



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

Atividade biológica do sumo de
Punica granatum L. da variedade
“*Assaria*”

Solange Raquel de Sousa Custódio

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas
Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Maria Graça da Costa Miguel
e co-orientação da Professora Maria Alcinda Neves



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

Atividade biológica do sumo de *Punica granatum* L. da variedade “Assaria”

Solange Raquel de Sousa Custódio

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas
Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Maria Graça da Costa Miguel
e co-orientação da Professora Maria Alcinda Neves

Atividade biológica do sumo de *Punica granatum* L. da variedade
“Assaria”

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

(Solange Raquel de Sousa Custódio)

Copyright © 2020 Solange Custódio

A universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, desde que seja dado o devido crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço à professora Maria Graça Miguel por ter aceitado ser a minha orientadora nesta última fase do meu percurso pelo mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, que apesar se da minha situação de trabalhadora-estudante provocar limitações ao meu tempo despendido no laboratório, manteve-se disponível e paciente para me orientar e transmitir os seus conhecimentos.

Agradeço também às minhas colegas de laboratório, Souki, Sara e Oumaima por me ajudarem quando precisava, e por darem também o seu contributo na orientação desta tese.

Agradeço à minha família, nomeadamente, os meus pais, irmã e avó por me apoiarem todas as minhas escolhas, e ajudarem com apoio moral nesta fase.

Agradeço às minhas colegas de trabalho e amigas por me tolerarem e apoiarem nos melhores e piores momentos deste percurso académico, ajudando a manter a motivação para continuar e chegar ao seu final.

Resumo

Punica granatum L. é um dos frutos comestíveis mais antigos conhecidos, sendo um fruto referenciado em várias culturas e religiões, sendo usada como método terapêutico para diversos problemas de saúde ou como simbolismo. Na atualidade, o desenvolvimento científico veio revelar os metabolitos ativos presentes na romã, que vieram comprovar o facto de ser uma fruta especial. A ancestralidade e diversidade de regiões e climas em que a romã pode ser encontrada, levou a que se desenvolvessem fenótipos diferentes de romãs, fazendo com que surgissem enormes variedades de romãs. A variedade “*Assaria*” é a variedade de romã endémica da região sul de Portugal.

O objetivo deste trabalho consiste em fazer a quantificação de alguns metabolitos ativos presentes no sumo de romãs da variedade “*Assaria*”, nomeadamente a quantidade de antocianinas e de fenóis totais, assim como verificar o seu potencial antioxidante e anti-inflamatório.

Os métodos utilizados são todos eles baseados espectrofotometria. Para a determinação de antocianinas monoméricas foi utilizado um método de variação de pH, para a determinação de fenóis totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu; para a atividade antioxidante utilizou-se o método de captação de radicais livres de ABTS; e para a atividade anti-inflamatória analisou-se a capacidade na inibição de monóxido de azoto (NO) usando um método baseado na reação de Griess.

Os resultados obtidos foram, para a concentração de antocianinas monoméricas totais no sumo variaram entre $50,0 \pm 4,2$ e 732 ± 90 mg cyn3-Gluc/L, e por 100g de fruto foi de $0,646 \pm 0,013$ mg cyn3-Gluc/100g de fruto a $11,535 \pm 0,064$ mg cyn3-Gluc/100g de fruto. O conteúdo em fenóis totais compreendeu-se entre $485,8 \pm 0,0$ mg GAE/L a 2023 ± 100 mg GAE/L e $4,63 \pm 0,00$ mg GAE/ 100g de fruto a $29,86 \pm 0,77$ mg GAE/100g de fruto. A atividade antioxidante observou-se com uma variação entre $50,7 \pm 3,2$ mmol TEAC/L a 350 ± 47 mmol TEAC/L, e por peso de fruto $0,494 \pm 0,035$ mmol TEAC/100g de fruto a $6,70 \pm 0,89$ mmol TEAC/100g de fruto, sendo que se determinou também o IC50 entre $0,2225 \pm 0,0055$ mg/mL e $1,279 \pm 0,040$ mg/mL. Por fim, a inibição de NO observada para a atividade anti-inflamatória foi de $42,9 \pm 2,8\%$ a $69,2 \pm 2,4\%$ para amostras com uma diluição de 1:2.

Desta forma, tendo em conta os resultados pode-se verificar que existe uma variabilidade significativa entre as amostras testadas em relação ao seu conteúdo em fenóis e antocianinas. Conseguiu-se constatar que as amostras apresentam capacidade

antioxidante e anti-inflamatória, embora seja necessário um estudo mais aprofundado para que a importância farmacológica seja consolidada.

Palavras-chave: *Punica granatum*; Romã; antocianinas; fenóis; atividade antioxidante; atividade anti-inflamatória

Abstract

Punica granatum L. is one of the oldest known edible fruits, being a fruit referred in several cultures and religions, as a therapeutic method for several health problems, or as a symbolism. In the current time, the scientific developments revealed that the active metabolites present in pomegranates, proving the fact that it is indeed a special fruit. The ancestry and diversity of regions and climates in which pomegranates could be found, lead to the development of different pomegranate phenotypes, that caused an enormous quantity of pomegranates cultivars to emerge. The “*Assaria*” cultivar is the endemic cultivar from the south region of Portugal.

The aim of this study is to quantify some of the active metabolites present in the “*Assaria*” cultivar juice, namely, the anthocyanins and the total phenol content, as well as analyzing its antioxidant and anti-inflammatory potential.

The methods used are based in spectrophotometry. For the quantification of total monomeric anthocyanins was used a pH variation method; for the total phenolic content determination it was used the Folin-Ciocalteu assay; for the antioxidant activity assessment it was used a free radical scavenging assay using ABTS; and the anti-inflammatory was assessed the pomegranate juice’s ability to inhibit nitrogen monoxide (NO) using a method based on Griess reaction.

The results obtained for the total monomeric anthocyanins of the juice vary in between $50,0 \pm 4,2$ and 732 ± 90 mg cyn3-Gluc/L, and for 100g of fruit weight was $0,646 \pm 0,013$ mg cyn3-Gluc/100g of fruit weight and $11,535 \pm 0,064$ mg cyn3-Gluc/100g of fruit weight. The total phenol content fluctuated between $485,8 \pm 0,0$ mg GAE/L and 2023 ± 100 mg GAE/L, and $4,63 \pm 0,00$ mg GAE/100g of fruit weight and $29,86 \pm 0,77$ mg GAE/ 100g of fruit weight. For the antioxidant activity assessment it was observed a variation within $50,7 \pm 3,2$ mmol TEAC/L and 350 ± 47 mmol TEAC/L, and accounting the fruit’s weight $0,494 \pm 0,035$ mmol TEAC/100g of fruit weight until $6,70 \pm 0,89$ mmol TEAC/100g of fruit weight. It was determined as well the IC50 for the antioxidant activity, which exhibited values in the middle of $0,2225 \pm 0,0055$ mg/mL and $1,279 \pm 0,040$ mg/mL. And for the NO inhibition observed for the anti-inflammatory activity evaluation was among $42,9 \pm 2,8\%$ and $69,2 \pm 2,4\%$, for samples used with a dilution of 1:2.

Thus, according the results obtained it was possible de verify the existence of a significative variability amongst samples for its total phenol and anthocyanins content. It was also possible to verify that the samples tested exhibit an antioxidant and anti-inflammatory abilities, although it is necessary to a deeper study to consummate its pharmacological importance.

Key words: *Punica granatum* L.; pomegranate; anthocyanins; total phenolic content; antioxidant activity; anti-inflammatory activity

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo v	
Abstract vii	
Índice de Figuras	xi
Índice de Quadros	xii
Abreviaturas	xiii
Parte 1	1
1. Introdução.....	1
2. <i>Punica granatum</i> L.....	2
2.1. Descrição Botânica	2
2.2. História e a sua relevância etnofarmacológica	6
2.3. Composição química	7
2.3.1. Compostos Fenólicos	8
2.3.1.1. Antocianinas	8
2.3.1.2. Ácidos fenólicos.....	11
2.3.1.3. Taninos Hidrolisáveis.....	12
2.4. Atividades biológicas atribuídas a <i>Punica granatum</i> L.....	13
2.4.1. Atividade antioxidante.....	13
2.4.2. Atividade anti-inflamatória.....	13
2.4.3. Atividade hepatoprotetora	14
2.4.4. Atividade nefroprotetiva.....	15
2.3.6. Atividade sobre o sistema reprodutor.....	15
2.3.7. Atividade antidiabética	16
2.3.8. Atividade antibacteriana	16
2.3.9. Atividade antifúngica	17
2.3.10. Atividade antiviral	17
2.3.11. Atividade antimalárica	17
2.3.12. Atividade anti-neoplásica.....	18
2.3.13. Atividade anti-obesidade.....	19
2.3.14. Atividade cardioprotetora.....	19
2.3.15. Atividade neuroprotectora.....	20
2.3.16. Atividade antidiarreica.....	20
2.3.17. Atividade fotoprotetora	20
2.3.18. Benefícios para a saúde oral.....	21
2.4. Segurança e Toxicidade	21

2.5.	Objetivos	22
Parte 2 23		
1	Atividade Biológica de <i>Punica granatum</i> L. da variedade “Assaria”	23
1.1.	Materiais e Métodos	23
1.1.1.	Amostras	23
1.1.2.	Reagentes	23
1.1.3.	Determinação de Antocianinas monoméricas totais	23
1.1.4.	Determinação do Conteúdo Fenólico Total (CFT)	24
1.1.5.	Determinação de atividade antioxidante total pelo método ABTS.....	25
1.1.6.	Determinação da atividade anti-inflamatória pela Inibição de monóxido de azoto (NO)	26
1.1.7.	Análise Estatística	28
Parte 3 30		
1.	Resultados e Discussão.....	30
1.2.	Determinação de Antocianinas monoméricas totais.....	30
1.3.	Determinação do Conteúdo Fenólico Total (CFT).....	33
1.4.	Determinação de atividade antioxidante total pelo método ABTS	35
1.5.	Determinação da atividade anti-inflamatória pela inibição de monóxido de azoto (NO)	38
1.6.	Breve análise estatística	40
2.	Conclusão	41
Parte 4 43		
1.	Referências Bibliográficas	43

Índice de Figuras

Figura 1.1 - <i>Punica granatum</i> L	3
Figura 1.1. - Flor de <i>Punica granatum</i> L.	4
Figura 1.2. - Fruto de <i>Punica granatum</i> L.	5
Figura 1.3. - Catião flavílio	9
Figura 1.4 - Variação estrutural das antocianinas a diferentes valores de pH ($R_1=H$ ou glicósido; $R_2=H$ ou grupo metil)	10
Figura 1.5 - Estrutura molecular do ácido gálico e do ácido elágico	11
Figura 1.6 - Estrutura molecular da punicalina (A), punicalagina (B) e ácido galágico (C).....	12
Figura 2.1 - Reações redox com ABTS e o persulfato de potássio (oxidação) e com um antioxidante (redução)	26
Figura 2.2 - Esquematização da reação de Griess	27
Figura 3.1. - Variação da concentração de antocianinas (mg cyn3-Gluc/ L) em relação à coloração dos arilos da romã	32
Figura 3.2 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), a partir das medidas de dissimilaridade entre 24 amostras de sumo de romã, baseado na distância Euclidiana.	40
Figura 3.3 - Gráfico de barras empilhadas em valores absolutos de fenóis, antocianinas e capacidade para captar os radicais ABTS	41

Índice de Quadros

Quadro 1.1 - Classificação taxonómica de <i>Punica granatum</i> L.	2
Quadro 1.2 - Principais substâncias encontradas nas diferentes partes que constituem <i>P. granatum</i>	7
Quadro 1.3 - Principais antocianidinas encontradas na natureza	9
Quadro 3.1 - Valores da concentração de antocianinas nas amostras em miligramas de cianidina-3-glicosido por litro (mg cyn3-Gluc/L), e por miligramas de cianidina-3-glicosido por grama de sumo (mg cyn3-Gluc/100 g fruto) ± desvio-padrão para as amostras de 2017	30
Quadro 3.2 - Valores da concentração de antocianinas nas amostras em miligramas de cianidina-3-glicosido por litro (mg cyn3-Gluc/L), e por miligramas de cianidina-3-glicosido por grama de sumo (mg cyn3-Gluc/100 g fruto) ± desvio-padrão para as amostras de 2018	31
Quadro 3.3 - Valores da concentração de compostos fenólicos nas amostras em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE/L), e por miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de sumo (mg GAE/100g fruto) ± desvio-padrão, assim como a razão de antocianinas em fenóis totais para as amostras de 2017	34
Quadro 3.4 - Valores da concentração de compostos fenólicos nas amostras em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE/L), e por miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de sumo (mg GAE/100g fruto) ± desvio-padrão, assim como a razão de antocianinas em fenóis totais para as amostras de 2018	35
Quadro 3.5 - Quantificação da atividade antioxidante em milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por litro de sumo (mmol TEAC/L), por milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por 100 gramas de sumo (mmol TEAC/100 g fruto) e IC ₅₀ em miligramas por mililitro (mg/mL) ± desvio-padrão para as amostras de 2017	36
Quadro 3.6 - Quantificação da atividade antioxidante em milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por litro de sumo (mmol TEAC/L), por milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por 100 gramas de sumo (mmol TEAC/100 g fruto) e IC ₅₀ em miligramas por mililitro (mg/mL) ± desvio-padrão para as amostras de 2018	37
Quadro 3.7 - Valores de percentagem de inibição de monóxido de azoto ± desvio-padrão para a diluição de 1:2, para as amostras da colheita de 2017	39
Quadro 3.8 - Valores de percentagem de inibição de monóxido de azoto ± desvio-padrão para a diluição de 1:2, para as amostras da colheita de 2018	39

Abreviaturas

A – Absorvência

A₀ – Absorvência do controle

ABTS - ácido 2,2'-azin obis-(etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ABTS^{•+} - ácido 2,2'-azin obis-(etilbenzotiazolina-6-sulfónico) radical

CFT – Conteúdo fenólico total

CH₃COONa – Acetato de sódio

COX 2 – Cicloxigenase-2

CUF – Unidades formadoras de colónias

Cyn-3 – Cianidina-3-glicosido

CYP450 – Citocromo P450

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRAP – Direção Regional da Agricultura e Pescas

EIM-C – Espessura da camada íntima-média da carótida

EPPR – Extrato padronizado de pele de romã

FD – Fator de diluição

FSH – Hormona folículo-estimulante

GAE – Equivalentes de ácido gálico

HDL – lipoproteína de alta densidade

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

HSV – 2 – Vírus *Herpes Simplex 2*

IC₅₀ – Metade da concentração inibitória máxima

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível

IL-β – Interleucina beta

KCl- Cloreto de potássio

Kg - quilograma

LD₅₀ – Dose letal mediana

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LH – Hormona luteinizante

mg - miligrama

mM – milimolares

MM – Peso molecular

mmol - millimole

MMP – Metaloproteínas

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NED - Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina

nm - Nanometros

NO – Monóxido de azoto

OMARIA - Orissa Malaria Research Indigenous Attempt

PAST - Paleontological Statistics

PBS – Tampão fosfato salino

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PON 1 – Paraoxonase 1

R – correlação de Pearson

R² – Coeficiente de determinação

ROS – Espécies reativas de oxigénio

Rpm – Rotações por minuto

SNP - Nitroprussiato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

TEAC – Equivalente de atividade antioxidante de Trolox

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

CFT – Conteúdo fenólico total

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

Parte 1

1. Introdução

A procura e utilização de produtos de origem natural é um mercado que tem vindo a crescer. A *Global Industry Analysts, Inc.* estima que o mercado global de produtos à base de plantas poderá atingir os US\$ 140 biliões até 2024. A promessa da prevenção e tratamento de doenças e problemas de saúde, e melhoria da qualidade de vida; assim como o crescimento de evidências científicas que suportam o efeito de muitas plantas e o aumento da preocupação dos efeitos secundários provocados por fármacos utilizados em alopatia tem promovido a sua expansão.(1)

Desde os primórdios da Humanidade, tem-se procurado tirar proveito dos recursos naturais que se encontram a nosso dispor, nomeadamente, para o tratamento e prevenção de algumas doenças. O estudo da atividade biológica de compostos naturais, muitas vezes já utilizados na medicina tradicional, constitui a base para algumas das descobertas mais importantes para a medicina.(2) O interesse na etnofarmacologia e nos produtos naturais como fonte de compostos com propriedades farmacológicas, tornou-se particularmente popular entre a indústria farmacêutica, não só para obtenção direta de compostos com atividade farmacológica, mas também para fornecer moléculas “lead” para a descoberta e síntese de novas moléculas com finalidade terapêutica. Estima-se que cerca de metade de novas moléculas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) entre 1981 e 2002 provieram de produtos naturais.(3)

A romã é uma das frutas subtropicais comestíveis mais antigas, havendo referências de pelo menos 3000 a.C., carregando consigo o simbolismo de fertilidade e prosperidade. Várias partes da planta têm aplicações na medicina tradicional. Por isso, a romã tem suscitado curiosidade nos últimos anos, sendo utilizada não só na alimentação, mas também como suplemento à dieta.(4)

Embora a romãzeira seja originária da Ásia Central, devido à sua grande capacidade de adaptação a diversas condições climáticas e do solo, foi transportada e cultivada em diferentes regiões geográficas, como a região Mediterrânica, Ásia, Califórnia. Nas diversas regiões existem diferentes variantes do fruto, que se devem a seleções de variantes ou mutações que originaram determinadas características e que refletem as preferências e culturas de cada país.(5) Na Europa, o principal produtor de romãs é a Espanha, na qual já foram reportadas pelo menos 40 variantes diferentes, sendo

as mais conhecidas “*Mollar de Elche*”, “*Mollar de Valencia*” e “*Wonderful*”.(5,6) Em Portugal, é na região do Algarve onde se concentra 86% da área de produção, e corresponde a 96% da produção total de romã no continente. A variedade tipicamente Algarvia é a “*Assaria*”, que corresponde a uma variedade com coloração rosada, arilos vermelhos, e sementes macias, e doce, com um elevado teor de açúcar e baixo de acidez.(7–9)

2. *Punica granatum* L.

