

Determinação de elagitaninos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e desenvolvimento de forma farmacêutica enxaguatório bucal a partir de extrato bruto seco de Punica granatum L. (romã)

Maria Gabrielle de Oliveira Tabosa¹, Vanessa Camylla Bernardo de Oliveira^{1*}, Yasmim Dayane Leal Paixão¹, Carlos Eduardo Miranda de Sousa², Valdenice Aparecida de Menezes³ & Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo⁴

¹Graduandas do curso de Bacharelado em Farmácia do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita)

²Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e docente do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita)

³Doutora em Odontologia pela Universidade de Pernambuco (UPE) e docente do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita)

⁴Doutor em Produtos naturais e sintéticos bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e docente do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita)

*E-mail para contato: vanessacamylla1@gmail.com

RESUMO

A *Punica granatum* Linn. (romã) é uma planta medicinal conhecida por seus compostos bioativos responsáveis por suas atividades terapêuticas no âmbito popular e científico, podendo ser aplicada como tratamento complementar na odontologia devido sua ação antimicrobiana. Este estudo analisou o extrato bruto seco (EBS) da casca da *P. granatum* L. realizando testes toxicológicos de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) e Concentração Letal Média (CL₅₀), como também a atividade antimicrobiana. Por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) buscou determinar a presença de ácido elágico e a partir desses resultados desenvolver um enxaguatório bucal. O EBS foi avaliado quanto a sua toxicidade e apresentou CL₅₀ de 977,876 µg/mL e FOE com percentual de lise de 7,8% em sua maior concentração testada, demonstrando ter baixa toxicidade. Sua atividade antimicrobiana foi confirmada sob todas as cepas testadas com potencial de inibição do biofilme formado por estas. O método para quantificação de ácido elágico por CLAE foi desenvolvido, permitindo a separação e quantificação de ácido elágico presente no EBS da casca da *P. granatum* L, demonstrando ser eficiente e confiável. Foram preparadas fórmulas centesimais de enxaguatório segundo o preconizado pelo Manual Odontológico de Formulações Magistrais (2007), e realizado o controle de qualidade determinando-se densidade e pH, mostrando que a formulação possui estabilidade, além de testes para comprovação de segurança quanto a presença de microrganismos patógenos na forma farmacêutica. Diante dos resultados, a *P. granatum* possui potencial para ser utilizada em formulações odontológicas como tratamento adjuvante em afecções bucais.

Palavras-chave: Punicaceae, biofilmes, Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

ABSTRACT

Punica granatum Linn. (pomegranate) is a medicinal plant known for its bioactive compounds responsible for its therapeutic activities in the popular and scientific scope, and can be applied as a complementary treatment in dentistry due to its antimicrobial action. This study analyzed the dry crude extract (EBS) of the *P. granatum* L. bark by performing toxicological tests of erythrocyte osmotic fragility (FOE) and mean lethal concentration (LC50), as well as antimicrobial activity. Through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) it sought to determine the presence of ellagic acid and from these results develop a mouthwash. The EBS was evaluated for its toxicity and presented LC50 of 977,876 $\mu\text{g/mL}$ and FOE with lysis percentage of 7.8% in its highest tested concentration, demonstrating to have low toxicity. Its antimicrobial activity was confirmed under all strains tested with potential inhibition of the biofilm formed by them. The method for HPLC quantification of ellagic acid was developed, allowing the separation and quantification of ellagic acid present in the EBS of *P. granatum* L bark, proving to be efficient and reliable. Centesimal rinsing formulas were prepared as recommended by the Master's Manual for Dental Formulations (2007), and quality control was performed by determining density and pH, showing that the formulation has stability, as well as tests to prove safety for the presence of pathogenic microorganisms in pharmaceutical form. Given the results, *P. granatum* has the potential to be used in dental formulations as an adjuvant treatment in oral disorders.

Keywords: Punicaceae, biofilms, High Pressure Liquid Chromatography.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem, em pelo menos uma de suas partes, substâncias que podem ser utilizadas com fins medicinais, e o estudo de seus efeitos e aplicações em patologias é denominado fitoterapia. Trata-se de uma área que vem crescendo graças a enorme quantidade de metabólitos secundários vistos pela ciência como novas fontes de tratamento para diversas doenças.

Desde os tempos antigos, as plantas medicinais são importantes recursos terapêuticos para o tratamento da saúde, inclusive de afecções bucais, por conta de seu potencial antimicrobiano (RIBEIRO, 2017). Na ortodontia, faz-se o uso de diversos produtos de origem vegetal como terapia complementar, por exemplo, antissépticos, que atuam contra problemas desencadeados a partir do biofilme dental.

A cavidade oral pode abrigar mais de 400 espécies de diferentes microrganismos, os quais podem gerar as mais diversas patologias. A formação do biofilme consiste em um processo ordenado de fixação, proliferação e adesão bacteriana na arcada dentária, onde as bactérias colonizadoras primárias (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*) favorecem o aparecimento de bactérias colonizadoras secundárias cariogênicas (*Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* e *Lactobacillus casei*) (PEREIRA et al., 2006; JOIA, 2017).

O número de pesquisas a respeito de produtos vegetais no meio odontológico aumentou, devido à descoberta da resistência bacteriana a determinados antibióticos. Dessa forma, os estudos voltados a utilização de plantas medicinais para o tratamento de problemas odontológicos passa a ser uma terapia alternativa, dado a diversidade de espécies capazes de fornecer metabólitos com potencial antimicrobiano.

A espécie *Punica granatum L.* (romã) possui ação antibiótica, anti séptica, antiviral e adstringente empregada frequentemente no tratamento de faringites, inflamações orais e rouquidão (BATISTA, 2013). Desta forma o extrato de sua casca atua inibindo o crescimento bacteriano e impedindo sua adesão na arcada dentária, dificultando o desenvolvimento do biofilme (ARGENTA, 2012).

Essa ação é atribuída a um grupo de taninos hidrolisáveis presentes em toda extensão da espécie, mas principalmente, na casca do fruto. Este grupo recebe a denominação de elagitaninos (forma conjugada) ou ácido elágico (forma livre) que conferem a romã sua

capacidade antimicrobiana. Explicam ainda a sua utilização constante pela população como adstringente e em tratamento de doenças bucais.

Nesse contexto, o estudo buscou produzir novas formas farmacêuticas a partir de uma espécie contemplada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Reni-SUS), que atende as necessidades locais, além de confirmar ou questionar valores científicos presentes na literatura.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado nos laboratórios do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita) e teve delineamento do tipo exploratório experimental laboratorial, onde o potencial toxicológico agudo, a fragilidade eritrocitária e a ação antimicrobiana do extrato bruto seco da casca da infrutescência da espécie vegetal foram avaliados. Posteriormente, foi realizada a identificação e quantificação de ácido elágico (AE) em CLAE/HPLC. Foi desenvolvida então a forma farmacêutica enxaguatório bucal para o tratamento de biofilme e assim realizados os testes de controle de qualidade físico-químicos e microbiológico.

Preparação do extrato bruto seco (EBS) de casca de *Punica granatum* Linn.

A espécie foi coletada entre 7h da manhã, em quantidade suficiente para exsicata e produção de extrato, apresentando aspecto saudável, sendo eliminadas partes manchadas e deterioradas por insetos. Posteriormente, uma parte foi enviada ao IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) e depositada, recebendo o número de tombo 91170. A parte restante da droga vegetal foi devidamente separada para produção do extrato.

