henrique Napoleão Magda Rhayany Assunção Ferreira Luiz Alberto Lira Soares, Ph.D.
Abstract:	The aim was to evaluate the chemical composition, the antioxidant and antimicrobial potential from crude extracts and fractions from leaves of three herbal species: <i>Cinnamomum verum</i> , <i>Eugenia uniflora</i> and <i>Punica granatum</i> . The crude extract (acetone: water, 7:3) were obtained by turbo extraction and their fractions by partitioning process. Phytochemical analyses were performed by TLC and HPLC, and the antioxidant capacity was verified by DPPH• and ABTS•+. The Minimal Inhibitory/Bactericidal Concentration were conducted against twenty-two bacteria, selecting five strains susceptible to extracts/fractions and resistant to the antibiotics tested. Thereby, ampicillin, azithromycin, ciprofloxacin and gentamicin were associated to Ethyl Acetate Fractions (EAFs) against multidrug resistant strains in modulatory and checkerboard models. The chromatographic data showed phenolic in crude extracts, as well the flavonoid enrichment in the EAFs. The flavonoids are closely connected to the electron transfer activity demonstrated in DPPH• and ABTS•+ assays. The Gram-positive cocci were more susceptible to EAFs and their action spectra were improved by association, comprising Gram-negative bacilli. Synergisms were observed to ciprofloxacin and gentamicin against <i>K. pneumoniae</i> KPC and <i>P. aeruginosa</i> colistin resistant. The results are promising to obtain multi-targeting in a single therapy, which on antioxidants extracts/fractions can act as antimicrobial combinations.

ANEXO A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA



Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária

PERNAMBUCO
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N° 66/2017

	N° de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	91671	Canela	Lauraceae	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl	O. Cano
2	91672	Pitanga	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	O. Cano
3	91673	Romã	Lythraceae	<i>Punica granatum</i> L.	O. Cano

Dr^a Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbário IPA

Consulta: Liliane Bezerra de Lima

Procedência: PE - Recife, bairro de Dois Unidos, Av. Hildebrando de Vasconcelos s/n.

Coletor: a mesma em 07/10/17.

Determinada em: 18/10/2017.

Resultado encaminhado por e mail

em 18.10.2017.

Obs.: Material botânico em estudo no curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas - PPGCF/UFPE sob orientação do Prof^o Dr. Luiz Alberto Lira Soares.

Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento

ANEXO B – CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN)



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AFF07B4

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	AFF07B4
Usuário:	Universidade Federal de Pernambuco
CPF/CNPJ:	24.134.488/0001-08
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Cinnamomum verum J. Presl.
Punica granatum Linn
Eugenia uniflora Linn
Cinnamomum verum J. Presl.
Punica granatum Linn
Eugenia uniflora Linn

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável

Título da Atividade:	Avaliação da atividade antimicrobiana e sinérgica de extratos e frações obtidos de espécies vegetais frente a cepas multidroga-resistentes para veiculação em sistemas dispersos
----------------------	---

Equipe

LUIZ ALBERTO LIRA SOARES	Universidade Federal de Pernambuco
Liliane Bezerra de Lima	Universidade Federal de Pernambuco
Janaina Carla Barbosa Machado	Universidade Federal de Pernambuco
Wliana Alves Viturino da Silva	Universidade Federal de Pernambuco
Sarah Luanne Silva	Universidade Federal de Pernambuco
Magda Rhayanny Assunção Ferreira	Universidade Federal de Pernambuco

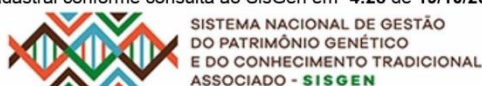
Parceiras no Exterior

Eberhard Karls Universität Tübingen

Data do Cadastro:	19/10/2018 04:28:28
Situação do Cadastro:	Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 4:28 de 19/10/2018.



ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE (CAMPUS RECIFE)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Sinérgica de Extratos e Frações Obtidos de Espécies Vegetais Frente a Cepas Multidroga-resistentes para Veiculação em Sistemas Dispersos

Pesquisador: LILIANE BEZERRA DE LIMA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99925418.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.043.449

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Sinérgica de Extratos e Frações Obtidos de Espécies Vegetais frente a cepas Multidroga-resistentes para veiculação em sistemas dispersos" tem como responsável a doutoranda em Ciências Farmacêuticas da UFPE, Liliane Bezerra de Lima, tendo como orientador o Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE e a Profa. Magda Rhayanny Assuncao Ferreira. O projeto visa avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Eugenia uniflora* (pitangueira) e *Punica granatum* (romãzeira), o potencial sinérgico dos mesmos em combinação com antimicrobianos clássicos (ampicilina, gentamicina, azitromicina, levofloxacina, cefoxitina, anfotericina B e fluconazol), além do estudo da viabilidade de sistemas dispersos emulsificados contendo os derivados vegetais. Trata-se de uma pesquisa experimental com a utilização de microorganismos de isolados clínicos humanos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial antimicrobiano e efeito(s) sinérgico(s) de extratos brutos e frações das folhas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pitangueira (*Eugenia uniflora*) e romãzeira (*Punica granatum*), frente a cepas multidroga-resistentes, visando o desenvolvimento de sistemas

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 28 de Novembro de 2018

Assinado por:
 Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
 (Coordenador(a))