2.1. Descrição Botânica

A romã é a fruta proveniente da romãzeira, também conhecida por romãzeira-de-jardim ou romeira (*Punica granatum* L.), cuja classificação taxonómica se encontra apresentada no **Quadro 1.1**.

Quadro. 1.1 - Classificação taxonómica de *Punica granatum* L. (10)

Domínio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Spermatophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasse	<i>Rosidae</i>
Ordem	<i>Myrtales</i>
Família	<i>Lythraceae</i>
Género	<i>Punica</i>

É uma planta nativa da região da Ásia central (Região do Irão e Afeganistão), que foi progressivamente dispersa pelo mundo, sendo encontrada de forma subespontânea na região Mediterrânica, da América do Sul, Sul de África e Austrália. (4, 11, 12)

A romãzeira pode ser considerada um arbusto ou uma árvore pequena que pode chegar a 3-8 metros de altura. Trata-se de uma planta de folha perene em zonas tropicais, mas de folha caduca em zonas temperadas ou subtropicais. A romãzeira apresenta vários ramos (**Figura 1.1**), que quando novos são espinhosos, de forma quadrangular, variando de cor consoante a variedade, podendo ser rosa, roxos, verdes-claros, com pontos ou com riscas. Ao amadurecerem os seus ramos tornam-se arredondados, e a casca começa a destacar-se do ramo, adquirem uma coloração acinzentada, que vai escurecendo

progressivamente. As folhas têm forma oblanceolada, com um ápice obtuso, e uma base aguda. As folhas são de coloração verde, inteiras, suaves, sem pelos, com uma aparência acetinada, derivada de secreções da mesma, ainda desconhecidas.(5)



Figura 1.1 - *Punica granatum* L.

Fonte: Elaborado pelo autor

As flores ocorrem nos ramos novos, podendo aparecer de forma solitária, aos pares ou em aglomerados. Geralmente as flores solitárias aparecem ao longo do tronco, enquanto que os aglomerados nas terminações. (5)

A romãzeira floresce por volta de abril-maio, podendo, no entanto, no hemisfério norte, continuar até ao final do verão, usualmente em plantas novas, contudo a fruta que delas resulta não matura adequadamente devido à descida de temperatura à entrada das estações mais frias do clima Mediterrâneo. Desde o início da floração ao aparecimento da fruta decorre cerca de um mês. (5)

Nos primeiros estágios da flor, o gomo tem uma estrutura semelhante a uma pequena pêra, com uma coloração esverdeada na base e avermelhada no ápice, ou pode apresentar todo ele uma coloração de vermelho escuro. Ao maturar, a flor (**Figura 1.2.**) pode desenvolver 5 a 8 sépalas de coloração vermelha-alaranjada a vermelha, variando de acordo com as variedades da planta. A cor das sépalas aparenta estar relacionada com a cor da pele da romã, uma vez que estas também acabam por ser parte integrante do fruto, formando a sua coroa. Por outro lado, as pétalas, que ocorrem usualmente no mesmo número que as sépalas, são vermelhas-alaranjadas, ou cor de rosa, e por vezes brancas. As pétalas têm formato obovado, muito delicadas e enrugadas. Os estames têm os seus filamentos vermelho-alaranjado, com anteras amareladas, que se inserem de forma circular entre o cálice formado pelas pétalas. O número de carpelos pode variar, mas geralmente são 8 por flor. (5)

As flores podem ser hermafroditas (forma de vaso), ou masculinas (forma de sino), sendo que apenas as hermafroditas são passíveis de desenvolver fruto. A disposição das anteras em relação ao estigma nas plantas hermafroditas permite tanto a autopolinização, como também por polinização cruzada. (5)



Figura 1.2 – Flor de *Punica granatum* L.

Fonte: Elaborado pelo autor

A romã (**Figura 1.3**) é uma baga carnuda, apresenta um formato aproximadamente redondo, com um cálice proeminente. O ápice da coroa pode ser quase fechado a aberto, dependendo da variedade, e do estado de amadurecimento. As cores da pele da romã podem variar de amarelo, a verde, rosa a vários tons de vermelho, dependendo da variedade e do estado de amadurecimento. Interiormente, a romã apresenta lóculos que estão separados por septos, e pelo mesocarpo. Os lóculos estão organizados de forma assimétrica. Em cada lóculo encontram-se muitas sementes, que são comestíveis, e podem ter cores do branco ao vermelho, independentemente da cor da pele, dependendo da variedade; sendo possível existirem diferentes cores dentro de cada romã. Consoante a variedade, as sementes variam em tamanho e na dureza. De uma forma geral, o peso da romã distribui-se em 50% pele, 40% arilos e 10% sementes (alguns autores consideram arilo a parte carnuda onde se encontram as sementes). A fruta amadurece entre 5 e 8 meses após o início do desenvolvimento da mesma. (5, 13)



Figura 1.3 – *Fruto de Punica granatum L.*

Fonte: Elaborado pelo autor

A larga distribuição da romã pelo mundo levou a surgissem romãs com diferentes características, sendo que mais de 500 variedades de romã já foram identificadas. As características mais importantes para a caracterização são o tamanho do fruto, cor da pele (de amarelo a roxo), cor dos arilos (branco a vermelho), dureza das sementes, maturação, conteúdo em sumo, sabor (ácido a doce) e adstringência. Por exemplo, a variedade

“Wonderful” é uma das variedades mais comercializada, sendo cultivada na Califórnia, no oeste da Europa, Israel e Chile. Trata-se de uma das variedades com uma coloração mais acentuada, tanto da pele, assim como dos arilos, com um sabor rico com baixa acidez e adstringência. (12) A variedade “Assaria” ainda continua por caracterizar morfológicamente.

2.2. História e a sua relevância etnofarmacológica

O nome *Punica* em *Punica granatum* é a feminização do nome romano para a cidade de Cartago, de onde os fenícios transportavam as romãs para a Itália; “*granatum*” por sua vez significa “com sementes”, alusivo às muitas sementes que caracterizam o fruto. Inicialmente, era conhecida pelo nome era *Malum punicum*, significando “maçã de Cartago”, mas foi Lineu, botânico considerado o pai da taxonomia moderna, que selecionou o seu nome atual. (12, 15) A origem da palavra portuguesa “romã” por sua vez não tem sido tão consensual. Alguns autores reconhecem que deriva da palavra “romana”, ao passo que outros consideram ser mais provável que derive de línguas semíticas, como o árabe, que as designam por “*rummān*”; assim como o nome Hebreu (“*rimmon*”) são reportados como originando de “fruta do paraíso” (12, 15, 16)

As romãs são tradicionalmente valiosas em várias culturas pelas suas capacidades curativas, e por isso associadas a simbolismos. É umas das frutas mencionadas no Velho Testamento como frutas de Israel. Na mitologia Grega e outras culturas, era associada com a fertilidade devido às suas muitas sementes. Em religiões como o Cristianismo e o Judaísmo é associada à realeza devido à sua forma em coroa. No Judaísmo é também símbolo de justiça, e as sementes da romã representam os 613 mandamentos do Torá. (16)

As romãs têm também o seu lugar marcado na gastronomia de vários países, nomeadamente do Médio Oriente, Índia e Irão, em que o sumo de romã é uma bebida tradicional. Na cozinha Indiana e Paquistanesa, as sementes secas de romã são utilizadas como especiaria. (16)

Na medicina tradicional, a romã pelas suas propriedades adstringentes tem sido utilizada em feridas, na irritação da garganta, disenteria, parasitas intestinais, e gengivites. Hipócrates documentou a utilização do sumo de romã fervido como antipirético. (16–18) A romã também tem sido referida pela sua utilização como antidiarreico (20, 21)

Estudos etnofarmacológicos nas ilhas Fiji, descrevem a utilização de *P. granatum* para várias aplicações na medicina tradicional. Com o uso do sumo de romã como antidiarreico e para o tratamento de icterícia; a utilização do produto da decocção das

sementes no tratamento de sífilis e a toma da fruta moída em jejum para a diabetes. (20) Na Índia, a polpa da fruta com as sementes para alívio de problemas digestivos, como dispepsia, inflamação e dificuldades digestivas, palpitações, diarreia, dispepsia, febre, antiemético; a pele da fruta para a diarreia, disenteria e problemas uterinos; as raízes e casca como anti-helmíntico; o sumo das flores para epístases; e pó do gomo das flores para tratamento de bronquite; as folhas para a estomatites, recomendado pela Farmacopeia Ayurveda Indiana. (21, 22) A sua aplicação na mordedura de cobra também é referida em províncias indianas. (22)

2.3. Composição química

O interesse crescente por *P. granatum* nos últimos anos levou a várias descobertas sobre a planta, nomeadamente das suas propriedades biológicas, não só da parte comestível da fruta (sementes), mas também de outras partes da planta, como as folhas, a pele, a casca dos troncos. Os efeitos terapêuticos atribuídos a *P. granatum* são devidos, principalmente, aos seus metabolitos secundários, como flavonoides, antocianinas, taninos hidrolisáveis, ácidos fenólicos, mas também alguns atribuídos aos seus metabolitos primários, especificamente, aos ácidos gordos presentes no óleo das sementes, que compreende cerca de 12 a 20% do peso total das sementes (**Quadro 1.2**). Contudo, a composição em metabolitos primários e secundários apresenta grandes variações dependendo da variedade e das diferenças climáticas onde as plantas se desenvolvem, técnicas agrícolas a que foram submetidas, do estado de maturação da planta e das condições de armazenamento dos frutos. (13, 24)

Quadro 1.2 - Principais substâncias encontradas nas diferentes partes que constituem *P. granatum* (24, 25)

Sementes	Ácido metilelágico; ácido punicico; ácido oleico; ácido palmítico; ácido esteárico; ácido linoleico; esteróis; tocoferol
Arilos	Açúcares simples; ácidos orgânicos alifáticos; antocianinas; ácido gálico; ácido elágico; ácido quínico; ácido ascórbico; catequinas; quercetina; minerais
Pele	Ácido gálico; ácido elágico; punicalina; punicalagina; elagitaninos; ácido cafeico; luteolina; alcaloides de peletierina; quercetina; kaempferol
Flor	Ácido gálico; ácido ursólico; punicalagina; ácido elágico; triterpenóides; ácidos gordos
Folha	Ácido elágico; saponinas; taninos; flavonóides; alcalóides de piperidina; elagitaninos; ácidos gordos

Raízes e tronco	Elagitaninos; alcalóides de piperidina; alcalóides de pirrolidina; alcalóides de peletierina
-----------------	--

A investigação também se tem interessado por urolitinas, um grupo de metabolitos fenólicos que são originados por hidrólise do ácido elágico, que é realizada pela microbiota intestinal, que aparenta ter atividades benéficas para a saúde. (4, 26)

2.3.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem um grupo grande e diverso de moléculas, que apresentam variadas estruturas moleculares e funções nas plantas. Entende-se por compostos fenólicos moléculas simples ou complexas, que sejam constituídas, pelo menos por um anel aromático, apresentando um ou mais grupos hidroxilo. (26)

Os componentes fenólicos são considerados das substâncias mais importantes e diversas nas plantas. A sua importância deve-se à sua capacidade de doar elétrons a moléculas oxidantes, como radicais livres, tornando-os moléculas inócuas. O consumo de plantas e frutos ricos neste tipo de compostos tem sido demonstrado pertinente para prevenção do envelhecimento e de doenças que sejam associadas a processos oxidativos, como o cancro. (26)

P. granatum tem sido reportada como sendo uma planta com uma composição rica em compostos fenólicos, tanto que num estudo realizado com quatro variedades diferentes de romã Turca, verificaram que a composição fenólica do sumo de romã ronda 784,4 a 1551,5 mg GAE /L. A parte da planta mais rica em fenóis é a pele da romã, compreendendo entre 1775,4 a 3547,8 mg GAE/L. (27) Os principais grupos de componentes fenólicos presentes no sumo de romã são as antocianinas e os taninos hidrolisáveis. (28)

2.3.1.1. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturalmente presentes em plantas, solúveis em água, responsáveis pelas colorações vermelhas, roxas e azuis de flores, folhas e frutas, como hibiscos, arandos, uvas, mirtilos, morangos e romãs, e alguns vegetais. (30, 31)

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides. A sua estrutura base é composta por um catião flavílio, que é composto por um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C₆-C₃-C₆, que contêm várias ligações duplas que são responsáveis pela absorção de luz a cerca de 500 nm (**Figura 1.4**). O catião pode estar

ligado a diferentes açúcares, ou a grupos hidroxilo ou metoxilo. As antocianinas podem ser mono-, di- ou triglicosidos. Os resíduos de açúcares substituídos podem estar ligados a ácidos aromáticos ou alifáticos. (31, 32) As geninas das antocianinas designam-se antocianidinas, sendo conhecidas até à data, 31 diferentes dos quais se destacam como principais grupos as cianidinas, peonidinas, delphinidinas, pelargonidinas, malvidinas e petunidinas (**Quadro 1.3**). (32)

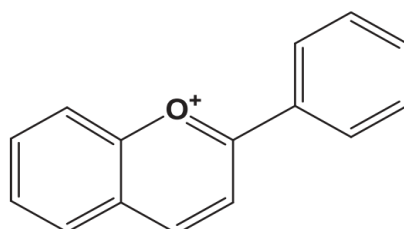
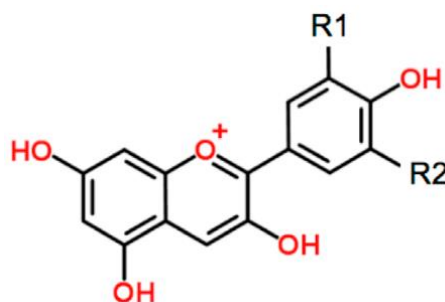


Figura 1.7 - Catião flavílio (33)

Quadro 1.3 - Principais antocianidinas encontradas na natureza (31, 32)



Antocianidina	R1	R2	Cor
Pelargonidina	-H	-H	Vermelho/Laranja
Cianidina	-OH	-H	Vermelho
Peonidina	-OCH ₃	-H	Vermelho
Delfinidina	-OH	-OH	Roxo
Petunidina	-OCH ₃	-OH	Roxo
Malvidina	-OCH ₃	-OCH ₃	Roxo

As antocianinas são particularmente sensíveis a variações de pH, variando de cor. Isto verifica-se devido à estrutura molecular ser de natureza iónica, que permite a existência de um equilíbrio em solução aquosa em valores de pH entre 1 e 8. O pH é uma variante muito importante para a coloração das antocianinas. Isto verifica-se devido à estrutura base das antocianinas ser o catião flavílio, que fica protonado a pH baixo, que corresponde ao catião, e a valores de pH mais altos a molécula é desprotonada, formando-se um anião. Em condições ácidas, algumas antocianinas apresentam coloração

vermelha. A um pH neutro apresentam uma tonalidade roxa, mudando para azul como aumento do pH. (Figura 1.5) (30,33)