A casca foi colocada em maceração com uma solução extrativa hidroalcoólica 95% (v/v) durante sete dias. Posteriormente, a solução foi filtrada para obtenção do extrato bruto fluido. Sua solução extrativa foi evaporada no evaporador rotativo à temperatura de 60°C. Após a evaporação de 95% da solução, o extrato foi colocado em uma estufa de ar circulante (B.O.D), obtendo-se assim o EBS de casca da infrutescência de *Punica granatum* Linn. A partir da relação entre o peso da droga vegetal fresca e o peso do EBS obteve-se o percentual de rendimento, sendo este de 9,56%.

Análise toxicológica

Determinação da CL₅₀ frente à Artemia salina Leach

A determinação da CL₅₀ seguiu a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), sendo realizada em triplicata. Os ovos de *A. salina* Leach foram incubados em solução marinha em um recipiente de plástico, o qual foi mantido sob iluminação artificial (lâmpada de 40 W), temperatura constante de 28°C, por um período de 48 horas. Após este procedimento, se obteve o estágio de metanúplio, modelo padrão para testes de toxicidade devido a sua maior sensibilidade.

Foram utilizados 50 mg do EBS de *Punica granatum* L., nos quais foram utilizados 1 mL de Tween 80 a 5% para ajudar a solubilização do mesmo. A solução foi homogeneizada e o volume completado para 5 mL com água salinizada a pH = 8,0. Desta solução retirou-se alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25 µL que foram transferidas para tubos de ensaio que já continham 5 mL de solução salina, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL. A amostra foi submetida à iluminação artificial durante 24 horas. Após esse período, foi realizada contagem do número de larvas vivas e mortas e os dados tabulados utilizando o programa Microcal Origin 4.1.

Estudo da fragilidade osmótica de eritrócitos

O teste de fragilidade osmótica de eritrócitos tem por objetivo mensurar a resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, frente a extratos de plantas (RODRIGUES, 2009; SANT'ANA, 2001). O teste foi baseado na técnica descrita por Dacie e Lewi (1975), onde o sangue de carneiro foi mantido sob refrigeração em recipiente com esferas, para evitar sua coagulação.

Foram utilizados 50 mg dos extratos brutos secos de *Punica granatum* L. diluídos com soro fisiológico a 0,9%, homogeneizados e o volume completado para 5 mL com soro fisiológico 0,9%. Dessas soluções retirou-se alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25 µL que foram transferidos para tubos de ensaio que já continham 5 mL de soro fisiológico 0,9%, obtendo-se as concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL e adicionando-se em todos os tubos com 25 µL de sangue de carneiro. A amostra foi submetida à centrifugação 3300 G durante 15 min em temperatura ambiente, após o processo, a absorbância do sobrenadante de cada tubo foi mensurada em espectrofotômetro bioplus

545 nm. A obtenção da curva do percentual de fragilidade osmótica se baseou-se no valor de absorvância da hemoglobina do sobrenadante multiplicado pelo percentual total e dividido pelo valor de absorvância médio da hemólise completa dos eritrócitos.

Análise antimicrobiana

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de *Punica granatum* L. foi realizada a técnica de poços, conforme metodologia determinada por Koneman et al. (2008). Foram preparados inóculos das respectivas cepas em solução salina a 0,9%, utilizando a escala Marc-Farland 0,5 para padronizar a turbidez do inóculo na solução. Com o auxílio do swab foi realizado o semeio em tapete por toda a extensão das placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (para bactérias) e Ágar Sabouraud (para fungos). Em cada placa semeada quatro poços de 6 mm de diâmetro foram confeccionados, para a inserção de 150 µL do extrato em diferentes concentrações, a partir de diluições em 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 com relação à amostra inicial de cada extrato bruto seco da planta, sendo o procedimento realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior mensuração dos halos em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo esta entendida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)

A avaliação da ação de menor concentração de extrato, em meio de enriquecimento com adição de dextrose, necessária para inibir a aderência dos microrganismos ao tubo do vidro, é denominada como Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA). Esta foi determinada usando-se concentrações 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 dos extratos brutos secos, onde as cepas foram inoculadas a 37°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI), em microaerofilia, por um período de 24 horas, sendo os tubos inclinados a 30° (Silva et al., 2008).

Potencial Inibitório

O teste para triagem da atividade antimicrobiana e assim avaliação do potencial antimicrobiano das cepas é utilizado para observar a formação de halos ao redor dos poços contendo extrato da espécie em estudo e foi realizado conforme recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2001). As bactérias obtidas da suspensão realizada em solução salina 0,9% estéril foram semeadas pela técnica em tapete nas placas de petri com Ágar Mueller-Hinton e Ágar Sabouraud. Foram feitos poços com 6 mm de diâmetro, os quais preenchidos com 150 µL das concentrações de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 de extrato. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em estufa a temperatura de 37°C para crescimento bacteriano, durante 24 horas. Os fármacos controle utilizados foram amoxicilina e fluconazol. Após crescimento, foi verificado se houve a formação de halo.

Identificação e quantificação de ácido elágico por CLAE/HPLC

Matérias primas e solventes

O padrão de AE para CLAE/HPLC foi adquirido através da empresa Interprise localizada na cidade de Paulínia-SP, sendo o item № 10569 CAS № 476-66-4 (Cayman Chemical), com pureza $\geq 95\%$. Enquanto os produtos químicos utilizados para o desenvolvimento do trabalho, foram adquiridos em lojas especializadas localizadas em Caruaru e/ou Recife - Pernambuco que trabalham com venda de produtos hospitalares e laboratoriais, sendo eles: álcool etílico absoluto P.A, Neon, São Paulo-SP; acetato de etila P.A, Vetec, Rio de Janeiro-RJ; álcool etílico P.A, Isofar, Capivari-RJ, clorofórmio P.A e hexano P.A, Química Moderna, Barueri-SP; ácido fórmico 85% P.A, Dinamica, Idaiatuba-SP.

Amostra

O taninos hidrolisáveis foram extraídos do EBS da casca de *Punica granatum* L. por método de decantação. Para isso, 2 g do EBS foram dissolvidos em metanol:água (1:1), seguindo o procedimento em funil de separação utilizando solventes em escalas de

polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol). Obteve-se o AE na fase do solvente acetato de etila que foi comprovado estar presente no material através de prova qualitativa com cloreto férrico (FeCl_3) 1%, e por meio de cromatografia em camada delgada.

Soluções padrão

As amostras padrão utilizadas no sistema foram preparadas a partir de uma solução mãe de 1 mg/mL, onde o AE foi solubilizado em metanol. A partir desta, foram produzidas soluções em cinco concentrações diferentes, utilizando o solvente acetonitrila, que constituíram a curva de calibração. Essas soluções padrão de AE foram utilizadas para o processo de quantificação dos mesmos e validação dos métodos analíticos.

Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu®, equipado com os módulos: duas bombas LC 20AD, Detector UV-Visível SPD 20A, Controlador CBM 20A, injetor manual SIL e software Lab-Solutions versão 3.6. O método de análise cromatográfica foi determinado de acordo com o melhor desempenho de separação obtida, a partir das variáveis analisadas, resultando na utilização de fase móvel acetonitrila:água acidificada com ácido fórmico 1% (30:70). Foi utilizada a coluna C8 Shim-pack CLC 150 x 46 mm, com tempo de corrida de 6 minutos, fluxo de 0,8 mL/min e comprimento de onda de 240 nm.