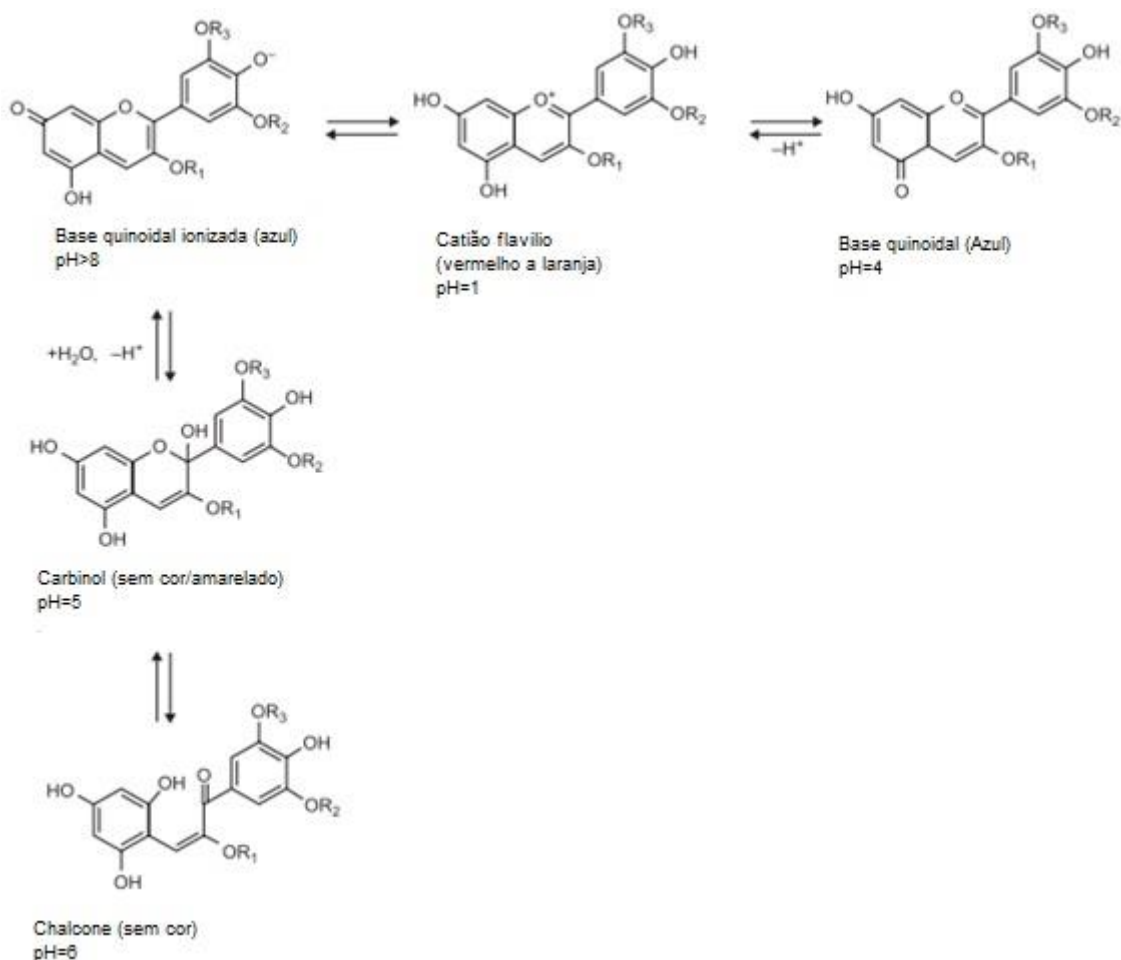


Figura 1.8 - Variação estrutural das antocianinas a diferentes valores de pH (R₁=H ou glicósido; R₂=H ou grupo metil) (30)

A romã apresenta uma composição rica em antocianinas e seus derivados. Estes metabolitos secundários da planta acumulam-se nos tecidos da romã, principalmente nos arilos e na pele da fruta. Até então, foram identificados na romã seis moléculas diferentes de antocianinas, incluindo monoglicosídeos e diglicosídeos de cianidinas, delphinidinas, e de pelargonidinas. A principal antocianina presente no sumo de romã, de uma forma geral, é a delphinidina-3,5-diglicosídeo. (35, 36) Contudo, estudos realizados com a variedade “Assaria” apontam que a sua principal antocianina constituinte do sumo é delphinidina-3-glicosídeo, seguido pela delphinidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3,5-diglicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo. (37, 38)

Estudos realizados em diversas variedades, originárias de diferentes regiões há evidência de diferenças quantitativas e qualitativas significativas na composição de

antocianinas. (13) Foi estudado em romãzeiras israelitas que o conteúdo em derivados de delphinidina compreende 40% da totalidade de antocianinas presentes no sumo de arilos, e os derivados de cianidina até 60%. Na variedade “*Mollar*” de origem espanhola, o conteúdo total de antocianinas é de cerca 50% derivados de delphinidina, e 45% de derivados de cianidina. (13)

A função das antocianinas nas plantas, nomeadamente na romãzeira, ainda não é totalmente conhecida. A sua ausência não parece afetar a viabilidade e fertilidade da planta, uma vez que as romãzeiras com romãs que apresentam fenótipo da variedade “branca”, que não produzem antocianinas, têm capacidade de crescer e de se propagar. No entanto, frutas e flores brancas parecem ser mais suscetíveis a escurecer e a danos de radiação UV. (38) A acumulação de antocianinas em folhas jovens sugere que estas as protegem de stress durante o desenvolvimento da folha. (13)

Em termos de conteúdo total de antocianinas, diferentes estudos tem revelado diferentes concentrações de antocianinas presentes em sumos de romãs: num estudo realizado em romãzeiras cultivadas na Tunísia, demonstrou uma variação entre 9 a 115 mg/L de sumo de romã (39); noutro estudo realizado com romãzeiras iranianas, o total de antocianinas variou de 15 a 252,2 mg/L de sumo (37); ainda outro estudo demonstrou que romãs iranianas podem atingir uma concentração de 7760 mg/L.(40)

2.3.1.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são um dos grupos de metabolitos secundários mais importantes e abundantes nas plantas. Este grupo pode ser subdividido em dois subgrupos consoante o ácido de que derivam: ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos fenólicos mais abundantes em *Punica granatum* L. são o ácido gálico e ácido elágico (**Figura 1.6**) e respetivos derivados (ácidos hidroxibenzóicos). (27, 29)

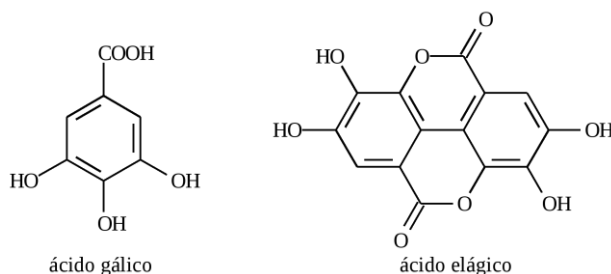


Figura 1.9 - Estrutura molecular do ácido gálico e do ácido elágico

2.3.1.3. Taninos Hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são moléculas constituídas por ácido gálico e ácido elágico, que se encontram esterificados pelos grupos hidroxilo por um açúcar central. Estes são divididos em dois grupos, dependendo dos ácidos fenólicos que lhe dão origem: galhotaninos quando derivados do ácido gálico e elagitaninos quando derivados do ácido hexahidroxi-difénico. (13, 29)

Na romã, os taninos hidrolisáveis encontram-se presentes na pele e nos arilos. (13) Constituem os polifenóis predominantes no sumo de romã, compreendendo 92% da atividade antioxidante. (28) Os taninos hidrolisáveis mais prevalentes na romã é a punicalagina, punicalinas, ácido galagico (galhotaninos) (**Figura 1.7**). (29, 42)

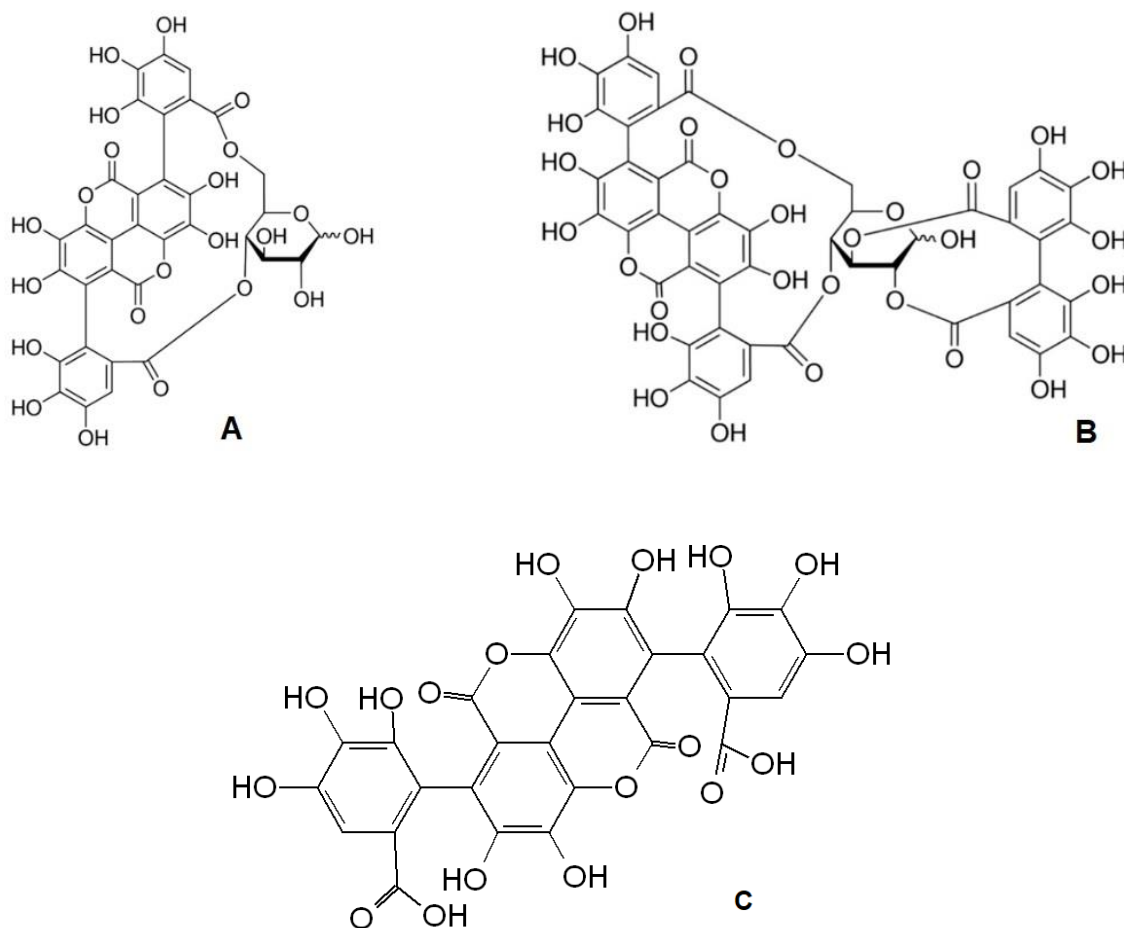


Figura 1.10 - Estrutura molecular da punicalina (A), punicalagina (B) e ácido galágico (C)

2.4. Atividades biológicas atribuídas a *Punica granatum* L.

2.4.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante apresentada pela romã deve-se à sua composição fenólica, nomeadamente de antocianinas, flavonoides, flavonas e catequinas. Estes compostos são encontrados em várias partes da planta, como as sementes, a pele (42, 43) e as folhas (44). Os estudos demonstraram que o extrato metanólico da pele de romã é o que apresenta atividade antioxidante mais pronunciada, em relação a extratos aquosos e etanólicos, também testados para outras partes do fruto. (42) No seguimento desta conclusão, foi realizado um estudo *in vivo* em que foi administrado tetracloreto de carbono (CCl₄) a ratos, e administrado extrato metanólico de romã em pó, de modo a avaliar as atividades de enzimas hepáticas envolvidas na neutralização de ROS (*reactive oxygen species*), como a SOD (superóxido dismutase), catalase e peroxidase. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato metanólico de pele de romã tem capacidade de manter, ou até mesmo melhorar a atividade destas enzimas. (43)

2.4.2. Atividade anti-inflamatória

O tratamento com anti-inflamatórios não esteróides e glucocorticoides apesar de eficazes, acarretam vários efeitos secundários que tornam a sua utilização mais contida, principalmente para uma fatia considerável da população que apresenta determinadas patologias e que pode ser agravada pela sua utilização. Por isso a procura de tratamentos igualmente eficazes, mas com menos efeitos secundários é um campo de investigação de interesse. Por isso vários estudos têm sido feitos em busca de alternativas.

Estudos têm demonstrado que várias partes de *P. granatum* têm potencial de exercer um efeito anti-inflamatório significativo. Bagri, *et al.* (45) utilizando extratos hidro-alcoólico da pele, flores e folhas obtiveram uma redução dose-dependente do edema induzido por carragenina em ratos, sendo o extrato mais eficaz aquele obtido a partir da pele, seguido do de flores, e por fim o de folhas, apresentando uma inibição de 82,14%, 71,42% e 67,85%, respetivamente.

Mo *et al.* (46) testaram a atividade anti-inflamatória tópica de um extrato padrão de pele de romã (EPPR), que demonstrou ter potente atividade anti-inflamatória e

analgésica. O mecanismo de ação do extrato passa pela inibição da infiltração leucocitária, e modulação dos componentes pro-inflamatórios, como a IL- β e TNF- α . Outro estudo realizado por Ahmed *et al.* (47) demonstrou a capacidade do extrato de romã de inibir a expressão de IL- β , diminuindo a expressão de metaloproteinasas da matriz (MMPs), e assim retardar a degradação de cartilagem e, conseqüentemente pode retardar o desenvolvimento de artrite.

Num outro estudo, Mo *et al.* (48) descreveram EPPR como tendo capacidades cicatrizantes em feridas, por promover a síntese de colagénio e inibir a infiltração de neutrófilos, para além de demonstrar capacidades antimicrobianas.

Larrosa *et al.* (25) avaliaram a relação entre o consumo de romã e de urolitina-A, um dos principais metabolitos da microbiota intestinal derivados do consumo de romãs, e os processos inflamatórios, nomeadamente, no intestino, realizado em ratos de Fisher machos. A observação histológica do intestino, análise fecal, análise da expressão genética e a expressão de marcadores inflamatórios, como a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), cicloxigenase-2 (COX-2), prostaglandina E₂ (PGE₂), entre outros, revelou uma redução da inflamação intestinal.

Outros trabalhos demonstraram que o extrato de romã para além de apresentar considerável efeito anti-inflamatório e analgésico, comparável com o da indometacina (49), também tem capacidades gastroprotetoras contra lesões provocadas por álcool e indometacina (50).

2.4.3. Atividade hepatoprotetora

Um estudo efetuado por El-Beih *et al.* (51), com o objetivo de verificar a atividade anti-diabética do sumo de sementes de romã, demonstrou que este tinha atividade hepatoprotetora, uma vez que o grupo de ratos aos quais este foi administrado não apresentavam danos hepáticos provocados pela mistura indutora de diabetes (estreptozotocina-nicotinamida).

Toklu *et al.* (52) visavam avaliar o efeito de administração crónica de extrato de pele de romã em ratos com obstrução do canal biliar, e na fibrose hepática associada; observou-se que a administração do extrato atenuou a lesão hepática, e melhorou a função hepática.

2.4.4. Atividade nefroprotetiva

El-Habibi (53) avaliou o sumo de romã e o extrato metanólico da pele de romã em termos de atividade nefroprotetiva, o que sugere que os extratos de romã, especialmente o extrato metanólico da pele de romã, apresenta propriedades nefroprotetoras, que são atribuídos às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

El-Daly (54) procurou investigar os efeitos nefrotóxicos do cádmio em ratos, e avaliar os efeitos obtidos com a subsequente administração de extrato alcoólico da pele de romã. Os resultados obtidos sugerem uma melhoria considerável da nefrotoxicidade induzida pelo cádmio, e melhorou o processo de desintoxicação dos ratos. Mais uma vez, este efeito foi atribuído à capacidade antioxidante, reduzindo a concentração de radicais livres.

O grupo de investigação Sadeghi *et al.* (55) investigou a capacidade do extrato hidro-alcoólico da flor de *P. granatum* proteger a função renal de toxicidade induzida pela gentamicina, que revelou resultados positivos.

2.4.5. Atividade sobre o sistema reprodutor

Al-Olayan *et al.* (56) verificaram que a administração de sumo de romã reduz os efeitos nocivos do tetracloreto de carbono (CCl₄), provocando um aumento de testosterona, LH (hormona luteinizante) e FSH (hormona estimuladora dos folículos) de acordo com alguns autores.

Leiva, K. *et al.* (57) demonstraram que o extrato alcoólico do pericarpo da romã pode ser útil no tratamento de infertilidade masculina associada à exposição de chumbo, pois um estudo com ratos aos quais foi administrado acetato de chumbo, verificou-se um aumento na produção de espermatozoides após tratamento com o extrato.

Türk *et al.* (58) procuraram investigar os efeitos do consumo de sumo de romã no sistema reprodutor masculino de ratos saudáveis. Os resultados revelaram que o seu consumo levou a um aumento no número de espermatozoides, de células espermatogénicas e germinativas, aumento da mobilidade e diminuição de espermatozoides anormais.

Azadzoi *et al.* (59) demonstraram que um tratamento com sumo de romã, devido à sua grande capacidade antioxidante, pode ser utilizado profilaticamente para evitar lesões devido a disfunção erétil arterogénica.

2.4.6. Atividade antidiabética

Vários trabalhos com *P. granatum* demonstraram as propriedades antidiabéticas da mesma, assim como a sua capacidade de prevenir comorbidades associadas à diabetes.

Por exemplo, El-Beih *et al.* (51), testaram a atividade antidiabética do sumo de sementes de romã, assim como de punicalagina, um elagitanino ao qual se tem vindo a atribuir a capacidade antidiabética da romã. Os autores demonstraram que as atividades anti-inflamatória e antioxidante do sumo melhoraram a sensibilidade à insulina e levou a um aumento de massa musco-esquelética em ratos diabéticos. Concluiu-se que o sumo de romã é mais efetivo do que a punicalagina, não se devendo a capacidade hipoglicemiante particularmente à punicalagina.

Salwe *et al.* (60) com o objetivo de testar a capacidade antidiabética e antihiperlipemiante do extrato etanólico das folhas de *P. granatum* em ratos albinos, revelou significantes reduções de glicémica, colesterol total, triglicéridos, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e aumento de HDL (lipoproteína de alta densidade). Desta forma, o extrato apresenta para além de atividade antidiabética, qualidades protetoras contra o desenvolvimento e progresso de aterosclerose e complicações cardiovasculares associadas à diabetes. Um outro trabalho revelou que o extrato hidroalcoólico da pele de romã também apresenta atividade antidiabética e hipolipemiante. (61) Outro estudo com o mesmo objetivo, mas testando a ação da casca em pó de *P. granatum*, revelou também ter as mesmas propriedades, assim como capacidade de aumentar o nível de hemoglobina. (62)

2.4.7. Atividade antibacteriana

A emergência crescente de microrganismos patogénicos multirresistentes despoletou o interesse dos produtos naturais como inibidores de agentes patogénicos. Muitas plantas estão descritas como sendo eficazes contra o crescimento de microrganismos patogénicos. Isto verifica-se porque muitas plantas são fontes de metabolitos secundários como taninos, terpenoides, alcaloides, fenóis e glicósidos, cuja atividade antimicrobiana se encontra comprovada. (63)

Devatkal (64) demonstrou que o extrato aquoso de pele de romã apresenta atividade antibacteriana contra *Pseudomonas stutzeri*, uma bactéria oportunista encontrada em carne de aves. Al-Zorey (65) com extrato metanólico de pele de romã demonstrou ser um potente inibidor de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli e *Yersinia enterocolitica*. Nuamsetti *et al.* (66) estudaram a atividade antibacteriana de diferentes extratos (acetona, etanol 95% e água quente) da pele de romã e das suas sementes em *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, bactérias relacionadas com a contaminação de comida. Ficou demonstrado que todos os extratos exibiram atividade contra todas as bactérias testadas, contudo as bactérias gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos. O extrato mais potente foi o da pele de romã tendo como solvente água quente. (66)

Deste modo, extratos derivados de *P. granatum*, nomeadamente, extratos da pele da fruta, parecem ser de interesse para utilização para a preservação de alimentos, e possivelmente também de interesse para a indústria farmacêutica. (65–67)

2.4.8. Atividade antifúngica

Dahham *et al.* (68) testaram a atividade antifúngica de extratos de pele de romã, de extrato das sementes, de toda a fruta e de apenas sumo. O extrato da pele de romã foi o que demonstrou, de um modo geral, maior atividade antifúngica para as espécies estudadas (*Aspergillus niger*, *Mucor indicus*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*), sendo a espécie mais sensível *Aspergillus niger*. Extratos etanólicos e metanólicos da romã contra *Candida albicans*, revelaram resultados positivos pelo que a sua aplicação no tratamento de infeções pela mesma revela-se interessante. (68, 70)

2.4.9. Atividade antiviral

Um estudo demonstrou que os taninos presentes no pericarpo da romã são eficazes contra *Herpes simplex-2* (HSV-2) e bloqueia a sua absorção pelas células. (70)

Outro estudo demonstrou que a acidez do sumo de romã leva a uma rápida inativação do vírus *Influenza*, para além de que os polifenóis encontrados na romã promovem alterações nas glicoproteínas presentes no envelope do vírus. (71)

2.4.10. Atividade antimalárica

A atividade antimalárica de compostos presentes na romã parece dever-se ao ácido galágico e punicalaginas, pois apresentam atividade inibidora para a estirpe D6 e W2 do *Plasmodium falciparum*. (72)

Investigação da ação do extrato de pele de romã em lesões no baço provocada por malária causada por *Plasmodium chabaudi* em murinos, demonstrou uma redução de lesões no baço, e uma redução de parasitemia. (73)

Baseado na utilização de pele de romã imatura seca ao sol, designado de OMARIA (*Orissa Malaria Research Indigenous Attempt*) como terapêutica e profilaxia da malária numa província na Índia, Orissa, foi realizado um estudo para explorar se o efeito contra a malária de OMARIA também teria mecanismos associados com a resposta imunitária do hospedeiro. Este revelou que para além da pele de romã ter efeito anti-parasitário direto, também tem a capacidade de inibir mecanismos pró-inflamatórios do hospedeiro, limitando conseqüentemente a progressão da sua severidade, como a lesão cerebral. (74)

2.4.11. Atividade anti-neoplásica

O cancro é uma patologia multifatorial que compreende vários processos que levam ao seu estabelecimento e progressão. As substâncias oxidantes são associadas a danos celulares e de biomoléculas como o DNA, pelo que se relacionam com o desenvolvimento de neoplasias. As várias partes de *P. granatum* são ricas em substâncias com propriedades antioxidantes, que por sua vez podem ter um papel preventivo do cancro.

Num estudo procurou-se saber o efeito de um extrato padrão de romã numa linha de células cancerígenas de cancro mamário de ratos, revelou que o extrato de romã, *Pomella*[®], extrato padronizado das punicalaginas presentes na romã, inibiu a proliferação das células cancerígenas de forma dependente da concentração e do tempo. (75) Dilkmen *et al.* (76) direcionaram a sua investigação para o cancro da mama, realizando-a com células humanas e com extrato metanólico da pele da romã, verificaram também a redução da proliferação e a indução da apoptose das células cancerígenas.

Hong *et al.* (77) focaram-se na expressão de genes relacionados com a produção de enzimas que participam na síntese de androgénios e dos seus recetores em células de cancro na próstata. Os autores demonstraram que o sumo de romã, assim como os seus componentes, como elagitaninos e ácido elágico suprimem significativamente a sua expressão, inibindo o crescimento e progressão do tumor.

2.4.12. Atividade anti-obesidade

A obesidade é um problema de saúde que tem vindo a aumentar, e que constitui um fator de risco comum a vários problemas de saúde.

Investigação realizada neste ramo, demonstrou que o extrato de folha de *P. granantum* tem propriedades que lhe confere atividade anti-obesidade; não só provocando perda de peso corporal, mas revelando uma diminuição do consumo de energia, da quantidade sérica de colesterol total, triglicéridos e glucose em ratos obesos realizado um tratamento de 5 semanas. Especula-se que o efeito do extrato estudado se deve em parte por inibir a lipase pancreática e supressão do consumo de energia. (78)

2.4.13. Atividade cardioprotetora

A incidência de doenças cardiovasculares tem vindo a aumentar consideravelmente nas últimas décadas, sendo atribuído ao crescente envelhecimento da população e ao estilo de vida sedentário e dieta rica em hidratos de carbono, gorduras saturadas e colesterol, pelo que se tem tornado cada vez mais importante prevenir e tratar problemas cardiovasculares.

A administração crónica de romã aparenta conseguir reduzir a pressão arterial e a reatividade vascular a catecolaminas em ratos com hipertensão induzida por administração de angiotensina II. (79)

Outras descobertas reportam que o consumo de sumo de romã diminui a suscetibilidade das LDL se agregarem e ficarem retidas, e promove a protege contra a peroxidação de lípidos e oxidação das LDL, demonstrando desse modo que o sumo de romã tem um efeito antiaterogénico. (80,81)

O estudo realizado por Aviram *et al.* (82) com pacientes com estenose da artéria carótida, sobre o consumo crónico de sumo de romã, revelou que o grupo suplementado com sumo de romã teve uma melhoria marcante em relação ao grupo de controlo: redução da espessura da camada íntima-média da carótida (EIM-C) em 30%, aumento da atividade da paraoxonase 1 (PON 1), uma esterase associada à HDL com a habilidade de hidrolisar a LDL, em 83%, estado oxidativo de LDL basal sérico e suscetibilidade de oxidação de LDL pelo ião cobre foram reduzidos em 90% e 59%, respetivamente; redução em 21% da pressão arterial sistólica, após consumo durante 1 ano. Demonstrando assim que a romã tem um efeito benéfico geral em reduzir o risco cardiovascular.

2.4.14. Atividade neuroprotectora

Com o envelhecimento da população, torna-se mais provável o crescimento da incidência e prevalência de doenças neurodegenerativas. Com essa problemática em mente foi demonstrado que o sumo de romã tem potencial neuroprotetor, no sentido de reduzir os efeitos de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), uma substância neurotóxica associada ao desenvolvimento de Parkinson.

Outro estudo focado no stress oxidativo associado à doença de Alzheimer, demonstrou que o mesmo era reduzido em modelos geneticamente predispostos para a doença, demonstrando que a romã pode ter um papel na diminuição do progresso da mesma. (83)

2.4.15. Atividade antidiarreica

Um estudo *in vivo* utilizando extrato aquoso de pele de romã em ratos com diarreia induzida com óleo de rícino, demonstrou que o extrato utilizado exibe uma inibição dose-dependente dos movimentos espontâneos gastrointestinais, e reduz as contrações induzidas pela acetilcolina. Estes resultados despertam o interesse para o seu uso em distúrbios gastrointestinais. (84)

2.4.16. Atividade fotoprotetora

A exposição a radiação UV tem sido correlacionada com várias condições agudas e crônicas, como queimaduras solares, edema, fotoenvelhecimento e cancro, pelo que é de interesse encontrar formas de prevenir os danos associados à sua exposição.

Um estudo verificou os efeitos de extrato aquoso da pele de romã, de sumo fermentado e de óleo obtido das sementes de romã na função dos queratinócitos e fibroblastos da epiderme humana. Verificou-se que o óleo extraído das sementes promove a proliferação de queratinócitos, levando a um ligeiro aumento da espessura da epiderme; por outro lado apenas o extrato da pele de romã, e de forma menos acentuada, o sumo fermentado de romã, demonstraram ter efeito a nível dos fibroblastos, verificando-se um aumento na síntese de procolagénio tipo I, e inibição da metaloproteinase-1 (MMP-1) da matriz, ou seja, tem efeito no aumento da síntese de colagénio, e diminuição da sua degradação. (85)

Descobriu-se também que extrato de romã normalizado é eficaz em proteger fibroblastos de sofrerem danos irreversíveis por exposição a radiação ultra-violeta (UV), sendo atribuído ao elevado conteúdo em polifenóis, que participam na redução da ativação da transcrição de fatores pro-inflamatórios, aumento das fases G0/G1, que estão relacionadas com a reparação de DNA, e com isso a diminuição da apoptose. (86)

Em epiderme previamente tratada com produtos derivados de sumo e óleo de romã observou-se uma redução de efeitos induzidos pela radiação UVB, como danos no DNA, oxidação de proteínas e estimulação de MMPs (metaloproteinases da matriz). (87)

2.4.17. Benefícios para a saúde oral

Investigações realizadas sobre a influência dos extratos de *P. granatum* sobre a saúde oral, levadas a cabo devido aos efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos comprovados, demonstrou que a utilização destes extratos tem capacidade de ser benéfico na prevenção e manutenção da saúde oral.

Estudos demonstraram que a utilização de extrato aquoso de romã como colutório tem a capacidade de diminuir a placa dentária, levando a uma diminuição em 84% de CFU (colony forming unit) /mL. (88) Também foi demonstrado que o sumo de romã tem capacidade inibitória de bactérias presentes na placa bacteriana, *Streptococci* e *Lactobacilli*, verificando-se uma redução de CFU em 23% e 46%, respetivamente. (89) Para além disso, outras avaliações dos parâmetros salivares relevantes para a saúde oral têm-se mostrado benéficas para o tratamento e prevenção de gengivites. (90, 91)

2.5. Segurança e Toxicidade

Como já anteriormente referido, a romã é um fruto largamente consumido, tendo o seu consumo, nas mais variadas formas, se tenham generalizado nos anos recentes devido aos seus benefícios para a saúde. Mas com o seu consumo alargado, e especialmente na produção de suplementos alimentares e extratos padronizados das suas substâncias, torna-se importante tomar conhecimento da segurança e possível toxicidade dos extratos obtidos da romã.

Um dos metabolitos ativos mais relevantes da romã é punicalagina, à qual é atribuída mais de 50% da sua atividade antioxidante (92), pelo que alguns dos estudos realizados se focam na determinação sua segurança para consumo.

Foi feita a determinação de LD₅₀ oral em ratos e ratinhos para um extrato padronizado de romã para 30% punicalaginas, 5% ácido elágico e 0,3% ácido gálico, que foi definido como >5 g/kg de peso corporal. O LD₅₀ intraperitoneal foi determinado como 217 mg/kg de peso corporal para ratos, e 187 mg/kg de peso corporal para ratinhos. No mesmo estudo avaliou-se a possibilidade de toxicidade subcrónica em ratos, que foram submetidos a uma dieta contendo até 600 mg/kg de peso corporal do extrato, que foi dado por um período de 90 dias. Em comparação com o grupo de controlo, não foram observadas alterações nos órgãos que fossem associadas ao tratamento. (93)

Alguns estudos avaliaram a toxicidade e efeitos adversos associados à administração de extratos de romã. Paller *et al.* (94) num estudo procurando revelar a influência da administração de um extrato de polifenóis de romã (POMx – cápsulas contendo 600mg de polifenóis de romã) na terapêutica de cancro na próstata recorrente, constatou a ocorrência de diarreia dose-dependente. Contudo, a maioria dos estudos não constatou efeitos tóxicos pelo consumo destes extratos. (83, 96, 97)

Outro ponto importante a avaliar é o risco de interações alimento-medicamento pelo consumo de romã. Alguns estudos evidenciam que componentes da romã interagem com enzimas do citocromo P450 (CYP450). (98, 99) Um estudo de um caso clínico associou o desenvolvimento de rabdomiólise com consumo de sumo de romã em simultâneo com a toma crónica de rosuvastatina. (99)

Os compostos da romã responsáveis por interações medicamentosas ainda se encontram por descobrir. Contudo, a romã contém dois compostos conhecidos por serem inibidores da CYP450: a quercetina e o ácido elágico. A quercetina é um inibidor da CYP3A4, que se encontra numa concentração de até 172 mg/ 100g de fruto, dependendo da forma de preparação. O ácido elágico, que é abundantemente encontrado no sumo de romã, trata-se de um inibidor da CYP2A2, CYP3A1 E CYP2C6 em ratos, sendo o efeito em isoenzimas humanas ainda por definir. (100)

2.6. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho incluem estudar a variabilidade em antocianinas e fenóis totais presentes em sumos de vários acessos de romã '*Assaria*' obtidos de duas colheitas de anos consecutivos, e relacionar a variabilidade com a capacidade de captação de radicais livres e capacidade em neutralizar substâncias pró-inflamatórias, como monóxido de azoto.