Desenvolvimento e validação do método analítico

Os parâmetros para validação do método analítico aqui apresentados, foram retirados da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. O método foi avaliado conforme os parâmetros de seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Desenvolvimento farmacotécnico

Várias formulações centesimais foram desenvolvidas na busca da preparação ideal. Foram modificados apenas a quantidade dos excipientes das formulações, o que teve como objetivo buscar as concentrações capazes de fornecer um produto com maior estabilidade se apresentando na forma mais ideal possível.

Enxaguatório bucal

A forma farmacêutica foi preparada conforme recomendação do Manual Odontológico de Formulações Magistrais (2007). Segundo Ferreira (2011), enxaguatórios bucais são soluções aquosas com um ou mais ingredientes ativos que possuem propriedades antissépticas, adstringente, desodorante e analgésica.

Para o desenvolvimento da formulação foi realizado um estudo quali e quantitativo variando as concentrações do EBS da casca incorporado na formulação (F1, F2 e F3), como é possível observar na Tabela 1, a fim de se obter formulação com melhor estabilidade e seguir para os testes seguintes. Além disso, foi preparado o enxaguatório branco, em que não foi incorporado o EBS, servindo como comparativo de estabilidade para os testes de controle de qualidade subsequentes. Para cada formulação foram produzidos 450 mL de enxaguatório bucal.

Tabela 1 - Concentração (%) dos componentes do enxaguatório bucal no estudo quali e quantitativo

Componentes	Branco	F1	F2	F3
Extrato	-	6,25	2,5	1,5
Propilenoglicol	2	2	2	2
Glicerina	2	2	2	2
Metilparabeno	0,2	0,2	0,2	0,2
Polissorbato 20	0,8	0,8	0,8	0,8
Água	qsp	qsp	qsp	qsp

As concentrações dos extratos adotadas foram baseadas no teste de CIM e na revisão bibliográfica, os quais demonstraram que os componentes ativos da casca da romã apresentam ação antimicrobiana em concentrações 65 µg/mL segundo estudos realizados por Pagliarulo et al. (2016) com bactérias da cavidade oral.

Controle de qualidade físico-químico das preparações obtidas

Foi realizado de acordo com os parâmetros definidos pela ANVISA, em seu Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos vol. 1 e no Guia de Controle de Qualidade de produtos Cosméticos 2ª edição. Os testes seguiram os estudos de estabilidade acelerada adaptado, com três amostras da formulação em temperaturas distintas (ambiente, estufa e geladeira) sendo avaliados nos tempos 0, 1, 7, 15, 30 e 45 dias.

Parâmetros organolépticos

Estes parâmetros permitiram a avaliação do estado da formulação verificando alterações como: separação de fases, turvação e precipitação permitindo seu reconhecimento primário. Os parâmetros de aspecto e cor foram determinados por meio de observação visual, enquanto o odor foi avaliado através do olfato.

Parâmetros físico-químicos

Potencial hidrogeniônico – pH

Seguindo a literatura da ANVISA (2008), o pH foi determinado por potenciometria. Antes do uso, foi verificada a limpeza e determinada a sensibilidade do eletrodo, utilizando-se soluções tampão de referência e quando aplicável, ajustando-se o equipamento. Foi realizada com uma quantidade de 50 mL da amostra usando o pHmetro de bancada Quimis Q400AS. Foi avaliada a diferença de potencial entre dois eletrodos – o de referência e o de medida – imersos na amostra e dependente da atividade dos íons de hidrogênio na solução. Foi utilizado como critério de estabilidade valores de pH compatíveis com o pH bucal, ou seja, entre 5,5 e 6,5.

Densidade

Baseia-se na razão entre a massa e o volume de uma dada amostra. Foi determinada utilizando-se uma proveta de 20 mL, tarada em balança analítica e adicionado o produto até atingir um volume constante de 5 mL. Em seguida a massa apresentada na balança foi dividida pelo volume, aplicando a equação básica de densidade:

$$\text{densidade} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume (L)}}$$

Controle de qualidade microbiológico das preparações obtidas

As etapas do controle de qualidade microbiológico foram realizadas dentro de capela de exaustão adequada para evitar contaminação do ambiente, desde a diluição das amostras, até a distribuição em placas de Petri com meio de cultura. A metodologia adotada foi adaptada da descrita por Yamamoto et al. (2004). As amostras foram diluídas em soro fisiológico (1:10), e o procedimento foi realizado em triplicata, utilizando a técnica de Pour-Plate.

Em três placas de Petri estéreis, foi depositado 1 mL da diluição da amostra mais 20 mL de meio Ágar Mueller-Hinton para observar crescimento bacteriano, enquanto em outras três placas de Petri estéreis, foi utilizado o meio Ágar Sabouraud, para observação de crescimento fúngico. Foram depositados ainda ambos os meios em placas separadas, sem conter a amostra, servindo de placas controle. As placas foram movimentadas em forma de “8”, havendo homogeneização de ambos os líquidos. Ainda dentro da capela de exaustão, os meios tornaram-se sólidos, as placas foram devidamente fechadas e incubadas em estufa e em temperatura ambiente, sendo observadas após 5 dias e após 7 dias respectivamente.

Análise estatística

As informações obtidas foram calculadas por técnicas estatísticas descritivas através de distribuições absolutas, percentuais de medidas e técnicas de estatísticas inferenciais (Teste qui-quadrado e/ou Exato de Fischer). Os softwares utilizados foram o Microsoft® Office Excel 2013, Microcal Origin® 4.1 e GraphPad Prism 5 Demo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise toxicológica

Determinação da CL₅₀ frente à Artemia salina Leach

Em testes realizados com a espécie *Artemia salina*, para determinação da toxicidade de extratos de plantas, é importante analisar critérios como natatória e mortalidade dos metanaúplios (WANG et al., 2017). Enquanto que a mortalidade é definida como ausência total de movimento por aproximadamente 10 segundos de observação, a locomoção ou natatória dos animais é um parâmetro utilizado como indicador de estresse em bioensaios (LIBRALATO et al., 2016).