Parte 2

1 Atividade Biológica de *Punica granatum* L. da variedade “Assaria”

1.1. Materiais e Métodos

1.1.1. Amostras

As amostras da variedade “Assaria” foram fornecidas pela Direção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve (DRAP Algarve). As 24 amostras podem ser divididas em dois grupos: um grupo composto por 11 amostras da colheita de 2017 e outro grupo composto por 13 amostras da colheita de 2018. O sumo obtido da romã foi acondicionado a -18°C até ser analisado. Antes da sua utilização, uma alíquota da amostra é retirada e centrifugada a 5000 rpm, durante 10 minutos.

1.1.2. Reagentes

Cloreto de potássio, acetato de sódio, reagente de Folin-Ciocalteu (Merck), carbonato de sódio anidro (JMS), ácido gálico (Acros Organics), ácido 2,2'-azino-bis(3-etinilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), persulfato de potássio, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox®) (Sigma-Aldrich), ácido sulfanílico (Acros Organics); nitroprussiato de sódio dihidratado (Riedel-de Haën); dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Panreac); tampão fosfato salino x10 concentrado.

1.1.3. Determinação de Antocianinas monoméricas totais

O método utilizado para quantificação de antocianinas monoméricas baseia-se num diferencial de pH. A alteração estrutural reversível causada pelas alterações de pH, altera também a coloração das antocianinas: a pH 1,0 predomina a forma catiónica colorida, e a pH 4,5 a solução perde a cor por predominância da forma hemiacetal. Este método permite quantificar antocianinas monoméricas, de forma eficaz mesmo na presença de interferentes, como pigmentos degradados. (101)

O procedimento adotado baseia-se no protocolo definido por Giusti e Wrolstad. (101) Para tal, foram preparadas duas soluções, uma com pH 1,0, e outra com pH 4,5. A solução de pH 1,0 foi preparada com KCl 0,025 M (1,86 g KCl:1000 mL de água), sendo que antes de perfazer por completo com água, o pH é ajustado com HCl. A solução de pH 4,5

foi preparada com CH₃COONa 0,4 M (54,43 g de CH₃COONa:1000 mL de água), sendo que, mais uma vez, antes de perfazer por completo com água, o pH é ajustado com HCl diluído.

Cada extrato foi diluído com a solução tampão de pH=1, de forma a obter uma absorvência entre 0,2 e 1,0 a $\lambda_{\text{vis-max}}$, 520 nm, que corresponde ao comprimento de onda máximo antocianina cianidina-3-glicosido, uma vez que não existem dados sobre a absorvência da delphinidina-3,5-diglicosido. (34, 101) Para manter o pH da solução, a quantidade de amostra utilizada não deve exceder 20% do volume total solução. Usando a diluição determinada, realizou-se o mesmo procedimento com a solução a pH 4,5, e fez-se a leitura da absorvência a $\lambda=700$ nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicado.

As antocianinas poliméricas são resistentes a alteração de cor com a variação do pH, por isso não são medidos através deste método uma vez que estas absorvem radiação a um comprimento de onda de 520 nm a pH 4,5 e 1,0. (102)

A obtenção da absorvência corrigida das amostras (A) faz-se através de:

$$A = \left(A_{\lambda=520nm_{pH1}} - A_{\lambda=700nm_{pH1}} \right) - \left(A_{\lambda=520nm_{pH4,5}} - A_{\lambda=700nm_{pH4,5}} \right)$$

A concentração total de antocianinas na amostra original determina-se através da seguinte equação:

$$\text{Antocianinas}(mg/L) = \frac{A \times MM \times FD \times 1000}{\epsilon}$$

Sendo que MM corresponde ao peso molecular da cianidina-3-glicosido (MM= 449,2 g/mol), FD corresponde ao fator de diluição utilizado, e ϵ correspondente à absorvência molar da cianidina-3-glicosido ($\epsilon= 26900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

1.1.4. Determinação do Conteúdo Fenólico Total (CFT)

Para a determinação quantitativa dos componentes fenólicos presentes nas amostras foi selecionado o método Folin-Ciocalteu (103). Este método baseia-se na utilização do reagente Folin-Ciocalteu que consiste numa mistura de ácido fosfotungsténio (H₃PW₁₂O₄₀) e ácido fosfomolibdénico (H₃PMo₁₂O₄₀), que reage com substâncias redutoras, nomeadamente compostos fenólicos, formando, em condições alcalinas, óxidos de tungsténio (Mo₈O₂₃) e molibdénio (Mo₈O₂₃) que podem ser detetados

espectrofotometricamente por apresentarem coloração azul, que é proporcional à concentração de polifenóis. (105, 106)

O procedimento utilizado fundamentou-se no trabalho de Singleton e Rossi (103). Para tal foi preparada uma solução de reagente de Folin-Ciocalteu com uma diluição de 1:10 (10 mL de Reagente de Folin-Ciocalteu em 90 mL de água destilada), uma solução de carbonato de sódio a 7,5% (7,5 g de Na_2CO_3 em 100 mL de água destilada). Das soluções preparadas, a cada 100 μL de amostra diluída foi adicionado 500 μL de reagente de Folin-Ciocalteu, e 400 μL de carbonato de sódio. Após agitação, a reação foi incubada durante 30 minutos e, posteriormente, realizada a leitura da absorvência a 765 nm. A diluição das amostras foi realizada de forma a que a absorvência da solução final após incubação seja entre 0,3 e 1,0. Cada leitura, após determinação da diluição das amostras, foi realizada em triplicado.

O conteúdo fenólico das amostras foi determinado através de uma reta de calibração obtida através de sete padrões de ácido gálico com concentrações compreendidas entre 2,5 mg/L e 62,5 mg/L.

1.1.5. Determinação de atividade antioxidante total pelo método ABTS

A atividade antioxidante é uma das principais atividades biológicas atribuídas ao sumo de romã. Um dos métodos passíveis de serem utilizados para a determinação da atividade antioxidante é o método ABTS. (106)

O método ABTS baseia-se na formação do catião radical ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), um cromóforo azul/verde, através da reação entre ABTS e persulfato de potássio, que apresenta uma absorção máxima nos comprimentos de onda 645 nm, 734 nm e 815 nm. A adição de antioxidantes ao catião $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reduz a ABTS, levando a uma descoloração da solução, (**Figura 2.1**) com uma extensão e rapidez dependente da concentração de antioxidante e duração da reação. A determinação da atividade antioxidante passa pela determinação da inibição de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em relação a um padrão, como o *Trolox*[®], preparado nas mesmas condições. (106)

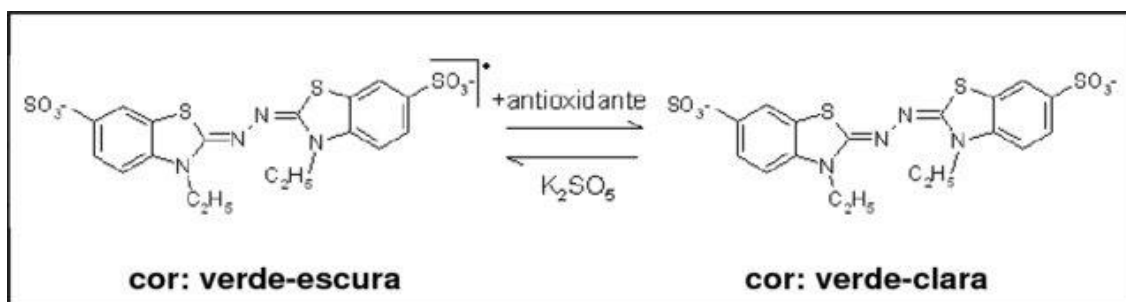


Figura 2.1 - Reações redox com ABTS e o persulfato de potássio (oxidação) e com um antioxidante (redução)

A preparação de ABTS•⁺ foi feita à luz do procedimento descrito por Re (1998), fazendo reagir ABTS a 7 mM (0,0384 g:10 mL de água destilada), com persulfato de potássio a 2,45 mM (0,0066 g:10 mL de água destilada). A mistura foi armazenada num local escuro durante 16 h antes de ser utilizada. Antes da sua utilização, a solução ABTS•⁺ foi diluída com etanol 96° até obter uma absorvência de 0,7 a um comprimento de onda de 734 nm.

Para análise das amostras, foi necessária diluição das mesmas. De cada amostra, realizaram-se 3 diluições diferentes. Após a diluição, 50 µL da amostra diluída foi adicionada a 950 µL da solução de ABTS•⁺; devido à forte coloração da amostra, foi utilizado um branco específico para cada amostra diluída, sendo adicionado 50 µL da amostra diluída a 950 µL de água destilada. Simultaneamente, foi verificada a absorvência da mistura de 50 µL de água destilada adicionada a 950 µL da solução de ABTS•⁺. Foi realizada uma reta de calibração usando como soluções padrão de Trolox[®], um análogo da vitamina E (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), preparadas com o mesmo procedimento ao descrito para as amostras, com concentrações compreendidas entre 0,62 mM e 4,99 mM.

1.1.6. Determinação da atividade anti-inflamatória pela Inibição de monóxido de azoto (NO)

Para determinação da atividade anti-inflamatória recorreu-se ao método de inibição de monóxido de azoto (NO). Isto porque o NO age como mediador de diversos processos patológicos e fisiológicos de sinalização celular, estando envolvida em processos como a homeostasia vascular, como neurotransmissor, e em processos de defesa do organismo como a inflamação. Os processos inflamatórios são resposta fisiológica e imunológica a lesão dos tecidos. No decorrer destes processos são ativadas

células inflamatórias, neutrófilos; eosinófilos, fagócitos e macrófagos, que libertam quantidades aumentadas de prostaglandina E2, citocinas e NO, que são responsáveis por despoletar lesões nos tecidos e na ativação de mais macrófagos. Ambos os excesso e deficiência de NO nos tecidos estão implicados em vários tipos de patologias. O excesso de NO nos tecidos tem sido associado a várias doenças de cariz inflamatório, como artrite reumatoide e de cancro. (107–110)

O método selecionado trata-se de um método de determinação indireta de NO realizada por espectrofotometria através da determinação dos seus produtos de decomposição mais estáveis NO_3^- e NO_2^- . (110, 112) O método apoia-se na reação de Griess que envolve dois passos de diazotização, o primeiro passo envolve um agente nitrosante, proveniente da auto-oxidação de NO que é libertado pelo nitroprussiato de sódio (SNP) de um doador de NO, que em solução aquosa e a pH fisiológico liberta espontaneamente NO, que com o oxigénio produz iões de nitrito (NO_2^-). (112, 113) Este depois reage com o ácido sulfanílico, cujo produto resultante reage com N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED), criando um corante azotado que absorve fortemente a um comprimento de onda de 540nm (**Figura 2.2**). (111)

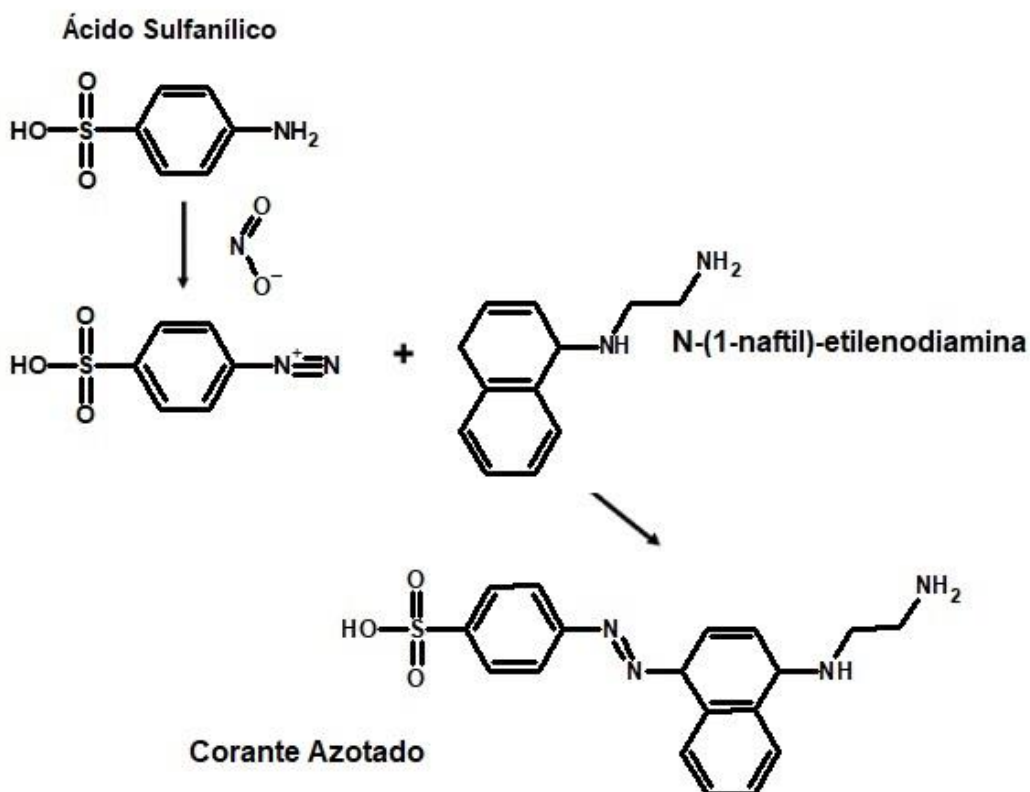


Figura 2.2 - Esquemática da reação de Griess

O procedimento para a determinação da inibição de NO foi realizado em microplacas. Para a sua realização, foram preparadas várias soluções de reagentes:

- A. Solução de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED) 0,1% (15 mg:15 mL de água MiliQ);
- B. Solução de ácido sulfanílico a 1% (150 mg:15 mL de ácido sulfúrico a 5%)
- C. Solução de nitroprussiato de sódio (SNP) a 10 mM (0,149 g:50 mL de PBS, *phosphate buffered saline* pH 7,4)

As amostras foram diluídas e cada diluição (3 no total) foi analisada.

Procedeu-se à mistura 1:1 da solução de SNP e das amostras. Para corrigir a coloração intrínseca das amostras, foram preparadas para cada diluição de cada amostra, soluções para a correção da interferência, misturando-se 1:1 a amostra com PBS. Para cada placa, foram realizados 6 controlos com uma mistura 1:1 de SNP e água MilliQ. Ambas as misturas (amostras, correção e controlo) foram incubadas durante 1 h à luz e com oxigenação. Após incubação, parte da mistura (150 µL) foi transferida para os poços da microplaca. As soluções acima assinaladas como A e B foram misturadas numa proporção de 1:1, formando o reagente de Griess, e adicionada 20 µL a cada um dos poços, e adicionada mais água MiliQ (130 µL) até preencher os poços. As misturas foram lidas a um comprimento de onda de 548 nm usando um leitor de microplacas Tecan Infinite 200.

Para o cálculo da percentagem da inibição de NO é obtida pela seguinte equação:

$$\%_{inibição\ NO} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

Sendo que A_0 corresponde à média da absorvência dos controlos obtidos, e A_1 corresponde à absorvência corrigida da amostra.

1.1.7. Análise Estatística

Na determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson (r), que mede o grau de correlação entre os ensaios, recorreu-se ao software informático Excel (Microsoft Office 365, 2020). Para a elaboração do gráfico de barras empilhado e para o dendrograma obtido para a medida de dissimilaridade, que avalia a diferença entre grupos

numa população, pelo método UPGMA, que faz a diferenciação dos grupos baseando-se nas médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, recorreu-se ao Programa Estatístico PAST 4.02 (113).

Parte 3

1. Resultados e Discussão

1.2. Determinação de Antocianinas monoméricas totais

As concentrações das antocianinas nas amostras recolhidas em 2017 e 2018 encontram-se descritas nos **Quadro 3.1** e **Quadro 3.2**, respetivamente. As concentrações de antocianinas foram calculadas relativamente à quantidade cianidina-3-glicosido por litro (mg cyn3-Gluc /L) e por 100 g de fruto.

Quadro 3.1 - Valores da concentração de antocianinas nas amostras em miligramas de cianidina-3-glicosido por litro (mg cyn3-Gluc/L), e por miligramas de cianidina-3-glicosido por grama de sumo (mg cyn3-Gluc/100 g fruto) \pm desvio-padrão para as amostras de 2017

Amostras	Cor dos arilos	Antocianinas	Antocianinas
		(mg cyn3-Gluc/L)	(mg cyn3-Gluc/100 g fruto)
10580/017	+++	653,3 \pm 3,7	11,535 \pm 0,064
10581/017	+++	402,8 \pm 7,1	7,71 \pm 0,14
10582/017	++	118,12 \pm 0,68	2,217 \pm 0,013
10583/017	++	129,2 \pm 3,2	2,253 \pm 0,056
10584/017	++	195,7 \pm 3,9	3,558 \pm 0,067
10585/017	++	379,1 \pm 8,3	7,08 \pm 0,16
10586/017	+	169,2 \pm 3,7	3,192 \pm 0,070
10587/017	+	50,0 \pm 1,7	0,899 \pm 0,031
10588/017	++	205,9 \pm 1,7	3,966 \pm 0,030
10589/017	++	93,2 \pm 1,1	1,718 \pm 0,020
10590/017	++	148,4 \pm 2,8	2,684 \pm 0,051
Média		206 \pm 173	3,1 \pm 3,0

Os valores apresentados são a média dos triplicados realizados; **Legenda:** + vermelho claro; ++ vermelho; +++ vermelho escuro

A concentrações obtidas encontram-se compreendidas num intervalo de 50,0 \pm 4,2mg cyn3-Gluc /L e 732 \pm 90 mg cyn3-Gluc /L. Os valores descritos por outros estudos realizados com a mesma metodologia revelam valores e intervalos diferentes, como um estudo que obteve valores até 492,9 mg cyn3-Gluc/L no sumo de romãs produzidas na

Turquia, (114) que são valores mais da mesma ordem de grandeza dos obtidos no presente trabalho. Todavia tratando-se de variedades de romãs diferentes, é de esperar que ocorram variações nos valores. Basta reparar que na mesma variedade de romã utilizada no presente trabalho, a variedade detetada. A variedade pode também dever-se à metodologia usada. Por exemplo, outros estudos que recorreram à quantificação das antocianinas por cromatografia líquida de alta “performance” (HPLC) obtiveram concentrações de 9 a 115 mg/L para as romãs da Tunísia (39); noutro estudo realizado com sumo de romãs iranianas o total de antocianinas variou de 15 a 252,2 mg/L (37); ainda outro estudo demonstrou que o sumo das romãs iranianas podem atingir uma concentração de 7760 mg/L (40). Contudo são esperadas variações nas composições de romãs provenientes de diferentes regiões e de diferentes variedades.

Quadro 3.2. - Valores da concentração de antocianinas nas amostras em miligramas de cianidina-3-glicosido por litro (mg cyn3-Gluc/L), e por miligramas de cianidina-3-glicosido por grama de sumo (mg cyn3-Gluc/100 g fruto) \pm desvio-padrão para as amostras de 2018

Amostra	Cor dos arilos	Antocianinas (mg cyn3-Gluc/L)	Antocianinas (mg cyn3-Gluc /100g fruto)
10341/018	+++	732 \pm 10	7,135 \pm 0,097
10342/018	++	557,7 \pm 2,9	4,534 \pm 0,023
10343/018	++	83,5 \pm 3,7	0,801 \pm 0,036
10344/018	+	121,1 \pm 2,3	1,156 \pm 0,022
10345/018	++	286,7 \pm 8,0	9,18 \pm 0,26
10346/018	+	75,5 \pm 1,1	0,808 \pm 0,011
10347/018	+	146,7 \pm 2,6	1,401 \pm 0,025
10348/018	++	76,8 \pm 1,4	0,751 \pm 0,014
10349/018	++	162,7 \pm 2,3	1,542 \pm 0,022
10350/018	+	67,7 \pm 1,4	0,646 \pm 0,013
10351/018	++	143,8 \pm 2,1	1,356 \pm 0,020
10352/018	+	123,2 \pm 2,7	1,172 \pm 0,026
10353/018	++	178,1 \pm 5,7	1,687 \pm 0,054
Média		206 \pm 173	3,1 \pm 3,0

Os valores apresentados são a média dos triplicados realizados; **Legenda:** + vermelho claro; ++ vermelho; +++ vermelho escuro

As diferentes amostras apresentam colorações diferentes de vermelho, tendo sido caracterizadas como vermelhas escuras 3 amostras, 14 amostras como vermelhas e 7 amostras como vermelhas claras. Os valores obtidos são concordantes, pela maior parte, com a coloração das amostras, sendo possível observar na **Figura 3.1.** a tendência crescente da média das concentrações de acordo com a intensidade da cor do sumo. Uma vez que as antocianinas são o pigmento natural responsável pelo vermelho das plantas, neste caso, dos arilos das romãs, é de esperar que quanto mais intensa a coloração dos arilos, maior a concentração de antocianinas. As amostras com uma coloração vermelha mais escura são das amostras (10580/017, 10581/017 e 10341/018), são as que apresentam uma maior concentração de antocianinas ($653,3 \pm 3,7$ mg cyn3-Gluc/L; $402,8 \pm 7,1$ mg cyn3-Gluc/L e 732 ± 10 mg cyn3-Gluc/L, respetivamente), sendo a média das concentrações em antocianinas de 596 ± 172 mg cyn3-Gluc/L. Para os arilos de coloração vermelha a média das concentrações das amostras foi de 197 ± 77 mg cyn3-Gluc/L. Os arilos de coloração mais clara (10587/017, 10346/018, 10350/018) correspondem também às concentrações mais baixas ($50,0 \pm 1,7$ mg cyn3-Gluc/L; $75,5 \pm 1,1$ mg cyn3-Gluc/L e $67,7 \pm 1,4$ mg cyn3-Gluc/L, respetivamente), cuja média das concentrações corresponde a 108 ± 41 mg cyn3-Gluc/L.

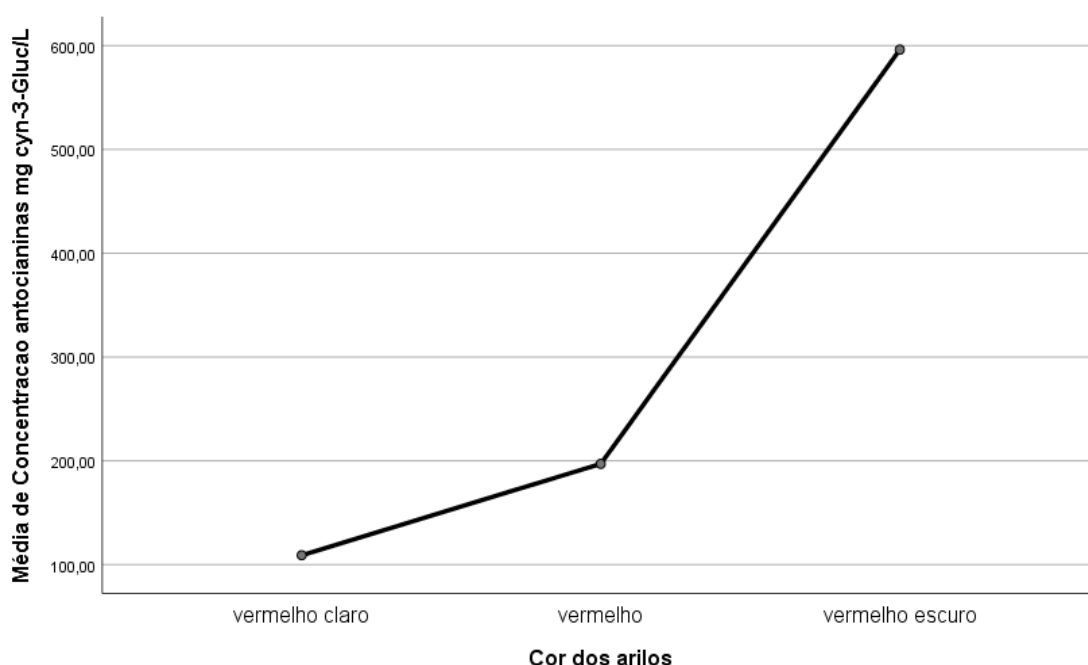


Figura 3.1. - Variação da concentração de antocianinas (mg cyn3-Gluc/L) em relação à coloração dos arilos da romã

Os resultados das antocianinas quando apresentados por peso de amostra, verificou-se que o intervalo variou entre $0,646 \pm 0,013$ e $11,535 \pm 0,064$ mg cyn3-Gluc/100 g fruto fresco. Comparando os resultados obtidos com os descritos na literatura, os valores obtidos neste estudo são concordantes com os obtidos noutros trabalhos. Um exemplo, num estudo de comparação entre o sumo de romã obtido por pressão mecânica e por liquidificadora, em que os valores obtidos de mg de cianidina-3-glicosido por 100 g de peso fresco foram, respetivamente, de $13,33 \pm 1,49$ mg cyn3-Gluc/100 g peso fresco e $8,07 \pm 1,47$ mg cyn3-Gluc/100 g de peso fresco (115), isto é, da mesma grandeza do que aqueles obtidos no presente trabalho.

1.3. Determinação do Conteúdo Fenólico Total (CFT)

As concentrações das amostras encontram-se descritas no **Quadro 3.3.** e **Quadro 3.4.**, que dizem respeito aos anos 2017 e 2018, respetivamente. O conteúdo fenólico foi calculado em mg equivalentes de ácido gálgico por litro (mg GAE/L). Para tal, foi realizada uma reta de calibração usando como padrões soluções de ácido gálgico com concentrações compreendidas entre 6,25 mg/L e 62,5 mg/L. A equação da reta obtida foi $y=(0,0247\pm 0,0037)x-(0,05\pm 0,13)$, para um intervalo de confiança a 95%, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9841. A reta de calibração foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

A concentrações obtidas encontram-se compreendidas num intervalo de $485,8 \pm 0,0$ mg GAE/L e 2023 ± 100 mg GAE/L. Em relação a resultados obtidos noutros estudos utilizando outras variedades de romã, utilizado o mesmo método, obtiveram valores entre 784,4 a 1551,5 mg GAE/L (27), que determinam um intervalo menor de valores, em relação aos valores obtidos no presente trabalho. Porém existe um estudo que reportou valores de conteúdo total fenólico até 9300 mg GAE/L.(40) Todavia como já mencionado, é de esperar variação na composição, neste caso do conteúdo fenólico, de variedades diferentes e de romãs de regiões diferentes.

O conteúdo fenólico por 100 g fruto fresco variou dentro do intervalo de $4,63 \pm 0,00$ e $29,86 \pm 0,77$ mg GAE/100 g de fruto fresco. Estes são valores consideravelmente mais baixos em relação a valores obtidos noutros estudos realizados com outras variedades de romã, como um estudo realizado com romãs produzidas na Geórgia, EUA, os valores obtidos foram entre 151,3 e 173,4 mg GAE/100 g de fruto fresco (116); noutro estudo, já anteriormente referido, comparando sumo de romã obtido por pressão mecânica

e por liquidificadora, obteve uma quantificação do conteúdo fenólico variando 28,98 e 84,94 mg GAE/100 g de fruto fresco e 27,25 e 77,06 mg GAE/100 g de fruto fresco, respetivamente (115).

Quadro 3.3. - Valores da concentração de compostos fenólicos nas amostras em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE/L), e por miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de sumo (mg GAE/100 g fruto) \pm desvio-padrão, assim como a razão de antocianinas em fenóis totais para as amostras de 2017

Amostra	Fenóis (mg GAE/L)	Fenóis (mg GAE/100 g fruto)	Razão antocianinas/fenóis
10580/017	1460 \pm 14	25,78 \pm 0,25	0,45
10581/017	1195 \pm 88	22,9 \pm 1,7	0,34
10582/017	919 \pm 75	16,47 \pm 0,57	0,13
10583/017	929 \pm 16	16,21 \pm 0,27	0,14
10584/017	827,1 \pm 1,8	15,039 \pm 0,032	0,24
10585/017	1056 \pm 44	19,72 \pm 0,82	0,36
10586/017	720 \pm 41	13,58 \pm 0,76	0,24
10587/017	609 \pm 17	10,95 \pm 0,30	0,08
10588/017	786 \pm 74	14,1 \pm 1,4	0,26
10589/017	844 \pm 39	15,55 \pm 0,72	0,11
10590/017	1103 \pm 10	19,95 \pm 0,19	0,13
Média	956 \pm 334	13,7 \pm 6,2	0,21

Comparando com a quantificação de antocianinas, as amostras com uma maior quantidade total de antocianinas, corresponde também, uma maior quantidade de compostos fenólicos. Contudo verificou-se variações na razão entre as antocianinas monoméricas e os compostos fenólicos totais, sendo que se obtiveram razões vareando de 0,05 a 0,52. Revelando que algumas das amostras apresentam proporções muito diferentes de antocianinas dentro dos seus componentes fenólicos, como alguns metabolitos ativos da romã já descritos, como ácidos fenólicos, e destacando-se os taninos hidrolisáveis que junto com as antocianinas são os compostos fenólicos mais abundantes no sumo de romã.(41)

Quadro 3.4. - Valores da concentração de compostos fenólicos nas amostras em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE/L), e por miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de sumo (mg GAE/100 g fruto) \pm desvio-padrão, assim como a razão de antocianinas em fenóis totais para as amostras de 2018

Amostra	Fenóis (mg GAE/L)	Fenóis (mg GAE/100 g fruto)	Razão antocianinas/fenóis
10341/018	2023 \pm 100	19,70 \pm 0,98	0,36
10342/018	1079 \pm 14	8,77 \pm 0,11	0,52
10343/018	1059 \pm 90	10,17 \pm 0,87	0,08
10344/018	755 \pm 46	7,21 \pm 0,44	0,16
10345/018	933 \pm 24	29,86 \pm 0,77	0,31
10346/018	597 \pm 22	6,39 \pm 0,23	0,13
10347/018	730 \pm 33	6,98 \pm 0,32	0,20
10348/018	1466 \pm 66	14,33 \pm 0,65	0,05
10349/018	808 \pm 14	7,66 \pm 0,14	0,20
10350/018	485,8 \pm 0,0	4,63 \pm 0,00	0,14
10351/018	872,1 \pm 3,5	8,227 \pm 0,033	0,16
10352/018	1197 \pm 75	11,38 \pm 0,71	0,10
10353/018	1119 \pm 33	10,59 \pm 0,31	0,16
Média	956 \pm 334	13,7 \pm 6,2	0,21

Os valores apresentados são a média dos triplicados realizados

1.4. Determinação de atividade antioxidante total pelo método ABTS

Os resultados de atividade antioxidante obtidos encontram-se representados nos **Quadros. 3.5 e 3.6**. A atividade antioxidante foi calculada em miligramas equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por litro (mg TEAC/L). Para tal, foi realizada uma reta de calibração usando com as soluções padrão de Trolox com concentrações compreendidas entre 0,62 mM e 4,99 mM. A equação da reta obtida foi $y=(20,4\pm 2,4)x-(3,4\pm 6,5)$, para um intervalo de confiança a 95%, com um R^2 de 0,991. A reta de calibração foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Os valores obtidos para a atividade antioxidante variaram entre $50,7 \pm 3,2$ e 350 ± 47 mmol TEAC/L de sumo de romã, tendo uma média de 103 ± 72 mmol TEAC/L; sendo que relativamente à atividade antioxidante por peso de fruto variou de $0,494 \pm 0,035$ a

6,70 ± 0,89 mmol TEAC/100 g de fruto, com uma média de 1,5 ± 1,3 mmol TEAC/100 g de fruto. As determinações das atividades antioxidantes das amostras demonstram uma grande variabilidade, havendo amostras demonstrando uma atividade antioxidante consideravelmente superior às restantes amostras, nomeadamente as amostras 10581/017, 10341/018 e 10580/017, com atividades de 350 ± 47 mmol TEAC/L, 318 ± 33 mmol TEAC/L e 187 ± 23 mmol TEAC/L, respetivamente. As atividades antioxidantes observadas coincidem com algumas das amostras que demonstraram uma concentração total de compostos fenólicos e antocianinas mais elevados.