As Concentrações Letais Médias deste estudo foram obtidas pelo cálculo dos parâmetros A e B, que são gerados automaticamente quando os dados de mortalidade são plotados no Microcal Origin® 4., de acordo com a equação de regressão linear apresentada abaixo:

$$y = A + B * x$$

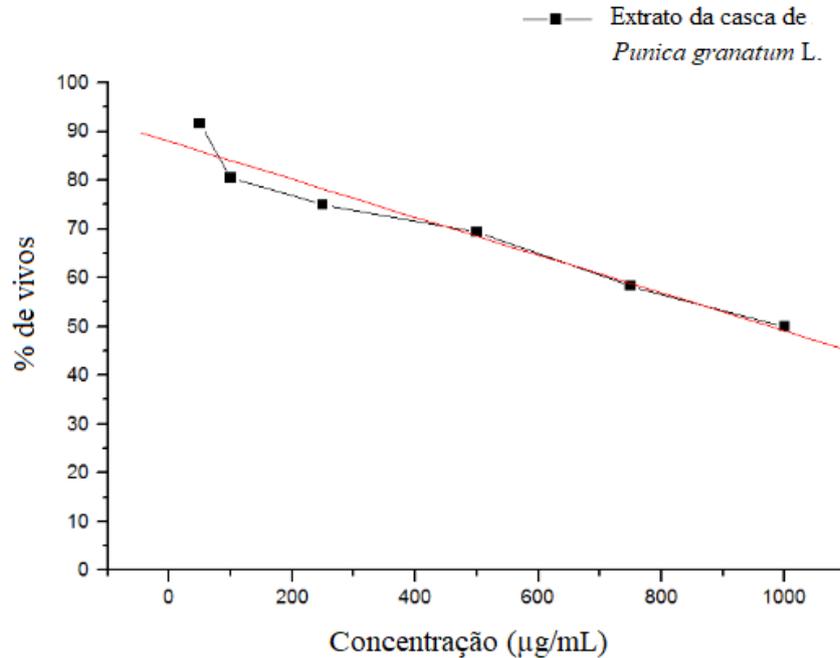
Onde: y – probabilidade de letalidade de 50%

A – coeficiente angular da reta

B – coeficiente linear

Tomando como parâmetro que quanto mais próximo de zero for a CL₅₀, mais tóxica é a planta e quanto mais próximo de 1000, menor a toxicidade da planta, o extrato da casca da infrutescência da *Punica granatum* L. mostrou-se praticamente atóxico para a *Artemia salina* Leach nas concentrações e condições testadas, apresentando CL₅₀ de 977,876 µg/mL. Apesar de praticamente atóxico, a natatória dos animais se mostrou lenta nas concentrações testadas quando comparada a do grupo controle, contudo, foi possível observar um baixo número de morte em todas as concentrações, como é possível observar na Figura 1. O gráfico abaixo é gerado pelo programa utilizado e demonstra a curva de vivos levando em consideração as concentrações de extrato que o microcrustáceo foi submetido.

Figura 1 - Percentual de vivos relacionado as concentrações do EBS da casca de romã



Les et al. (2015) constataram que o suco da romã não é tóxico em concentrações entre 1 a 1000 µg/mL. Neste estudo, o suco da romã foi testado em associação com peróxido de hidrogênio a fim de avaliar a redução da toxicidade dessa substância aplicada ao co-tratamento com a espécie *Punica granatum* L. Os resultados demonstraram que o suco de romã aumentou a sobrevivência dos metanaúplios de *Artemia salina* nos intervalos de 24, 48 e 72 horas com dose de 1 mg/mL.

Schreiner (2016) observou que a mediana de náuplios vivos da espécie *Artemia salina* após 24 horas nas diferentes concentrações testadas foi de 4 para o extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 3,1% e 6,5 náuplios para o extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 1,5%, demonstrando que nas condições testadas a toxicidade da *Punica granatum* L. é dose dependente.

Da mesma forma, o estudo de Altunkaya et al. realizado em 2013 concluiu que a letalidade do microcrustáceo *Artemia salina* em relação ao extrato da planta *Punica granatum* implica diversos resultados podendo ser caracterizado como dose dependente já que este varia de 27 a 82% dependendo da concentração de extrato a qual os metanaúplios foram expostos.

Semelhante à CL_{50} , a determinação da dose letal necessária para matar 50% da população exposta ao teste (DL_{50}) também é um parâmetro de toxicidade avaliado para espécies vegetais relacionando aos seus metabólitos secundários. Para avaliação desta, Ouachrif e colaboradores (2012) submeteram duas linhagens de ratos albinos (Wistar e albinos) a extratos metanólicos de casca de romã utilizando duas variações diferentes da espécie *Punica granatum* L., denominadas de Amrouz e Sefri. A DL_{50} do extrato em ratos Wistar quando expostos a espécie Amrouz foi de 320,5 mg/kg e 355,8 mg/kg para Sefri. Em ratos albinos, a DL_{50} foi determinada como sendo 300 mg/kg e 348,2 mg/kg para Amrouz e Sefri, respectivamente, quando testada por via intraperitoneal.

Estudo da fragilidade osmótica eritrocitária (FOE)

Como rastreamento da citotoxicidade, a FOE fornece informações acerca de interações entre compostos químicos presentes em extratos de espécies vegetais e entidades biológicas a nível celular *in vitro*. Este parâmetro avalia a susceptibilidade de lise celular em eritrócitos ocasionados por alterações ácido-base, por meio de resultados em duplicata nas concentrações testadas de forma que seja possível calcular a média aritmética e de absorbância (CARVALHO, et al. 2017).

O extrato da casca da infrutescência da romã apresentou lise de 7,8% na maior concentração testada de 1000 $\mu\text{g/mL}$ demonstrando um moderado percentual de lise de hemácias. Os valores mediante as absorbâncias foram obtidos por espectrofotometria e são apresentados na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 - Percentual de hemólise da casca da infrutescência da romã

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância média	Percentual de hemólise (%)
1000	0,099	0,107	0,107	7,80
750	0,087	0,096	0,096	6,89
500	0,078	0,088	0,088	6,28
250	0,065	0,044	0,044	4,09
100	0,033	0,058	0,058	3,40
50	0,047	0,048	0,048	3,56
Controle	0,071	0,042	0,056	4,24

Aqil e Ahmad pesquisaram em 2007 a toxicidade da *Punica granatum* L. por meio de testes de hemólise com eritrócitos de ovelhas. O extrato etanólico da casca da romã não apresentou ação hemolítica na concentração de 100 mg/mL, tanto na diluição de 1:1000 como na de 1:1.

Vidal et al. (2003) observou que na dose de 0,1 mg por embrião de rato Wistar, o extrato hidroalcoólico de fruto mais casca de *Punica granatum* não apresentou embriotoxicidade, assim como, não alterou coração, rim, fígado, pulmão e cérebro de ratos Wistar machos adultos, após administração de doses nasofaríngeas de 0,4 mg/kg, 1,2 mg/kg e 7 mg/kg.

A síntese fitoquímica de nanopartículas tem sido estudada em vista da discussão sobre sua biocompatibilidade, tendo por objetivo torná-las menos tóxicas. Dessa forma, compostos de vegetais são utilizados para produção dessas partículas, demonstrando eficácia na redução de sua citotoxicidade (ROY et al., 2013). A romã encontra-se entre as espécies utilizadas, e segundo Jacometo (2017) as nanopartículas de prata (NPAg) produzidas utilizando extrato da casca de *Punica granatum*, permitiram viabilidade celular superior a 70% na concentração mais elevada (250 ug/mL), enquanto que as NPAg sintetizadas por agentes redutores químicos como o borohidreto e citrato de sódio, exibiram viabilidade celular inferior a 70%, observando que a espécie vegetal apresentou potencial para redução da citotoxicidade conferida pelas nanopartículas.

Os dados encontrados na literatura científica acabam por demonstrar a baixa toxicidade da espécie, assim como reafirma sua presença na Reni-SUS, cooperando com os resultados exibidos no atual estudo. É importante lembrar que a toxicidade apresentada em alguns casos pode ser atribuída a presença de alcalóides na composição química da planta.

Análise antimicrobiana

O extrato da casca de *Punica granatum* L. apresentou ação frente a todas as bactérias testadas, com destaque para *Streptococcus mutans*, microrganismo presente na formação do biofilme considerado bactéria colonizadora primária, e *Lactobacillus casei*, em que foi possível observar a formação de halos em todas as concentrações testadas, demonstrando CIM de 1:8 o que corresponde a 93 mcg/mL (Tabela 3).

Tabela 3 - Diâmetro dos halos formados (mm) por diferentes concentrações do extrato bruto seco da *Punica granatum* L.

Cepas	Concentrações do extrato			
	1:1	1:2	1:4	1:8
<i>Streptococcus mutans</i>	21±1	17±0	14±1	12±0
<i>Staphylococcus aureus</i>	19±2	15±0	13±1	-
<i>Lactobacillus casei</i>	20±1	17±2	15±3	12±0
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-

Comparado aos halos do controle, a *Punica granatum* L. se apresentou com uma melhor ação em todas as concentrações frente a *S. mutans*, visto que o controle demonstrou halos de 16 e 13 mm respectivamente para as concentrações de 1:1 e 1:2, não apresentando halo nas demais concentrações.

Ramos (2016) realizou o teste de concentração inibitória mínima conforme a técnica de diluição em microplacas, sendo o extrato etanólico da casca da romã testado nas concentrações de 5, 10 e 15%, frente a espécie *Staphylococcus aureus*. Neste teste, a inibição do crescimento bacteriano foi observado através da ausência de turvação nas microplacas, sendo observada essa ausência em todas as concentrações testadas frente ao microrganismo em questão, concluindo sua ação bactericida.

Em teste utilizando as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL de extrato etanólico da casca de romã, foram obtidas, respectivamente, zonas médias de inibição de 26,66 mm, 23,66 mm e 20,66 mm frente a *S. aureus*, enquanto a espécie *Lactobacillus casei* testada, mostrou-se resistente em todas as concentrações (JAISINGHANI; MAKHWANA; KANOJIA, 2018). Enquanto que Millo e colaboradores (2017), obteve inibição de *L. casei* na concentração de 500 mg/mL do extrato da casca de *Punica granatum*.

No teste de Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), onde avalia-se a capacidade do microrganismo de produzir biofilme *in vitro* e do extrato de ser capaz de inibir esta formação. No presente teste, o extrato da casca de romã apresentou ação em *S.*

mutans, *L. casei* e *C. albicans* (Tabela 4), revelando assim ser um bom antimicrobiano para ser implementado em terapias alternativas com plantas medicinais na ortodontia.

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato da casca de romã frente aos microrganismos testados

Cepas	Concentrações do extrato			
	1:1	1:2	1:4	1:8
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+

+: inibiu a formação do biofilme

-: não inibiu a formação do biofilme

No estudo realizado por Freire Abílio (2014), observou-se pela técnica de microdiluição atividade do decocto de *Punica granatum* L. frente a *S. aureus* e *C. albicans*, sendo a concentração para a levedura de 10 mg/mL⁻¹. Na mesma pesquisa concluiu-se que, desta forma, o extrato da romã poderia ser utilizado em casos de estomatite protética como antifúngico tópico, uma vez que seu resultado foi semelhante ao do antifúngico miconazol.

O gel da romã se mostrou eficaz em inibir a aderência na arcada dentária em teste *in vitro* produzido por Hajifattahi e outros (2015), prevenindo a adesão principalmente de cepas do gênero *Streptococcus*. O mesmo autor e Vahid Dastjerdi et al. (2014), observaram que seu extrato hidroalcoólico é capaz tanto de reduzir em até 84% a formação de biofilme na boca de pacientes que utilizam aparelhos ortodônticos, quanto tem máximo efeito antibacteriano sobre *S. mutans* com concentração mínima de 3,9 mg/mL.

Assim, Betanzos-Cabrera et al. (2015) e Santos et al. (2014), concluíram que existem três hipóteses relacionadas ao mecanismo de ação antibacteriano presente na romã: a primeira delas pressupõe que há uma inibição das enzimas de bactérias e fungos; outras duas dizem respeito à ação dos taninos: 1) os taninos irão agir fazendo uma modificação no

metabolismo das membranas celulares destes microrganismos; 2) menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade destes que são elementos essenciais para o metabolismo de bactérias e fungos.

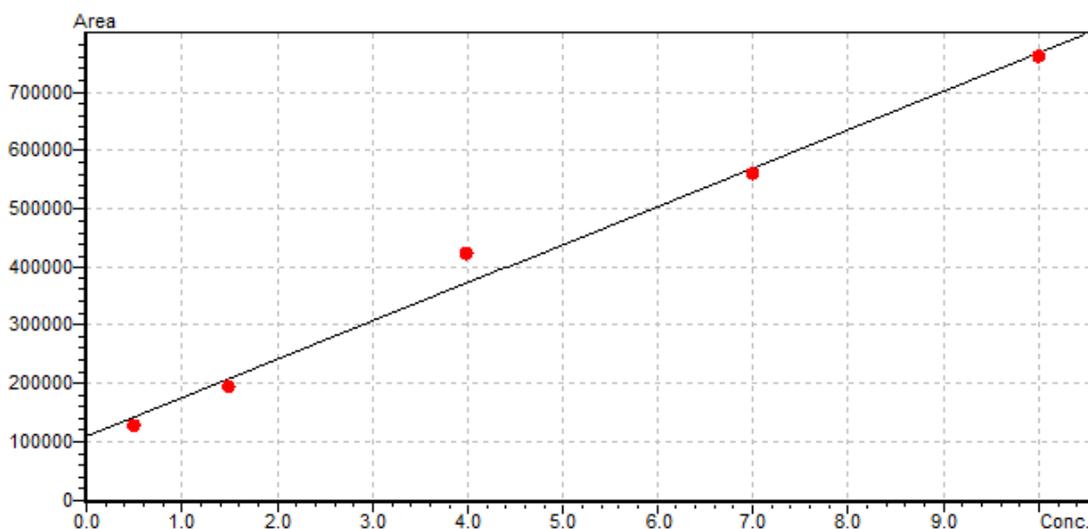
Identificação e quantificação de ácido elágico em CLAE

Para determinação da quantidade de AE por CLAE presente na casca da romã, o método utilizado foi validado conforme demonstrado a seguir na Tabela 5 e Figura 2. Os parâmetros se apresentaram dentro dos limites aceitáveis, sendo o pico de AE, identificado e quantificado na fase acetato de etila da amostra.

Tabela 5 - Valores obtidos frente a parâmetros de validação do método CLAE/HPLC e seus critérios

Critério	Valores obtidos	Coefficiente de variação	Critérios de aceitação
Precisão	4,011±0,110	2,75	≤ 5%
Robustez	4,007±0,078	1,95	≤ 5%

Figura 2 - Gráfico de linearidade do método CLAE/HPLC



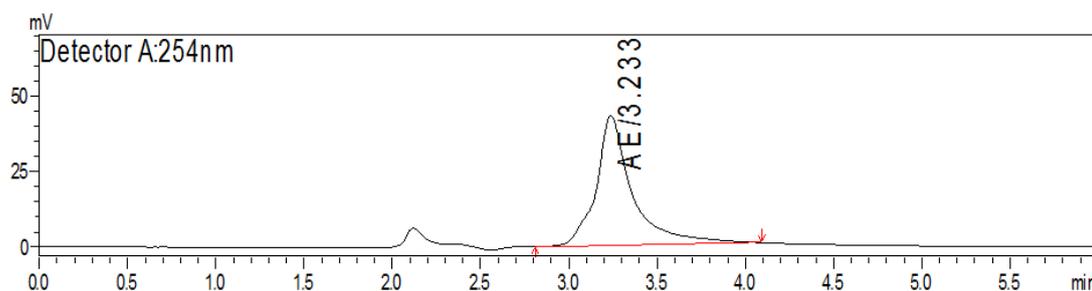
A equação $Y = aX + b$ apresentou os valores 65722,24 e 109715,7 para a e b respectivamente, sendo obtido a partir da equação $R = 0,994$.