Quadro 3.5 - Quantificação da atividade antioxidante em milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por litro de sumo (mmol TEAC/L), por milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por 100 grama de sumo (mmol TEAC/100 g fruto) e IC₅₀ em miligramas por mililitro (mg/mL) ± desvio-padrão para as amostras de 2017

Amostra	mmol TEAC/L	mmol TEAC/100 g	IC₅₀ (mg/mL)
10580/017	187 ± 23	3,30 ± 0,41	0,4309 ± 0,0065
10581/017	350 ± 47	6,70 ± 0,89	0,2225 ± 0,0055
10582/017	59 ± 18	1,10 ± 0,33	0,9964 ± 0,0028
10583/017	84,9 ± 4,2	1,481 ± 0,072	0,917 ± 0,019
10584/017	88 ± 11	1,60 ± 0,20	0,887 ± 0,051
10585/017	82,0 ± 4,4	1,531 ± 0,081	0,880 ± 0,011
10586/017	67,8 ± 4,7	1,278 ± 0,088	1,060 ± 0,087*
10587/017	82 ± 15	1,47 ± 0,26	0,952 ± 0,012
10588/017	79,7 ± 3,9	1,431 ± 0,069	0,914 ± 0,023
10589/017	72 ± 15	1,32 ± 0,28	1,1575 ± 0,0015
10590/017	94,7 ± 2,8	1,713 ± 0,050	0,7745 ± 0,0078
Média	103 ± 72	1,5 ± 1,3	0,85 ± 0,27

* - Atividade máxima obtida para 48,8%

Em outros trabalhos realizados usando o mesmo método, as atividades determinadas foram, de uma forma geral, inferiores às demonstradas no presente estudo, sendo que a atividade reportada mais elevada no sumo de romã, pelo método ABTS foi 36,3mmol TEAC/L de sumo. (117) No estudo de Alcaraz-Mármol *et al* (6), o estudo que procurou caracterizar várias variedades de romãs espanholas documentou valores com

um intervalo de atividade antioxidante por peso de fruto fresco inferiores, variando de $1,55 \pm 0,29$ mmol TEAC/kg e $4,24 \pm 0,73$ mmol TEAC/kg ($0,155 \pm 0,029$ mmol TEAC/100 g a $0,424 \pm 0,073$ mmol TEAC/100 g).

Quadro 3.6 - Quantificação da atividade antioxidante em milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por litro de sumo (mmol TEAC/L), por milimoles equivalentes de atividade antioxidante de Trolox por 100 grama de sumo (mmol TEAC/100 g fruto) e IC₅₀ em miligramas por mililitro (mg/mL) \pm desvio-padrão para as amostras de 2018

Amostra	mmol TEAC/L	mmol TEAC/100 g	IC ₅₀ (mg/mL)
10341/018	318 \pm 33	3,10 \pm 0,33	0,2385 \pm 0,0033
10342/018	102,3 \pm 5,9	0,832 \pm 0,047	0,815 \pm 0,018
10343/018	98 \pm 13	0,94 \pm 0,14	0,776 \pm 0,017
10344/018	80,2 \pm 4,6	0,765 \pm 0,044	0,8799 \pm 0,0063
10345/018	103,3 \pm 9,5	3,31 \pm 0,31	0,637 \pm 0,013
10346/018	59,3 \pm 7,9	0,635 \pm 0,085	1,078 \pm 0,012
10347/018	89 \pm 27	0,85 \pm 0,25	1,07054 \pm 0,00059
10348/018	50,7 \pm 3,2	0,494 \pm 0,035	1,279 \pm 0,025*
10349/018	81,7 \pm 7,8	0,775 \pm 0,074	0,914 \pm 0,031
10350/018	54,6 \pm 2,1	0,521 \pm 0,020	1,279 \pm 0,040
10351/018	90,5 \pm 7,2	0,853 \pm 0,068	0,738 \pm 0,019
10352/018	51 \pm 16	0,49 \pm 0,15	1,032 \pm 0,025
10353/018	97 \pm 16	0,92 \pm 0,15	0,787 \pm 0,024
Média	103 \pm 72	1,5 \pm 1,3	0,85 \pm 0,27

* - Atividade máxima obtida de 48,9%

Para o mesmo método foi calculado o valor de IC₅₀, que representa a concentração de extrato necessária para reduzir 50% do radical livre de ABTS inicial. Os valores obtidos variaram entre $0,2225 \pm 0,0055$ mg/mL e $1,279 \pm 0,040$ mg/mL

Na literatura, El Kar *et al.* (118) com o objetivo de caracterizar a atividade antioxidante, usando o mesmo método, do sumo de romãs reportaram que o intervalo de valores de IC₅₀ variou entre 525 ± 19 mg/L a 3760 ± 101 mg/L ($0,525 \pm 0,19$ mg/mL a $3,76 \pm 1,01$ mg/mL), demonstrando que as amostras de sumo de romã testadas neste estudo têm uma atividade antioxidante inferior às amostras analisadas no presente estudo.

O valor de IC₅₀ das amostras, quando comparado com a o IC₅₀ calculado para o Trolox, pode-se verificar que as amostras apresentam uma atividade antioxidante mais

acentuada, revelando em média um valor de IC_{50} de $0,85 \pm 0,27$ mg/L, enquanto que o IC_{50} calculado para o Trolox foi de 2,62 mg/L. Ou seja, para qualquer uma das amostras analisadas, é necessária uma quantidade inferior das mesmas, para exercer uma inibição semelhante ao Trolox.

Deste modo, é possível verificar que as amostras de sumo de romã “*Assaria*” revelam, de uma forma geral, uma atividade antioxidante mais expressiva do que as variedades de romã cujo sumo tenha sido testado, pelo menos até ao presente estudo.

1.5. Determinação da atividade anti-inflamatória pela inibição de monóxido de azoto (NO)

Para a análise da inibição de NO, 15 das amostras foram analisadas com uma diluição de 1:2. As percentagens de inibição de NO obtidas para cada uma das amostras encontra-se descrita no **Quadro 3.7** e **Quadro 3.8**.

Nas amostras analisadas com o método utilizado conseguiu-se observar, para uma diluição de 1:2 das amostras compreendidas entre $69,2 \pm 2,4\%$ e $42,9 \pm 2,8\%$, com uma média de $56,7 \pm 8,5\%$. Desta forma, podemos verificar que os resultados obtidos demonstram que as amostras testadas apresentam capacidade de inibir NO, e assim, por conseguinte demonstram atividade anti-inflamatória.

Estes resultados vêm corroborar as conclusões obtidas noutros estudos com o mesmo intuito (108, 120–122), embora nenhum estudo, até à data, não se tenha conhecimento de que tenha sido utilizando este método para a determinação da atividade anti-inflamatória para romãs.

Quadro 3.7 - Valores de percentagem de inibição de monóxido de azoto \pm desvio-padrão para a diluição de 1:2, para as amostras da colheita de 2017

Amostras	% inibição de NO
10580/017	N/D
10581/017	59,2 \pm 2,4
10582/017	69,2 \pm 2,4
10583/017	62,6 \pm 3,1
10584/017	65,7 \pm 2,2
10585/017	66,1 \pm 1,6
10586/017	49,7 \pm 3,3
10587/017	48,1 \pm 1,5
10588/017	N/D
10589/017	47,8 \pm 2,6
10590/017	N/D

Legenda: N/D – Não determinado;

Quadro 3.8 - Valores de percentagem de inibição de monóxido de azoto \pm desvio-padrão para a diluição de 1:2, para as amostras da colheita de 2018

Amostras	% inibição de NO
10341/018	N/D
10342/018	61,1 \pm 1,7
10343/018	56,1 \pm 2,3
10344/018	56,8 \pm 1,4
10345/018	N/D
10346/018	N/D
10347/018	53,1 \pm 1,6
10348/018	N/D
10349/018	61,75 \pm 0,62
10350/018	N/D
10351/018	N/D
10352/018	45,73 \pm 0,51
10353/018	42,9 \pm 2,8

Legenda: N/D – Não determinado

1.6. Breve análise estatística

Um breve tratamento estatístico foi efetuado e apenas considerando o teor em fenóis totais, o teor em antocianinas monoméricas e a atividade antioxidante, determinada pelo método da capacidade de captar os radicais livres ABTS. A capacidade de captar os radicais monóxido de azoto não foi tido em consideração neste breve tratamento estatístico, porque nem todas as amostras foram analisadas.

A partir da **Figura 3.2** que é um dendrograma e para uma distância Euclidiana de aproximadamente 7, poder-se-á considerar 3 grupos principais:

- Grupo I: Amostras 1, 2, 6, 11, 12, 16 (amostras com níveis mais elevados de fenóis, antocianinas e maior capacidade de captar os radicais livres ABTS);
- Grupo II: Amostras 8, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24 (amostras com os níveis mais baixos de fenóis, antocianinas e menor atividade antioxidante);
- Grupo III: Amostras com níveis intermédios de fenóis, antocianinas e atividade antioxidante.

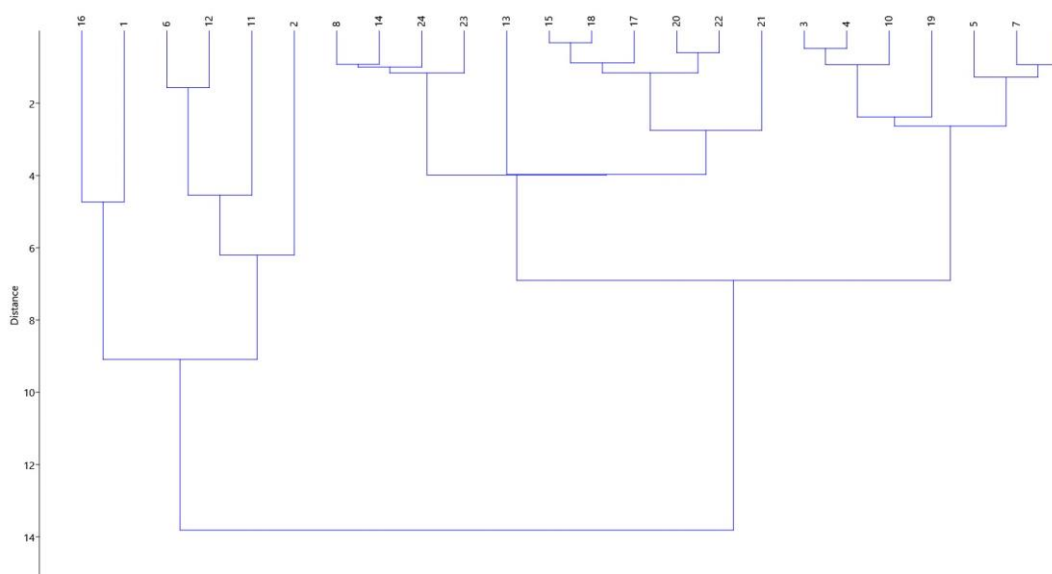


Figura 3.2 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), a partir das medidas de dissimilaridade entre 24 amostras de sumo de romã, baseado na distância Euclidiana.
Legenda: 1: 10580; 2: 10581;

Estes grupos podem também ser observados na **Figura 3.3**, em que o gráfico de barras empilhadas mostra que as amostras 1, 2, 6, 11, 12, 16 têm as barras mais altas,

portanto, maior concentração de fenóis totais, antocianinas monoméricas e maior atividade antioxidante, ao invés das amostras 8, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23 e 24.

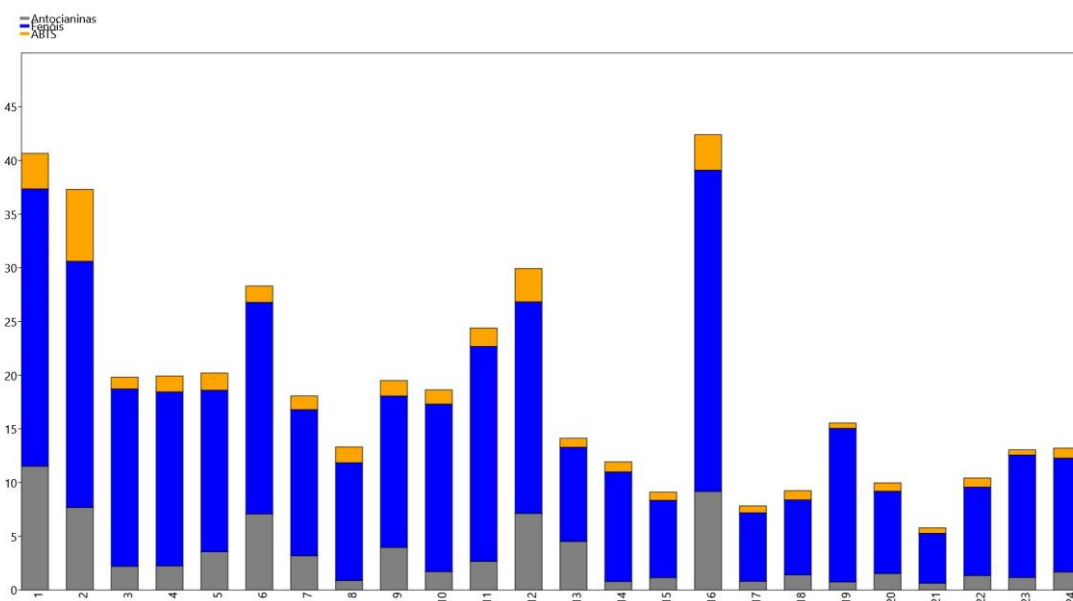


Figura 3.3 - Gráfico de barras empilhadas em valores absolutos de fenóis, antocianinas e capacidade para captar os radicais ABTS.

Legenda: 1: 10580; 2: 10581;

Estes dados permitem concluir que na generalidade, as amostras do ano 2018 são menos ricas em metabolitos secundários (fenóis e antocianinas) e em atividade antioxidante do que as amostras do ano 2017.

O coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre a atividade antioxidante e o teor em antocianinas foi de $r = 0.75$, maior do que o verificado entre a atividade antioxidante e o teor em fenóis ($r = 0.40$), pelo que a capacidade de captar radicais ABTS deve-se particularmente ao teor em antocianinas do que ao teor em fenóis totais presentes nas amostras.

2. Conclusão

O presente trabalho permitiu concluir que há variabilidade significativa no teor em fenóis totais e antocianinas monoméricas totais nas amostras de sumo de romã da variedade 'Assaria' predominante no Algarve. Esta variabilidade repercutiu-se na capacidade para captar os radicais ABTS e NO. No trabalho foi possível encontrar 3 grupos principais no que diz respeito ao teor dos metabolitos secundários e da capacidade para captar os radicais ABTS. Verificou-se que quatro das 11 amostras de 2017 tinham

os valores mais altos de fenóis e antocianinas e maior atividade antioxidante, ao passo que só duas amostras, entre 13, colhidas em 2018 estavam neste grupo. A maior parte das amostras de 2018 (dez) tinham os valores mais baixos daqueles metabolitos e menor atividade, constituindo um segundo grupo. Estes dados permitem concluir que existe variabilidade significativa nos teores dos metabolitos secundários e na atividade antioxidante, de ano para ano. O presente trabalho permitiu também concluir que a capacidade para captar os radicais livres ABTS se deve particularmente ao teor de antocianinas totais e não tanto ao teor dos fenóis totais.

Parte 4

1. Referências Bibliográficas

1. Global Industry Analysts I. Herbal Supplements and Remedies (MCP-1081) - Global Industry Analysts, Inc. [Internet]. 2019 [citado 18 de Julho de 2019]. Disponível em: <https://www.strategyr.com/market-report-herbal-supplements-and-remedies-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>
2. Roy A, Chaguturu R. Holistic Drug Targeting. Innovative Approaches in Drug Discovery: Ethnopharmacology, Systems Biology and Holistic Targeting. Elsevier Inc.; 2016. 65–88 p.
3. Chaguturu R, Patwardhan B. Drug Discovery Impasse. Em: Innovative Approaches in Drug Discovery. Elsevier; 2017. p. 1–22.
4. Wu S, Tian L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). Vol. 22, Molecules. MDPI AG; 2017.
5. Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Em: Deciduous Fruit Trees Sciences. 2009. p. 127–91.
6. Alcaraz-Mármol F, Nuncio-Jáuregui N, García-Sánchez F, Martínez-Nicolás JJ, Hernández F. Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 17 de Maio de 2017;219:152–60.
7. Neves A, Marreiros A. *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*. A Romã Fruto do passado, fruto do futuro. 2018;18–21.
8. Portugal A dos JA de. *Manual de boas práticas para culturas emergentes: A cultura da romã*. 2017.
9. Neves A. A romã: novas formas de consumo e comercialização [Internet]. *Agrotec - Revista técnico-científica agrícola*. 2019 [citado 23 de Setembro de 2019]. Disponível em: <http://www.agrotec.pt/noticias/a-roma-novas-formas-de-consumo-e-comercializacao/>
10. Integrated Taxonomic Information System (ITIS) [Internet]. [citado 11 de Agosto de 2019]. Disponível em: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27278#null

11. Erkan M, Kader AA. Pomegranate (*Punica granatum L.*). Em: Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Elsevier Ltd; 2011.
12. Stover E, Mercure EW. The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. *HortScience*. 2007;42(5):1088–92.
13. Bar-Ya'akov I, Tian L, Amir R, Holland D. Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. Vol. 10, *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.; 2019.
14. Romanelli RC. A propósito da etimologia do port. romã. *Ensaio Lit e Filol*. 1978;1:101.
15. Silva MLB. A origem da palavra romã: Uma pequena contribuição ao estudo da herança árabe na língua portuguesa. *Fikr*. :78–89.
16. Horowitz S. The Power of the Pomegranate: Biblical fruit with medicinal properties. *Alternative Complement Ther*. 2006;12(3):121–6.
17. P.Alock J. Food in the ancient world. Greenwood Press. Londres: Greenwood; 2006. 308 p.
18. Arseculeratne SN, Gunatilaka AAL, Panabokke RG. Studies on medicinal plants of Sri Lanka. Part 14: toxicity of some traditional medicinal herbs. *J Ethnopharmacol*. 1985;13(3):323–35.
19. Duke JA. *The Green Pharmacy*. Rodale Press. 1997. 168 p.
20. Singh YN. Traditional medicine in Fiji: Some herbal folk cures used by Fiji Indians. *J Ethnopharmacol*. 1986;15(1):57–88.
21. Khare CP. *Indian Medicinal Plants*. Springer. 2007.
22. Jain SP, Puri HS. Ethnomedicinal plants of Jaunsar-Bawar Hills, Uttar Pradesh, India. *J Ethnopharmacol*. 1984;12(2):213–22.
23. Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. Vol. 2014, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
24. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. Novembro de 2010;9(6):635–54.
25. Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ, Selma M V., Azorín-Ortuño M, Toti S, et al. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem*. Agosto de 2010;21(8):717–25.

26. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int J Food Sci Technol*. 2012;47(10):2023–44.
27. Gözlekçi S, Saraçoğlu O, Onursal E, Ozgen M. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacogn Mag*. Abril de 2011;7(26):161–4.
28. Schulman RN, Heber D. Pomegranates: Ancient roots to modern medicine. Em: *Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. 2006. p. 1–244.
29. Aishah B, Nursabrina M, Noriham A, Norizzah AR, Mohamad Shahrimi H. Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*, *Melastoma malabathricum* and *Ipomoea batatas* and its color properties. Vol. 20, *International Food Research Journal*. 2013.
30. Burton-Freeman B, Sandhu A, Edirisinghe I. Anthocyanins. Em: *Nutraceuticals*. Elsevier; 2016. p. 489–500.
31. Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki; 2005.
32. Andersen ØM, Jordheim M. The Anthocyanins. Em: Andersen ØM, Markham KR, editores. *Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & F. CRC Press; 2006. p. 471–537.
33. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*. Janeiro de 2017;61(1):1361779.
34. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*. 2002;50(1):166–71.
35. Du CT, Wang PL, Francis FJ. Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. Vol. 40, *Journal of Food Science*. Massachusetts; 1975.
36. Miguel G, Fontes C, Antunes D, Neves A, Martins D. Anthocyanin Concentration of «Assaria» Pomegranate Fruits During Different Cold Storage Conditions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004.
37. Alighourchi H, Barzegar M, Abbasi S. Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *Eur Food Res Technol*. 2008;227(3):881–7.
38. Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Trainin T, Harel-Beja R, Bar-Yaakov I, Borocho-

- Neori H, et al. A «white» anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX; ANS) gene. *PLoS One*. 2015;10(11):1–21.
39. Hasnaoui N, Jbir R, Mars M, Trifi M, Kamal-Eldin A, Melgarejo P, et al. Organic acids, sugars, and anthocyanins contents in juices of Tunisian pomegranate fruits. *Int J Food Prop*. 2011;14(4):741–57.
 40. Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem*. 2009;115(4):1274–8.
 41. Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem*. 2007;55(23):9559–70.
 42. Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem*. 2002;50(1):81–6.
 43. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem*. 14 de Agosto de 2002;50(17):4791–5.
 44. Zhang LH, Li LL, Li YX, Zhang YH. In vitro antioxidant activities of fruits and leaves of pomegranate. *Em: Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science; 2008. p. 31–4.
 45. Bagri P, Ali M, Aeri V, Sultana S, Bhowmik M. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Punica Granatum* linn. *Int J Drug Dev Res*. 2010;2(4):698–702.
 46. Mo J, Panichayupakaranant P, Kaewnopparat N, Nitiruangjaras A, Reanmongkol W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid in vivo. *J Ethnopharmacol*. 30 de Julho de 2013;148(3):901–8.
 47. Ahmed S, Wang N, Hafeez B Bin, Cheruvu VK, Haqqi TM. *Punica granatum* L. Extract Inhibits IL-1 β -Induced Expression of Matrix Metalloproteinases by Inhibiting the Activation of MAP Kinases and NF- κ B in Human Chondrocytes In Vitro. *J Nutr*. 1 de Setembro de 2005;135(9):2096–102.

48. Mo J, Panichayupakaranant P, Kaewnopparat N, Nitiruangjaras A, Reanmongkol W. Wound healing activities of standardized pomegranate rind extract and its major antioxidant ellagic acid in rat dermal wounds. *J Nat Med.* 2014;68(2):377–86.
49. González-Trujano ME, Pellicer F, Mena P, Moreno DA, García-Viguera C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. *Int J Food Sci Nutr.* 1 de Junho de 2015;66(4):395–9.
50. Labib RM, El-Ahmady SH. Antinociceptive, anti-gastric ulcerogenic and anti-inflammatory activities of standardized egyptian pomegranate peel extract. *J Appl Pharm Sci.* 2015;5(1):048–51.
51. El-Beih NM, Ramadan G, El-Husseiny EA, Hussein AM. Effects of pomegranate aril juice and its punicalagin on some key regulators of insulin resistance and oxidative liver injury in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *Mol Biol Rep.* 2019;
52. Toklu HZ, Sehirli O, Sener G, Dumlu MU, Ercan F, Gedik N, et al. Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. *J Pharm Pharmacol.* Setembro de 2007;59(9):1287–95.
53. El-Habibi ESM. Renoprotective effects of *Punica granatum* (Pomegranate) against adenine-induced chronic renal failure in male rats. *Life Sci J.* 2013;10(4):2059–69.
54. El-Daly AA. Pomegranate peel Extract Protects Cadmium-induced nephrotoxicity in albino mice. Vol. 2, *Journal of Bioscience and Applied Research.* 2016.
55. Sadeghi F, Nematbakhsh M, Noori-Diziche A, Eshraghi-Jazi F, Talebi A, Nasri H, et al. Protective effect of pomegranate flower extract against gentamicin-induced renal toxicity in male rats. *J Ren Inj Prev.* 2015;4(2):45–50.
56. Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM, Abdel Moneim AE. Protective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on testes against carbon tetrachloride intoxication in rats. *BMC Complement Altern Med.* 22 de Maio de 2014;14(164).
57. Leiva KP, Rubio J, Peralta F, Gonzales GF. Effect of *Punica granatum* (pomegranate) on sperm production in male rats treated with lead acetate. *Toxicol Mech Methods.* Julho de 2011;21(6):495–502.

58. Türk G, Sönmez M, Aydın M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr.* Abril de 2008;27(2):289–96.
59. Azadzoï KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: Prophylactic role of antioxidants. *J Urol.* 2005;174(1):386–93.
60. Barman S, Das S. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic extract of leaves of *Punica granatum* in alloxan-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus albino rats. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(2):219.
61. Salwe KJ, Sachdev DO, Bahurupi Y, Kumarappan M. Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *J Nat Sci Biol Med.* 1 de Janeiro de 2015;6(1):56–62.
62. Radhika S, Smila KH, Muthezhilan R. Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Punica granatum* linn on alloxan induced rats. *World J Med Sci.* 2011;6(4):178–82.
63. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Vol. 12, *Clinical Microbiology Reviews.* 1999. p. 564–82.
64. Devatkal SK, Jaiswal P, Jha SN, Bharadwaj R, Viswas KN. Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against *Pseudomonas stutzeri* isolated from poultry meat. *J Food Sci Technol.* 2013;50(3):555–60.
65. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol.* 15 de Setembro de 2009;134(3):244–8.
66. Nuamsetti T, Dechayuenyong P, Tantipaibulvut S. Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *ScienceAsia.* Setembro de 2012;38(3):319–22.
67. Sadeghian A, Ghorbani A, Mohamadi-Nejad A, Rakhshandeh H. Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of pomegranate fruit skin. Vol. 1, *Avicenna Journal of Phytomedicine* Received. 2011.
68. Dahham SS, Naiman Ali M, Tabassum H, Khan M. Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *J Agric Environ Sci.* 2010;9(3):273–81.
69. Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and

- structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Brazilian J Microbiol.* Julho de 2013;44(3):839–48.
70. Zhang J, Zhan B, Yao X, Gao Y, Shong J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus in vitro. *China J Chinese Mater medica.* Setembro de 1995;20(9):556–8, 576, inside backcover.
 71. Sundararajan A, Ganapathy R, Huan L, Dunlap JR, Webby RJ, Kotwal GJ, et al. Influenza virus variation in susceptibility to inactivation by pomegranate polyphenols is determined by envelope glycoproteins. *Antiviral Res.* 2010;88:1.
 72. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73(5):461–7.
 73. Mubaraki MA, Hafiz TA, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Beneficial effect of *Punica granatum* peel extract on murine malaria-induced spleen injury. *BMC Complement Altern Med.* 16 de Julho de 2016;16(1).
 74. Dell'Agli M, Galli G V., Bulgari M, Basilico N, Romeo S, Bhattacharya D, 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. *Malar J.* 2010;9(1).
 75. Dai Z, Nair V, Khan M, Ciolino HP. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of MMTV-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells in vitro. *Oncol Rep.* 2 de Setembro de 2010;
 76. Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *J Med Food.* 1 de Dezembro de 2011;14(12):1638–46.
 77. Hong MY, Seeram NP, Heber D. Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J Nutr Biochem.* Dezembro de 2008;19(12):848–55.
 78. Lei F, Zhang XN, Wang W, Xing DM, Xie WD, Su H, et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes.* Junho de 2007;31(6):1023–9.
 79. Mohan M, Waghulde H, Kasture S. Effect of pomegranate juice on angiotensin II-induced hypertension in diabetic wistar rats. *Phyther Res.* 2010;24:196–203.
 80. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al.

- Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress atherogenic modifications to LDL and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1062–76.
81. de Nigris F, Williams-Ignarro S, Botti C, Sica V, Ignarro LJ, Napoli C. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide - Biol Chem.* Novembro de 2006;15(3):259–63.
 82. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, 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. *Clin Nutr.* 2004;23(3):423–33.
 83. Subash S, Essa M, Al-Asmi A, Al-Adawi S, Vaishnav R, Braidy N, et al. Pomegranate from Oman alleviates the brain oxidative damage in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Tradit Complement Med.* 1 de Outubro de 2014;4(4):232–8.
 84. Qnais EY, Elokda AS, Ghalyun YYA, Abdulla FA. Antidiarrheal activity of the aqueous extract of *Punica granatum* (pomegranate) peels. *Pharm Biol.* Novembro de 2007;45(9):715–20.
 85. Aslam MN, Lansky EP, Varani J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol.* 20 de Fevereiro de 2006;103(3):311–8.
 86. Lisbeth A, Noratto G, Hingorani L, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *J Agric Food Chem.* 24 de Setembro de 2008;56(18):8434–41.
 87. Afaq F, Zaid MA, Khan N, Dreher M, Mukhtar H. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Exp Dermatol.* 2009;18(6):553–61.
 88. Menezes SMS, Cordeiro LN, Viana GSB. *Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque. *J Herb Pharmacother.* 2006;6(2):79–92.
 89. Kote S, Kote S, Nagesh L. Effect of pomegranate juice on dental plaque microorganisms (streptococci and lactobacilli). *Anc Sci Life.* 2011;31(2):49–51.

90. Disilvestro RA, Disilvestro DJ, Disilvestro DJ. Pomegranate Extract Mouth Rinsing Effects on Saliva Measures Relevant to Gingivitis Risk. *Phytother Res.* 2009;23:1123–7.
91. Deepak JC, Samuel SR. Effectiveness of Pomegranate Mouthrinse in Reducing Bacterial Plaque, Gingival Inflammation and Total Salivary Proteins over a Period of 90 Days: A Double-Blind Randomized Trial. *J Int Acad Periodontol.* 2008;20(3):110–4.
92. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000;48(10):4581–9.
93. Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* Agosto de 2008;46(8):2728–35.
94. Paller CJ, Ye X, Wozniak PJ, Gillespie BK, Sieber PR, Greengold RH, et al. A randomized phase II study of pomegranate extract for men with rising PSA following initial therapy for localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013;16(1):50–5.
95. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Vol. 158, *Atherosclerosis.* 2001.
96. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* 1 de Agosto de 2006;187(2):363–71.
97. Hidaka M, Okumura M, Fujita K, Ogikubo T, Yamasaki K, Iwakiri T, et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 3A (CYP3A) and Carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drgu Metab Dispos.* 2005;33(5):644–8.
98. Ibrahim ZS, Ahmed MM, El-Shazly SA, Alkafafy ME. Effects of Pomegranate on drug metabolising cytochrome P450 enzymes expressions in rats. *Glob Vet.* 2016;5(16):481–90.
99. Sorokin A V., Duncan B, Panetta R, Thompson PD. Rhabdomyolysis Associated With Pomegranate Juice Consumption. *Am J Cardiol.* 1 de Setembro de 2006;98(5):705–6.
100. Khuu T, Hickey A, Deng MC. Pomegranate-containing products and tacrolimus: A potential interaction. *J Hear Lung Transplant.* 2013;32(2):272–4.

101. Mónica Giusti M, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Curr Protoc Food Anal Chem.* 2001;0(1):F1.2.1-F1.2.13.
102. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int.* 2005;88(5):1269–78.
103. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144–58.
104. Lamuela-Raventós RM. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Meas Antioxid Act Capacit Recent Trends Appl.* 2017;107–15.
105. Bancuta OR, Chilian A, Bancuta I, Ion RM, Setnescu R, Setnescu T, et al. Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Rom J Phys.* 2016;61(7–8):1255–64.
106. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231–7.
107. Rao U. M, Ahmad BA, Mohd KS. In Vitro nitric oxide scavenging and anti inflammatory activities of different solvent extracts of various parts of *Musa paradisiaca*. *Malaysian J Anal Sci.* 2016;20(5):1191–202.
108. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *Fed Eur Microbiol Soc.* 2007;51:443–52.
109. Low SY. Application of pharmaceuticals to nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26:97–138.
110. Bruckdorfer R. Nitric oxide in physiology and pathology. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2 SPEC. ISS.):1–2.
111. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(5):645–57.
112. Boora F, Chirisa E, Mukanganyama S. Evaluation of Nitrite Radical Scavenging Properties of Selected Zimbabwean Plant Extracts and Their Phytoconstituents. *J Food Process.* 2014;2014.
113. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001;4(1):1–9.
114. Orak HH. Evaluation of antioxidant activity, colour and some nutritional

- characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and its sour concentrate processed by conventional evaporation. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60(1):1–11.
115. Rajasekar D, Akoh CC, Martino KG, MacLean DD. Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia. *Food Chem*. 2012;133(4):1383–93.
 116. Garima P, Akoh CC. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. *J Agric Food Chem*. 2009;57(20):9427–36.
 117. Wan HC, Sultana B, Nigam PS, Owusu-Apenten R. Pomegranate iron (III) reducing antioxidant capacity (iRAC) compared to ABTS radical quenching. *Beverages*. 2018;4(58).
 118. El Kar C, Ferchichi A, Attia F, Bouajila J. Pomegranate (*Punica granatum*) juices: Chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. *J Food Sci*. Agosto de 2011;76(6).
 119. Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. Consumption of hydrolyzable tannins rich pomegranate extract (POMx) suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition*. 2008;24(7–8):733–43.
 120. Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem*. 2010;118(2):315–22.
 121. Panichayupakaranant P, Tewtrakul S, Yuenyongsawad S. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. *Food Chem*. 2010;123(2):400–3.