Tabela 6 - Exatidão do método CLAE/HPLC

Valores calculados	Concentração (µg/mL)		
	0,5	4	10
Média	0,494	4,077	10,095
Desvio Padrão	0,011	0,008	0,093
Coefficiente de variação	2,281	0,196	0,923
Exatidão	-1,200	1,925	0,957

Em resposta a quantificação de AE na amostra, concluiu-se que a cada 100 g de extrato bruto seco da casca de *Punica granatum* L., 3 g são referentes a substância em questão. Abe (2007), através de CLAE, quantificou 62 mg/100 g de ácido elágico em suco de romã, observando ainda que o teor obtido a partir da casca da fruta, chegou a ser aproximadamente 10 vezes maior.

Figura 3 - Cromatograma do ácido elágico (AE)



Desenvolvimento do enxaguatório bucal e controle de qualidade

No processo de formulação de um produto cosmético, farmacêutico ou fitoterápico são exigidos pela Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) a garantia da qualidade destes quanto a sua segurança e eficácia. Neste sentido, Guias de controle de qualidade e normas de boas práticas de fabricação (Resolução da Diretoria Colegiada n° 17/2010) foram publicadas para manutenção da integridade do produto, bem como a proteção do usuário. Neste estudo, foram realizados testes para avaliação da estabilidade do produto e testes

microbiológicos, cumprindo-se as etapas de fabricação em condição ambiental apropriada para minimizar o risco de contaminação.

A formulação produzida inicialmente, denominada de branco, recebeu concentrações apenas dos excipientes como pode ser observado na Tabela 1 exposta anteriormente. A mesma foi produzida com o intuito de observação e comparação com as formulações posteriores que receberam o extrato como princípio ativo. Esta, não apresentou separação de fases, precipitação nem turvação. Exibiu odor característico e aspecto translúcido, visto que nenhum corante foi adicionado a fórmula.

Dentre as formulações produzidas, a F3 demonstrou maior estabilidade, enquanto F1 e F2 foram desconsideradas nas avaliações iniciais. Acredita-se que devido a sua maior concentração de extrato, ainda na fase de produção, foi possível a observação de precipitação de material. A mesma pode ter sido decorrente de saturação da mistura de excipientes da formulação com a quantidade de extrato exposta.

A F3 não apresentou precipitado, justificando a hipótese de que houve saturação da formulação com EBS mais concentrado. Também não foram observadas separação de fase e turvação. O odor foi considerado adocicado e o aspecto aproximou-se do demonstrado pela formulação branco, exibindo-se de forma translúcida, e uma leve coloração âmbar em consequência da adição do EBS.

Outras formulações de enxaguatório bucal com *Punica granatum* estão presentes na literatura científica, sendo descritas com atividades antimicrobianas em predomínio, associada principalmente a inibição de biofilme dental. Exemplos destas são PomElla®, enxaguante bucal com extrato aquoso da romã (DI SILVESTRO, 2009), enxaguante bucal com extrato hidroalcoólico de romã (MENEZES, 2006), enxaguante bucal a base de *P. granatum* e Clorexidina 0,2% (AHUJA et al., 2011).

Parâmetros físico-químicos

Potencial hidrogeniônico – pH

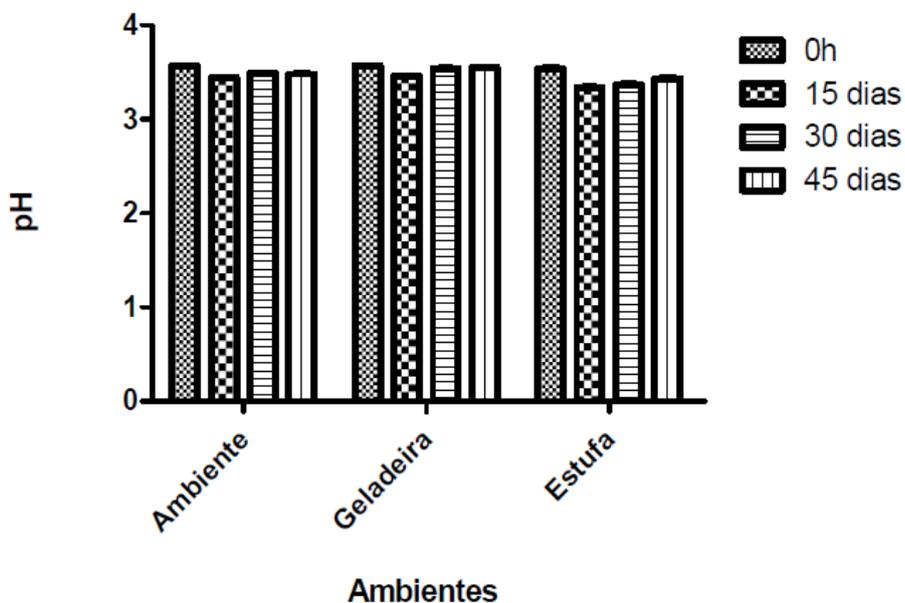
O pH é um dos fatores diretamente envolvidos com o crescimento de microrganismos, bem como com a sua inibição. A cavidade oral, dispõe de uma faixa de pH que pode variar de 6,32 a 6,9, considerando o pH da saliva (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2011; LI

et al., 2016). Ela, é capaz de suportar tanto a acidez quanto a alcalinidade, apesar dos diversos fatores que podem ocorrer em decorrência da exposição a ambos. A dissolução do esmalte dental por exemplo, pode ser ocasionada pelo uso prolongado de enxaguatórios bucais bem como pelo clareamento caseiro e o consumo diário de bebidas ácidas (BOHNER, 2013).

Apesar destes fatores, o pH ideal do produto pode ser definido como aquele que confira à formulação maior estabilidade físico-química para que seu ativo desempenhe seu potencial, desde que não confira toxicidade ao organismo.

As médias apresentadas de pH no presente estudo, foram obtidas através da exposição do material em 3 temperaturas diferentes, onde em cada temperatura, o material apresentou-se em triplicata. Frente ao enxaguatório branco, foi possível observar durante os 45 dias de avaliação, que a menor média de pH exibida foi igual a 5,53, enquanto a maior foi de 6,02; já o enxaguatório F3 exibiu como menor e maior média 3,34 e 3,57 (Figura 4).

Figura 4 - Potencial hidrogeniônico do enxaguatório F3



Durante o tempo de testes, ambas as amostras exibiram aumentos e decaimentos no valor de pH, apesar disto, não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo o branco

mantido sua faixa de pH entre 5,5 e 6,5, enquanto a F3 manteve-se entre 3,4 e 3,6. Esta diferença de faixa no qual se encontram as formulações, demonstra que a incorporação do EBS como princípio ativo proporcionou maior acidez a preparação.

Ao final dos intervalos de teste, o enxaguatório branco acondicionado na geladeira foi o que apresentou-se mais próximo da neutralidade de pH, e a F3 também acondicionada na geladeira, apresentou valor de pH maior. O pH, quando apresentado abaixo de 5,5, é capaz de provocar dissolução do esmalte dental (SILVA, 2015), dessa forma, uma estratégia que pode vir a ser aplicada frente ao enxaguatório de *Punica granatum*, é a adição de um excipiente tampão, com o intuito de ajustar o valor de pH.

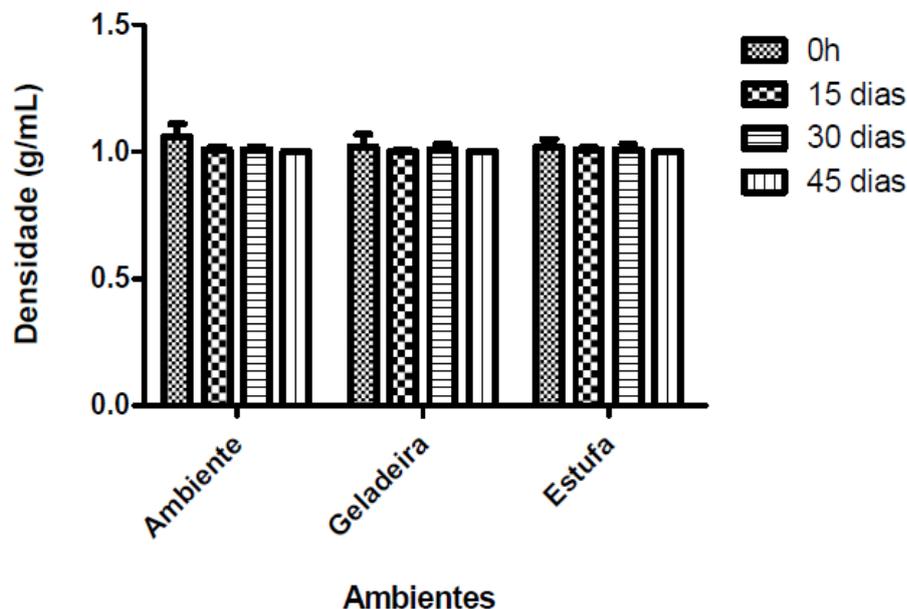
Enquanto o presente enxaguatório com a *Punica granatum* L apresentou um pH mais ácido, a pesquisa de Silva (2014) obteve pH 6, garantindo um pH mais neutro em sua formulação com extrato hidroalcoólico de romã, utilizando álcool 96, aspartame, glicerina, nipagin, flavor para clorexidine, corante castanho e água destilada.

Densidade

A análise de densidade, no caso de líquidos, é capaz de apontar a perda de substâncias voláteis, bem como a perda de água e a incorporação de ar na formulação (BRASIL, 2010 apud LOPES et al., 2018), o que faz com que esta seja importante no controle de qualidade. A densidade das formulações com os extratos da *P. granatum* L. foram avaliadas em intervalos de até 45 dias com resultados entre 1,00 a 1,06 nas condições de temperatura já estabelecidas.

O enxaguatório branco apresentou aumento leve de densidade no decorrer dos testes, enquanto a F3 se manteve estável, sem mudanças significativas, como é possível visualizar na Figura 5. A entrada de ar na formulação e a perda de substâncias voláteis, são hipóteses que tendem a explicar, respectivamente, os dados obtidos. Realizando a análise estatística, foi possível perceber que não houve alterações significativas. Essa variabilidade também foi identificada no estudo de Pedrazzi (2012), tendo justificativa a presença de ar incorporado no processo da mistura.

Figura 5 - Densidade do enxaguatório F3



O enxaguatório branco apresentou aumento leve de densidade no decorrer dos testes, enquanto a F3 se manteve estável, sem mudanças significativas. A entrada de ar na formulação e a perda de substâncias voláteis, são hipóteses que tendem a explicar, respectivamente, os dados obtidos. Realizando a análise estatística, foi possível perceber que não houve alterações significativas. Essa variabilidade também foi identificada no estudo de Pedrazzi (2012), tendo justificativa a presença de ar incorporado no processo da mistura.

Controle microbiológico

O controle de qualidade microbiológico é um dos parâmetros utilizados em desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e como padrão de qualidade. É exigido para garantir a segurança das formulações principalmente se tratando de microrganismos patogênicos, sendo necessária para avaliação da carga microbiana do produto.

A RDC nº 67 de 2007, é utilizada para regulação e controle dos possíveis contaminantes, que preconiza as condições mínimas para manipulação e dispensação de preparações magistrais, oficinais, homeopáticas, alopáticas e correlatos. Para isto, são exigidos limites

de contaminação nos produtos, sendo essa exigência feita pela Farmacopeia Brasileira (5ª ed., vol. 2, 2010) de 100 UFC/mL para fungos e 300 UFC/mL para bactérias.

Segundo Pinto et al. (2003) no livro “*Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*”, produtos contendo plantas medicinais são propícios à contaminação com microrganismos como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Staphylococcus spp.*

No ensaio realizado com os enxagatórios bucais contendo extrato de *Punica granatum L.*, não foi encontrada formação de colônias bacterianas ou fúngicas após o período de incubação das amostras. Sendo estas avaliadas em 24, 48, 120 e 168h.

As placas contendo as amostras, bem como as placas controles, não apresentaram nenhuma contaminação, confirmando que as Boas Práticas de Manipulação foram seguidas e garantindo a segurança do produto caso este venha a ser utilizado por pacientes.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados, é possível afirmar a coerência da presença da *Punica granatum* Linn na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Reni-SUS), em vista de sua baixa toxicidade. Seu potencial antimicrobiano corrobora com o encontrado na literatura científica, demonstrando alta atividade inibitória de microrganismos frente a metodologias diversificadas. A presença de ácido elágico na quantidade observada reforça que a casca da espécie é a parte que apresenta maior concentração da substância punicalagina, que está envolvido em grande parte das atividades terapêuticas exibidas pela romã. O enxagatório desenvolvido apresenta condições favoráveis para tornar-se um produto de uso odontológico, agindo como possível inibidor do biofilme dental e cicatrizante. Frente a esta forma farmacêutica, mais alguns testes ainda devem ser realizados. Dessa forma, é possível concluir que o estudo em questão contribui para a inovação de medicamentos fitoterápicos utilizando uma espécie bastante conhecida pela população, utilizado a muito de forma empírica, e com potencial terapêutico rico e disponível para ser estudado e convertido em benefício à saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe-Matsumoto LT. Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros. São Paulo:Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2007. Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Ahuja S, Dodwad V, Kukreja BJ, Menra P, Kukreja P. A comparative evaluation of efficacy of Punica granatum and chlorhexidine on plaque and gingivitis. Journal of Investigations in Dentistry 2011; 3: 29-32. Disponível em: <http://www.jicdro.org/article.asp?issn=2231-0754;year=2011;volume=3;issue=1;spage=29;epage=32;aui=12345>

Altunkaya A, Hedegaard RV, Harholt J, Brimer L, Gokmen V, Skibsted LH. Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. Food & function. 2013;4(10):1468-73.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Editora Anvisa; 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 67, 08/10/2007. Regulamento técnico de boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias – Outubro, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2ª ed. Revista - Brasília: Anvisa; 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 17, 16/04/2010. Boas práticas de fabricação de medicamentos – Abril, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. Ministério da Saúde. 5ª ed. 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2007;29(2):79-92.

Argenta JA et al. Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro e in vivo. *Arquivos em Odontologia*. 2012;48(4):218-226. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?pid=S1516-09392012000400003&script=sci_arttext&tlng=pt

Batista JFR. Potencial Antibacteriano da *Punica granatum* Linn. (Romã) na Odontologia [manuscrito] : Revisão de Literatura. Biblioteca Digital da Universidade Federal da Paraíba. 2013. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/bitstream/123456789/4084/1/PDF%20-%20Jaffton%20Ferreira%20R%C3%A9gis%20Batista.pdf>

Betanzos-Cabrera G et al. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Food & nutrition research*. 2015;59(1):2762-2772. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/fnr.v59.27620>

Bohner LOL. Ação do enxaguatório bucal a base de *Casearia Sylvestris* e Clorexidina 0,12% na cor e rugosidade superficial do esmalte dental submetido ao clareamento caseiro e bebida alimentícia ácida. São Paulo: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2013. Tese de Doutorado.

Carvalho LAL et al. avaliação eritrocitária através da biotecnologia de citometria de fluxo. *Investigação*. 2017;16(8):44-49. Disponível em: <http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/2435>

Dacie JV, Lewis SM. Practical Hematology. 5th Edition. Churchill Livingstone. London. 1975.

Di Silvestro RA, Di Silvestro DJ, Di Silvestro DJ. Pomegranate Extract Mouth Rinsing Effects on Saliva Measures Relevant to Gingivitis Risk. *Phytother Res* 2009;23(8): 1123-1127. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.2759>

Ferreira AO. Guia Prático de Farmácia Magistral. 4. Ed. 2011.

Fiorucci AR, Soares MHFB, Cavalheiro ETG. O conceito de solução tampão. *Química Nova na Escola*. 2001;13(1).

Freire Abílio VM et al. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. *Rev Cubana Estomatol*. 2014;51(3):259-269. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53742>

Hajifattahi F. et al. Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of *Punica granatum* Linn. Petal on Common Oral Microorganisms. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Biomaterials. 2015;2016(1):1-7. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2016/8098943/abs/>

Jacometo WH. Síntese de nanopartículas de prata a partir da romã (*Punica granatum*): análises físico-química, antibacteriana e citotóxica. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Odontologia).

Jaisinghani RN, Makhwana S, Kanojia A. Study on antibacterial and flavonoid content of ethanolic extract of Punica granatum (pomegranate) peel. Microbiology Research. 2018;9(1):6-9. Disponível em:

<https://www.pagepress.org/journals/index.php/mr/article/view/7480>

Joia F. Cálcio favorece a formação de biofilme por Porphyromonas gingivalis= Calcium increases Porphyromonas gingivalis biofilm formation. Campinas: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2017. Dissertação (Mestre em Biologia Buco-Dental).

Koneman EW, Allen S. Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica. Panamericana. 2008.

Les F, Prieto JM, Arbones-Mainar JM, Valero MS, Lopez V. Bioactive properties of commercialised pomegranate (Punica granatum) juice: antioxidant, antiproliferative and enzyme inhibiting activities. Food & function. 2015;6(6):2049-57.

Li XQ et al. Filmes bucais mucoadesivos de tramadol para o controle eficaz da dor. Braz. J. Anesthesiol. 2016;67(3):231-237. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-70942017000300231&script=sci_arttext&tlng=pt

Libralato G et al. A review of toxicity testing protocols and endpoints with Artemia spp. Ecological indicators. 2016;69(1):35-49.

Lopes AC et al. Análise físico-química comparativa de sabonetes líquidos. Visão Acadêmica. 2018;19(2):84-89. Disponível em:

<https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/58026>

Meyer ACA, Terá TM, Eto Y. Manual odontológico de formulações manipuladas. São Paulo: Livraria Santos. Editora, 2007.

Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS. Punica granatum (pomegranate) extract is active against dental plaque. J Herb Pharmacother 2006;6(2):79-92.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Plant. Med. 1982;45:31.

Millo G et al. Antibacterial Inhibitory Effects of Punica Granatum Gel on Cariogenic Bacteria: An in vitro Study. International journal of clinical pediatric dentistry. 2017;10(2):152-157. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5571384/>

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Ninth informational supplement. NCCLS document M100-S11. Wayne, PA, 2000.

Ouachrif A et al. Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of Punica granatum. Pharmaceutical biology. 2012;50(4):429-438. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2011.611142>

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. 2016;190(1):824-831.

Pedrazzi V et al. Avaliação da densidade e do pH de géis fluoretados disponíveis no mercado nacional. Revista da Faculdade de Odontologia de Lins. 2012;22(2):21-26. Disponível em: <https://www.metodista.br/revistas/revistas-unimep/index.php/FOL/article/view/1208>

Pereira JV et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da Punica granatum Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. Rev brasileira de farmacognosia. 2006;16(1):88-93.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

Ramos LA. Avaliação microbiológica do extrato de romã (Punica granatum L.). Bahia: Faculdade Maria Milza, 2016. Monografia para obtenção de título de graduação.

Ribeiro JS. Desenvolvimento e avaliação da efetividade de agentes potencialmente clareadores livres de peróxidos. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2017. Dissertação (Mestrado em Odontologia).

Rodrigues HG, Batista MTA, Fonseca LC, Aversi-Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. Biotemas. 2009;22(1):7-16. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/20483>

Roy N et al. Green synthesis of silver nanoparticles: an approach to overcome toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2013;36(3):807-812.

Sant'ana VAC, Birgel EH, Mourao GB, Mirandola RMS. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo. Ciência Rural. 2001;31(4):609-614. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n4/a08v31n4.pdf>

Santos LA et al. Avaliação da atividade de Punica granatum Linnaeus contra Staphylococcus aureus isolados de mastite bovina e ação anti-inflamatória “in vivo”.

Revista da Universidade Vale do Rio Verde. 2014;12(1):775-784. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/1557>

Schreiner F. Análise da utilização endodôntica do gel produzido à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L. (Romã) contra *Enterococcus faecalis*: efeito antimicrobiano e toxicidade. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016. Tese de Doutorado.

Silva MSA et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Rev brasileira de farmacognosia.2008;18(2):236-240.

Silva FRS. Avaliação clínica da efetividade de um enxaguatório (*Punica granatum* Linn.) sobre o controle de biofilme dentário e inflamação gengival em escolares. Biblioteca Digital da Universidade da Paraíba. 2014. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/8136>

Silva, LAL. Controle de qualidade de uma formulação de enxaguatório bucal à base de *Libidibia ferrea* L. Amazonas: Universidade Federal do Amazonas, 2015. Projeto de Pesquisa (Iniciação Científica).

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 J Publ Health. 2014;43(12):1688-1694. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4499091/>

Vidal A et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. Journal of ethnopharmacology. 2003;89(2-3):295-300.

Wang C et al. Toxicity of α -Fe₂O₃ nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. *Science of the Total Environment*. 2017;598(1):847-855.

Yamamoto CH et al. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na Zona da Mata, MG. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*; 12-15 set 2004; Belo Horizonte; 2004.